

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

47.

Diagnóstico microbiológico de arbovirosis y robovirosis emergentes

2 0 1 3

Coordinadora: Ana Isabel Negredo Antón

**Autores: Leticia Franco Narvárez
M^a Isabel Gegúndez Cámara
Jose M^a Navarro Mari
Ana Isabel Negredo Antón
Fernando de Ory Manchón
M^a Paz Sánchez-Seco Fariñas
Antonio Tenorio Matanzo**



ISBN-13: 978-84-616-6119-0

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción

2. Síndromes clínicos y principales agentes implicados

3. Arbovirosis y robovirosis autóctonas

- 3.1. Virus West Nile
 - 3.1.1. Aspectos virológicos
 - 3.1.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos
- 3.2. Virus Toscana
 - 3.2.1. Aspectos virológicos
 - 3.2.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos
- 3.3. Virus de la coriomeningitis linfocitaria
 - 3.3.1. Aspectos virológicos
 - 3.3.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos

4. Principales arbovirus y robovirosis importadas

- 4.1. Virus dengue
 - 4.1.1. Aspectos virológicos
 - 4.1.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos
- 4.2. Virus de la fiebre amarilla
 - 4.2.1. Aspectos virológicos
 - 4.2.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos
- 4.3. Virus chikungunya
 - 4.3.1. Aspectos virológicos
 - 4.3.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos
- 4.4. Virus Lassa
 - 4.4.1. Aspectos virológicos
 - 4.4.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos

5. Diagnóstico de las arbovirosis y robovirosis

- 5.1. Recogida y transporte de muestras
- 5.2. Aislamiento mediante cultivo
- 5.3. Detección de antígeno
- 5.4. Detección de ácidos nucleicos
- 5.5. Detección de respuesta inmunológica humoral

6. Bibliografía

- 6.1. Bibliografía general
- 6.2. Infección por el virus West Nile
- 6.3. Infección por el virus Toscana
- 6.4. Infección por el virus de la coriomeningitis linfocitaria
- 6.5. Infección por el virus dengue
- 6.6. Infección por virus chikungunya
- 6.7. Infección por el virus de la fiebre amarilla
- 6.8. Infección por el virus de Lassa

DOCUMENTOS TÉCNICOS

- PNT-ARBOV-01. Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus West Nile**
- PNT-ARBOV-02. Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus Toscana**
- PNT-ARBOV-03. Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus chikungunya**
- PNT-ARBOV-04. Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus dengue**
- PNT-ARBOV-05. Detección de antígeno de los virus dengue**

Procedimientos en Microbiología Clínica

**Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y
Microbiología Clínica**

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

47. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE ARBOVIROSIS Y ROBOVIROSIS EMERGENTES. 2013

Coordinadora: Ana Isabel Negredo Antón

**Autores: Leticia Franco Narváez
M^a Isabel Gegúndez Cámara
Jose M^a Navarro Mari
Ana Isabel Negredo Antón
Fernando de Ory Manchón
M^a Paz Sánchez-Seco Fariñas
Antonio Tenorio Matanzo**

1. INTRODUCCIÓN

Los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) y los transmitidos por roedores (robovirus) o por otros animales se engloban en los que actualmente denominamos “virus transmitidos por vector” (VTV). Este término agrupa a cientos, probablemente miles, de virus pertenecientes a diferentes familias evolutivas, la mayoría con genoma ARN, lo que les confiere una elevada capacidad adaptativa a nuevos huéspedes vertebrados o invertebrados, entre los que se incluye al ser humano.

En los últimos decenios la humanidad ha sufrido dramáticos ejemplos de aparición de nuevos virus. Entre ellos el virus del sida, un virus hasta entonces de primates no humanos, el coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo, o las nuevas variantes del virus de la gripe han mostrado una rápida capacidad de adaptación y de transmisión altamente eficaz entre seres humanos. Con un nivel intermedio de adaptación, se encuentran los VTVs causantes de las fiebres hemorrágicas, para los que la transmisión directa entre humanos puede causar brotes epidémicos limitados, pero no pandemias.

Entre todos los VTVs, los virus del dengue, de la fiebre amarilla o el virus de la enfermedad denominada “fiebre chikungunya” son virus adaptados a nuestra especie, por lo que generan ciclos urbanos de transmisión que utilizan como vectores de transmisión a los mosquitos, generalmente del género *Aedes*. En España, como en otros países europeos, existe un riesgo potencial de transmisión autóctona en aquellas regiones geográficas en las que está presente el mosquito *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) o el mosquito *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) -conocido comúnmente como mosquito tigre-, una especie de origen asiático que en los últimos 35 años se ha extendido por los distintos continentes, y cuya presencia se asocia al riesgo de asentamiento de los arbovirus que son capaces de transmitir. No hay que olvidar que *Ae. aegypti*, actualmente erradicado pero con un elevado riesgo de reintroducción en la Península Ibérica, fue responsable de grandes epidemias de dengue y de fiebre amarilla en España entre el siglo XVIII y comienzos del XX.

La mayoría de los VTVs, sin embargo, no utilizan a los humanos en su ciclo vital, aunque algunos de ellos pueden infectarlo y causar enfermedad, que en ocasiones llega a ser letal. En estos casos el individuo infectado no produce una cantidad de virus suficiente como para infectar a otros humanos o a otros vectores. Entre estos virus en los que el humano es un huésped final, el virus West Nile, el virus de la coriomeningitis linfocitaria y el virus Toscana son los que más frecuentemente causan enfermedad en España.

Los cambios introducidos por nuestra especie en los ecosistemas que ocupan estos virus, los cambios

en el clima y la velocidad y la frecuencia con la que viajan actualmente las personas y las mercancías están favoreciendo su rápida dispersión y provocando frecuentes amenazas a la salud pública.

Ante el riesgo de asentamiento de estos agentes, las autoridades europeas han priorizado la investigación de brotes y en algunos países se van estableciendo planes para su vigilancia y control que están permitiendo la pronta identificación de casos autóctonos. En España se han aprobado protocolos activos de vigilancia y control de las enfermedades producidas por los tres VTVs adaptados a nuestra especie (virus dengue, chikungunya y de la fiebre amarilla), así como para el virus West Nile y los productores de fiebre hemorrágicas. El Centro Nacional de Microbiología (CNM), como Laboratorio Nacional de Referencia, ha puesto en marcha un programa de vigilancia microbiológica de las infecciones por VTVs, en estrecho contacto con la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. El diseño del programa (vigilancia pasiva) se basa en la identificación de casos sospechosos por parte de los clínicos y microbiólogos del Sistema Nacional de Salud, que juegan un papel esencial para que el programa tenga una sensibilidad suficiente para identificar cambios en los riesgos de infección por los VTVs en nuestro país.

2. SÍNDROMES CLÍNICOS Y PRINCIPALES AGENTES IMPLICADOS

Los VTVs producen en los humanos infecciones de diferente gravedad, que abarcan desde la infección asintomática al síndrome febril, acompañado o no de enfermedad neurológica, hepática, renal, pulmonar y/o hemorrágica. La tabla 1 resume algunos de los aspectos claves a considerar tras la aparición de un síndrome determinado en un paciente infectado en un área geográfica concreta. La tabla 1 deberá analizarse como una primera aproximación, que debe completarse por parte del clínico, del microbiólogo y/o del epidemiólogo con una identificación más precisa de las áreas geográficas y períodos de actividad de los VTVs. Para ello puede ser de utilidad consultar páginas especializadas, como las que ofrecen el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (<http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Pages/AZIndex.aspx>), la *European Network for Imported Viral Diseases* (http://www.enivd.de/FS/fs_encdiseases.htm), la Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/es/index.htm>) o los Centros para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (http://www.cdc.gov/std/healthcomm/fact_sheets.htm)

Tabla 1. Principales síndromes clínicos producidos por los VTVs, presencia en España y zonas endémicas.

	Género	Virus	España	Europa	Asia	Australia/ Oceanía	África	América Central/ Sur	América Norte	Riesgo Biológico ¹	Vector	
Fiebre hemorrágica/compromiso hepático	<i>Arenavirus</i>	Lassa					•			4	Roedores	
		LuJo					•			4	Roedores	
		Junín						•		4	Roedores	
		Machupo						•		4	Roedores	
		Guanarito						•		4	Roedores	
		Sabiá						•		4	Roedores	
		Chaparé						•		4	Roedores	
	<i>Fam. Filoviridae</i>	Ébola						•			4	Desconocido
		Marburg						•			4	Desconocido
		Lloviu (patogenicidad desconocida)	•								4	Desconocido
	<i>Nairovirus</i>	Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo	•	•	•		•			4	Garrapatas	
	<i>Rhabdovirus</i>	Bas-Congo					•			4	Desconocido	
	<i>Phlebovirus</i>	Huaiyangshan			•						4	Garrapatas
		Fiebre del valle del Rift			•		•				3	Mosquitos
	<i>Flavivirus</i>	Dengue			•	•	•	•	•		3	Mosquitos
		Fiebre amarilla					•	•			3	Mosquitos
		Fiebre hemorrágica de Omsk			•						3	Garrapatas
		Fiebre hemorrágica del Bosque de Kyasanur			•						3	Garrapatas
	<i>Hantavirus</i>	Hantaan			•						3	Roedores
		Dobrava-Belgrado		•							3	Roedores
Seoul			•	•	•	•	•	•		3	Roedores	
Puumala			•							2	Roedores	
Neurrológico	<i>Henipavirus</i>	Hendra				•				4	Equinos	
		Nipah			•	•				4	Quirópteros y Porcino	
	<i>Flavivirus</i>	West Nile	•	•	•	•	•	•	•		3	Mosquitos
		Encefalitis japonesa			•						3	Mosquitos
		Encefalitis del valle de Murray				•					3	Mosquitos
		Encefalitis de St. Louis						•	•		3	Mosquitos
		Usutu	•	•			•				3	Mosquitos
		Encefalitis transmitida por garrapatas		•	•						3*	Garrapatas
		Encefalitis de Powassan							•		3	Garrapatas
	<i>Alphavirus</i>	Encefalitis equina venezolana						•	•		3	Mosquitos
		Encefalitis equina del este						•	•		3	Mosquitos
		Encefalitis equina del oeste						•	•		3	Mosquitos
	<i>Orthobunyavirus</i>	Encefalitis de California							•		3	Mosquitos
		Tahyna		•	•						3	Mosquitos
	<i>Phlebovirus</i>	Fiebre del valle del Rift			•		•				3	Mosquitos
		Toscana	•	•							2	Flebotomos
		Granada	•								2	Flebotomos
		Nápoles		•							3	Flebotomos
		Sicilia		•							3	Flebotomos
	<i>Arenavirus</i>	coriomeningitis linfocitaria	•	•	•	•	•	•	•		3	Roedores
<i>Rhabdovirus</i>	Rabia	•	•	•	•	•	•	•		3*	Mamíferos	
Renal	<i>Hantavirus</i>	Hantaan			•					3	Roedores	
		Puumala		•						2	Roedores	
		Seoul		•	•	•	•	•	•		3	Roedores
Pulmonar	<i>Hantavirus</i>	Andes					•			3	Roedores	
		Sin Nombre						•		3	Roedores	
Artritis	<i>Alphavirus</i>	Chikungunya			•	•	•			3*	Mosquitos	
		O'nyong-nyong					•			2	Mosquitos	
		Sindbis		•	•	•	•				2	Mosquitos
		Barmah Forest				•					2	Mosquitos
		Ross River				•					2	Mosquitos
Mayaro						•			3	Mosquitos		

¹Definiciones de riesgo biológico:

- Riesgo biológico 1: microorganismos cuyo riesgo de producir enfermedad en el trabajador es poco probable, no presentan riesgo de propagación a la colectividad y para los que no es necesario disponer de medidas profilácticas o terapéuticas adecuadas.
- Riesgo biológico 2: microorganismos que pueden causar una enfermedad y constituir un riesgo para los trabajadores, el riesgo de propagación a la colectividad es poco probable y para los que hay disponibles medidas profilácticas o terapéuticas en la mayoría de los casos.
- Riesgo biológico 3: microorganismos que pueden provocar una enfermedad grave y constituir un grave peligro para los trabajadores, el riesgo de propagación a la colectividad es probable y para los que hay disponibles medidas profilácticas o terapéuticas en la mayoría de los casos.
- 3*: aun siendo de riesgo biológico 3, normalmente no se disemina por vía aérea.
- Riesgo biológico 4: microorganismos que provocan una enfermedad grave y constituyen un serio problema para los trabajadores, el riesgo de propagación a la colectividad es elevado y no hay disponible profilaxis o tratamiento eficaz.

3. ARBOVIROSIS Y ROBOVIROSIS AUTÓCTONAS

Los datos de los que disponemos sugieren que son tres los principales virus autóctonos transmitidos por vector que producen enfermedad humana en nuestro país (virus Toscana, virus de la coriomeningitis linfocitaria y virus West Nile). Los tres se han asociado a enfermedad neurológica aguda y son transmitidos por vectores ampliamente distribuidos en nuestro territorio (flebotomos, ratón común y mosquitos del género *Culex*, respectivamente), por lo que no muestran una distribución geográfica específica. También causante de enfermedad neurológica aguda, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos, hay que considerar al virus Usutu, detectado de momento en la Península Ibérica sólo en sus ciclos silvestres en aves y mosquitos.

Son muchos otros los VTVs descubiertos en España en los últimos años (probablemente sin gran impacto en la salud humana) y quedan otros muchos por descubrir. Entre los virus identificados en ciclos de circulación autóctona hay, sin embargo, algunos que deben mantenernos en alerta, pues podrían producir casos autóctonos de fiebre hemorrágica vírica. De hecho, aunque sólo en ciclos silvestres, en los últimos años se ha detectado genoma de una variante africana del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo en garrapatas y de un nuevo filovirus, relacionado con los virus Ébola y Marburg, denominado virus Lloviu, que causó un brote de infección en murciélagos de la especie *Miniopterus schreibersii*.

No hay que olvidar que algunas enfermedades importadas pueden además iniciar ciclos de circulación autóctona. Es el caso de los síndromes febriles por los virus dengue y chikungunya, pero también el de otros virus que han demostrado su capacidad de invasión de nuevos territorios en los que existen vectores y reservorios adecuados, como es el caso en España, del virus de la fiebre del valle del Rift, todavía no detectado en nuestro país.

El panorama descrito exige una permanente vigilancia microbiológica en la que participa el Laboratorio Nacional de Referencia y una alerta constante por parte de los clínicos, los microbiólogos y los epidemiólogos en todo el territorio.

3.1. VIRUS WEST NILE

El virus West Nile (WNV) es un virus de aves que puede transmitirse a los seres humanos a través de la picadura de un mosquito infectado y producir un cuadro neurológico.

3.1.1. Aspectos virológicos. El WNV pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. Como todos los flavivirus, las partículas víricas (viriones) son generalmente esféricas y miden 40-60 nm. Cada virión está formado por una nucleocápsida icosaédrica rodeada de una envuelta lipídica que incorpora la glicoproteína vírica (E), que media el anclaje, la fusión y penetración en la célula huésped y una proteína de membrana (M) no glicosilada. La nucleocápsida está formada por la proteína de la cápsida (C), que protege el genoma vírico.

El genoma de los flavivirus es un ARN de cadena simple y polaridad positiva que mimetiza a los ARNm celulares en todos los sentidos (tiene una estructura cap-1 en su extremo 5'), excepto porque no tiene extremo 3' poli-adenilado. Sus aproximadamente 11 Kb codifican una poli-proteína que dará lugar a las 3 proteínas estructurales (C, preM y E) y 8 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B y NS5), implicadas principalmente en los procesos de replicación y modulación de la respuesta antivírica generada por el hospedador. La región codificante está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por regiones no codificantes, con una estructura secundaria muy conservada para cada flavivirus y que son necesarias para una eficiente traducción y replicación del genoma vírico. La glicoproteína vírica es el blanco mayoritario de los anticuerpos neutralizantes generados tras la infección en el huésped, aunque también se produce respuesta humoral frente a las proteínas M, NS1 y NS3. La proteína NS1 es una glicoproteína muy conservada dentro de los flavivirus, se puede encontrar en el retículo endoplásmico o anclada a la membrana pero además es secretada por la célula infectada y se ha visto que es inmunogénica. La proteína NS1 secretada se puede detectar en el suero de los pacientes infectados al inicio de la infección vírica y hasta 9-11 días de iniciados los síntomas.

El género *Flavivirus* incluye cuatro grandes grupos evolutivos: el de los flavivirus transmitidos por mosquitos a los vertebrados (entre los que se

encuentran los virus WNV, dengue, de la fiebre amarilla y otros), el de los que son transmitidos por garrapatas (entre los que destaca el virus euroasiático de la encefalitis transmitida por garrapatas), el que agrupa a los que no se conoce el vector de transmisión a los animales vertebrados (ninguno de ellos detectado en humanos) y un cuarto grupo de flavivirus detectados sólo en mosquitos y que probablemente son incapaces de infectar a vertebrados.

A su vez, entre los flavivirus transmitidos por mosquitos se han descrito diversos grupos antigénicos, que agrupan a virus relacionados evolutiva y antigénicamente. Entre ellos, los más relevantes en enfermedad humana son el grupo de los virus dengue, el grupo de los virus relacionados con el virus de la fiebre amarilla y el grupo de los virus relacionados con el virus de la encefalitis japonesa (JEV), en el que se agrupa el WNV junto con el virus de la encefalitis de Saint Louis (SLEV) y el virus de la encefalitis del valle de Murray (MVEV), también productores de cuadros neurológicos y el virus Usutu (USUV) de escasa patogenicidad en humanos.

El WNV presenta a su vez una alta variabilidad genética, con 7 linajes diferentes descritos hasta el momento. El linaje 1 es el mayoritario y actualmente está presente en los cinco continentes. Este linaje tradicionalmente se ha considerado el causante de la afectación neurológica (forma más grave de la enfermedad causada por el WNV) tanto en los seres humanos como en los équidos y, es el que circula en América tras su introducción en 1999. El linaje 2 se había localizado siempre en África subsahariana y Madagascar y se había considerado productor de la forma más leve de enfermedad hasta que en 2004 aparece en Europa (Hungría, Rusia, Rumanía, Grecia) y causa importantes brotes con afectación neurológica. El linaje 3 se ha descrito en mosquitos de Centroeuropa sin asociarse a casos de enfermedad en mamíferos. El linaje 4 ha sido descrito en garrapatas capturadas en el Cáucaso. El linaje 5 se ha asociado a casos de enfermedad neurológica en la India y el linaje 6 corresponde a una detección única en Malasia. Por último, se han detectado, en mosquitos de nuestro país, secuencias que muestran suficientes divergencias como para sugerir la existencia del linaje 7 del WNV.

En España se ha detectado la circulación del linaje 1, que ha sido el causante de los brotes descritos en Andalucía en los últimos años. Por otra parte, los estudios realizados en la provincia de Sevilla y en la población del Delta del Ebro detectan prevalencias de anticuerpos específicos entre el 0,2 y el 0,6% de la población.

3.1.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos. Se calcula que sólo el 20% de las infecciones por el linaje 1 del WNV son sintomáticas y que menos del 1% derivan en un cuadro neuroinvasivo. El cuadro no neuroinvasivo se conoce como fiebre por el WNV y se trata de un cuadro pseudogripal. Tras un periodo de incubación de 2-6 días (que puede prolongarse hasta 14-21 días, especialmente en los pacientes

trasplantados), aparecen fiebre, cefalea, artromialgias, adenopatías y en ocasiones exantema. La fiebre puede ser bifásica. Cuando el virus atraviesa la barrera hematoencefálica, produce encefalitis en el 60% de los casos, meningitis en el 35% de los casos o un síndrome similar a una parálisis flácida. La edad avanzada constituye un factor de riesgo para la enfermedad neuroinvasiva. Otras manifestaciones menos frecuentes incluyen la afectación ocular con coriorretinitis, hemorragias retinianas, rabdomiolisis, fiebre hemorrágica con púrpura y fallo multi-orgánico que cursa con elevada mortalidad, hepatitis, pancreatitis, miocarditis, miositis y orquitis.

El ciclo biológico del virus implica a un mosquito vector, generalmente del género *Culex* (en nuestro ámbito *Cx. pipiens* y *Cx. perexiguus* son sus vectores principales) y un ave que actúa de huésped amplificador. Las infecciones se producen entre abril y noviembre siempre ligadas a la presencia del vector. Los humanos y otros mamíferos como los caballos actúan como huésped final pudiendo resultar su infección en una enfermedad de diversa consideración. Se ha descrito la transmisión por transfusión de sangre y a través de trasplante de órgano sólido de donantes infectados con el virus.

El virus se describió en África en 1937 cuando se aísla de la sangre de una mujer con síndrome febril. En Europa se han producido brotes de diferente intensidad y limitados en cuanto a su propagación en el espacio y su duración en el tiempo. Hasta mediados de la década de los 90 se consideraba que era un agente de bajo riesgo sanitario porque los brotes que producía eran esporádicos. Esta situación cambia cuando en los Estados Unidos de América se diagnostican casos humanos de infección por el WNV por primera vez en 1999 causando un brote en la ciudad de Nueva York. La expansión ha sido continua desde entonces habiéndose detectado el virus en múltiples especies de mosquitos, aves y otros animales, considerándose en la actualidad endémico y un problema de salud pública importante en Estados Unidos. Se ha expandido por prácticamente toda Norteamérica alcanzando también el Caribe y llegando puntualmente a Argentina. Hasta 2010 se produjeron en los Estados Unidos 30.662 casos y 1.163 muertes. En 2011 se producen 712 casos y 43 muertes mientras que en el 2012, en lo que parece un repunte de la actividad del virus, se han contabilizado 5.387 casos con 243 muertes.

En el entorno Mediterráneo, el primer brote con un alto número de casos tuvo lugar en Rumanía en 1996, en donde se confirmaron 393 casos de enfermedad neuroinvasiva y 17 muertes. Hasta 2010, se había descrito un brote grave en Rusia en 1999 (más de 300 casos y 40 muertes) y en Israel el año siguiente (más de 400 casos y 35 muertes) y se habían descrito otros brotes esporádicos en estos mismos países, al igual que en Italia, Hungría, Francia y Portugal. A partir de 2010 se produce en Grecia uno de los mayores brotes por el WNV de los descritos en Europa, siendo la primera vez que se

describen casos en este país. Se confirman 262 casos de los cuales 197 desarrollaron una enfermedad neurológica y se produjeron 33 muertes. Este mismo año, en Rusia, se detectaron 480 casos y se detectan casos esporádicos en Rumanía, Italia, Hungría, Israel y Turquía. En España también en 2010 se informa de la presencia del virus en caballos (41 afectados y 14 muertes) y se confirma la infección en dos pacientes, en la provincia de Cádiz, con cuadros neurológicos en este mismo año. Es el primer brote que se detecta en España donde sólo se había descrito un caso de infección neurológica en 2004, aparentemente adquirido en Badajoz. En el año 2011, además de detectarse brotes esporádicos en, prácticamente las mismas zonas que en 2010, se producen dos brotes destacables en Grecia y en Italia. En Grecia se describe la infección de 74 casos humanos y 13 caballos mientras que en Italia hay 4 pacientes infectados y dos focos equinos afectados. Los estudios de epidemiología molecular muestran al linaje 2 del WNV como la causa etiológica de los brotes en Grecia, Rumanía y Rusia. Es la primera vez en Europa, que se describe enfermedad por este linaje. En nuestro país, el pasado año se detecta, en la misma zona que en 2010, un foco de infección en ganadería equina y, en octubre de 2012, se han detectado tres focos en equinos también en la zona de Cádiz. En la actualidad se ha aprobado un Protocolo de vigilancia en humanos y está puesto en marcha un Plan de vigilancia en caballos, aves y mosquitos (Plan de vigilancia de la Encefalitis del oeste del Nilo, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino) que permite detectar circulación del virus en aves y vectores en zonas especialmente susceptibles, como los humedales del país, y disponer de la información para valorar el riesgo de enfermedad en caballos y humanos.

3.2. VIRUS TOSCANA

El virus Toscana (TOSV) se transmite a los seres humanos a través de la picadura de un flebótomo infectado y puede producir un síndrome neurológico.

3.2.1. Aspectos virológicos. El TOSV pertenece al género *Phlebovirus* de la familia *Bunyaviridae*. Dentro de los flebovirus el TOSV pertenece, junto con el virus Nápoles (SFNV), al serogrupo de Nápoles. Estos virus y el virus Sicilia (SFSV) pueden producir un síndrome febril denominado fiebre papatasi. En este género hay además otros patógenos importantes para el ser humano como el virus productor de la fiebre del valle del Rift (RVFV).

El TOSV es un virus esférico, de 80-120 nm de diámetro, envuelto y su genoma es un ARN monocatenario, formado por tres segmentos (S, M y L). La polaridad del genoma es negativa excepto para el segmento S (*Small*), el más pequeño, que tiene una estrategia de codificación en ambos sentidos: la proteína N, que forma las nucleocápsidas y es altamente inmunogénica, se traduce a partir de un ARNm subgenómico complementario al ARN vírico correspondiente al extremo 3' del segmento, mientras un ARNm subgenómico correspondiente al extremo 5' codifica

una proteína no estructural (NSs) cuya función no se conoce. El fragmento M (*Medium*) codifica las glicoproteínas G1 y G2 que se insertan en la envoltura vírica y son responsables del reconocimiento del receptor celular, confieren al virus capacidad de hemaglutinación e inducen respuesta inmune protectora. El segmento L (*Large*) es el más grande y en él está codificada la polimerasa que forma también parte del virión. Los segmentos genómicos tienen además secuencias complementarias, propias de grupo, en los extremos 3' y 5' que pueden hibridar formando bucles que se cree son importantes en los procesos de replicación, transcripción, empaquetamiento y ensamblaje.

Las cepas del TOSV muestran variabilidad genética según las áreas geográficas en las que se detecte, probablemente debido a su asociación evolutiva con el vector de transmisión; así las cepas del TOSV aisladas en España muestran diferencias significativas en la secuencia de nucleótidos con respecto a la cepa tipo italiana ISS.Phl.3 tanto en el segmento L (hasta del 20%) como en el S (entre el 12-13%), mientras que la homología a nivel de aminoácidos es casi del 100%. La mayor variabilidad genética ocurre en el segmento M, con diferencias de hasta el 20% y 10% en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos respectivamente, agrupándose las cepas del TOSV en dos genotipos distintos, denominados A (italiano) y B (español), cuya distribución confluye, aparentemente, en el sur de Francia.

3.2.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos. El TOSV es el único flebovirus con capacidad neurovirulenta que se ha aislado en nuestro medio. En España, como en otros países de la cuenca del Mediterráneo, se considera la segunda causa de meningitis, tras enterovirus, durante los meses cálidos. La infección neurológica es más frecuente durante el verano, con un pico de incidencia en el mes de agosto, coincidiendo con la época de máxima actividad del vector. A diferencia de las infecciones producidas por los enterovirus, las producidas por los flebovirus son más frecuentes en adultos jóvenes que en niños. Clínicamente la infección se caracteriza por cursar con fiebre alta, cefalea, vómitos, por tener carácter benigno y resolverse de manera espontánea, a corto o medio plazo, sin secuelas neurológicas permanentes. Ocasionalmente puede provocar meningoencefalitis o encefalitis sin meningitis, en algunos casos de curso grave y con secuelas. Rara vez se ha asociado a cuadros no neurológicos como exantema o síndromes pseudogripales. Los principales brotes de infección por TOSV se han producido entre población susceptible procedente de países en los que no circula el TOSV que llega a un área endémica.

El periodo de incubación de la enfermedad puede ser prolongado. Por otra parte, se suelen encontrar anticuerpos IgG e IgM anti-TOSV en el comienzo de los síntomas. La elevada tasa de infección de viajeros procedentes de zonas no endémicas y la caída en la incidencia de la infección paralela al

incremento en la edad de la población residente en zonas de circulación vírica, sugieren una inmunidad duradera.

Aunque se ha constatado que el TOSV puede infectar a diferentes mamíferos, no se ha podido precisar la existencia de ningún reservorio animal en su ciclo de vida. Sólo puntualmente se ha detectado su presencia en algunos mamíferos como murciélagos o cabras, pero no en la medida necesaria para establecer datos concluyentes que los implique como reservorios en el ciclo natural del virus. Como vectores del TOSV se han descrito *Phlebotomus perniciosus*, ocasionalmente *P. perfiliewi* y recientemente se ha detectado genoma vírico en *Sergentomyia minuta*. Se ha podido demostrar la transmisión transovárica del virus en colonias de flebotomos, lo que junto a la transmisión sexual podría jugar un papel en el ciclo de amplificación del virus y su supervivencia durante los meses en que no circula el vector. La distribución del virus es típicamente mediterránea, habiéndose detectado casos autóctonos de infección en Italia, España, Francia, Portugal, Chipre y Turquía; países donde también se han infectado viajeros procedentes de áreas no endémicas como Suecia o Alemania. En España se aisló por primera vez en un paciente con infección del sistema nervioso central (SNC) en 1988; posteriormente se han descrito casos en el resto de la Península Ibérica, excepto la zona cantábrica. Estudios de prevalencia sugieren también la circulación del TOSV por todas las regiones en las que se ha descrito la leishmaniosis, con tasas más altas en el área mediterránea. Así, se han detectado tasas en la población general de hasta el 24,9% en Granada, frente al 7,2% en Madrid. La prevalencia aumenta de forma significativa con la edad de la población, alcanzando el 60% en mayores de 65 años. La elevada prevalencia de anticuerpos entre la población de lugares donde se ha aislado el TOSV junto con la baja incidencia de enfermedad apuntan hacia la posibilidad de frecuentes infecciones asintomáticas o paucisintomáticas.

3.3. VIRUS DE LA CORIOMENINGITIS LINFOCITARIA

El virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) puede producir en los seres humanos infección del SNC, y se transmite principalmente a través de la inhalación de aerosoles procedentes de excretas de roedores infectados.

3.3.1. Aspectos virológicos. El LCMV pertenece a la familia *Arenaviridae*, género *Arenavirus*. Los arenavirus son virus envueltos que presentan una morfología esférica, y un tamaño que varía entre 50 y 300 nm. Al microscopio electrónico, presentan un aspecto "arenoso" debido a la presencia de ribosomas que derivan de la célula huésped. En su envoltura se enclavan dos glicoproteínas, denominadas G1 y G2, que son las estructuras víricas responsables de la unión a la célula huésped e inducen la formación de anticuerpos neutralizantes. En su interior se encuentran dos nucleocápsidas de

simetría helicoidal que están compuestas por la asociación de la proteína N o nucleoproteína, el otro antígeno vírico importante, el genoma y la polimerasa vírica. El genoma de los arenavirus está constituido por dos segmentos de ARN monocatenario. El segmento S (*Small*) es el de menor tamaño y codifica dos proteínas estructurales, la proteína N y un precursor de las glicoproteínas (GPC). El segmento L (*Large*) codifica la polimerasa vírica dependiente de ARN (L) y una proteína de unión al zinc (Z). Cada uno de los genes contenidos en cada segmento, presentan información no solapante y marcos de lectura en orientaciones opuestas y están separados por una región intergénica no codificante que presenta una estructura secundaria en forma de horquilla. Los extremos 3' y 5' de ambos segmentos son complementarios y son los responsables de la circularización de los dos segmentos de ARN así como los sitios de reconocimiento de la polimerasa vírica. Las proteínas N y L son procesadas a partir de un ARN mensajero complementario al genoma vírico transcrito a partir de la mitad 3' de los segmentos S y L, respectivamente. El GPC y la proteína Z son traducidas a partir de un ARNm similar al genoma vírico, codificado en la mitad 5' de los segmentos S y L.

Los arenavirus se clasifican de acuerdo a características antigénicas y genéticas en dos grupos distintos: arenavirus del Nuevo Mundo que agrupa a los que circulan en el continente americano, entre los que se encuentran virus responsables de cuadros hemorrágicos de gravedad, y arenavirus del Viejo Mundo donde se incluyen los de distribución en África, como el virus Lassa, también productor de cuadros de fiebre hemorrágica y los de distribución universal, como el LCMV.

El LCMV presenta una elevada diversidad genética y se distinguen cuatro linajes, del I al IV. Los tres primeros se asocian a enfermedad humana y el linaje I, además, relaciona al ratón casero (*Mus musculus*) como reservorio del virus. En España se han identificado cepas pertenecientes a los linajes I y IV. Las pertenecientes al linaje I se han aislado de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con meningitis, mientras que las tres cepas que constituyen el linaje IV se han detectado en tejidos de ratones de campo (*Apodemus sylvaticus*) y, hasta el momento, no se han vinculado con enfermedad humana.

3.3.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos. La mayoría de las infecciones producidas por el LCMV cursan de forma asintomática o como cuadrosseudogripales, sin embargo, un tercio de los pacientes desarrollan cuadros neurológicos de diversa consideración. En estos casos, los síntomas aparecen tras un periodo de incubación de 6 a 13 días y la enfermedad sigue un curso bifásico. En la primera fase, que dura de 3 a 5 días, los enfermos presentan fiebre, malestar general, cefaleas, mialgias y, en algunos casos faringitis, náuseas y vómitos. En sangre son características la leucopenia y la trombocitopenia. Tras una remisión clínica de unos 4

a 6 días, la cefalea y la fiebre pueden reaparecer acompañándose de otros síntomas y signos característicos de meningitis o meningoencefalitis. En el LCR se aprecia pleocitosis linfocitaria, hiperproteorraquia y, en un 25% de los casos, hipoglucorraquia. Como resultado de la invasión del virus al SNC, las células T destruyen las células menígeas del huésped infectadas por el virus, provocando una respuesta inflamatoria que causa las alteraciones neurológicas, pero que en la mayoría de los pacientes inmunocompetentes se resuelven favorablemente en aproximadamente una semana, siendo la tasa de mortalidad inferior al 1%. La primoinfección en embarazadas puede causar abortos o infecciones congénitas. Como consecuencia de la infección del feto, éste puede desarrollar hidrocefalia o microcefalia y sufrir secuelas neurológicas como retraso mental, parálisis cerebral, calcificaciones intracraneales, epilepsia y manifestaciones oculares como coriorretinitis o ceguera. Los pacientes inmunodeprimidos, como es el caso de los enfermos receptores de trasplante, pueden desarrollar un fallo multiorgánico con una elevada mortalidad.

El LCMV tiene como reservorio al ratón casero. Los ratones infectados excretan el virus por orina, heces y saliva durante toda su vida, sin mostrar signos de enfermedad. Otros roedores como hámsteres y cobayas, pueden adquirir la infección por contacto con reservorios naturales y, a su vez, eliminar el virus. Los humanos pueden contagiarse al inhalar aerosoles producidos a partir de excretas contaminadas, al contactar con las mismas a través de abrasiones en la piel o mediante la mordedura de cualquiera de dichos roedores. Además, el LCMV puede transmitirse vía vertical durante el embarazo y a través de trasplante de órganos sólidos pertenecientes a donantes infectados con el virus.

La mayoría de las infecciones por este virus aparecen en forma de casos esporádicos a lo largo de todo el año dependiendo de cuando ocurra el contacto con los roedores infectados. También se han descrito varios pequeños brotes epidémicos relacionados con infecciones en trabajadores de laboratorios de experimentación animal o con receptores de órganos sólidos infectados. La distribución geográfica del virus, al igual que la de su reservorio, es universal pero prácticamente la totalidad de los casos clínicos informados hasta la fecha se han producido en América y Europa. Los escasos estudios epidemiológicos realizados en roedores y distintos grupos de población humana indican una amplia distribución del virus en muchos países europeos. Sin embargo, poco se sabe acerca de la verdadera incidencia de la enfermedad por el LCMV y se sospecha que la mayoría de los casos no están siendo diagnosticados. De hecho, aunque se han diagnosticado casos de patología neurológica y/o de infecciones congénitas en Alemania, Hungría, antigua Unión Soviética, Dinamarca, Holanda, Portugal y Francia, en la última década sólo se han comunicado casos aislados de meningitis en Francia, Rumanía y España.

En España, se han encontrado anticuerpos específicos frente al LCMV en roedores del norte, centro y sur del país y genoma vírico (linaje IV) en roedores capturados de Andalucía. El primer caso documentado de infección por el LCMV en España fue una meningoencefalitis en 1996. Un estudio retrospectivo demostró que el LCMV fue la causa del 1,2 % de las meningitis linfocitarias que habían quedado sin filiar tras descartar los agentes etiológicos más frecuentes entre los años 2000-2005. Los casos se distribuyeron por Madrid, Extremadura y Andalucía. Posteriormente, en un estudio multicéntrico prospectivo realizado durante los años 2008 y 2009 para determinar incidencia de los distintos virus causantes de infecciones agudas en el SNC se encontró que, tras descartar los virus más prevalentes, el LCMV fue responsable del 1,3% de los cuadros neurológicos estudiados, en concreto meningitis linfocitarias y meningoencefalitis. Además, se han diagnosticado, mediante RT-PCR y serología, dos casos de meningitis en un ambiente urbano próximo con un año de diferencia. Todos estos datos indican que, aunque con baja incidencia, las infecciones por el LCMV ocurren en nuestro medio y que el virus puede permanecer circulante en determinadas zonas durante largos periodos de tiempo. Es necesario tener en cuenta este tipo de infecciones dadas las serias repercusiones que pueden ocasionar en las embarazadas y en los pacientes trasplantados a partir de donantes aparentemente sanos.

La prevención de estas infecciones se basa en evitar infestaciones de roedores en casas y lugares de trabajo. Los roedores de experimentación deben tener una procedencia conocida y ser sometidos a controles regulares. Los manipuladores de estos animales deberían utilizar métodos de barrera como guantes y mascarillas. En cuanto a los criaderos y tiendas de roedores, especialmente de hámsteres, debe impedirse el contacto de los mismos con roedores silvestres. En el caso de las mujeres embarazadas es conveniente que se les informe del riesgo potencial de adquirir la infección al introducir un roedor mascota nuevo durante el embarazo en su domicilio. La prevención de la transmisión del LCMV mediante trasplante de órganos es difícil ya que la infección en los donantes puede ser subclínica y, además, resulta difícil conocer el dato de contacto con roedores. Por otra parte, la detección sistemática del virus en donantes, por ahora, no es viable debido a su elevado coste y la posible obtención de resultados falsos negativos.

4. PRINCIPALES ARBOVIROSIS Y ROBOVIROSIS IMPORTADAS

No se debe perder de vista que la atención debe centrarse esencialmente en aquellos virus que pueden suponer una amenaza para la salud pública en España, ya sea porque pueden transmitirse directamente por contacto interpersonal (virus productores de cuadros de fiebre hemorrágica) o mediada por un vector presente en nuestra geografía (virus dengue, chikungunya y de la fiebre del valle

del Rift). El diagnóstico etiológico de otras infecciones, aun siendo importante para el manejo del paciente, no influirá en la toma de medidas de prevención y control de un posible brote de circulación autóctona.

Sin duda son los casos de fiebre hemorrágica vírica los que despertarán una mayor alarma en el hospital. Ante cualquier sospecha, el clínico o el laboratorio deben informar inmediatamente a las autoridades sanitarias responsables, que iniciarán y orientarán las medidas de contención de la infección, y al Centro Nacional de Microbiología (CNM), que informará sobre la toma y el envío de muestras. El riesgo de importación de casos es real, como demuestran las estadísticas de otros países de nuestro entorno, pero las medidas a tomar son eficaces y tanto el trabajo de laboratorio como el clínico puede llevarlo a cabo cualquier profesional que haya sido adecuadamente informado. Respecto al país de importación, no se debe considerar que el riesgo de encontrarse con un virus de elevado riesgo biológico está exclusivamente en pacientes procedentes del África subsahariana (exportadora de casos de fiebre hemorrágica de Lassa, de Ébola, de Marburg y de Crimea-Congo). En otros continentes del Viejo Mundo (Europa y Asia) también circula el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo y son varios los países de América del Sur en los que hay periódicamente brotes de fiebre hemorrágica por arnavirus (Argentina, Bolivia, Venezuela y Brasil). En los últimos años se han descrito además nuevos virus causantes de fiebre hemorrágica vírica y que se consideran de elevado riesgo biológico por su capacidad de transmisión a humanos (virus LuJo y Bas-Congo en África y virus Huaiyangshan en China) y serán más los que vayan siendo descubiertos gracias a las nuevas herramientas de detección de genoma vírico. El diagnóstico diferencial es clave en una fiebre hemorrágica; obviamente, no todos los casos serán causados por virus de elevado riesgo biológico, el síndrome puede estar causado también por otros virus (fiebre amarilla, dengue o hantavirus, entre otros), o por parásitos y bacterias.

Sin embargo, el mayor impacto potencial para la salud pública en España sería que algunos de los virus que están causando una elevada carga de enfermedad en otros países llegaran a establecer ciclos de circulación autóctona. Es el caso de los virus dengue y chikungunya, muy frecuentemente importados por viajeros que regresan infectados de zonas endémicas y que desarrollan su periodo febril en zonas peninsulares o insulares en las que está presente su vector de transmisión (mosquitos del género *Aedes*). En estos casos debe considerarse también urgente el diagnóstico etiológico y el consejo al paciente para que evite las picaduras de mosquitos mientras esté en periodo febril. Cualquier caso positivo debe comunicarse además a las autoridades sanitarias, algo que se convierte en crítico en las zonas infestadas por el mosquito vector.

Son muchos otros los VTVs que pueden infectar a los viajeros (Tabla 1), pero su repercusión potencial

en la salud colectiva es nula o escasa. El CNM, como Laboratorio Nacional de Referencia, dispone de los métodos adecuados para el diagnóstico de la mayor parte de los VTVs y cuenta además con el apoyo de las redes internacionales de virosis emergentes en las que participa, entre ellas la *European Network for Imported Viral Diseases*.

4.1. VIRUS DENGUE

El virus dengue (DENV) se transmite a los seres humanos a través de la picadura de mosquitos infectados y puede ocasionar un síndrome febril denominado dengue.

4.1.1. Aspectos virológicos. El dengue está causado por cuatro virus muy relacionados antigénica y evolutivamente a los que se conoce como serotipos DENV 1, DENV 2, DENV 3 y DENV 4; pertenecen al género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*) (como ya se ha comentado en el apartado correspondiente al WNV). Junto con el virus Kedougou, forman uno de los grupos antigénicos más relevantes entre los flavivirus transmitidos por mosquitos. Cada serotipo del DENV a su vez puede ser clasificado, basado en el análisis filogenético y en su diversidad de secuencias, en varios grupos o subtipos llamados genotipos, que suelen incluir a su vez varios linajes evolutivos.

4.1.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos. La infección por el DENV presenta un amplio espectro clínico que va desde la infección asintomática o inaparente, pasando por manifestaciones clínicas típicas como fiebre, cefalea, dolor muscular, articular y erupción cutánea -definido como manifestaciones del dengue clásico o dengue sin signos de alarma, según la nueva clasificación de la OMS de 2009, o evolucionar dando lugar a la aparición de signos de alarma: dolor abdominal, sangrado de mucosas y acumulación de líquidos, hasta desencadenar un dengue grave, anteriormente denominado dengue hemorrágico o síndrome de choque por dengue, producido por la extravasación de líquido con insuficiencia respiratoria, sangrado intenso y pudiendo ser afectados distintos órganos. Actualmente, dentro del dengue grave se incluyen otros síndromes clínicos como las encefalitis, miocarditis y hepatitis causadas por el DENV.

Una infección primaria con uno de los serotipos del DENV confiere inmunidad para toda la vida frente a ese mismo serotipo y solo una inmunidad temporal y parcial frente a los demás serotipos. En una infección secundaria con otro serotipo del DENV diferente al de la primo infección predispone al paciente a padecer un dengue con signos de alarma o grave. Esto es debido a que en la infección secundaria se favorece la replicación vírica mediada por los anticuerpos no neutralizantes (producidos frente al virus de la primoinfección) y por ende el desencadenamiento de una fuerte respuesta inmunológica, fundamentalmente celular, y la consiguiente activación de una cascada de citoquinas y otros mediadores celulares e inflamatorios que provocan un desequilibrio transitorio que conduce a disfunción de las células

endoteliales vasculares, al trastorno del sistema de coagulación y a la posterior extravasación de plasma, colapso súbito o postración y sangrado. Se sabe que otros factores, además de la infección secundaria, pueden desencadenar un dengue con signos de alarma o grave, como son las enfermedades crónicas (asma bronquial, anemia de células falciformes y diabetes mellitus), la raza, la edad y el intervalo de tiempo entre las infecciones secuenciales de los serotipos del DENV. Debido a que se ha visto también dengue grave en infecciones primarias, se postula que la cepa vírica también influye; en este sentido, los genotipos asiáticos por lo general son más virulentos que los americanos.

El dengue es una de las arbovirosis más extendida, produciendo brotes y epidemias en países tropicales y subtropicales. Con una incidencia anual estimada por la OMS de más de 50 millones de casos, la enfermedad se extiende por Asia, América, África, Oceanía y, recientemente, emerge en Europa después de más de 80 años de ausencia.

El dengue se transmite por la picadura de mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti*, su vector principal, y también por su vector alternativo, *Ae. albopictus*, que junto con su reservorio humano componen el ciclo urbano del dengue. También existe un ciclo selvático entre *Aedes* de los bosques tropicales de África del Oeste y Malasia y primates no humanos. El DENV de los ciclos selváticos es muy diferente al encontrado en los ciclos endémicos urbanos, y aunque se transmite infrecuentemente a los humanos, se han descrito casos de dengue con signos de alarma o graves (hemorrágicos) tanto con cepas selváticas del DENV africanas como asiáticas. En Europa meridional *Ae. aegypti* estuvo presente hasta la década de los 1950s, actualmente solo está presente en Madeira (Portugal) y el Cáucaso; por el contrario, *Ae. albopictus*, se introdujo en Europa en los 1980s y actualmente está presente en más de 20 países del continente, en especial en el entorno del Mediterráneo, incluidas la mayor parte de las islas y provincias costeras españolas.

La combinación de virus importados a través de viajeros procedentes de áreas endémicas y de presencia de vectores ha generado al menos tres brotes recientes de circulación autóctona del DENV 1 en Europa: en Francia y Croacia en 2010 y en la isla de Madeira (Portugal) en 2012, siendo este último el de mayor morbilidad con más de 2.000 casos declarados durante ese año. El brote iniciado en Madeira en 2012 ha supuesto la primera transmisión sostenida de dengue en Europa desde la década de 1920s, cuando se documentó la última epidemia de dengue en Grecia, que afectó también a España y otros países mediterráneos. Todo ello ha llevado a las autoridades europeas a priorizar la investigación de estos brotes y a establecer planes para su vigilancia y control. En España, como se ha comentado antes, en 2013 se ha aprobado un Protocolo de vigilancia del dengue.

4.2. VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA

El virus de la fiebre amarilla (YFV) causa la enfermedad denominada fiebre amarilla, enfermedad febril aguda que se transmite a los seres humanos a través de la picadura de mosquitos. El virus se multiplica principalmente en el hígado produciendo cambios variables en su estructura y función que pueden llevar a la muerte hasta en el 80% de las personas infectadas durante una epidemia.

4.2.1. Aspectos virológicos. El YFV es la especie tipo de la familia *Flaviviridae* y del género *Flavivirus*, al que pertenecen también los virus WNV y DENV descritos con anterioridad, y define además un grupo de virus relacionados antigénicamente con él dentro del gran grupo de los flavivirus transmitidos por mosquitos. Se han definido 7 linajes del YFV tras el análisis de la secuencia de nucleótidos de las proteínas estructurales prM/E y de la región no codificante del extremo 3' del genoma, cinco de ellos circulan en África y dos en Sudamérica. Es importante conocer la secuencia de nucleótidos para definir patrones de desplazamiento de los diferentes genotipos víricos que pueden estar circulando en las áreas endémicas, donde la gran cantidad de vectores y posibles reservorios favorecen la variabilidad, tal como se ha demostrado en diversas regiones de África, Brasil y Perú.

4.2.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos. La infección presenta un amplio espectro de gravedad, desde la infección subclínica, que en África llega hasta el 80% de las infecciones durante las epidemias, hasta la enfermedad mortal que se produce entre el 20% al 50% de las infecciones aparentes durante una epidemia. El período de incubación varía de 3 a 6 días después de la picadura de un mosquito infectado.

El cuadro clínico se ha dividido en tres períodos evidentes: período de infección: fase congestiva de inicio súbito y síntomas generales como fiebre, escalofríos, disociación pulso-temperatura (signo de Faget), cefalea, hiperemia conjuntival, dorsalgias, mialgias generalizadas, postración, dolor a la palpación abdominal, náuseas y vómitos, que dura aproximadamente entre 1 y 5 días. Los exámenes de laboratorio muestran leucopenia. Período de remisión: en el que la mayoría de los pacientes presentan una mejoría transitoria de 6-12 horas, que puede llevar a la desaparición de la fiebre y los síntomas generales. Pasada esta fase la fiebre vuelve a aparecer acompañada de náuseas, vómitos, dolor epigástrico, dando lugar al período de intoxicación: caracterizado por el predominio de síntomas de insuficiencia hepato-renal, como ictericia, hematemesis, melenas u otras manifestaciones hemorrágicas, oliguria, albuminuria y postración intensa. En los casos mortales, además de la hepatitis, se asocia la aparición de miocarditis, glomerulonefritis y encefalitis. En este período, alrededor del 50% de los casos mueren a los 10-14 días y el resto se recupera sin daños significativos.

El YFV puede producir epidemias de grandes proporciones en poblaciones susceptibles no inmunizadas. Se estima que la incidencia anual es de 200.000 casos con 30.000 muertes. Son zonas endémicas de fiebre amarilla, 33 países en África subsahariana y zonas selváticas y rurales de América Central y del Sur (Brasil, Bolivia, Ecuador, Perú, Colombia, Venezuela, Trinidad y Tobago, Guyana, Suriname y Guayana francesa). Se reconocen dos ciclos de transmisión, uno urbano que es epidémico y frecuente en África Subsahariana y otro selvático que es responsable del mantenimiento del virus en África y es el único existente actualmente en el Nuevo Mundo. En Asia y Oceanía, a pesar de estar presente de forma abundante el vector transmisor, *Ae. aegypti*, nunca se ha descrito la circulación del YFV. La fiebre amarilla es una infección zoonótica mantenida en la naturaleza por primates no humanos y mosquitos de hábitos diurnos, tales como *Haemagogus* spp. en América y *Aedes* spp. en África. Diferentes primates selváticos en las Américas presentan los efectos viscerotrópicos del virus. La transmisión enzoótica ocurre entre monos y mosquitos y cuando penetra el ser humano en la selva ocurre entre mono-mosquito-humano. El ciclo urbano o epidémico se establece cuando un humano virémico entra en una zona con suficiente población humana susceptible y presencia del vector *Ae. aegypti*, tal como ocurre con el dengue.

La enfermedad confiere inmunidad de por vida. La inmunidad pasiva transitoria conferida por la madre inmune al recién nacido se prolonga durante seis meses. Hay disponible una vacuna contra la fiebre amarilla; una sola dosis subcutánea de vacuna integrada por virus atenuados de la cepa 17D, induce en 10 días la producción de anticuerpos específicos protectores. La inmunidad después de la vacunación es probablemente de por vida, pero la validez legal es de 10 años. Dos son los criterios empleados para recomendar la vacunación contra fiebre amarilla a viajeros, por un lado proteger a estas personas de adquirir la infección al visitar las zonas de riesgo y por otro lado dificultar la dispersión del virus a nivel internacional. La vacunación contra la fiebre amarilla es segura, aunque se han observado efectos adversos tras la administración de la vacuna (síndrome visceral o neurológico) por lo que se han establecido contraindicaciones para su aplicación:

- Ser menor de 9 meses, debido a inmadurez del sistema nervioso y al teórico potencial neurotrópico del virus vacunal 17D.
- Desarrollar reacciones alérgicas a proteínas del huevo
- Presentar condiciones severas de inmunosupresión
- Aplicación simultánea con otras vacunas con virus vivos como la de sarampión

- Presentar alteraciones funcionales en la glándula del timo
- Primer trimestre de embarazo

Si existe alguna de las condiciones anteriores, el médico deberá ponderar en cada caso individual el riesgo de exposición contra el riesgo de inmunización y considerar otros medios alternativos de protección.

4.3. VIRUS CHIKUNGUNYA

El virus chikungunya (CHIKV) puede causar en el ser humano un síndrome febril que cursa con dolores articulares; es un virus transmitido por mosquitos, endémico en África y Asia desde donde ha sido importado a Europa, y producido brotes autóctonos en regiones en las que está presente el mosquito vector *Ae. albopictus*.

4.3.1. Aspectos virológicos. El CHIKV pertenece al serogrupo del virus del Bosque de Semliki dentro del género *Alphavirus* en la familia *Togaviridae*. Es un virus con envuelta y genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva de unas 11,7 Kb con dos marcos de lectura abierta flanqueados por regiones no traducidas en los extremos 5' y 3'. La traducción de la región codificante del extremo 5' da lugar a 4 proteínas no estructurales encargadas de la replicación y modulación de las respuestas antiviricas celulares, mientras que la región del extremo 3' da lugar a un ARN subgenómico que se traduce dando lugar a 3 proteínas estructurales denominadas C (Cápsida), E1 y E2 (glicoproteínas de la Envoltura). Existen dos linajes principales: uno circulante en África Occidental y el otro en el Este, Centro y Sur del continente (genotipo ECSA) así como en Asia (donde ha evolucionado independientemente constituyendo una variante diferente a la africana). Su origen es africano habiéndose introducido en Asia desde el África Oriental. Desde esta zona se exportó también a las islas del Océano Índico donde produjo importantes brotes en torno a 2004. Durante esta epidemia, por un proceso de evolución adaptativa, se produjo una mutación en la proteína E1 (A226V) que parece haber dado una ventaja evolutiva al virus en cuanto a su replicación en el mosquito *Ae. albopictus*, que fue el principal vector en dicha epidemia. Posteriormente se vio que la epidemia que tuvo lugar en la India en el periodo 2005-2006 se originó también a partir de cepas circulantes en África Oriental y, en 2007 la misma mutación apareció tras un proceso de evolución convergente.

4.3.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos. El CHIKV puede producir cuadros febriles cuya característica fundamental es la aparición de manifestaciones cutáneas y artralgias en ocasiones incapacitantes y de larga duración. El periodo de incubación es de 1 a 12 días, con una media de 4 a 7 días. Los principales síntomas clínicos consisten en la aparición repentina de fiebre alta (>38,5°C), dolor de cabeza y espalda, mialgia y artralgia severa (que afecta principalmente a las extremidades).

Alrededor de la mitad de los casos desarrollan una erupción maculopapular. Los síntomas desaparecen generalmente entre los 7 y 10 días del inicio, aunque puede presentarse una fase crónica en la que la artralgia puede durar varios meses. Entre las complicaciones posibles destacan los trastornos gastrointestinales, la descompensación cardiovascular o la meningoencefalitis. Se ha registrado algún caso mortal, principalmente en pacientes de edad avanzada o en casos con problemas inmunológicos.

El virus se transmite mediante la picadura de mosquitos del género *Aedes*. Las especies *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* son los principales vectores de este virus. Una característica importante del mismo es que es de los pocos arbovirus junto al DENV y al YFV para los que el ser humano constituye un reservorio eficaz por lo que se pueden establecer ciclos urbanos con cierta facilidad a partir de un viajero infectado que llega en fase virémica a una zona donde circule el mosquito vector. La expansión de *Ae. albopictus* así como el nivel de viremia que este virus alcanza en el huésped humano son dos de los factores causales de la emergencia y/o re-emergencia del virus en diversas partes del mundo.

El virus se descubre en 1953 tras un brote de enfermedad febril en Tanzania. Desde entonces se han repetido los brotes en África y en el Sudeste Asiático con intervalos de entre 2 y 20 años. Se distribuye geográficamente en África, la India y el Sudeste Asiático, zonas endémicas también para el DENV por lo que debido a las similitudes clínicas con la infección por el DENV su incidencia ha sido subestimada por un diagnóstico clínico equivocado.

Dos epidemias destacables por su magnitud fueron la que tuvo lugar en la República Democrática del Congo entre 1999 y 2000 que afectó a unas 50.000 personas y la posterior en 2000-2003 en Indonesia. En el 2004 comenzó un proceso de expansión global caracterizado por diversas epidemias que han afectado a unos 5-10 millones de personas. En 2004, desde Kenia, se produce la llegada a las islas del Océano Índico, de una nueva variante del virus, adaptada al vector *Ae. albopictus*. El virus causa entonces importantes epidemias también en la India, Sudeste Asiático y China. En 2007, llega a Italia desde la India a través de un viajero en fase virémica, y produce más de 200 casos siendo *Ae. albopictus* el vector implicado en la transmisión del virus. Posteriormente, en 2010, se describe la aparición de un segundo brote de infección autóctona en Europa, en esta ocasión sólo se ven afectadas dos personas en Francia, y de nuevo, se sospecha que es un viajero en fase virémica procedente de la India quien origina el brote. Otra epidemia importante se produce cuando el virus del genotipo ECSA llega a Camerún en 2006 y desde allí a Gabón (2007) causando más de 20.000 casos. Por otra parte, en el 2006 se produce en Malasia una gran epidemia causada por el subtipo asiático que desde entonces no ha sido asociado a epidemias masivas en lo que parece haber sido un

desplazamiento competitivo de esta variante por la circulante en las islas del Océano Índico.

En nuestro país, el vector *Ae. albopictus* se halla presente al menos desde 2004, cuando se detecta por primera vez en Sant Cugat del Vallés (Barcelona). A finales del 2012 el vector se había establecido en muchos municipios de la costa mediterránea (de Gerona a Murcia con la excepción de Valencia) y de Mallorca. Desde 2006 se empiezan a diagnosticar casos importados en España. La mayoría de ellos se detectaron en 2006 y 2007 coincidiendo con los brotes ocurridos en las Islas Occidentales del Océano Índico y en la India, zonas desde donde se importaron la mayoría de los casos (6 y 20 casos, respectivamente). La mitad de los casos llegó a las zonas en las que sabemos que hay presencia del vector. Los antecedentes de circulación autóctona en regiones europeas con presencia del vector *Ae. albopictus* han llevado a las autoridades sanitarias de nuestro país a la aprobación en 2013 de un Protocolo de vigilancia encaminado a evitar la aparición de casos secundarios y a la prevención del asentamiento del CHIKV en nuestro territorio.

4.4. VIRUS LASSA

El virus Lassa (LASV) es el agente etiológico de la fiebre de Lassa, enfermedad febril transmitida a través de roedores infectados. La enfermedad es endémica en el Oeste de África desde donde se originan anualmente casos importados de fiebre hemorrágica.

4.4.1. Aspectos virológicos. El LASV pertenece al género *Arenavirus*, único género en la familia *Arenaviridae*. Se incluye dentro del serocomplejo de los arenavirus del Viejo Mundo donde también se agrupa el LCMV de distribución mundial y el virus LuJo, virus recientemente descubierto que se asocia a cuadros de fiebre hemorrágica en humanos. Se han descrito otros arenavirus asociados a brotes de fiebre hemorrágica en América que se agrupan en el serocomplejo de los arenavirus del Nuevo Mundo (Tabla 1). Por estudios genéticos se han identificado cinco linajes de LASV, en tres de ellos se incluyen cepas que circulan en Nigeria, el cuarto linaje agrupa secuencias genéticas de las cepas detectadas en el resto de países endémicos, Liberia, Guinea y Sierra Leona y al quinto linaje corresponde un cepa aislada de un caso importado de Costa de Marfil. Se ha observado una gran variabilidad genética en el LASV que ha de ser considerada en el diseño de los métodos moleculares de detección y en su aplicación para el diagnóstico.

4.4.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos. El LASV causa un síndrome febril que puede evolucionar a una fiebre hemorrágica. Se le considera un virus de elevado riesgo biológico (nivel 4 en una escala del 1 al 4) dado que no hay disponible tratamiento farmacológico específico ni vacunas y el riesgo de transmisión a la colectividad es elevado, pues el virus puede transmitirse directamente entre los seres humanos.

La fiebre de Lassa presenta un periodo de incubación de 6 a 21 días. La infección es asintomática o cursa como un síndrome pseudogripal con fiebre en torno a los 39°C en el 80% de las personas infectadas, pero un 20% de los pacientes puede desarrollar fiebre hemorrágica. En estos pacientes la fiebre va acompañada con faringitis, dolor muscular, torácico y abdominal, vómitos y diarrea, también pueden aparecer lesiones ulcerosas en la mucosa bucal, hemorragias en las encías y conjuntiva y la presencia de eritema en la cara, el tronco o los brazos; a menudo hay afectación hepática y renal, con dolor a la palpación; algunos pacientes desarrollan síntomas neurológicos. En los pacientes se detectan altos niveles de enzimas hepáticas siendo los niveles de AST mucho mayores que los de ALT, también se observa proteinuria, trombocitopenia, leucopenia y moderada hemoconcentración. La patogenia de la enfermedad está relacionada, principalmente, con las lesiones del endotelio vascular y una hemostasia deficiente, la lesión de los macrófagos y las células dendríticas y se observa un insuficiente volumen sanguíneo y fallo multiorgánico. En la patogenia de la enfermedad también se sospecha la alteración del proceso inflamatorio, dados los niveles de citoquinas alterados que se detectan en los pacientes. El índice de mortalidad en embarazadas se estima entre el 7% al 30%, según avanza la gestación. La mortalidad del feto es muy elevada, oscilando entre el 75% y el 90%. El tratamiento con ribavirina puede reducir el pronóstico de mortalidad de la enfermedad de un 55% a un 5% si se administra en los 5 primeros días tras la aparición de los síntomas.

La fiebre de Lassa es una enfermedad endémica en el Oeste de África, (Nigeria, Guinea, Liberia y Sierra Leona), donde se ha estimado que entre 300.000 a 500.000 personas al año se pueden infectar, siendo el índice de mortalidad entre el 1-10% sin embargo, la mortalidad es mayor entre los casos hospitalizados (80%). La especie de roedor que actúa como reservorio en el ciclo de vida del LASV es *Mastomys natalensis*. Los seres humanos se infectan al inhalar aerosoles contaminados con excretas de roedores infectados o por contacto con los roedores infectados a través de mucosas, por consumo de alimentos contaminados con orina o excretas de roedores. En las zonas endémicas es práctica común el consumo, como alimento, de este roedor, por lo que la caza de los mismos supone una actividad de riesgo para adquirir la infección.

La importación de casos de fiebre de Lassa no es infrecuente. De hecho, se han descrito en áreas no endémicas al menos 30 casos importados hasta 2012, aunque probablemente hayan sido muchos más los casos reales, dadas las elevadas tasas de infección sin manifestaciones hemorrágicas e incluso asintomática y el hecho de que los pacientes pueden excretar el virus durante 3 a 9 semanas en su orina.

Dado que la infección se produce en áreas también afectadas por paludismo, es esencial realizar el diagnóstico diferencial entre ambos agentes ante la presencia de un paciente febril que ha regresado

hace menos de 21 días de un área endémica en la que se sospeche la circulación activa del LASV. Cualquier sospecha debe notificarse de inmediato a las autoridades sanitarias, que establecerán las medidas de contención de la infección en torno al caso sospechoso. El aislamiento del paciente y el uso de equipos de protección para la atención del paciente evitan las infecciones secundarias que son tan frecuentes y tienen tan elevadas tasas de mortalidad en las áreas endémicas.

5. DIAGNÓSTICO DE LAS ARBOVIROSIS Y ROBOVIROSIS

Antes de entrar en las particularidades del diagnóstico de las infecciones por VTVs hay que hacer hincapié en las consecuencias que puede tener para la salud pública la detección de un virus de elevado riesgo biológico (fiebre hemorrágica viral) o que pueda iniciar un ciclo de circulación autóctona en aquellas regiones en las que está presente su vector de transmisión.

En caso de sospecha de fiebre hemorrágica viral en España se debe contactar inmediatamente con las autoridades sanitarias y con el Laboratorio Nacional de Referencia (CNM, Instituto de Salud Carlos III), que orientarán sobre la toma, procesamiento y envío de las muestras al laboratorio para su diagnóstico. Recientemente se ha aprobado un Protocolo de vigilancia de las fiebres hemorrágicas s (FHV) así, cuando se detecte un caso probable de FHV, el servicio de Vigilancia de la Comunidad Autónoma lo comunicará de forma urgente al Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES) del Ministerio de Sanidad y Servicios Sociales e Igualdad y al Centro Nacional de Epidemiología. El CCAES valorará junto con las Comunidades Autónomas afectadas las medidas a tomar y si fuera necesario su notificación al Sistema de Alerta y Respuesta Rápida de Unión Europea y a la Organización Mundial de la Salud de acuerdo con el Reglamento Sanitario Internacional de 2005.

El laboratorio de microbiología debe asumir también la **responsabilidad de notificar** cualquier hallazgo de un virus importado en un paciente que puede haber iniciado un ciclo de transmisión autóctona en un área en la que está presente su vector de transmisión (DENV, CHIKV) y de los casos de infección por VTVs autóctonos para establecer las medidas de control de la infección. La **confirmación de los resultados** por parte del Laboratorio Nacional de Referencia es, además de obligatoria, de crucial importancia para las actividades de vigilancia microbiológica a escalas nacional e internacional. Finalmente, si el laboratorio no dispone de la metodología de diagnóstico del patógeno sospechado, debe enviar muestras al Laboratorio Regional o Nacional de Referencia, que se hará cargo del diagnóstico etiológico y de la notificación de los resultados. El Laboratorio Nacional de Referencia apoyará a los laboratorios de microbiología que lo demanden no sólo en éstos casos, sino también transfiriendo metodología para el diagnóstico de los virus transmitidos por vector y

facilitando el control de calidad de los reactivos utilizados.

En el diagnóstico del VTVs es imprescindible conocer información sobre posibles viajes realizados por el paciente así como conocer antecedentes en la exposición a animales, esta información orienta al laboratorio en la selección de análisis para identificación del agente causal, así como en la interpretación de los resultados de diagnóstico obtenido. Otra información muy preciada consiste en conocer la fecha de inicio de los síntomas dado que orientará en la selección del tipo de métodos, directos o indirectos, a emplear en el laboratorio.

En cuanto a los **marcadores de infección**, el diagnóstico puede basarse en la detección del propio agente infeccioso o de la respuesta inmune frente a la infección. Como norma general, debe considerarse que la detección del virus da menos rendimiento diagnóstico que la detección de anticuerpos IgM, muy rentable a partir del quinto día tras la aparición de los primeros signos de infección. En ambos casos, el diagnóstico tiene limitaciones que el microbiólogo debe conocer. La principal limitación que presenta la detección directa está en relación con la corta duración de la viremia y el bajo título que alcanzan los virus en sangre; los altos títulos de viremia que alcanza el CHIKV y los productores de fiebres hemorrágicas suponen una excepción. Por otra parte, los métodos indirectos se topan con la limitación de la reactividad antigénica cruzada observada no sólo entre los arbovirus sino también entre los robavirus del mismo género lo que dificulta el diagnóstico específico y se requiere el empleo de ensayos de neutralización que consumen tiempo en la obtención del resultado. El aislamiento del virus es considerado el método de elección que confirma el diagnóstico de una infección por los VTVs, sin embargo, el tiempo necesario para conseguir el aislamiento del virus e identificar el agente hace ineficiente esta técnica para el manejo clínico del paciente.

La **detección del virus** debe intentarse en las muestras tomadas durante la fase aguda de la infección, mientras el paciente tiene fiebre, usando métodos de detección de antígeno, de genoma o por cultivo del virus en líneas celulares procedentes de mosquito o de vertebrado. Todos estos métodos tienen sus limitaciones, aunque existen métodos comerciales con sensibilidad y especificidad adecuadas que pueden fácilmente implementarse en el laboratorio de microbiología. Las muestras de fase aguda son esenciales además en los programas de **vigilancia microbiológica** nacionales e internacionales.

Una vez que desaparece el virus del torrente sanguíneo, se hace evidente la **respuesta de anticuerpos**, que durará semanas o meses (IgM) o incluso años (IgG). La serología debe intentarse siempre que sea posible, pues es **el método con mayor rendimiento diagnóstico** para los VTVs. La excepción a la elección de los métodos de detección de anticuerpos lo presenta el diagnóstico de los cuadros de fiebre hemorrágica viral, en los que los

métodos de detección directa son los únicos aplicables en los pacientes con enfermedad letal.

El papel del microbiólogo en los hospitales es esencial para reforzar no sólo el **diagnóstico**, sino la **vigilancia** y el **control** de estas enfermedades. Dada la importancia de la vigilancia microbiológica de las enfermedades transmitidas por vector, el CNM ha puesto en marcha un programa que no tiene coste para el hospital, basado en el estudio de los casos sospechosos.

5.1. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Las muestras adicionales que resultan apropiadas para la investigación de los VTVs se seleccionarán en función del síndrome clínico observado dado que la muestra de elección es el suero. En general, se deben obtener, siempre que sea posible, muestras en la fase aguda de la enfermedad (suero y muestras biológicas complementarias, según el síndrome). El estudio de muestras tomadas en la fase convaleciente puede ayudar en algunos casos a establecer un diagnóstico (tabla 2).

Tabla 2. Muestras empleadas para el diagnóstico en función del tipo de síndrome clínico observado.

Síndrome	Fase aguda	Fase convaleciente
Febril	Suero	(1)
Neurológico (2)	Suero, LCR	(1)
Renal	Suero, Orina	(1)
Pulmonar	Suero, LBA*	(1)
Hemorrágico (3)	Consultar (3)	(3)

*Lavado broncoalveolar

- (1) El estudio de esta muestra puede ser necesario para establecer el diagnóstico etiológico final si los resultados obtenidos en la fase aguda de la enfermedad no fueran concluyentes.
- (2) Suero y LCR deben obtenerse simultáneamente para poder estudiar la producción intratecal de anticuerpos. Este estudio es necesario en determinadas situaciones, como la presencia de una patología neurológica asociada a la vacunación frente la fiebre amarilla.
- (3) Las muestras obtenidas se enviarán urgentemente al CNM siguiendo la normativa de materiales biológicos Clase A. El laboratorio recomienda tomar las siguientes muestras, que servirán para la detección urgente de virus de elevado biológico, y de antígenos de plasmodio y de leptospira y para la realización de estudios complementarios posteriores: sangre anticoagulada con citrato: 2 viales de 10 ml, sangre coagulada: 2 viales de 10 ml (no centrifugar para evitar la formación de aerosoles en el laboratorio), orina: 2 viales con 10 ml y en caso de enfermedad que afecte preferentemente a un órgano, consultar con el CNM.

El suero debe tomarse en fase aguda de la enfermedad, en los primeros días tras inicio de los síntomas (hasta el quinto a séptimo día), y en fase convaleciente 10 a 14 días después. El LCR debe tomarse en las primeras 72 h tras inicio de los síntomas y enviarse inmediatamente al laboratorio para su procesamiento.

Es imprescindible una buena conservación de las muestras hasta su análisis (4°C si se tarda en procesar menos de 48-72 horas y a -70°C si el proceso se demora más), con objeto de asegurar la infectividad de las partículas y la integridad del ARN vírico. Las muestras destinadas a estudios serológicos pueden conservarse a -20°C.

5.2. AISLAMIENTO MEDIANTE CULTIVO

El aislamiento en el laboratorio de los VTVs a partir de las muestras clínicas se puede realizar mediante técnicas de cultivo celular en los laboratorios con instalaciones de seguridad biológica adecuados para el virus sospechado, así el cultivo de los WNV, LCMV, DENV y CHIKV analizados en este documento, requiere disponer de un laboratorio de nivel 3 de bioseguridad (tablas 1 y 3). Sin embargo, la manipulación de muestras clínicas que no implique la replicación de los virus se puede realizar en un laboratorio de nivel 2 de bioseguridad, con prácticas adecuadas.

El aislamiento del virus en cultivo, aparte de su interés diagnóstico permite realizar estudios de caracterización biológica, antigénica, molecular y genética de los nuevos virus que hayan sido detectados.

En el caso de emplear muestra de suero o sangre es necesario que haya sido recogida, en general, durante los 5-7 primeros días de inicio de los síntomas. El LCR no es una muestra en la que sea fácil recuperar virus en cultivo dadas las bajas cargas víricas y la escasa vida media de los virus envueltos en esta muestra biológica. Para alguno de los virus mencionados, como el LCMV el rendimiento del cultivo en líneas celulares es muy bajo.

Los VTVs son capaces de infectar y producir efecto citopático (ECP) en varias líneas celulares de vertebrados como: Vero (riñón de mono verde africano), HeLa (tumor uterino humano), BHK-21 (riñón de hámster), CV-1 (riñón de mono *Cercopithecus aethiops*), y LLC-MK2 (riñón de mono Rhesus). También se pueden aislar los VTVs en ratones inoculados intracerebralmente. Para el aislamiento de los virus transmitidos por mosquitos (WNV, DENV, YFV y CHIKV) se utilizan además líneas celulares de mosquito como son las líneas C6/36 HT (derivadas de *Ae. albopictus*), AP61 (derivadas de *Ae. pseudoscutellaris*) y para DENV además, se utiliza la línea TRA-284 derivada de *Toxorhynchites amboinensis*, entre otras (tabla 3). Tras la detección de ECP, la identificación específica del virus se realiza por técnicas de biología molecular, por pruebas de neutralización del crecimiento del virus o por inmunofluorescencia (IF) usando anticuerpos específicos, aunque esta última técnica tiene limitaciones en cuanto a su posible

especificidad. A continuación se apuntan algunas características que se han de considerar ante la identificación del agente etiológico empleando técnicas inmunológicas:

WNV: antigénicamente está muy relacionado con los virus del grupo de la encefalitis japonesa, grupo al que pertenece, tales como el propio JEV, el USUV o el SLEV. Existe un cierto grado de reactividad cruzada en los ensayos de fijación del complemento e IF y la forma de identificarlos inequívocamente mediante métodos serológicos consiste en la obtención de diferencias significativas (4 veces) en la prueba de neutralización del crecimiento del virus.

TOSV: antigénicamente está muy relacionado con el SFNV, con el que existe un alto grado de reactividad cruzada en determinadas pruebas como son la reacción de fijación del complemento e IF. No obstante, ambos virus, además de presentar diferencias biológicas, presentan diferencias inmunológicas mediante el test de neutralización de reducción de placas. El tratamiento con dimetilsulfóxido (DMSO) no afecta al tamaño de las placas que produce el TOSV, a diferencia de lo que ocurre con el SFNV que con la adición de DMSO aumenta tanto el tamaño como el número de placas formadas.

DENV: la prueba de IF o IF indirecta (IFI), es la técnica más empleada para la identificación del DENV en cultivo. Para la IF directa se dispone de un anticuerpo policlonal marcado con fluoresceína (FITC). Para la IFI, se dispone de anticuerpos monoclonales que están disponibles comercialmente en forma de complejo anti-dengue (Chemicon Int. Inc, Temecula, CA, USA), el cual detecta de forma genérica todos los serotipos o en forma individual para la tipificación de cada uno de los serotipos.

CHIKV: para la identificación inmunológica hay que tener en cuenta la reactividad cruzada con otros miembros del serogrupo al que pertenece, fundamentalmente con el virus O'Nyong nyong (ONNV) que produce también un cuadro clínico similar y con el que comparte la distribución geográfica en África y el vector de transmisión. Durante la fase aguda de la enfermedad este virus produce viremias de alto título por lo que debe extremarse el cuidado en su manejo para evitar contaminaciones.

5.1. DETECCIÓN DE ANTÍGENO

Las tecnologías basadas en el reconocimiento de un componente vírico (proteína o ácido nucleico) o de la partícula del virus en su totalidad son útiles en etapas tempranas de la infección, antes de que la respuesta inmune haga desaparecer a las partículas víricas, por lo que la fecha de la toma de muestra, principalmente suero, ha de ser, en general, entre los 5-7 primeros días de inicio de los síntomas.

Tabla 3. Arbovirus y robovirus, nivel de riesgo biológico, líneas celulares y tiempo de observación del efecto citopático.

Virus	Riesgo biológico	Tipo de línea celular	T ^a	Observación de efecto citopático
TOSV	2	Vero, BHK 21, CV-1 LLC-MK	37°C	2-4 días 6-7 días
WNV	3	Vero, BHK, C6/36 HT	37°C 33°C	6 días 6 días
LCMV	3	Vero, BHK	37°C	3-5 días, el virus crece sin efecto citopático (ECP) aparente
DENV	3	C6/36 C6/36 HT AP61 TRA-284 Vero, BHK-21, LLC-MK2	28°C 33°C 28°C 28°C 37°C	5-10 días dependiendo del serotipo y genotipo viral. El ECP puede variar desde un efecto inaparente, con formación de sincitios o un levantamiento de la monocapa en el caso de cepas muy virulentas.
YFV	3	Vero, BHK, LLC-MK C6/36	37°C 28°C	8 días 10 días
CHIKV	3	Vero, BHK21, HeLa C6/36	37°C 28°C	3-4 días 3-4 días

Los métodos basados en la detección de antígeno presentan la ventaja de permitir obtener un resultado rápido, generalmente en unas pocas horas después de la recepción de la muestra. Como contrapartida, estos resultados pueden ser difíciles de interpretar debido a la reactividad antigénica cruzada que existe entre las especies del mismo género vírico como ocurre con los flavivirus (WNV, DENV o YFV, entre otros), interpretación de resultados que se complica si distintas especies del mismo género vírico circulan en la misma zona geográfica (tabla 1).

Las técnicas de detección de antígeno basadas en métodos inmunohistoquímicos han sido especialmente útiles en los casos en que no se ha podido establecer el diagnóstico por otras vías o para demostrar la infección vírica en síndromes complejos, como el síndrome visceral tras vacunación frente al YFV o en infecciones asociadas a trasplante de órganos por el LCMV o por el WNV.

El desarrollo y comercialización de métodos de detección de antígeno de los VTVs se ha centrado principalmente sobre el DENV y los VTVs neurotrópicos americanos (WNV, SLEV, virus de la encefalitis equina del este (EEEV), virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) y el virus de la encefalitis equina del oeste (WEEV). En Estados Unidos se comercializa un método para la vigilancia de la circulación de los VTVs neurotrópicos en mosquitos. El método usa una tira recubierta con anticuerpos frente a los WNV, SLEV y VEEV y es rápido y de fácil manejo, aunque menos sensible que el uso de métodos moleculares.

Para la detección de antígeno del WNV también se ha desarrollado un sistema dirigido a la proteína E

basado en el reconocimiento a partir de un nanobiosensor electroquímico utilizando una membrana de alúmina y se ha observado que el límite de detección lo hace comparable a las técnicas de PCR.

Sin embargo, actualmente, tanto para la detección del DENV como para la de otros flavivirus, el antígeno NS1 suele ser la diana de elección, por tratarse de un antígeno soluble que generalmente se encuentra de forma abundante durante la infección. En este caso, además, los ensayos suelen generar resultados específicos, con niveles muy bajos de reactividad cruzada entre los diferentes flavivirus. En el caso de la detección de la proteína NS1 del DENV puede realizarse desde el día 1 hasta el día 11 de inicio de los síntomas y están disponibles numerosos equipos comerciales basados en técnicas inmunoenzimáticas así como inmunocromatográficas (tabla 4).

5.2. DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las técnicas moleculares basadas en la detección del genoma vírico han supuesto un enorme avance también en el diagnóstico de las infecciones producidas por los VTVs, dada la rapidez en la obtención de resultados, su especificidad y sensibilidad. Son consideradas de elección en el diagnóstico rápido en los primeros días de la enfermedad, aunque han de ser complementadas con los resultados procedentes de los métodos serológicos dada la corta viremia que caracteriza a la mayoría de las infecciones producidas por este grupo de virus.

Tabla 4. Métodos comerciales disponibles para la detección del antígeno NS1 de dengue

Denominación	Fabricante/ catalogo	Descripción	Muestra	Sensibilidad*	Especificidad*
Platelia™ Dengue NS1 Ag test	BIORAD/72830	Detección cualitativa o semicuantitativa del antígeno NS1 (inmunoenzimático)	Suero y plasma	63-91%	100%
Dengue NS1 Ag Strip	BIORAD/880094	Detección cualitativa del antígeno NS1 (Inmuncromatografía de flujo lateral)	Suero y plasma	67,8-92,3%	89-100%
Pan-E™ Dengue Early	Alere &PanBio	Detección cualitativa del antígeno NS1 (inmunoenzimático)	Suero	63-100%	96,2-100%
Dengue Early rapid	Alere & PanBio	Detección cualitativa del antígeno NS1 (inmucromatografía)	Suero	62,9-68,9%	96-96,8%
SD BioLine, Dengue Ag NS1 ELISA	Standard Diagnostic /11EK50	Detección cualitativa del antígeno NS1 (inmunoenzimático)	Suero	68-98%	94,6-98,3%
SD BioLine, Dengue NS1 Ag WB	Standard Diagnostic /11FK50	Detección cualitativa del antígeno NS1 (Inmuncromatografía)	Sangre, suero y plasma	51-98%	96,7-100%
SD BioLine, Dengue Duo NS1Ag+Ab combo	Standard Diagnostic /11FK46	Detección simultanea del antígeno NS1 y de IgM/IgG (inmucromatografía)	Sangre, suero y plasma	80,7-84%	89,1-98%

*según laboratorio fabricante

Se han desarrollado numerosos métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tanto en el formato PCR convencional como en el formato PCR en tiempo real. Estas técnicas abordan la detección de virus bien a nivel de género, capaces de detectar cualquier especie dentro de un mismo género vírico, o bien dirigidas a detectar específicamente un único virus. En los métodos genéricos, con la PCR convencional la secuenciación del producto obtenido permite la identificación de la especie del virus implicada en la infección. Con la PCR en tiempo real la identificación del agente causal se realiza en función del tipo de fluorescencia emitida por la sonda que reconoce específicamente el producto amplificado o analizando la curva de desnaturalización del producto.

Para ambos tipos de métodos se requiere un paso de transcripción reversa y, en el diseño del método, una rigurosa selección de los cebadores dada la variabilidad genética que presentan los VTVs al contener genomas de ARN y evolucionar por separado en diferentes ecosistemas. El paso de transcripción reversa (RT) supone la transformación de ARN en ADN y este paso se puede acoplar a la PCR (*one-step*), o bien puede realizarse independientemente, en una reacción previa a la reacción de amplificación genómica.

La PCR en tiempo real comienza a desplazar a la RT-PCR convencional, que muchas veces requiere la aplicación de una PCR secuencial (PCR anidada o *nested-PCR*) para alcanzar una sensibilidad similar, lo que comporta más carga de trabajo, un incremento del tiempo necesario hasta la obtención de los resultados y un mayor riesgo de contaminaciones.

Hay disponibles métodos comerciales de PCR en tiempo real para los WNV, DENV, CHIKV, JEV, hantavirus, y virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, entre otros. La mayoría de ellos utilizan sondas de hibridación TaqMan como sistema de marcaje específico del producto amplificado, algunos han sido empleados en ensayos de control de calidad dirigidos por una red europea de laboratorios especializados en el diagnóstico de las infecciones tropicales (*European Network for Diagnostics Imported Viral Diseases*); sin embargo la mayoría de los métodos desarrollados siguen siendo técnicas "caseras" que ofrecen resultados óptimos de sensibilidad y especificidad. Aunque para el diagnóstico en el laboratorio la PCR en tiempo real se ha impuesto a las clásicas técnicas de PCR, para la realización de estudios de epidemiología molecular y variabilidad genética es preferible la utilización de la PCR convencional que permite la obtención de fragmentos genómicos de mayor

tamaño portadores de información filogenética de contrastada calidad.

Otras estrategias metodológicas desarrolladas para la detección de genoma de los VTVs utilizan técnicas de amplificación isotérmica tales como NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*), TMA (*Transcription-Mediated Amplification*) y RT-LAMP (*Retrotranscription Loop-mediated isothermal AMPlification*). Las técnicas NASBA y TMA consisten en la amplificación del genoma durante un proceso isotérmico, a una temperatura entre 41°C a 60°C, en presencia de tres enzimas: transcriptasa, polimerasa y ARNasa. La técnica LAMP consiste también en un proceso isotérmico en el que la síntesis de nuevas cadenas se consigue utilizando un enzima con capacidad de desplazar la hebra de ADN y 4 cebadores cuyo diseño permite la obtención de una horquilla o *loop* de ADN. Alguna de esta metodología se ha desarrollado para detectar los WNV, DENV, CHIKV. En Estados Unidos se ha comercializado una TMA para el análisis de la presencia de genoma del WNV en muestras de donantes de sangre y de órganos y recientemente esta metodología se está ensayando para la detección del DENV en donantes de sangre en Puerto Rico. En la tabla 5 se muestra una selección de métodos de detección de ácidos nucleicos para los virus mencionados en el documento.

5.3. DETECCIÓN DE RESPUESTA INMUNOLÓGICA HUMORAL

Desde pocos días después del inicio de los síntomas empieza a ser detectable una respuesta de anticuerpos específicos. En un primer momento son del isotipo IgM, anticuerpos que son de rápida aparición (normalmente entre 5 y 7 días desde el comienzo de la sintomatología) y, en general, de corta duración (2-4 meses), seguidos por anticuerpos del isotipo IgG, que permanecen detectables durante toda la vida. Para muchos de los VTVs, dado su corto periodo de viremia, la serología basada en la detección de la respuesta de anticuerpos es el método diagnóstico de elección.

La muestra más adecuada para hacer el diagnóstico serológico es el suero, aunque en ocasiones se puede realizar sobre muestra de plasma. La detección de IgM es el marcador elegido para el diagnóstico de una infección reciente, en tanto que la respuesta IgG aislada es un indicador de una infección pasada, o de vacunación en su caso, siendo el marcador de aplicación para estudios de seroprevalencia. Cuando las muestras se toman muy cerca del comienzo de la enfermedad es frecuente la ausencia de respuesta detectable de IgM, por lo que es preciso analizar otra muestra tomada 7-10 días después; analizando las muestras pareadas se confirma la infección demostrando seroconversión de IgM o IgG específica. La respuesta IgM puede ser detectable varios meses después de la infección por los TOSV, WNV, DENV y CHIKV, lo que origina dificultades para interpretar el resultado como una infección aguda. Los flavivirus muestran un alto grado de reacción cruzada, dependiendo la

intensidad de esta reactividad del grado de purificación del antígeno empleado, lo que supone que con frecuencia se puedan detectar reactividades múltiples. En la interpretación de los resultados serológicos frente a los flavivirus además ha de considerarse el antecedente de vacunación frente a alguno de ellos (JEV, TBEV y YFV).

En estas situaciones son especialmente útiles los ensayos de avidez de IgG, de aplicación para el WNV y el DENV. De cualquier forma, para la caracterización última de la respuesta serológica específica es preciso realizar la técnica de neutralización tanto para los flavivirus, como para el TOSV y los alphavirus, considerando en este último grupo de virus que tanto el CHIKV como el ONNV pueden ocasionar síndromes articulares. La técnica de neutralización se debe realizar en laboratorios expertos y adecuadamente equipados en términos de seguridad biológica dado el nivel 3 de riesgo biológico en el que se incluyen la mayoría de estos virus (tablas 1 y 3).

Dado el tropismo neurológico de alguno de los VTVs, la demostración de producción intratecal de anticuerpos es una herramienta aplicable para confirmar la infección del SNC por los WNV, TOSV, LCMV, TBEV, DENV y para el CHIKV.

Como ya se ha comentado, la especificidad de los ensayos depende en gran medida del grado de purificación de los antígenos empleados. Básicamente, para el diagnóstico serológico de las infecciones por estos virus se emplean tanto técnicas de IFI, en general empleando células infectadas por virus, como de ELISA, con extractos de células infectadas o más adecuadamente antígenos recombinantes. El uso de antígenos recombinantes es la aproximación más adecuada para conseguir minimizar las reactividades heterólogas, aunque no las evita totalmente.

Existen numerosos ensayos disponibles comercialmente para identificar la respuesta serológica frente a algunos de estos virus, basados en diferentes metodologías (IFI, ELISA, inmunocromatografía IC). Se carece sin embargo de métodos comerciales para otros muchos, entre ellos el LCMV; en éstos casos se pueden producir reactivos caseros utilizando antígenos obtenidos en laboratorios especializados y adecuadamente equipados. En la tabla 6, que no pretende ser exhaustiva, se presenta una lista de estos ensayos que pueden estar disponibles en los laboratorios españoles. Los fabricantes de algunos de estos ensayos contemplan su aplicación no sólo a la determinación de anticuerpos en muestras de suero o plasma, sino a la caracterización de la avidez de IgG específica y a la confirmación de producción intratecal de anticuerpos, mediante el ensayo de muestras de LCR. Un aspecto importante para seleccionar el método más adecuado para cada laboratorio es conocer las características de los ensayos disponibles, mediante estudios de validación realizados en laboratorios experimentados.

Tabla 5. Métodos moleculares basados en la amplificación de genoma vírico

Virus	Región del genoma	Método	Sensibilidad	Especificidad ensayada	Muestras clínicas, procedencia	Referencia
WNV	3'UTR linajes 1 y 2	TaqMan (One step)	10 cop/reacc	DENV3 y SLEV	Clínicas	Tang Y, 2006
	3'UTR linajes 1 y 2	TaqMan (One step)	10 ⁻² -10 ⁻³ PFU/ml	USUV, YFV y DENV	Clínicas	Jiménez-Clavero M, 2006
	5'UTR linajes 1 y 2	TaqMan (One step)	2 PFU/ml	JEV, SLEV, TBEV, DENV 1-4 y YFV	No	Linkes S, 2007
	5'UTR linajes 1 y 2	TaqMan (One step)	0,3-1,1 cop/reacc	JEV, YFV y TBEV	No	Eiden M, 2010
	NS5	TaqMan (One step)	0,007cop/ml	YFV y DENV1-4	Clínicas	Zaayman D, 2009
	NS2a/NS5	RT-PCR Ligasa	>100 cop/ml	TBEV, POWV, SLEV, YFV DENV 1-4, MVEV y JEV	Clínicas	Yen JV, 2010
	NS2a	TaqMan (One step)	0,3-1,1 cop/reacc	MVEV, YFV y TBEV	No	Eiden M, 2010
	E	RT-LAMP	0,1 PFU/reacc	DENV2, JEV y SLEV	Clínicas	Parida M, 2006
TOSV	Segmento L	Nested	1-10 cop/reacc	SFNV, SFSV, AGUV, PTV y RVFV	Italia y España	Sánchez-Seco MP, 2003
	Segmento S	TaqMan	7 cop/reacc	SFNV, SFSV, RVFV, ARBV, CHCV, MV, E30, Influenza A/B	España	Pérez-Ruiz M, 2007
	Segmento S	TaqMan (One step)	10-100 moléculas	ND*	No	Weidmann M, 2008
LCMV	Segmento S (gen N)	Nested	ND*	ND*	No	Ledesma J, 2009
	Segmento S (gen N)	TaqMan (One step)	< 50 cop/reacc	LASV, TACV, MACV, WWAV, LATV y PICV	Clínicas	Cordey S, 2011
DENV	E/NS1	Nested	100 cop/reacc	No especificado	Clínicas	Domingo C, 2011
	C/preM	Nested	<10 ³ TCDI50	WNV, JEV, SLEV, YFV y EGV	Puerto Rico y Sudeste Asiático	Lanciotti R, 1992
	C	Nested	1-50 PFU/ml	DENV 1-4	Clínicas	Harris E, 1998
	3'NCR	TaqMan	0,4-1,2 x 10 ⁶ PFU/ml	JEV, SLEV WNV, YFV, VEEV, EEEV EEEV y WEEV	No	Johnson B, 2005
	3'NCR	TaqMan	100-5000 cop/reacc	WNV, YFV, LIV y JEV	Clínicas	Leparc I, 2009
	3'NCR	TaqMan	0-8000 cop/ml	ND*	Clínicas	Drosten C, 2002
YFV	Gen E	Semineste d	89 PFU/ml	DENV y SLEV	Brasil	Nunes MR, 2011
	NS5	SybrGreen (One Step)	8,9 PFU/ml	DENV y SLEV	Brasil	Nunes MR, 2011
	NS5	TaqMan (One step)	12 cop/reacc	DENV, TBEV y JEV	No	Mantel N, 2008
	5'UTR	TaqMan	25,9 PFU/ml	ND	Costa de Marfil y Brasil	Domingo C, 2012
	5'UTR	TaqMan (One Step)	10 cop/reacc	DENV, WNV, JEV, TBEV, VEEV, WEEV, CHIKV y ONNV	No	Weidmann M, 2010

Tabla 5 (continuación). Métodos moleculares basados en la amplificación de genoma vírico

Virus	Región del genoma	Método	Sensibilidad	Especificidad ensayada	Muestras clínicas, procedencia	Referencia
CHIKV	E1	RT-PCR convencional	100 cop/ml	ND*	India	Reddy V, 2012
	nsP4	TaqMan	10,5 cop/ml	RRV, ONNV, MAYV, SFV, SINV, WEEV, EEEV y VEEV	India, África e islas del Indico	Lanciotti R, 2007, Reddy V, 2012
	E1	RT-LAMP	20 cop	DENV1-4, JEV, WNV y SLEV	India	Parida M, 2007
	E1	TaqMan (One step)	3 cop/reacc	EV, HIV, HCV, HBV, CMV, EBV, HSV, VZV, DENV y WNV	Clínicas	Laurent P, 2007
	nsP1	SybrGreen	1 PFU/ml	ND*	No	Yang CF, 2010
	E1, nsP1, 5'NTR, nsP2	TaqMan (One step)	28 PFU 0,3PFU 0,3PFU 0,3PFU	SINV, SFV, MAYV, UNAV, OCKV, AURAV, RRV, NDUV, VEEV y EEV	No	Smith DR, 2009
	nsP1	TaqMan	3,8-5,3 cop/reacc	RRV, SINV, SFV, MAYV, VEEV, WEEV, EEEV, ONNV y BFV	Clínicas	Panning M, 2009 **

POWV (Powasan virus), AGUV (Aguacate virus), PTV (Punta Toro virus), ARBV (Arbia virus), CHCV (Chagres virus), MV (Mumps virus), E30 (Echovirus 30), TACV (Tacaribe virus), MACV (Machupo virus), WWAV (Whitewater arroyo virus), LATV (Latino virus), PICV (Pichinde virus), EHV (Edge Hill virus), LIV (Louping ill virus), EV (Enterovirus) HCV (hepatitis C virus), HBV (hepatitis B virus), CMV (citomegalovirus), EBV (Epstein-Barr virus), HSV (Herpes simplex virus), VZV (Varicella-zoster virus), SINV (Sindbis virus), SFV (Semliki forest virus), MYV (Mayaro virus), RRV (Ros river virus), UNA (Una virus), AURAV (Aura virus), OCKV (Ockelbo virus), BFV (Barmah Forest virus), NDUV (Ndumu virus)

*ND no hay datos disponibles

**Método comercializado (RealStar CHIKV RT-PCR; Astra Diagnostics, Hamburg Germany)

Tabla 6. Métodos comerciales serológicos basados en la detección de anticuerpos

Virus	Fabricante	Ensayo	Marcador	Antígeno
YFV	Eurolmmun	IFI	IgM, IgG, Avidéz de IgG	Células infectadas
JEV	Eurolmmun	IFI	IgM, IgG, avidéz de IgG	Células infectadas
	Eurolmmun	ELISA	IgM (i), IgG (i)	gE extraída con detergente
	InBios	ELISA	IgM (c), IgG (i)	Antígeno recombinante
TBEV	Siemens	ELISA	IgM (i), IgG (i)	Antígeno vírico inactivado
	Eurolmmun	ELISA	IgM (i), IgG (i)	Proteínas purificadas
	Serion	ELISA	IgM (i), IgG (i)	No especificado
	IBL	ELISA	IgM (i), IgG (i)	Virus no inactivado
	Eurolmmun	IFI	IgM e IgG	Células infectadas
WNV	Focus	ELISA	IgM (c), IgG (i)	Antígeno recombinante
	Panbio/Alere	ELISA	IgM (c), IgG (i)	Antígeno recombinante
	InBios	ELISA	IgM (c), IgG (c)	Antígeno recombinante
	Eurolmmun	ELISA	IgM (i), IgG (i)	gE extraída con detergente
	Panbio/Alere	IFI	IgM e IgG	Células infectadas
	Eurolmmun	IFI	IgM, IgG, avidéz de IgG	Células infectadas
DENV	InBios	ELISA	IgM (c), IgA (c), IgG (i)	Antígeno recombinante
	Eurolmmun	ELISA	IgM (c), IgG (i)	Partículas víricas purificadas
	Eurolmmun	IFI	IgM, IgG, avidéz de IgG	Células infectadas. Permite analizar los 4 tipos simultáneamente.
	Panbio/Alere	ELISA	IgM (c), IgG (i)	Antígeno recombinante
	Panbio/Alere	IC	IgM/IgG*	Antígeno recombinante
	Standard Diagnostics	IC	IgM/IgG**	Proteína de la envuelta recombinante
CHIKV	Standard Diagnostics	IC	IgM	Proteína estructural recombinante
	Novatec	ELISA	IgM (i), IgG (i)	Antígeno no especificado
	IBL	ELISA	IgM (c), IgG (c)	Antígeno no especificado
	Eurolmmun	IFI	IgM, IgG, avidéz de IgG	Células infectadas
	Eurolmmun	ELISA	IgG (i)	Proteína recombinante
TOSV	Diesse	ELISA	IgM (c), IgG (i)	Proteína N recombinante
	Eurolmmun	IFI	IgM, IgG, avidéz de IgG	Células infectadas Permite analizar simultáneamente Sicilia, Nápoles y Chipre
	Mikrogen	IB	IgM, IgG	Antígeno recombinante. Además del análisis del TOSV permite el estudio simultáneo de los hantavirus Puumala, Hantaan, Dobrava y Seoul
CCHFV	Eurolmmun	IFI	IgM e IgG	Células transfectadas
Hantavirus	Progen	ELISA	IgM e IgG	Células infectadas. Permite la detección conjunta de los virus Dobrava y Hantaan y por separado de Puumala
	Focus	ELISA	IgM (i), IgG (i)	Mezcla de Antígeno recombinante (Np)
	Progen	IFI	IgM, IgG	Células infectadas. Permite la detección por separado de Puumala, de Seoul y conjunta de Dobrava y Hantaan

*detección simultánea de IgG e IgM; **detección simultánea de IgG, IgM y antígeno NS1

(i) indirecto, (c) captura

IB: inmunoblot

6. BIBLIOGRAFÍA

6.1. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

1. Escadafal C, Olschläger S, Avšič-Županc T, y cols. First international external quality assessment of molecular detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6.
2. Estrada-Peña A, Palomar A, Santibáñez P, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18:179-180.
3. Fernández E, Alomar P, Bernal A, et al. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica, 1ª Edición. 2000; SEIMC.
4. Hobson-Peters J. Approaches for the development of rapid serological assays for surveillance and diagnosis of infections caused by zoonotic flaviviruses of the Japanese encephalitis virus serocomplex. *J Biomed Biotechnol.* 2012, Article ID 379738, doi:10.1155/2012/379738.
5. Günther G, Haglund M, Lindquist L, Sköldenberg B and Forsgren M. Intrathecal IgM, IgA and IgG antibody response in tick-borne encephalitis. Long-term follow-up related to clinical course and outcome. *Clin Diagn Virol.* 1997; 8:17-29.
6. Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *J Vet.* 2013; 195:33-40.
7. Mansfield K, Horton D, Johnson N, et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Gen Virol.* 2011; 92:2821-2829.
8. Mukhopadhyay S, Kuhn R and Rossmann M, et al. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3:13-22.
9. Negredo A, Palacios G, Vázquez-Morón S, et al. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in Europe. *PLoS Pathog.* 2011; 7.
10. Sánchez C, Guerrero C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos de Microbiología Clínica. SEIMC 2003; 2ª Edición.

6.2. INFECCIÓN POR EL VIRUS WEST NILE

1. Bernabeu-Wittel M, Ruiz-Pérez M, del Toro M, et al. West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007; 25:561-565.
2. Bofill D, Domingo C, Cardeñosa N, et al. Human West Nile virus infection, Catalonia, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12:1163-1164.
3. De Filette M, Ulbert S, Diamond M and Sanders N. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet Res.* 2012; 43:16.
4. Eiden M, Vina-Rodríguez A, Hoffmann B, Ziegler U, Groschup MH. Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. *J Vet Diagn Invest.* 2010; 22:748-753.
5. García-Bocanegra I, Jaén-Téllez J, Napp S, et al. West Nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:2397-2399.
6. Jimenez-Clavero M, Aguero M, Rojo G and Gomez-Tejedor C. A new fluorogenic real-time RT-PCR assay for detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile viruses. *J Vet Diagn Invest.* 2006; 18:459-462.
7. McMullen A, Albayrak H, May F, Davis CT, Beasley D, Barrett AD. The Molecular Evolution of Lineage 2 West Nile Virus. *J Gen Virol.* 2013; 94:318-325.
8. Levett P, Sonnenberg K, Sidaway F, et al. Use of immunoglobulin G avidity assays for differentiation of

primary from previous infections with West Nile virus. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:5873-5875.

9. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods.* 2007; 146:355-358.
10. Linke S, Mackay WG, Scott C, Wallace P, Niedrig M. Second external quality assessment of the molecular diagnostic of West Nile virus: are there improvements towards the detection of WNV?. *J Clin Virol.* 2011; 52:257-260.
11. Nixon M and Prince H. West Nile virus immunoglobulin A (WNV IgA) detection in cerebrospinal fluid in relation to WNV IgG and IgM reactivity. *J Clin Virol.* 2006; 37:174-178.
12. Papa A, Danis K, Athanasiadou A, Delianidou M and Panagiotopoulos T. Persistence of West Nile virus immunoglobulin M antibodies, Greece. *J Med Virol.* 2011; 83:1857-1860.
13. Parida M, Santhosh S, Dash P et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:4172-4178.
14. Pérez Ruiz M, Gámez S and Clavero M. West Nile virus infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29 Suppl 5:21-26.
15. Sotelo E, Fernández-Pinero J and Jiménez-Clavero M. West Nile fever/encephalitis: re-emergence in Europe and the situation in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30:75-83.
16. Tang Y, Anne Hapip C, Liu B and Fang CT. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RN J Clin Virol. 2006; 36:177-182.
17. Yeh J, Lee J, Seo H, et al. Fast duplex one-step reverse transcriptase PCR for rapid differential detection of West Nile and Japanese encephalitis viruses. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:4010-4014.
18. Zaayman D, Human S and Venter M. A highly sensitive method for the detection and genotyping of West Nile virus by real-time PCR. *J Virol Methods* 2009; 157:155-160.
19. Zhang W, Wu J, Li Y, Li F, Njoo H. Rapid and accurate in vitro assays for detection of West Nile virus in blood and tissues. *Transfus Med Rev.* 2009; 23:146-154.

6.3. INFECCIÓN POR EL VIRUS TOSCANA

1. Bartels S, de Boni L, Kretzschmar H and Heckmann JG. Lethal encephalitis caused by the Toscana virus in an elderly patient. *J Neurol.* 2012; 259:175-177.
2. Collao X, Palacios G, Sanbonmatsu-Gámez S, et al. Genetic diversity of Toscana virus. *Emerg Infect Dis.* 2009;15: 574-577.
3. Cusi M and Savellini G. Diagnostic tools for Toscana virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9:799-805.
4. Charrel R, Gallian P, Navarro-Mari JM, et al. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1657-1663.
5. Charrel R, Izri A, Temmam S, et al. Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:465-468.
6. De Ory-Manchón F, Sanz-Moreno J, Aranguéz-Ruiz E y Ramírez-Fernández R. Seroprevalencia edad dependiente frente al virus Toscana en la Comunidad de Madrid: años 1993-1994 y 1999-2000. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007; 25:187-189.
7. Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C. Arthropod-borne viruses transmitted by

Phlebotomine sandflies in Europe. *Euro Surveill.* 2010; 11:19507.

- Echevarría J, de Ory F, Guisasola ME, et al. Acute meningitis due to Toscana virus infection among patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *J Clin Virol.* 2003; 26:79-84.
- Magurano F and Nicoletti L. Humoral response in Toscana virus acute neurologic disease investigated by viral-protein-specific immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6:55-60.
- Navarro J, Fernández-Roldán C, Pérez-Ruiz M, de la Rosa M, Sánchez-Seco MP. Meningitis by Toscana virus in Spain: description of 17 cases. *Med Clin.* 2004; 27:420-422.
- Pérez-Ruiz M, Collao X, Navarro-Marí JM and Tenorio Reverse transcription, real-time PCR assay for detection of Toscana virus. *J Clin Virol.* 2007; 39:276-281.
- Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, Collao X, et al. Toscana virus in Spain. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:1701-1707.
- Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, Palop-Borrás B y Navarro-Marí JM. Unusual manifestation of Toscana virus infection, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:347-348.
- Sánchez-Seco MP, Echevarría JM, Hernández L, Estévez D, Navarro-Marí JM, Tenorio Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol.* 2003; 71:140-149.
- Verani P, Nicoletti L and Ciufolini MG. Antigenic and biological characterization of Toscana virus, a new Phlebotomus fever group virus isolated in Italy. *Acta Virol.* 1984; 28:39-47.
- Weidmann M, Sanchez-Seco M, Sall A, et al. Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *J Clin Virol.* 2008; 41:138-142.

6.4. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA CORIOMENINGITIS LINFOCITARIA

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Notes from the field: lymphocytic choriomeningitis virus infections in employees of a rodent breeding facility--Indiana, May-June 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012; 17:622-623.
- Cordey S, Sahli R, Moraz M, et al. Analytical validation of a lymphocytic choriomeningitis virus real-time RT-PCR assay. *J Virol Methods.* 2011; 177:118-122.
- De Ory F, Gegúndez M, Fedele G and Sánchez-Seco M. Toscana virus, West Nile virus and lymphochoriomeningitis virus as causing agents of aseptic meningitis in Spain. *Med Clin (Barc).* 2009; 25:587-590.
- De Ory F, Avellón A, Echevarría J, et al. Viral infections of the central nervous system in Spain: A prospective study. *J Med Virol.* 2013; 85:554-562.
- Ledesma J, Fedele G, Carro F, Lledó L, et al. Independent lineage of lymphocytic choriomeningitis virus in wood mice (*Apodemus sylvaticus*), Spain. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:1677-1680.
- Macneil A, Ströher U, Farnon E, et al. LCMV Transplant Investigation Team. Solid organ transplant-associated lymphocytic choriomeningitis, United States, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18:1256-1262.
- Pérez-Ruiz M, Navarro-Marí J, Sánchez-Seco M, et al. Lymphocytic choriomeningitis virus-associated meningitis, southern Spain. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18:855-858.

6.5. INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE

- Dengue, Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Organización Mundial de la salud y Programa especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales. Ed. 2009.
- Domingo C, Niedrig M, Teichmann A, et al. 2nd International external quality control assessment for the molecular diagnosis of dengue infections. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 5:10.
- Domingo C, Patel P, Linke S, Achazi K and Niedrig M. Molecular Diagnosis of Flaviviruses. *Future Virol.* 2011; 6:1059-1074.
- Domingo C, Niedrig M, Gascón J, et al. Molecular surveillance of circulating dengue genotypes through European travelers. *J Travel Med.* 2011; 18:183-190.
- Drosten C, Götting S, Schilling S, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:2323-2330.
- Harris E, Roberts T, Smith L, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:2634-2639.
- Johnson B, Russell B and Lanciotti R. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:4977-4983.
- Lanciotti R, Calisher C, Gubler D, Chang G and Vorndam Clin Microbiol. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:545-551.
- La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010; 15:19676.
- Leparc-Goffart I, Baragatti M, Temmam S, et al.. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. *J Clin Virol.* 2009; 45:61-66.
- Prince HE, Yeh C y Lapé-Nixon M. Utility of IgM/IgG ratio and IgG avidity for distinguishing primary and secondary dengue virus infections using sera collected more than 30 days after disease onset. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; 18:1951-1956.
- Puccioni-Sohler M, Soares CN, Papaiz-Alvarenga R, Castro MJ, Faria LC, Peralta JM. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. *Neurology.* 2009; 73:1413-1417.

6.6. INFECCIÓN POR EL VIRUS CHIKUNGUNYA

- Kashyap R, Morey S, Chandak N, Purohit H, Taori G, Dagainawala H. Detection of viral antigen, IgM and IgG antibodies in cerebrospinal fluid of chikungunya patients with neurological complications. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2010; 7:12.
- Lanciotti R, Kosoy O, Laven J, et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:764-767.
- Laurent P, Le Roux K, Grivard P, et al. Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus. *Clin Chem.* 2007; 53:1408-1414.
- Litzba N, Schuffenecker I, Zeller H, et al. Evaluation of the first commercial chikungunya virus indirect immunofluorescence test. *J Virol Methods.* 2008; 149:175-179.

5. Panning M, Hess M, Fischer W, Grywna K, Pfeffer M, Drosten C. Performance of the RealStar chikungunya virus real-time reverse transcription-PCR kit. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:3014-3016.
 6. Parida M, Santhosh S, Dash P, et al. Rapid and real-time detection of chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:351-357.
 7. Reddy V, Ravi V, Desai A, Parida M, Powers A, Johnson B. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of chikungunya fever. *J Med Virol.* 2012; 84:1771-1778.
 8. Smith D, Lee J, Jahrling J, et al. Development of field-based real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for detection of chikungunya and o'nyong-nyong viruses in mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81:679-684.
 9. Yang C, Chen C, Su C, et al. Screening of mosquitoes using SYBR Green I-based real-time RT-PCR with group-specific primers for detection of Flaviviruses and Alphaviruses in Taiwan. *J Virol Methods.* 2010; 168:147-151.
- 6.7. INFECCIÓN POR EL VIRUS EL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA
1. Domingo C, Patel P, Yillah J, et al. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:4054-4060.
 2. Jentes E, Pomeroy G, Gershman M, et al (Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever). The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11:622-632.
 3. Mantel N, Aguirre M, Gulia S, et al. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J Virol Methods.* 2008; 151:40-46.
 4. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1:11-20.
 5. Mutebi J, Wang H, Li L, Bryant J. and Barrett Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J Virol.* 2001; 75:6999-7008.
 6. Neilson A y Mayer C. Yellow fever: prevention in travellers. *Aust Fam Physician.* 2010; 39:570-573.
 7. Nunes M, Palacios G, Nunes K, et al. Evaluation of two molecular methods for the detection of Yellow fever virus genome. *J Virol Methods.* 2011; 174:29-34.
 8. Weidmann M, Faye O, Faye O, et al. Improved LNA probe-based assay for the detection of African and South American yellow fever virus strains. *J Clin Virol.* 2010; 48:187-192.
- 6.8. INFECCIÓN POR EL VIRUS LASSA
1. Bowen M, Rollin P, Ksiazek T, et al. Genetic diversity among Lassa virus strains. *J Virol.* 2000; 74: 6992-7004.
 2. Branco L, Grove J, Boisen M, et al. Emerging trends in Lassa fever: redefining the role of immunoglobulin M and inflammation in diagnosing acute infection. *J. Virol.* 2011; 24:478.
 3. Drosten C, Kümmerer B, Schmitz H and Günther S. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res.* 2003; 57:61-87.
 4. Emonet S, Lemasson J, Gonzalez J, de Lamballerie X, Charrel R. Phylogeny and evolution of old world arenaviruses. *Virology,* 2006; 5:251-257.
 5. Khan S, Goba A, Chu M, et al. New opportunities for field research on the pathogenesis and treatment of Lassa fever. *Antiviral Res.* 2008; 78:103-115.
 6. Olschläger S, Lelke M, Emmerich P, et al. Improved detection of Lassa virus by reverse transcription-PCR targeting the 5' region of S RN. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:2009-2013.
 7. Richmond J and Baglolle D. Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences. *BMJ.* 2003; 29:1271-1275.

**PNT-ARBOV-01
DETECCIÓN SEROLÓGICA DE ANTICUERPOS IgM E IgG FRENTE AL VIRUS WEST NILE**

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus West Nile	PNT-ARBOV-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es describir ensayos para la determinación en muestra de suero de anticuerpos IgG e IgM específicos frente al virus West Nile (WNV) mediante una técnica inmunoenzimática (Focus Diagnostics).

2. FUNDAMENTO

En el ensayo para IgM, se utilizan pocillos de placas de poliestireno recubiertos con suero (de conejo) anti-IgM humana (cadenas μ). Al inocular la muestra convenientemente diluida, la IgM presente en la muestra queda capturada en la fase sólida. Se añade antígeno recombinante del virus, que se unirá si en la muestra hay IgM específica. Finalmente se añade un antisuero de ratón anti-flavivirus conjugado con peroxidasa, revelándose la reacción con sustrato del enzima (tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno), y parándose la reacción. El color desarrollado en cada pocillo es directamente proporcional a la concentración de IgM específica del virus presente en la muestra.

Las muestras con resultado positivo deben ser sometidas a un ensayo de control de antígeno, para detectar reactividad positiva falsa causada por sustancias interferentes presentes en el suero. Para hacer el ensayo de control se procesan dos determinaciones del suero, uno en presencia y otro en ausencia de antígeno. Un resultado positivo en presencia de antígeno y negativo en su ausencia indica resultado positivo.

En el ensayo para IgG, los pocillos están recubiertos con antígeno recombinante del virus. Una vez inoculada la muestra prediluida, si existen anticuerpos específicos se unen al antígeno inmovilizado en la fase sólida. Se añade antisuero (de cabra) anti-IgG humana conjugado con peroxidasa, revelándose la reacción con sustrato del enzima (tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno), y parándose la reacción. El color desarrollado en cada pocillo es directamente proporcional a la presencia en la muestra de IgG específica del virus.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Welch RJ, Anderson BL, Litwin CM. 2008. Evaluation of a new commercial enzyme immunoassay for the detection of IgM antibodies to West Nile virus using a ratio method to eliminate nonspecific reactivity. *J Clin Lab Anal*; 22: 362-366.
- Matas Andreu L, Alonso Tarré C, Echevarría Mayo JM. Diagnóstico de las enfermedades Infecciosas. En Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S (eds). Tratado SEIMC de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana, capítulo 4, págs. 53-70, Madrid 2005.
- Prats G. Microbiología y Parasitología Médicas Editorial Médica Panamericana, capítulo 10, págs. 105-123, Madrid 2013.
- Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte, y procesamiento general de

muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología n° 1a, 2ª edición. SEIMC 2003.

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Manuales de instrucciones de los diferentes equipos comerciales utilizados.

- Procedimiento del laboratorio sobre gestión de residuos.

4. MUESTRAS

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO

Las muestras de suero deben tomarse asépticamente por punción venosa. Después de contraído el coágulo se deben centrifugar para separar el suero. Las muestras de suero se deben conservar a 2-8°C si se van a procesar en 24-48 horas tras su obtención o a -20°C si el procesamiento se realiza en días posteriores. No se deben analizar muestras hiperlipémicas, contaminadas, hemolizadas, ictericas, ni inactivadas por calor.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO

Antes de realizar la dilución de la muestra 1:101, los sueros deber ser homogeneizados en agitador vórtex.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Agua destilada.

6. APARATOS Y MATERIAL

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Centrífuga
 - Tubos
 - Agitador tipo vórtex
 - Pipetas automáticas
 - Probeta de 1 L
 - Microplacas
 - Pipetas de 1 mL y 5 mL
 - Reloj
 - Lector de placas de EIA*
 - Lavador automático de placas de EIA*
- *Alternativamente se puede emplear un procesador de ELISA que cubra estas funciones

7. PROCEDIMIENTO

Antes de comenzar el procesamiento los reactivos se deben atemperar.

No se detallan los procedimientos concretos de realización de las técnicas ya que se encuentran debidamente descritos en la documentación de cada equipo comercial, que son *West Nile Virus IgG DxSelect™* (código EL0300G) (para IgG) y *West Nile Virus IgM Capture DxSelect™* (código EL0300M) (para IgM), ambos de Focus Diagnostics (Cypress, California, EE.UU.).

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus West Nile	PNT-ARBOV-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 3

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Ensayo para IgM. Se consideran positivas las muestras con valor de absorbancia $\geq 1,1$ x el valor medio del suero calibrador incluido en el estuche, y negativas si el valor es $< 0,9$. Las muestras con valores $\leq 1,10$ y $\geq 0,9$ se consideran indeterminadas. Las muestras con resultado indeterminado deben ser analizadas de nuevo para confirmar la reactividad.

Para confirmar la reactividad se debe realizar un ensayo de control, como está descrito en la documentación del equipo.

Ensayo de control para IgM. Se sustrae el valor de absorbancia del pocillo de control del que contiene antígeno, considerándose los criterios citados en el apartado anterior.

Ensayo para IgG. Se consideran positivas las muestras con valor de absorbancia $\geq 1,5$ x el valor medio del suero calibrador incluido en el estuche, y negativas si el valor es $< 1,3$. Las muestras con valores $\leq 1,5$ y $\geq 1,3$ se consideran indeterminadas. Las muestras con resultado indeterminado deben ser analizadas de nuevo para confirmar la reactividad.

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico del laboratorio es el responsable de revisar la idoneidad de la solicitud del ensayo, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados, de acuerdo con los resultados de los controles. El facultativo responsable del laboratorio, además de la supervisión de las tareas citadas, es responsable de mantener actualizados los procedimientos, de la validación final, y de la interpretación e informe de los resultados.

El personal del laboratorio debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los resultados obtenidos en estos ensayos deben ser interpretados en función de los datos clínicos y epidemiológicos del paciente.

Es necesario confirmar la reactividad IgM mediante el ensayo de control para IgM.

La variación de dos veces en el índice es un indicador fiable de infección por el virus.

La prevalencia de IgG frente al virus varía en función de la localización geográfica, la edad y otros factores. En España, en zonas próximas a humedales la seroprevalencia ha sido del 0,2% en el delta del Ebro y del 0,6% en Sevilla.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La sensibilidad de la detección de IgM durante la primera semana es del 50% y después del día octavo desde el comienzo se eleva hasta más del 95%. Así, algunos casos de infección reciente por el virus pueden mostrar resultado falso negativo en el ensayo de IgM, por lo que se recomienda la detección de ácido nucleico y el estudio de muestra de seguimiento.

Estos ensayos pueden mostrar reacción cruzada con otros flavivirus (dengue, encefalitis japonesa, encefalitis transmitida por garrapatas, fiebre amarilla). Para confirmar la reactividad es preciso realizar ensayos de neutralización.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Bernabeu-Wittel M, Pérez-Ruiz-Pipaón M, Del Toro MD, Aznar J, Muniain A, De Ory F, Domingo C, Pachón J. West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25:561-565.
- Bofill D, Domingo C, Cardeñosa N, Zaragoza J, De Ory F, Minguell S, Sánchez-Seco MP, Domínguez A, Tenorio A. Human West Nile virus infection in the Ebro delta, Catalonia, Spain. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:1163-1164.
- Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett AD, Smith DJ, Galbraith SE, Solomon T, Fooks AR. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Gen Virol* 2011; 92:2821-2829.
- Prince HE, Calma J, Pham T, Seaton BL. Frequency of missed cases of probable acute West Nile virus (WNV) infection when testing for WNV RNA alone or WNV immunoglobulin M alone. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16:587-588.
- Tilley PA, Walle R, Chow A, Jayaraman GC, Fonseca K, Drebot MA, Preiksaitis J, Fox J. 2005. Clinical utility of commercial enzyme immunoassays during the inaugural season of West Nile virus activity, Alberta, Canada. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4691-4695.
- Welch RJ, Anderson BL, Litwin CM. 2008. Evaluation of a new commercial enzyme immunoassay for the detection of IgM antibodies to West Nile virus using a ratio method to eliminate nonspecific reactivity. *J Clin Lab Anal* 2008; 22:362-366.

PNT-ARBOV-02
DETECCIÓN SEROLÓGICA DE ANTICUERPOS IgM E IgG FRENTE AL VIRUS TOSCANA

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus Toscana	PNT-ARBOV-02	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es describir ensayos para la determinación en muestra de suero de anticuerpos IgG e IgM específicos frente al virus Toscana (TOSV), mediante técnica inmunoenzimática (DIESSE Diagnostica Senese).

2. FUNDAMENTO

En el ensayo para IgM, se utilizan pocillos de placas recubiertos con anticuerpos monoclonales anti-IgM humana. Al inocular la muestra convenientemente diluida, la IgM presente en la muestra queda capturada en la fase sólida. Se añade antígeno recombinante del virus biotinilado, que se unirá si en la muestra hay IgM específica. Finalmente se añade estreptavidina conjugada con peroxidasa, revelándose la reacción con sustrato del enzima (tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno), y parándose la reacción. El color desarrollado en cada pocillo es directamente proporcional a la concentración de IgM específica del virus.

En el ensayo para IgG, los pocillos están recubiertos con nucleoproteína recombinante del virus. Una vez inoculada la muestra prediluida, si existen anticuerpos específicos se unen al antígeno inmovilizado en la fase sólida. Se añade un monoclonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa, revelándose la reacción con sustrato del enzima (tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno), y parándose la reacción. El color desarrollado en cada pocillo es directamente proporcional a la presencia de IgG específica del virus.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Matas Andreu L, Alonso Tarré C, Echevarría Mayo JM. Diagnóstico de las enfermedades Infecciosas. En Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S (eds). Tratado SEIMC de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana, capítulo 4, págs. 53-70, Madrid 2005.

- Prats G. Microbiología y Parasitología Médicas Editorial Médica Panamericana, capítulo 10, págs. 105-123, Madrid 2013.

- Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte, y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología nº 1a, 2ª edición. SEIMC 2003.

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Manuales de instrucciones de los diferentes equipos comerciales utilizados.

- Procedimiento del laboratorio sobre gestión de residuos.

4. MUESTRAS

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO

Las muestras de suero deben tomarse asépticamente por punción venosa. Después de

contraído el coágulo se deben centrifugar para separar el suero. Las muestras de suero se deben conservar a 2-8°C si se van a procesar en 24-48 horas tras su obtención o a -20°C si el procesamiento se realiza en días posteriores. No se deben analizar muestras hiperlipémicas, contaminadas, hemolizadas, ictericas, ni inactivadas por calor.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO

Antes de realizar la dilución de la muestra 1:101, los sueros deben ser homogeneizados en agitador vórtex.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Agua destilada.

6. APARATOS Y MATERIAL

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Centrífuga
- Tubos
- Agitador tipo vórtex
- Pipetas automáticas
- Probeta de 1 L
- Microplacas
- Pipetas de 1 mL y 5 mL
- Reloj
- Lector de placas de EIA*
- Lavador automático de placas de EIA*

*Alternativamente se puede emplear un procesador de ELISA que cubra estas funciones

7. PROCEDIMIENTO

Antes de comenzar el procesamiento los reactivos se deben atemperar.

No se detallan los procedimientos concretos de realización de las técnicas ya que se encuentran debidamente descritos en la documentación del equipo comercial (*Enzywell, Toscana Virus IgG/IgM*, código 91067, DIESSE Diagnostica Senese, Italia).

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Ensayo para IgM. El valor de corte se establece como el valor medio del control negativo + 0,250. Se consideran positivas las muestras con valor de absorbancia $\geq 1,2$ x el valor de corte, y negativas con valores $< 0,8$. Las muestras con valores $\leq 1,2$ y $\geq 0,8$ se consideran indeterminadas.

Ensayo para IgG. Se consideran positivas las muestras con valor de absorbancia $\geq 1,2$ x el valor medio del suero calibrador incluido en el estuche, y negativas si el valor es $< 0,8$. Las muestras con valores $\leq 1,2$ y $\geq 0,8$ se consideran indeterminadas.

Las muestras con resultado indeterminado en ambos ensayos deben ser analizadas de nuevo para confirmar la reactividad

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus Toscana	PNT-ARBOV-02	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico del laboratorio es el responsable de revisar la idoneidad de la solicitud del ensayo, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados, de acuerdo con los resultados de los controles. El facultativo responsable del laboratorio, además de la supervisión de las tareas citadas, es responsable de mantener actualizados los procedimientos, de la validación final, y de la interpretación e informe de los resultados.

El personal del laboratorio debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los resultados obtenidos en estos ensayos deben ser interpretados en función de los datos clínicos y epidemiológicos del paciente, así como de otros resultados de laboratorio. El TOSV se ha identificado como una causa importante de meningitis aséptica en España pudiendo, en función de la localización geográfica, llegar a ser la segunda en importancia.

El uso combinado de la detección de IgM y la detección de ácido nucleico del virus mejora el rendimiento diagnóstico de la infección aguda.

La producción de casos de infección por el virus está limitada al periodo de circulación del vector. La prevalencia de IgG frente al virus varía en función de la localización geográfica, presencia del vector, la edad y otros factores. En España, se han encontrado valores de seroprevalencia entre 3% y 25%, habiéndose diagnosticado casos en prácticamente todas las zonas de la geografía española en que se ha detectado el vector.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Echevarría JM, De Ory F, Guisasola ME, Sánchez-Seco MP, Tenorio A, Lozano A, Córdoba J, Gobernado M. Acute meningitis due to Toscana virus infection among Spanish patients from both the Mediterranean region and the Region of Madrid. *J Clin Virol* 2003; 26:79-84.
2. De Ory F, Gegúndez MI, Fedele CG, Sánchez-Seco MP. Los virus Toscana, West Nile y de la coriomeningitis linfocitaria como causantes de meningitis en España. *Med Clin (Barc)* 2009; 132:587-590.
3. De Ory-Manchón F, Sanz-Moreno JC, Arangüez-Ruiz E, Ramírez-Fernández R. Seroprevalencia edad dependiente frente al virus Toscana en la Comunidad de Madrid: años 1993-1994 y 1999-2000. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25:187-189.
4. Navarro-Mari JM, Fernández-Roldán C, Pérez-Ruiz M, Sanbonmatsu S, de la Rosa M, Sánchez-Seco MP. Meningitis por el virus Toscana en España: descripción de 17 casos *Med Clin (Barc)* 2004; 122:420-422.

PNT-ARBOV-03
DETECCIÓN SEROLÓGICA DE ANTICUERPOS IgM E IgG FRENTE AL VIRUS
CHIKUNGUNYA

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus chikungunya	PNT-ARBOV-03	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es describir ensayos para la determinación en muestra de suero de anticuerpos IgG e IgM específicos frente al virus chikungunya (CHIKV), mediante técnica de inmunofluorescencia indirecta (EuroImmun).

2. FUNDAMENTO

Las muestras de suero diluidas convenientemente se inoculan sobre pocillos de portaobjetos que contienen dos zonas, una con células infectadas por CHIKV, y otro con células control, de forma que si hay anticuerpos específicos en la muestra se unen al antígeno inmovilizado. La identidad de los anticuerpos unidos se caracteriza mediante la adición de antisuero anti-IgG o anti-IgM conjugado con isotiocianato de fluoresceína (ITCF). Al leerse en microscopio de fluorescencia el ITCF emite luz visible de localización específica, que permite identificar respuesta positiva y, subsiguientemente, la presencia de anticuerpos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Matas Andreu L, Alonso Tarré C, Echevarría Mayo JM. Diagnóstico de las enfermedades Infecciosas. En Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S (eds). Tratado SEIMC de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana, capítulo 4, págs. 53-70, Madrid 2005.
- Prats G. Microbiología y Parasitología Médicas Editorial Médica Panamericana, capítulo 10, págs. 105-123, Madrid 2013.
- Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte, y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología nº 1a, 2ª edición. SEIMC 2003.
<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Manuales de instrucciones de los diferentes equipos comerciales utilizados.
- Procedimiento del laboratorio sobre gestión de residuos.

4. MUESTRAS

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO

Las muestras de suero deben tomarse asépticamente por punción venosa. Después de contraído el coágulo se deben centrifugar para separar el suero. Puede utilizarse suero o plasma, almacenados durante 2 semanas a 4°C, o durante más tiempo a -20°C.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO

Antes de realizar la dilución de la muestra 1:10, las muestras deber ser homogeneizadas en agitador vórtex. Previamente al ensayo de IgM, la muestra debe tratarse para la eliminación de IgG, para evitar la posibilidad de reactividades falsas debidas a la

presencia simultánea de factor reumatoide e IgG específica.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Agua destilada
Absorbente de IgG

6. APARATOS Y MATERIAL

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Centrífuga
- Centrífuga de microtubos
- Tubos
- Agitador tipo vórtex
- Pipetas automáticas
- Probeta de 1 L
- Microplacas
- Pipetas de 1 mL y 5 mL
- Reloj
- Cámara húmeda
- Cubeta de Coplin
- Microscopio de fluorescencia, equipado con objetivos de x20 y x40 aumentos

7. PROCEDIMIENTO

Antes de comenzar el procesamiento los reactivos se deben atemperar.

No se detallan los procedimientos concretos de realización de las técnicas ya que se encuentran debidamente descritos en la documentación de los equipos comerciales (*Anti-Chikungunya virus IIFT [IgG]*, código FI 293a-1010 G y *Anti-Chikungunya virus IIFT [IgM]*, código FI 293a-1010 M, Euroimmun, Alemania).

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras son positivas si las células infectadas muestran un patrón homogéneo o granular en el citoplasma, con intensidad en la membrana.

En el caso de que tanto las células infectadas como las células control muestren fluorescencia en el núcleo o en el citoplasma, se debe considerar la presencia de autoanticuerpos (anticuerpos anti-nucleares u otros), no siendo posible identificar respuesta específica frente a CHIKV.

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico del laboratorio es el responsable de revisar la idoneidad de la solicitud del ensayo, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados, de acuerdo con los resultados de los controles. El facultativo responsable del laboratorio, además de la supervisión de las tareas citadas, es responsable de mantener actualizados los procedimientos, de la validación final, y de la interpretación e informe de los resultados.

El personal del laboratorio debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus chikungunya	PNT-ARBOV-03	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El diagnóstico serológico mediante determinación de IgM es eficaz a partir del quinto día del comienzo de la enfermedad.

El uso combinado de técnicas moleculares y serológicas mejora el rendimiento diagnóstico.

Los resultados obtenidos en estos ensayos deben ser interpretados teniendo en cuenta, además de los datos clínicos y otros datos analíticos, los antecedentes epidemiológicos, siendo especialmente de interés el antecedente de viaje a zona endémica, considerando, cuando proceda, el diagnóstico diferencial con otros virus que puedan producir patología similar (virus O'nyong-nyong).

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Reddy V, Ravi V, Desai A, Parida M, Powers AM, Johnson BW. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. *J Med Virol* 2012; 84:1771-1778.
2. Sánchez-Seco MP, Negro AI, Puente S, Pinazo MJ, Shuffenecker I, Tenorio A, Fedele CG, Domingo C, Rubio JM, de Ory Manchón F. Diagnóstico microbiológico del virus Chikungunya en España (2006-2007): detección de casos en viajeros. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27:457-461.
3. Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses-an overview. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8:420-429.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-ARBOV-04
DETECCIÓN SEROLÓGICA DE ANTICUERPOS IgM E IgG FRENTE AL VIRUS DENGUE

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus dengue	PNT-ARBOV-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es describir los ensayos para la determinación en muestra de suero de anticuerpos IgG e IgM específicos frente al virus dengue (VDEN), mediante técnica inmunoenzimática (Panbio).

2. FUNDAMENTO

En el ensayo para IgM, se utilizan pocillos de placas de poliestireno recubiertos con anticuerpos anti-IgM humana (cadenas μ). Al inocular la muestra convenientemente diluida, la IgM presente en la muestra queda capturada en la fase sólida. Se añade antígeno recombinante del virus (dengue-1, -2, -3 y -4), que se unirá si en la muestra hay IgM específica. Finalmente se añade un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa, revelándose la reacción con sustrato del enzima (tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en tampón ácido cítrico/citrato), y parándose la reacción. El color desarrollado en cada pocillo es directamente proporcional a la presencia de IgM específica del virus.

Las muestras con resultado positivo deben ser analizadas en un ensayo de control de antígeno, para excluir reactividad positiva falsa causada por sustancias presentes en el suero. Para hacer el ensayo de control se procesan dos determinaciones del suero, uno en presencia y otro en ausencia de antígeno. Un resultado positivo en presencia de antígeno y negativo en su ausencia indica resultado positivo.

En el ensayo para IgG, los pocillos están recubiertos con una combinación de antígenos (dengue-1, -2, -3 y -4). Una vez inoculada la muestra prediluida, si existen anticuerpos específicos se unen al antígeno inmovilizado en la fase sólida. Se añade antisuero (de cabra) anti-IgG humana conjugado con peroxidasa, revelándose la reacción con sustrato del enzima (tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en tampón ácido cítrico/citrato), y parándose la reacción. El color desarrollado en cada pocillo es directamente proporcional a la presencia de IgG específica del virus.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Domingo C, De Ory F, Sanz JC, Reyes N, Gascón J, Wichmann O, Puente S, Schunk M, López-Vélez R, Ruíz J, Tenorio A. Molecular and serological markers of acute dengue infection in naïve and flavivirus vaccinated travellers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65:42-48.

- Matas Andreu L, Alonso Tarré C, Echevarría Mayo JM. Diagnóstico de las enfermedades Infecciosas. En Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S (eds). Tratado SEIMC de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana, capítulo 4, págs. 53-70, Madrid 2005.

- Prats G. Microbiología y Parasitología Médicas Editorial Médica Panamericana, capítulo 10, págs. 105-123, Madrid 2013.

- Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte, y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología nº 1a, 2ª edición. SEIMC 2003.

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Manuales de instrucciones de los diferentes equipos comerciales utilizados.

- Procedimiento del laboratorio sobre gestión de residuos.

4. MUESTRAS

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO

Las muestras de suero deben tomarse asépticamente por punción venosa. Después de contraído el coágulo se deben centrifugar para separar el suero. Las muestras de suero se deben conservar a 2-8°C si se van a procesar en 24-48 horas tras su obtención o a -20°C si el procesamiento se realiza en días posteriores. No se deben analizar muestras hiperlipémicas, contaminadas, hemolizadas, ictericas, ni inactivadas por calor.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO

Antes de realizar la dilución de la muestra 1:101, los sueros deben ser homogeneizados en agitador vórtex.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Agua destilada

6. APARATOS Y MATERIAL

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Centrífuga
 - Tubos
 - Agitador tipo vórtex
 - Pipetas automáticas
 - Probeta de 1 L
 - Microplacas
 - Pipetas de 1 mL y 5 mL
 - Reloj
 - Estufa a 37°C*
 - Lector de placas de EIA con filtro de 450 nm*
 - Lavador automático de placas de EIA*
- *Alternativamente se puede emplear un procesador de ELISA que cubra estas funciones

7. PROCEDIMIENTO

Antes de comenzar el procesamiento los reactivos se deben atemperar. No se detallan los procedimientos concretos de realización de las técnicas ya que se encuentran debidamente descritos en la documentación de cada equipo comercial, que son *Dengue IgG indirect ELISA* (referencia E-DEN01G) y *Dengue IgM capture ELISA* (referencia E-

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección serológica de anticuerpos IgM e IgG frente al virus dengue	PNT-ARBOV-04	
		Edición N° 01	Página 3 de 3

DEN01M/E), ambos de Panbio, Inverness Medical, Australia. Las muestras con resultado positivo en el ensayo de IgM se deben confirmar en un ensayo de control de IgM, como se ha descrito.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Ensayo para IgM. Se consideran positivas las muestras con índices (unidades Panbio) ≥ 11 , y negativas si el valor es < 9 . Las muestras con valores ≤ 11 y ≥ 9 se consideran indeterminadas. Las muestras con resultado indeterminado se deben analizar de nuevo para confirmar la reactividad.

Para confirmar la reactividad específica se debe realizar un ensayo de control.

Ensayo de control para IgM. Se sustrae el valor de absorbancia del pocillo de control del que contiene antígeno, considerándose los criterios citados en el apartado anterior.

Ensayo para IgG. Se consideran positivas las muestras con índices, expresados como unidades Panbio, ≥ 11 , y negativas si los valores son < 9 . Las muestras con valores < 11 y ≥ 9 se consideran indeterminadas. Las muestras con resultado indeterminado se deben analizar de nuevo para confirmar la reactividad.

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico del laboratorio es el responsable de revisar la idoneidad de la solicitud del ensayo, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados, de acuerdo con los resultados de los controles. El facultativo responsable del laboratorio, además de la supervisión de las tareas citadas, es responsable de mantener actualizados los procedimientos, de la validación final, y de la interpretación e informe de los resultados.

El personal del laboratorio debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO Y LIMITACIONES

Es necesario confirmar la reactividad IgM mediante el ensayo de IgM con un control. Estos ensayos pueden mostrar reacción cruzada con otros flavivirus (encefalitis japonesa, encefalitis transmitida por garrapatas, fiebre amarilla). En el caso de ser precisa la discriminación de reactividad heteróloga se debe realizar técnica de neutralización.

El uso combinado de la detección de IgM y la detección de antígenos del virus o de IgM y detección de ácido nucleico del virus mejora el rendimiento diagnóstico de la infección aguda.

A pesar de que España existen condiciones medioambientales que permiten la transmisión del dengue hasta este momento la enfermedad sólo ha sido diagnosticada en viajeros. Los resultados obtenidos en estos ensayos deben ser interpretados teniendo en cuenta, además de los datos clínicos y otros datos analíticos, el antecedente de viaje a zona endémica, considerando, cuando proceda, el diagnóstico diferencial con otros virus (chikungunya, sarampión).

Se debe proceder al registro epidemiológico de todos los casos IgM positivos de DENV.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Blacksell SD, Jarman RG, Gibbons RV, Tanganuchitcharnchai A, Mammen MP Jr, Nisalak A, Kalayanarooj S, Bailey MS, Premaratna R, de Silva HJ, Day NP, Lalloo DG. Comparison of seven commercial antigen and antibody enzyme-linked immunosorbent assays for detection of acute dengue infection. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19:804-810.
- Domingo C, De Ory F, Sanz JC, Reyes N, Gascón J, Wichmann O, Puente S, Schunk M, López-Vélez R, Ruíz J, Tenorio A. Molecular and serological markers of acute dengue infection in naïve and flavivirus vaccinated travellers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65:42-48.
- Fry SR, Meyer M, Semple MG, Simmons CP, Sekaran SD, Huang JX, McElnea C, Huang CY, Valks A, Young PR, Cooper MA. The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1199.
- Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett AD, Smith DJ, Galbraith SE, Solomon T, Fooks AR. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Gen Virol* 2011; 92:2821-2829.
- Muñoz J, Puente S, López-Vélez R, Domingo C, Ruiz J, Ramírez G, Navarro M, De Ory F, Sanz S, Rivas P, Turrientes MC, Tenorio A, Gascón J. Estudio clinicoepidemiológico del dengue importado en España. *Med Clí (Barc)* 2008; 131:18-21.

**PNT-ARBOV-05
DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE LOS VIRUS DENGUE**

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de antígeno de los virus dengue	PNT-ARBOV-05	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es describir el ensayo para la detección, en muestras de suero y plasma, de la proteína no estructural 1 o antígeno NS1 circulante en la sangre de pacientes con infección aguda por el virus dengue (DENV), mediante la técnica inmunoenzimática (PLATELIA™ DENGUE NS1 Ag. Ref. 72830. Bio Rad).

2. FUNDAMENTO

El ensayo para la detección del antígeno NS1, es un método inmunoenzimático de tipo sándwich, en formato microplaca, que permite la detección cualitativa o semi-cuantitativa del antígeno NS1 del DENV en el suero o en el plasma humano.

Los pocillos de la microplaca están recubiertos con anticuerpos monoclonales de ratón (AcM) que reconocen al antígeno NS1 si estuviera presente en la muestra. Junto con la muestra se añade el mismo anticuerpo monoclonal (AcM) pero conjugado con peroxidasa, que favorecerá la captura del antígeno, revelándose la reacción al añadir el sustrato del enzima (tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en tampón ácido cítrico/citrato) y parándose la reacción. El color desarrollado en cada pocillo es directamente proporcional a la presencia de antígeno NS1 en la muestra.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- PLATELIA™ DENGUE NS1 AG. Manual del fabricante. BIORAD. 92430 Marnes-la-Coquette Francia.12/2008
- Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte, y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología nº 1a, 2ª edición. SEIMC 2003.
- <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Procedimiento del laboratorio sobre gestión de residuos.

4. MUESTRAS

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO

Los ensayos se realizan en muestras de suero o en muestras de plasma recogidas con EDTA, citrato o heparina. Las muestras de sangre deben recogerse asépticamente por punción venosa. Para recoger el suero, dejar que se forme totalmente el coágulo sanguíneo antes del proceso de centrifugación.

Las muestras se conservarán a 2-8°C si se realizan los ensayos en las 24 horas siguientes. Si los ensayos no se realizaran en el día, o en caso de envío, las muestras deberán congelarse a -20°C (o incluso a menor temperatura). No se deben utilizar muestras que hayan sido sometidas a más de 3 ciclos de congelación/descongelación.

Antes de iniciar el ensayo, las muestras deben ser cuidadosamente homogeneizadas en un agitador vórtex tras la descongelación. No se recomienda

utilizar muestras hiperlipémicas, contaminadas, hemolizadas, ictericas, e incluso aquellas inactivadas por calor. Según la indicación del fabricante, los resultados no se ven afectados en las muestras que contengan 100 mg/L de bilirrubina ni en las muestras lipémicas que contengan el equivalente a 36 g/L de trioleína (triglicérido). Es posible que se produzca un aumento de la relación de muestras negativas con unas concentraciones de albúmina de 90 g/L o en muestras hemolizadas que contengan 10 mg/mL de hemoglobina.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO O PLASMA

Antes de realizar la dilución de la muestra, los sueros deben ser homogeneizados en agitador vórtex.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- 5.1. Provisos en el estuche comercial Platelia™ Dengue NS1 Ag. Referencia 72830. BioRad.
- 5.2. No provistos: agua destilada

6. APARATOS Y MATERIAL

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Agitador de tipo vórtex.
- Aparato de lectura para microplacas (equipados con filtros 450/620 nm)
- Estufa o incubadora seca para microplacas a una temperatura de 37±1°C
- Sistema de lavado manual, semiautomático o automático para microplacas (PW 40 Microplate Washer, Bio Rad referencia 358-5499).
- Contenedor de residuos contaminantes.
- Hipoclorito sódico (lejía) o Virkon®.
- Agua destilada o desionizada estéril.
- Probetas graduadas de 25 mL, 50 ml, 100 ml y 1000 ml.
- Guantes desechables.
- Papel absorbente.
- Pipetas automáticas de 50-100 µl, y 100-1000 µl.
- Tubos

7. PROCEDIMIENTO

Antes de comenzar el procesamiento los reactivos se deben atemperar. Es importante tener en cuenta que hay reactivos que deben ser reconstituidos, como la solución de lavado (dilución 1/20 con agua destilada) y el anticuerpo conjugado (dilución 1/50 con el diluyente provisto). Debe tenerse muy en cuenta las recomendaciones del fabricante en cuanto a la conservación de los reactivos reconstituidos. No detallaremos aquí el procedimiento completo ya que está muy bien descrito en el manual que acompaña al estuche comercial y se debe seguir estrictamente el protocolo establecido por el fabricante.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de antígeno de los virus dengue	PNT-ARBOV-05	
		Edición N° 01	Página 3 de 3

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1. CÁLCULO DE VALORES DE CORTE

En primer lugar se calcula el valor medio de las densidades ópticas (DO) obtenidas con el reactivo calibrador (reactivo R4 del estuche comercial) en duplicado. A este valor se lo define como CO.

Posteriormente se calcula la relación de la DO de la muestra (S) con respecto a la DO del reactivo calibrador (CO), según la siguiente fórmula:

Relación de la muestra: S/CO

8.2. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Para validar el ensayo, deberán cumplirse los siguientes criterios:

- El valor de CO > 0,200
- Relación del control negativo o R3 < 0,40 (Relación R3 = DOR3 / CO)
- Relación del control positivo o R5 > 1,50 (Relación R5 = DOR5 / CO)

Si no se cumplen alguno de estos criterios, el ensayo no está validado y se debe repetir.

8.3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Si la relación de la muestra es < 0,50 el resultado es negativo. Se considera que en la muestra no se detecta presencia del antígeno, bien porque no hay infección por el DENV o porque ya ha desaparecido el antígeno de la sangre.

Si la relación de la muestra es \geq a 0,5 y < 1,00 el resultado es equívoco. La muestra se considera dudosa para la presencia de antígeno. Se puede interpretar este resultado dentro de un contexto de infección por el DENV, como disminución de la concentración de antígeno si el paciente se encuentra con más de 9 días de haber iniciado los síntomas.

Si la relación de la muestra es \geq 1,00 el resultado es positivo. La interpretación debe realizarse en el contexto clínico y epidemiológico.

9. RESPONSABILIDADES

El procedimiento debe llevarse a cabo por personal técnico con conocimientos y entrenamiento adecuado. Se debe seguir estrictamente el protocolo del ensayo y en caso de que el ensayo no se haya validado, hay que evaluar la causa del error, corregirlo y realizar el ensayo nuevamente. El facultativo a cargo del diagnóstico debe supervisar el procedimiento, la validación del ensayo y finalmente realizar el informe de los resultados. También es responsabilidad del facultativo que se cumplan las recomendaciones del fabricante en cuanto a la estabilidad, conservación y duración de los reactivos reconstituidos y del uso de lotes diferentes de reactivos que pueden afectar el ensayo.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO Y LIMITACIONES

Para el diagnóstico de una infección reciente por el DENV se debe tener en cuenta el contexto epidemiológico y clínico del paciente. Además el resultado de un solo ensayo no constituye por sí mismo una prueba suficiente para el diagnóstico de una infección por el DENV. La combinación de la detección de antígeno con una prueba de detección de genoma viral (en muestras con < 6 días de inicio de síntomas) o la combinación de la detección de antígeno NS1 con detección en el suero de IgM e IgG (en muestras con > 6 días de inicio de síntomas) permite realizar un diagnóstico correcto del dengue.

La sensibilidad del ensayo descrita por el fabricante oscila entre el 96% al 100% en muestras tomadas dentro de los primeros 4 días de iniciados los síntomas, la cual decrece conforme la infección va avanzando, llegando a sólo un 35% de detección en muestras con más de 6 días del inicio de los síntomas, por lo que el momento de la toma de muestra es un factor limitante para la detección o no del antígeno NS1. Así mismo se ha descrito que en las infecciones secundarias se ve afectada la sensibilidad del ensayo debido a la presencia de altas concentraciones de IgG y la formación de inmunocomplejos. Otra limitación es que con esta prueba no se puede discriminar el serotipo causante de la infección.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel D, Flamand M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. J Clin Microbiol 2002; 40:376-381.
2. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes M, Rodrigues S, Storck-Herrmann C, Cesaire R, Morvan J, Flamand M, Baril L. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. Clin Vaccine Immunol 2006; 13:1185-1189.