

# Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de  
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



68.

## Diagnóstico microbiológico de las principales arbovirosis importadas y autóctonas

### Editores

Emilia Cercenado Mansilla  
Rafael Cantón Moreno

### Coordinador

Miguel Julián Martínez Yoldi

### Autores

Miguel Julián Martínez Yoldi  
Mercedes Pérez Ruiz  
María Paz Sánchez-Seco Fariñas  
Ana Vázquez González



ISBN: 978-84-09-24037-1

#### EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.  
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

#### SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Martínez Yoldi MJ, Pérez Ruiz M, Sánchez-Seco Fariñas MP, Vázquez González A. Diagnóstico microbiológico de las principales arbovirosis importadas y autóctonas. 2020. 68. Miguel Julián Martínez Yoldi (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2020.

#### AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web [www.seimc.org](http://www.seimc.org)”

# Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de  
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

## 68. Diagnóstico microbiológico de las principales arbovirosis importadas y autóctonas.2020

Coordinador:

Miguel Julián Martínez Yoldi<sup>1,2</sup>

Autores:

Miguel Julián Martínez Yoldi<sup>1,2</sup>

Mercedes Pérez Ruiz<sup>3,4</sup>

María Paz Sánchez-Seco Fariñas<sup>5</sup>

Ana Vázquez González<sup>5,6</sup>



<sup>1</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Clinic, Barcelona; <sup>2</sup> Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal), Barcelona; <sup>3</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada; <sup>4</sup>Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.Granada, Granada; <sup>5</sup>Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda (Madrid); <sup>6</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid

## INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

|    |                                                                                                       |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. | Introducción.....                                                                                     | 5  |
| 2. | Virus dengue .....                                                                                    | 6  |
|    | 2.1. Características generales.....                                                                   | 6  |
|    | 2.2. Distribución geográfica.....                                                                     | 6  |
|    | 2.3. Cuadro clínico.....                                                                              | 6  |
|    | 2.4. Diagnóstico de laboratorio.....                                                                  | 7  |
| 3. | Virus chikungunya.....                                                                                | 10 |
|    | 3.1. Características generales.....                                                                   | 10 |
|    | 3.2. Distribución geográfica.....                                                                     | 10 |
|    | 3.3. Cuadro clínico.....                                                                              | 10 |
|    | 3.4. Diagnóstico de laboratorio.....                                                                  | 11 |
| 4. | Virus Zika.....                                                                                       | 13 |
|    | 4.1. Características generales.....                                                                   | 13 |
|    | 4.2. Distribución geográfica.....                                                                     | 13 |
|    | 4.3. Cuadro clínico.....                                                                              | 14 |
|    | 4.4. Diagnóstico de laboratorio.....                                                                  | 14 |
| 5. | Virus del Nilo Occidental ( <i>West Nile</i> ).....                                                   | 17 |
|    | 5.1. Características generales.....                                                                   | 17 |
|    | 5.2. Distribución geográfica.....                                                                     | 17 |
|    | 5.3. Cuadro clínico.....                                                                              | 18 |
|    | 5.4. Diagnóstico de laboratorio.....                                                                  | 18 |
| 6. | Virus Toscana.....                                                                                    | 20 |
|    | 6.1. Características generales.....                                                                   | 20 |
|    | 6.2. Distribución geográfica.....                                                                     | 20 |
|    | 6.3. Cuadro clínico.....                                                                              | 20 |
|    | 6.4. Diagnóstico de laboratorio.....                                                                  | 21 |
| 7. | Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.....                                                   | 23 |
|    | 7.1. Características generales.....                                                                   | 23 |
|    | 7.2. Distribución geográfica.....                                                                     | 23 |
|    | 7.3. Cuadro clínico.....                                                                              | 23 |
|    | 7.4. Diagnóstico de laboratorio.....                                                                  | 24 |
| 8. | Otros arbovirus de interés.....                                                                       | 26 |
|    | 8.1. Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas ( <i>Tick borne encephalitis virus</i> )..... | 26 |
|    | 8.2. Virus de la encefalitis japonesa ( <i>Japanese encephalitis virus</i> ).....                     | 27 |
|    | 8.3. Virus de la fiebre amarilla ( <i>Yellow fever virus</i> ).....                                   | 28 |
| 9. | Bibliografía.....                                                                                     | 29 |
|    | Anexo I.....                                                                                          |    |
|    | I.1. Técnicas comerciales disponibles para el diagnóstico de las arbovirosis.....                     | 31 |
|    | I.2. Procedimientos normalizados de trabajo (PNTs) de técnicas comerciales.....                       | 35 |

## DOCUMENTOS TÉCNICOS

PNT-ARBOV-06. Cultivo celular de arbovirus

PNT-ARBOV-07. Detección de anticuerpos neutralizantes frente a arbovirus en suero

# 1. INTRODUCCIÓN

Los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) incluyen más de 500 especies, de las que más de 100 pueden afectar al ser humano. Se transmiten fundamentalmente a través de la picadura o mordedura de mosquitos, flebótomos y garrapatas infectados, están ampliamente distribuidos en el mundo y se estima que causan cientos de millones de infecciones en el hombre cada año. Poseen un claro potencial emergente, pudiéndose introducir en zonas hasta entonces libres de la enfermedad y dar lugar a brotes epidémicos explosivos y establecerse de forma endémica si se encuentran las condiciones necesarias para su transmisión. Representan una preocupación creciente de salud pública en Europa, donde en los últimos años se ha podido observar brotes o casos aislados de transmisión autóctona de chikungunya, dengue o Zika. La transmisión local de estos virus se produce fundamentalmente a través de viajeros infectados provenientes de zonas endémicas que son picados por mosquitos locales, los cuales pueden infectarse y transmitir la infección a otras personas que no han viajado a una zona endémica. En España se ha detectado transmisión vectorial de dengue en 2018 y 2019.

Los arbovirus comparten el mecanismo de transmisión vectorial, pero las especies de virus de este grupo pueden ser muy diferentes en cuanto a taxonomía, distribución geográfica o cuadro clínico que ocasionan. En esta edición de Procedimientos en Microbiología Clínica de la SEIMC, nos centramos en las principales arbovirosis importadas y autóctonas que pueden requerir diagnóstico en los laboratorios de Microbiología españoles. Este procedimiento actualiza la información recogida en el procedimiento 47 “Diagnóstico microbiológico de arbovirosis y robovirosis emergentes” publicado en 2013.

Los pilares diagnósticos de las arbovirosis son, como para muchos otros virus, las pruebas de detección directa (fundamentalmente basadas en amplificación de ácidos nucleicos) y las pruebas de detección de anticuerpos. En líneas generales, las pruebas de detección del virus proporcionan un diagnóstico de confirmación, pero sólo son rentables durante unos días de la fase aguda de la enfermedad. Las pruebas serológicas, por el contrario, pueden realizarse en períodos de tiempo más prolongados, pero deben interpretarse con cautela debido a la posibilidad de reacciones cruzadas con anticuerpos frente a otros arbovirus. La muestra clínica por excelencia para el diagnóstico de arbovirosis es el suero, donde pueden detectarse tanto el genoma del virus como anticuerpos contra el mismo. Otras muestras como sangre total, orina, líquido cefalorraquídeo (en cuadros neurológicos) son también utilizadas. Las muestras clínicas deberán mantenerse congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para preservar el ARN del virus, siempre que el diagnóstico molecular vaya a demorarse en el tiempo.

La mayoría de las arbovirosis son enfermedades de declaración obligatoria, debido a las implicaciones en salud pública que conlleva su diagnóstico. Dada la presencia en España de *Aedes albopictus* (mosquito tigre) y en menor medida *Aedes japonicus*, potenciales vectores para dengue, chikungunya o Zika, estas infecciones de deben notificar para una apropiada monitorización de los casos importados así como para dirigir labores de control entomológico que puedan derivarse de estos diagnósticos. En el caso de detección de casos autóctonos de arbovirosis no endémicas en nuestro país la notificación, además de obligatoria, es urgente. La detección de virus presentes en la península Ibérica pero que actualmente circulan a un bajo nivel como el virus del Nilo Occidental (*West Nile*) es igualmente importante para la temprana detección de posibles brotes. El virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, cuya presencia se ha descrito en España en los últimos años, es también motivo de singular preocupación en salud pública. La sospecha clínica de infección por este virus, clasificado en el máximo nivel de bioseguridad (nivel 4), debe notificarse y su diagnóstico confirmarse por el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid). En general, para establecer el diagnóstico de arbovirosis en un laboratorio de Microbiología, es necesario un conocimiento específico de estos virus, disponer de métodos diagnósticos frente a varios agentes (ya que los síntomas son a menudo inespecíficos), contar con una adecuada validación de los ensayos, y el soporte, al menos inicialmente, de centros especializados con experiencia en estos patógenos. Los arbovirus son generalmente clasificados como agentes biológicos de riesgo, por

lo que su cultivo debe realizarse en condiciones de bioseguridad de nivel 3 para la mayoría de los agentes. Esperamos que este procedimiento ofrezca guías generales para el diagnóstico de arbovirus, información útil sobre el tipo de muestra y el tipo de técnica a utilizar en función de los días transcurridos desde el inicio de los síntomas, y contribuya en definitiva a aumentar la sospecha y diagnóstico en nuestro país de estas infecciones que globalmente se consideran infradiagnosticadas.

## 2. VIRUS DENGUE

### 2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

El virus dengue pertenece al género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*). El genoma del virus está formado por una hebra de ARN de polaridad positiva de alrededor de 10.700 bases que codifica para una poliproteína la cual es procesada en tres proteínas estructurales (C, M y E) y en siete proteínas no estructurales (NS) según el siguiente orden genómico: 5'-CprM (M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'.

La infección por virus dengue está causada por cuatro serotipos del virus (dengue-1, 2, 3 y 4) los cuales inducen inmunidad de larga duración contra el mismo serotipo pero no protegen frente a infecciones por otros serotipos. Los serotipos del virus se dividen a su vez en distintos genotipos, de los que se han descrito más de 20.

El dengue se transmite por la picadura de hembras de mosquito del género *Aedes* infectadas, estableciéndose un ciclo urbano entre el ser humano y el vector que mantiene la circulación del virus y representa un gran problema de salud pública mundial. El virus es transmitido fundamentalmente por dos especies de mosquitos: *Aedes aegypti* (el vector principal a nivel mundial) y el *Aedes albopictus* (mosquito tigre).

### 2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El dengue está ampliamente distribuido en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, afectando a más de 120 países, de tal forma que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de la mitad de la población mundial vive en zonas con riesgo de contraer la enfermedad. Es probablemente la enfermedad transmitida por vectores que más rápido ha aumentado en las últimas décadas y algunos modelos estiman que globalmente podrían producirse cerca de 400 millones de nuevos casos de dengue cada año. El dengue es una enfermedad re-emergente que se expande a nuevos territorios y en la que distintos serotipos del virus se introducen o circulan simultáneamente en zonas endémicas. Representa un riesgo de salud pública para territorios no endémicos pero en los que están presentes mosquitos del género *Aedes* como ocurre en diversos países de la región Europea. En los últimos años, se han descrito casos de dengue de transmisión autóctona (por mosquitos tigre locales) en países como Francia o España.

El dengue es endémico en 5 de las 6 regiones de la OMS (exceptuando la región europea): África, Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental, América y el Pacífico Occidental. Las regiones más afectadas por la enfermedad son América, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. Nuestro conocimiento de la distribución y carga de enfermedad por dengue en África es limitado.

### 2.3. CUADRO CLÍNICO

El periodo de incubación desde la infección hasta la aparición de los síntomas generalmente dura entre 4 y 10 días. El espectro clínico de la infección por dengue es muy amplio. Las infecciones asintomáticas se consideran muy frecuentes, pudiendo representar más de la mitad de los casos. El cuadro de "fiebre clásica por dengue" incluye un síndrome febril agudo acompañado de uno o varios síntomas inespecíficos tales como cefalea intensa, dolor retro-ocular, mialgias y artralgias. Los síntomas gastrointestinales son frecuentes, e incluyen náuseas y vómitos, dolor abdominal, diarrea, percepción distorsionada del sabor de los alimentos (disgeusia) o anorexia. No es infrecuente la aparición de un exantema que predomina en tronco y se extiende a las extremidades. En la analítica sanguínea se observa típicamente leucopenia, y la trombocitopenia es también frecuente.

Los cuadros de dengue se clasifican a nivel clínico en 1) dengue con/sin síntomas de alarma y 2) dengue severo. El dengue es una enfermedad dinámica que clásicamente se divide en tres fases: febril, crítica y de recuperación. Durante la fase crítica, que dura uno o dos días desde la defervescencia de la fiebre pueden aparecer los denominados signos de alarma, que pueden indicar la progresión a dengue severo: dolor abdominal intenso y continuo, vómitos frecuentes, somnolencia y/o agitación, sangrado de mucosas, acumulación de líquido (ascitis, derrame pleural) o hepatomegalia >2 cm. El dengue severo se caracteriza por extravasación importante de plasma, sangrado intenso y fallo orgánico. Puede ser mortal sin un adecuado manejo clínico en el que es fundamental mantener el equilibrio hidroelectrolítico. No existen en la actualidad fármacos antivíricos disponibles específicos frente al dengue. La probabilidad de sufrir un dengue severo es mayor en los casos de dengue secundario que en los primeros episodios de dengue. Existe una vacuna contra los cuatro serotipos de dengue, que ya ha sido aprobada en algunos países, aunque no estaría indicada en niños menores de 9 años de edad por posibles problemas de seguridad, y estaría indicada especialmente en personas con evidencia serológica de haber pasado la infección previamente por alguno de los serotipos del virus

## 2.4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de laboratorio de la infección por virus dengue, al igual que el diagnóstico de otras infecciones por arbovirus, se basa en pruebas de diagnóstico directo y en pruebas de diagnóstico indirecto. Las pruebas de diagnóstico directo son ensayos para detectar el virus e incluyen el aislamiento del virus, la detección de antígeno NS1 y la detección del genoma del virus. Las pruebas de diagnóstico indirecto se basan en la detección de anticuerpos sintetizados contra el virus e incluyen la detección de anticuerpos IgM, la detección de anticuerpos IgG y la detección de anticuerpos neutralizantes. Además, hay disponibles pruebas rápidas para el despistaje de infección por dengue, aunque el rendimiento de estas pruebas es inferior al de los ensayos de referencia.

En general se considera que el diagnóstico directo ofrece una mayor confianza en el diagnóstico (la detección del virus proporciona un diagnóstico confirmado de infección por dengue) pero su oportunidad es menor, en el sentido de que debe realizarse en la fase aguda de la enfermedad, cuando el virus circula en la sangre del paciente. Por el contrario, el diagnóstico indirecto (detección de anticuerpos contra el virus) puede realizarse en un período de tiempo mucho más prolongado, pero ofrece una confianza en el diagnóstico menor, debido a las posibles reacciones cruzadas entre anticuerpos contra otros *Flavivirus* antígenicamente relacionados.

### 2.4.1. Diagnóstico directo

El **aislamiento** de virus dengue en cultivo celular es posible a partir de muestras de sangre o suero, inoculándolas en cultivos celulares utilizando la línea celular Vero (que deriva de riñón de mono verde africano) o la línea celular C6/C36 (células de mosquito *A. albopictus*). Como en el cultivo celular para aislar otros virus, el método se basa en la monitorización del cultivo y la observación de un efecto citopático (que no es específico del virus dengue), que indica crecimiento del virus. El aislamiento del virus no es un método de elección para el diagnóstico de dengue en la mayoría de laboratorios ya que es laborioso, tarda días en ofrecer resultados, precisa de un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 (P3) y no es más sensible que otros métodos de detección directa como los ensayos moleculares. Por todo ello, el aislamiento de dengue en cultivo celular suele utilizarse generalmente sólo en centros especializados, centros de referencia o que posean buena experiencia en el método o para estudios de investigación. El aislamiento del virus, sin embargo, permite confirmar la detección de virus infeccioso y obtener cepas de dengue que puedan ser estudiadas posteriormente para su caracterización. El cultivo ofrece su mayor rendimiento cuando se realiza en muestras obtenidas en los primeros días de la enfermedad (fase aguda virémica).

Las pruebas de **detección molecular** del genoma del virus representan actualmente las pruebas de referencia en cuanto a detección directa de dengue. Como para cualquier otro virus, existen diferentes posibilidades generalmente basadas en la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

Aunque pueden utilizarse protocolos de RT-PCR en tiempo final, los ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizando sondas fluorescentes son de elección debido a su rapidez y sensibilidad. Existe una variedad de métodos de RT-PCR tanto “caseros” (*in-house*) como comerciales para el diagnóstico de dengue. En general, es recomendable no sólo una revisión de la literatura previa a la implementación de un método sino también la validación del mismo con controles de calidad y el consejo de centros especializados de referencia a la hora de elegir un protocolo determinado. Además, dada la variabilidad genética del virus dengue, es posible la aparición de cepas circulantes que no sean detectadas con un método molecular establecido, por lo que se recomienda la vigilancia del rendimiento de los mismos. Un rendimiento subóptimo de un método molecular puede detectarse, por ejemplo, ante amplificación débil o ausencia de amplificación en los primeros días de la enfermedad (cuando la carga viral es elevada) en casos de dengue confirmados serológicamente o por detección de antígeno. Otros ensayos de detección molecular como las amplificaciones isotérmicas (LAMP o RPA) o los métodos basados en secuenciación (tipo Sanger o de nueva generación) son también posibles pero menos utilizados en la rutina diagnóstica. La caracterización molecular a nivel de serotipo del virus, genotipo o cepa circulante generalmente se utiliza con fines epidemiológicos más que diagnósticos.

La **detección de antígeno NS1** es también una herramienta útil dentro del diagnóstico directo de la infección por dengue. Esta proteína no estructural del virus es una glicoproteína que es liberada de las células infectadas y circula en el torrente circulatorio del paciente durante la fase inicial de la enfermedad. Su sensibilidad suele ser inferior para las infecciones por dengue serotipo 2 y para los casos de infección secundaria, por lo que un resultado negativo no excluye la enfermedad. En general, la detección de antígeno no suele ofrecer una mayor sensibilidad que los métodos de RT-PCR. Hay disponibles tests rápidos de detección de NS1 que son menos sensibles que los métodos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) pero que pueden ser útiles en determinadas circunstancias.

#### 2.4.2. Diagnóstico indirecto

Como en la mayoría de infecciones víricas, la detección de anticuerpos de tipo IgM contra el virus precede a la aparición de anticuerpos de clase IgG. La detección de anticuerpos contra el virus puede realizarse por varios métodos incluyendo (ELISA), quimioluminiscencia (CLIA) e inmunofluorescencia (IFI). En general, los métodos de ELISA o CLIA son preferibles a la inmunofluorescencia en términos de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, como ya se ha comentado, la exposición previa a otros *Flavivirus* (infección o vacunación) puede dar reacciones cruzadas en los ensayos serológicos. Dado que en algunas zonas endémicas para dengue otros *Flavivirus* también pueden circular (i.e. fiebre amarilla, *West Nile*, encefalitis japonesa, Zika) los resultados de las pruebas serológicas en ausencia de pruebas de detección directa positivas para dengue se han de interpretar con cautela.

Los ensayos de neutralización se consideran las pruebas serológicas más específicas para infecciones por *flavivirus*. Los anticuerpos neutralizantes no solamente reconocen epítomos de proteínas virales, sino que son funcionales en el sentido de que bloquean la infección del virus. Sin embargo, son ensayos laboriosos, precisan de cultivo celular y virus (y por tanto de los mismos requerimientos de bioseguridad que el aislamiento del virus) y sólo están disponibles en laboratorios especializados. Además, también han demostrado que pueden presentar reacciones cruzadas con anticuerpos contra otros *flavivirus*, por lo que claramente no son pruebas de elección para el diagnóstico serológico de rutina de las infecciones por dengue.

#### 2.4.3. Cinética de los marcadores de infección y aplicabilidad de las técnicas diagnósticas a las muestras clínicas

Dada la frecuencia de la enfermedad, es recomendable descartar la infección por dengue en los viajeros afectados de un síndrome febril compatible provenientes de áreas tropicales y subtropicales. Como además los síntomas son inespecíficos, es conveniente descartar otras arbovirosis como chikungunya o Zika que puedan circular en la misma área geográfica.

El patrón de marcadores de infección por dengue varía en función de si se trata de un primer episodio de dengue (dengue primario, la primera vez que un paciente contrae el dengue) o si se trata de un caso de dengue en un paciente que ya ha tenido la enfermedad con anterioridad (dengue secundario). Los casos de dengue secundario ocurren por un serotipo diferente al del primer episodio, pudiendo una persona sufrir hasta cuatro episodios de dengue (uno por cada serotipo) a lo largo de su vida.

#### 2.4.3.1. Dengue primario

En la fase aguda de la enfermedad, el virus circula en la sangre del paciente y es por tanto el período de elección para las pruebas de diagnóstico directo. Esta fase virémica generalmente dura alrededor de una semana. En esta fase el virus se puede detectar por RT-PCR (sobre todo en los primeros cinco días del cuadro). El antígeno NS1 también puede detectarse en esta fase (aunque es menos sensible que la RT-PCR) y en algunos casos puede ser positivo algunos días después de la negativización de la RT-PCR.

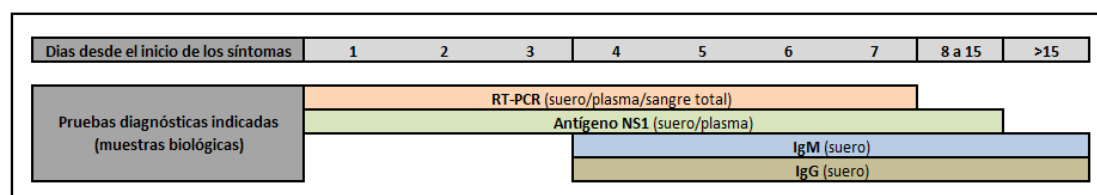
Los anticuerpos IgM aparecen rápidamente, pueden ser positivos desde el tercer o cuarto día tras el inicio de la enfermedad y por lo general son positivos en todos los casos una semana después del inicio del cuadro. Los anticuerpos IgG pueden empezar a detectarse al final de la primera semana del cuadro y suelen ser positivos en todos los casos a los 15 días del inicio de los síntomas. En la figura 1 se recogen las pruebas diagnósticas indicadas en los respectivos tipos de muestra en relación al tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. En la tabla 1 se recogen los criterios de laboratorio para clasificar los casos de dengue como confirmados o probables. En la fase aguda de la enfermedad siempre deberá intentarse detectar la infección por RT-PCR o antígeno NS1 para obtener un diagnóstico de confirmación. La detección de anticuerpos IgM se suele indicar a partir del cuarto día de la enfermedad. Cuando los anticuerpos comienzan a ser positivos, la probabilidad de que la RT-PCR sea positiva es menor. Si sólo se obtiene un resultado de IgM positivo esto se considera un caso probable y se deben repetir las determinaciones en una muestra posterior para valorar seroconversión en la IgG. En estos casos de diagnóstico puramente serológico, se deberían excluir las posibles infecciones por otros posibles *Flavivirus* que puedan presentar reacciones cruzadas.

#### 2.4.3.2. Dengue secundario

En los casos de dengue secundario el patrón de marcadores de la infección muestra algunas diferencias con respecto a la infección primaria. La fase virémica es similar, pudiéndose detectar el virus por RT-PCR. También puede detectarse el antígeno NS1, pero la sensibilidad de esta prueba es menor en casos secundarios, probablemente por la formación de inmunocomplejos entre el antígeno y anticuerpos preexistentes de la primera infección por dengue.

Existen IgG previas (sintetizadas contra el serotipo de la infección anterior) que ya son positivas desde el inicio de los síntomas, de forma que en el diagnóstico de laboratorio para dengue secundario se observa una prueba de RT-PCR positiva en presencia de una IgG positiva en la fase aguda del cuadro. Los anticuerpos IgM muestran valores generalmente inferiores a los obtenidos en un primer episodio de dengue, y pueden llegar a ser incluso negativos en algunos casos de dengue secundario.

**Figura 1. Pruebas indicadas para el diagnóstico de dengue en relación al tiempo desde el inicio de los síntomas**



#### Observaciones

Las pruebas de RT-PCR pueden intentarse en muestras de orina, ya que en algunos casos, es posible detectar el genoma viral más allá de la fase virémica  
 Las pruebas de detección de anticuerpos pueden presentar reacciones cruzadas ante una exposición (infección o vacunación) a otros flavivirus relacionados  
 Ante la sospecha de cuadro neurológico por dengue, realizar pruebas moleculares y serológicas en muestra de líquido cefalorraquídeo  
 Ante la sospecha de dengue secundario, solicitar pruebas de detección de anticuerpos desde el inicio de los síntomas

**Tabla 1. Criterios diagnósticos de laboratorio para la clasificación de casos de dengue**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Dengue confirmado:</b> al menos uno de los siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aislamiento del virus en cultivo celular</li> <li>2. Detección del genoma viral (RT-PCR positiva)</li> <li>3. Detección de antígeno NS1</li> <li>4. Seroconversión de anticuerpos contra dengue en dos muestras pareadas (con anticuerpos negativos frente a otros posibles flavivirus)</li> </ol> <p><b>Dengue probable:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Detección de anticuerpos IgM en una muestra</li> </ol> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**Observaciones**

Una prueba de RT-PCR positiva en suero en presencia de una IgG positiva contra dengue podría indicar un caso de dengue secundario

### 3. VIRUS CHIKUNGUNYA

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Según se recoge por el ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), el virus Chikungunya (VCHIK) pertenece al serocomplejo del virus del Bosque de Semliki dentro del género *Alphavirus* en la familia *Togaviridae*.

Se han descrito tres genotipos asociados a la distribución geográfica clásica: África del Oeste (WA), Este/Centro/Sur África (ECSA) y Asia. Se ha descrito también un subtipo del genotipo ECSA, el del Océano Índico, en el que una mutación en la glicoproteína E1 (A226V) favorece su transmisión en el mosquito *Aedes albopictus*. En los periodos inter-epidémicos, el virus se mantiene en un ciclo enzoótico entre primates no humanos y vectores del género *Aedes* aunque se ha descrito que puede infectar búfalos, roedores y aves. Las epidemias se producen cuando llega a las ciudades produciendo ciclos urbanos con el hombre como huésped y mosquitos de las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* como vectores.

#### 3.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La enfermedad se identifica en Tanzania en 1952. A continuación, circula básicamente en Asia (primera descripción en 1958) y África. Sin embargo, en 2004 alcanzó varias islas del Océano Índico y llegó a India produciendo más de un millón de casos. En 2007 se produce por primera vez en Europa un brote autóctono en Italia. La llegada a las Américas se produce en una isla del Caribe, Saint Martin, en diciembre de 2013 por una cepa de linaje asiático desde donde se expandió por el continente causando millones de casos.

#### 3.3 CUADRO CLÍNICO

El periodo de incubación típico es de 3-7 días (rango:1-12). Sólo un 15% de los casos son asintomáticos. Los síntomas típicos incluyen fiebre abrupta, poliartralgia, dolor de cabeza, erupción cutánea, mialgias, y náusea/vómito. Las manifestaciones clínicas se pueden dividir en tres fases y producen un gran impacto en la calidad de vida de los afectados.

**Fase aguda:** aparición brusca de fiebre alta y dolores articulares fuertes. Dura 3-10 días. Puede aparecer dolor de cabeza, de espalda, mialgias, náuseas, vómito, erupción cutánea y conjuntivitis.

**Fase subaguda o convalescente:** los síntomas mejoran pero más del 40% pueden presentar artralgias persistentes, astenia, mialgias, y/o dolor de cabeza.

**Fase crónica:** la definen las artralgias persistentes con una duración de más de 3 meses. Algunos pacientes presentan complicaciones por la respuesta inflamatoria crónica cursando con artritis y artropatía destructiva semejante a la artritis reumatoide o psoriásica. Generalmente son pacientes ancianos, con enfermedades articulares previas y presentan síntomas graves en la fase aguda.

### 3.4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

La detección directa del virus o alguno de sus componentes se considera criterio de laboratorio para confirmar la infección por VCHIK. La detección de IgM, seroconversión de IgG o aumento de cuatro veces el título de anticuerpos en muestras pareadas tomadas en un intervalo de unos 15 días son también confirmatorias de infección por el virus si no hay co-circulación de miembros del género *Alphavirus* antigénicamente relacionados (miembros del serocomplejo del Bosque de Semliki como O'nyong Nyong, Mayaro o Río Ross) o si se ha descartado su presencia con pruebas de laboratorio.

Los hallazgos hematológicos son generalmente inespecíficos, aunque la linfopenia y la hipocalcemia son los más frecuentes, mientras que la trombocitopenia es rara. La proteína C suele estar elevada en la fase aguda y se ha visto elevación de algunas enzimas hepáticas.

#### 3.4.1. Diagnóstico directo

El **aislamiento** de virus chikungunya en cultivo celular no se utiliza como herramienta diagnóstica rutinaria, pero es de gran interés para la obtención de cepas que pueden utilizarse para caracterizar mejor los virus y realizar otro tipo de investigaciones que requieran virus vivo. El virus puede aislarse a partir del suero hasta 7 días desde el inicio de los síntomas, inoculando la muestra en células de mamífero (fundamentalmente Vero pero también LLC-MK2, BHK-21 y 293T) o mosquito (C6-36), pudiéndose observar efecto citopático entre 1-3 días tras la inoculación. Probablemente en la línea celular de mosquito se alcanzan títulos virales más altos.

Las pruebas de **detección molecular** representan el método de elección para el diagnóstico directo de la infección por VCHIK. Hay numerosos métodos moleculares desarrollados y son el ensayo de elección en los primeros días de la infección cuando todavía la IgM no es detectable. Aunque hay pruebas LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) y TMA (*transcription-mediated amplification*), la RT-PCR en tiempo real es la técnica molecular más empleada. Es relevante decir que, cuando se hace el diagnóstico de infección por RT-PCR en lugares donde se sabe que el virus está circulando, se considera un diagnóstico de confirmación. Sin embargo, si el virus se detecta por primera vez en un área geográfica nueva, es necesario la confirmación del resultado por un segundo laboratorio para evitar falsos positivos.

Existe una gran variedad de métodos caseros publicados para la detección de VCHIK. En la revisión realizada por Natrajan y cols (2019) se aporta una tabla resumen con las principales características de PCR en tiempo real, en formato LAMP o convencionales mientras que Pezzi y cols (2019) hacen una revisión de los primeros utilizados en muchas de las RT-PCRs en tiempo real (las principalmente utilizadas en diagnóstico). La utilización de uno u otro método depende de las ventajas y desventajas que cada uno ofrece unido a las capacidades e instalaciones de un determinado laboratorio aunque hay que tener en cuenta que muchos métodos presentan limitaciones a la hora de detectar el linaje WA del virus.

En general, los métodos en tiempo real tienen una mayor sensibilidad que las PCRs convencionales, aunque entre ellos no han demostrado claras diferencias. El uso de sistemas multiplex que permitan diagnóstico diferencial con otros agentes en la misma reacción no tiene que suponer una menor sensibilidad para la detección de VCHIK aportando grandes ventajas para el diagnóstico de infecciones en zonas donde exista transmisión de varios arbovirus y/o otras infecciones como la malaria. Desde la Organización Mundial de la Salud se ha establecido un ARN como estándar internacional disponible para su utilización en técnicas basadas en amplificación de ácidos nucleicos y se pueden encontrar controles de calidad para detección molecular de VCHIK organizados por casas comerciales como QCMD o INSTAND. Algunas iniciativas internacionales han evaluado el rendimiento del diagnóstico entre diferentes laboratorios, mostrando como variables relevantes asociadas al mismo el desempeño de cada laboratorio, el peligro de contaminación de las RT-nested-PCRs y el problema de algunas pruebas en cuanto a sensibilidad y especificidad. Estos resultados indican la necesidad de un buen diseño de los iniciadores unido a adecuadas prácticas de laboratorio que deben ser evaluadas periódicamente en este tipo de ensayos.

### 3.4.2. Diagnóstico indirecto

Para la detección de anticuerpos IgM e IgG existe una variedad de métodos comerciales y muchos han sido evaluados por Johnson y cols (2016). En la revisión realizada por Pezzi y cols (2019) se pueden consultar los disponibles así como su nivel de eficiencia. En términos generales, los métodos enzimáticos (ELISA) son los más utilizados y dentro de ellos los desarrollados por Euroimmun e InBios presentan la mejor sensibilidad y especificidad seguidos por Abcam. La metodología para detección de respuesta serológica también se ha utilizado en diferentes intercomparaciones internacionales. Algo más del 50% de los laboratorios participantes obtuvieron buenos resultados (siendo la falta de sensibilidad el principal problema y detectándose grandes diferencias en el desempeño de laboratorios utilizando el mismo ensayo debido, probablemente, a errores en las prácticas de laboratorio).

Dos aspectos importantes a considerar en el diagnóstico serológico de VCHIK son la crioglobulinemia descrita para VCHIK y que podría dar lugar a resultados falsos negativos en pacientes si su suero ha sido conservado a 4°C y la reactividad cruzada descrita en algunos miembros de este género que dificulta la identificación específica del alfavirus causante de la infección. Al igual que para el diagnóstico molecular, se ha visto que el uso de muestras secas en papel de filtro puede ofrecer buenos resultados diagnósticos.

En cuanto a las pruebas de **detección de antígeno**, en general los métodos descritos adolecen de falta de sensibilidad y han sido probados mayoritariamente con cepas del linaje asiático únicamente.

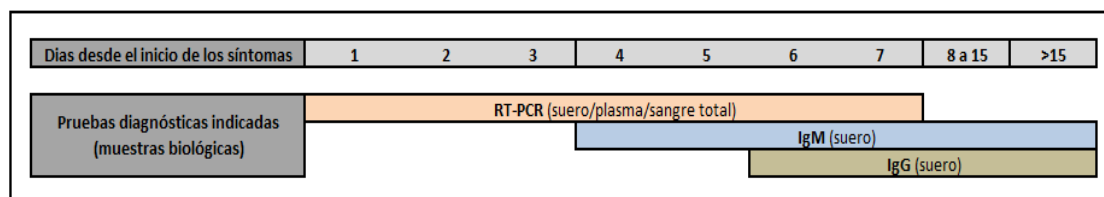
### 3.4.3. Cinética de los marcadores de infección y aplicabilidad de las técnicas diagnósticas a las muestras clínicas

Tras el período de incubación, la fase aguda de la infección se caracteriza por presentar una viremia, que puede estar por encima de  $10^{11}$  copias/ml de suero, y por tanto la aplicación de técnicas de RT-PCR es especialmente rentable en los 4-5 primeros días, aunque se ha detectado genoma del virus hasta 17 días desde el inicio de síntomas.

La IgM aparece a los 4-6 días del cuadro y se puede detectar hasta 3-4 meses desde el inicio de los síntomas aunque, sobre todo en casos con artralgias crónicas, puede persistir más de un año. También se ha detectado en LCR en pacientes con cuadros neurológicos aunque aparecería algo después que en suero. La IgG aparece algo después que la IgM, entre los días 6-7 tras aparición de los síntomas y puede persistir varios años.

Las muestras de elección para el diagnóstico son el suero o el plasma. El virus se ha podido detectar en otras muestras como saliva, semen, orina o leche materna, pero con unas tasas de detección inferiores a las de las muestras sanguíneas, por lo que no representan muestras de elección para el diagnóstico molecular. En cuadros neurológicos, los cuales son infrecuentes, puede detectarse el genoma viral en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR).

En la figura 2 se recogen las pruebas diagnósticas indicadas en los respectivos tipos de muestra en relación al tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. En la tabla 2 se indican los criterios de laboratorio para clasificar los casos de infección por VCHIK.

**Figura 2. Pruebas indicadas para el diagnóstico de Chikungunya en relación al tiempo desde el inicio de los síntomas****Observaciones**

Las pruebas de RT-PCR pueden intentarse en muestras de saliva en la primera semana; y en orina y semen, ya que en algunos casos, es posible detectar el genoma viral más allá de la fase virémica

Las pruebas de detección de anticuerpos pueden presentar reacciones cruzadas ante una exposición a otros alfavirus relacionados

Ante la sospecha de cuadro neurológico por chikungunya, realizar pruebas moleculares y serológicas en muestra de líquido cefalorraquídeo

**Tabla 2. Criterios diagnósticos de laboratorio para la clasificación de casos de Chikungunya**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Chikungunya confirmado:</b> al menos uno de los siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aislamiento del virus en muestra clínica.</li> <li>2. Presencia de ácido nucleico viral mediante en muestra clínica.</li> <li>3. Presencia de anticuerpos IgM específicos en una única muestra de suero.</li> <li>4. Seroconversión a anticuerpos o aumento de cuatro veces el título de anticuerpos contra Chikungunya en muestras pareadas (con anticuerpos negativos frente a otros alfavirus )</li> </ol> <p><b>Chikungunya probable:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Detección de anticuerpos IgM en una muestra</li> </ol> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## 4. VIRUS ZIKA

### 4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El virus de Zika (VZIK) pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, y se descubrió por primera vez en 1947 en África. El virus es transmitido por mosquitos del género *Aedes*, principalmente *A.aegypti*, pero otras especies, como *Aedes albopictus* también pueden transmitirlo. Además del vectorial, se han descrito otros modos de transmisión como de la madre al feto durante el embarazo, contacto sexual, transfusión de sangre y productos sanguíneos y el trasplante de órganos. Se han descrito dos linajes de este virus originado en el este de África, uno africano y otro asiático, siendo este último el responsable de su reciente expansión. Desde su descubrimiento, las infecciones por VZIK en humanos han sido esporádicas, asociándose a una enfermedad leve e inespecífica y cobró gran importancia a partir del 2013 (Asia) y 2015 (América) cuando se asoció a complicaciones neurológicas y casos de microcefalia, siendo tal la situación que la OMS declaró el estado de emergencia de salud pública a nivel internacional el 1 de febrero de 2016. El VZIK está incluido en la lista que ha desarrollado la OMS y que determina aquellas enfermedades que representan un riesgo para la salud pública debido a su potencial epidémico y para las cuales no existen o no hay contramedidas suficientes, priorizando así su investigación y desarrollo en contextos de emergencia de salud pública.

### 4.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Hasta la fecha se han registrado brotes de enfermedad por este virus en África, América, Caribe, Asia y el Pacífico. El VZIK se identificó por vez primera en macacos en Uganda en 1947 y en 1952 se identificó en el ser humano en Uganda y Tanzania. Entre los años sesenta y los ochenta se detectaron infecciones humanas esporádicas raras en África y Asia acompañadas de enfermedad leve. Ésto cambió debido a su emergencia en el Pacífico, registrándose el primer brote en la Isla de Yap (Micronesia) en 2007 y en 2013-2014 un gran brote en la Polinesia Francesa, donde se describieron cuadros neurológicos severos asociados, entre otros

el síndrome de Guillain-Barré (GBS). Posteriormente en 2015, el virus llegó a las Américas donde causó una gran epidemia entre 2015–2016, describiéndose los primeros casos en Brasil y expandiéndose por todo Latinoamérica y el Caribe, reportándose un aumento dramático en malformaciones congénitas severas (microcefalia) y su asociación con el síndrome de Guillain-Barré. Hasta Julio del 2019, 87 países y territorios han notificado casos autóctonos de infección por VZIK transmitida por mosquitos (*World Health Organization. Countries and territories with current or previous Zika virus transmission. July 2019.* <https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/countries-with-zika-and-vectors-table.pdf>).

Actualmente la circulación de VZIK ha disminuido sustancialmente en América y el Caribe, habiéndose informado brotes más pequeños en países de África, Asia y Oceanía. En Asia, las investigaciones retrospectivas y la vigilancia epidemiológica sugieren una amplia distribución geográfica del virus, mientras que en África, la información sobre la circulación sigue siendo limitada. En Europa hay dos vectores que han demostrado ser competentes para el VZIK en estudios de laboratorio: *Aedes albopictus* y *Aedes japonicus*, siendo su competencia menor que la de *Aedes aegypti*. Por lo tanto, la probabilidad de transmisión del VZIK por mosquitos es muy baja durante la primavera, mientras que durante el verano y el otoño, cuando las temperaturas y la abundancia de vectores son más altas, la transmisión autóctona es posible, si el virus es introducido por un viajero virémico. De hecho, en otoño del 2019 se han registrado los primeros casos autóctonos en humanos en Francia. En España, además de casos en viajeros, se han notificado casos de infección congénita y casos de transmisión sexual.

#### 4.3. CUADRO CLÍNICO

El periodo de incubación estimado de la enfermedad por VZIK es de 3 a 14 días si la transmisión ha sido vectorial, o más largo (12-44 días) si la transmisión ha sido vía sexual. La mayoría de las personas infectadas son asintomáticas y cuando se desarrollan síntomas éstos son generalmente leves, y pueden pasar desapercibidos o diagnosticarse erróneamente como dengue, chikungunya u otras patologías virales que cursen con fiebre y exantema. La enfermedad suele durar de 2 a 7 días y consiste en fiebre, erupciones cutáneas, conjuntivitis, dolores musculares y articulares, malestar y cefaleas. Las muertes asociadas al virus son raras. Si la infección se produce durante el embarazo, especialmente en el primer trimestre, el virus se puede transmitir de la madre al feto y producir microcefalia y otras malformaciones congénitas (como contracturas de los miembros, hipertonía muscular, alteraciones oculares y sordera), que constituyen el síndrome congénito por el virus de Zika. La infección se asocia también a complicaciones en el embarazo, como el parto prematuro, aborto espontáneo y muerte intrauterina. Se estima que entre un 5–15% de los hijos de mujeres infectadas durante el embarazo presentan complicaciones relacionadas con el virus, las cuales pueden aparecer tras infecciones sintomáticas o asintomáticas. La infección también puede desencadenar en afectaciones neurológicas como síndrome de Guillain-Barré, neuropatía y mielitis, sobre todo en adultos y niños mayores.

No existe un tratamiento profiláctico o curativo ni vacuna frente a la infección por VZIK. Por lo tanto, se recomiendan medidas personales preventivas para evitar las picaduras de mosquitos, especialmente en embarazadas, mujeres en edad fértil y niños pequeños

#### 4.4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El reciente aumento de los casos de microcefalia y de otros trastornos neurológicos asociados a la infección por VZIK ha provocado un aumento de la demanda de pruebas de laboratorio para detectar dicha infección. Los grupos prioritarios son los pacientes sintomáticos y las embarazadas asintomáticas posiblemente expuestas al virus. La infección puede sospecharse a partir de los síntomas en personas que residan o viajen a zonas donde haya transmisión del virus y/o mosquitos vectores (*Aedes* spp.). Sin embargo, el diagnóstico sólo se puede confirmar mediante pruebas de laboratorio, ya que los síntomas son muy similares a otras infecciones por arbovirus, como dengue, chikungunya o fiebre amarilla entre otros, con los cuales además comparte área de distribución. El diagnóstico de laboratorio es complicado, ya que la viremia es de corta duración en la fase aguda, y existe una alta reactividad cruzada a nivel serológico con otros miembros del género *Flavivirus*. Así como para otras arbovirosis, el correcto diagnóstico de la enfermedad debe combinar tanto métodos moleculares como serológicos.

#### 4.4.1. Diagnóstico directo

El **aislamiento** del virus en cultivo celular es una técnica laboriosa y menos sensible que la detección molecular, por lo que no se utiliza de rutina en el diagnóstico de la enfermedad y se realiza principalmente con fines de investigación y en laboratorios de referencia. Las líneas celulares más empleadas son de mamífero (Vero, LLC-MK<sub>2</sub> y PS-C<sub>1</sub>) y de insecto (C6/36). El virus se ha conseguido aislar con éxito de muestras humanas de sangre, semen y orina.

Las pruebas de **detección molecular** son de elección entre las técnicas de diagnóstico directo. Actualmente hay numerosos métodos moleculares desarrollados siendo los ensayos de RT-PCR y sobre todo la RT-PCR en tiempo real las técnicas más empleadas. Se está avanzando con otras técnicas como LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), TMA (*transcription-mediated amplification*), biosensores y NASBA (amplificación basada en secuencia de ácido nucleico), entre otras. Existe una gran variedad de métodos caseros publicados y comerciales para la detección de VZIK y la utilización de uno u otro depende de las ventajas y desventajas que cada uno ofrece unido a las capacidades e instalaciones de un determinado laboratorio. En general, el método más usado es la RT-PCR en tiempo real, que es rápida, sensible y mediante el uso de sondas específicas, permite su uso con sistema monoplex (solo detecta VZIK) o de sistemas multiplex para llevar a cabo un diagnóstico diferencial con otros agentes en la misma reacción aportando grandes ventajas para el diagnóstico de infecciones en zonas donde existe transmisión de varios agentes sindrómicos (por ejemplo, con dengue, Zika o fiebre amarilla, entre otros).

Los métodos de **detección de antígeno** no tienen una sensibilidad y especificidad bien definida. Se usan sólo para la identificación de antígenos virales en tejidos mediante técnicas de inmunohistoquímica.

#### 4.4.2. Diagnóstico indirecto

Los anticuerpos IgM o IgG contra VZIK se pueden detectar mediante ELISA, ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) o de quimioluminiscencia (CLIA). Existe una buena variedad de métodos comerciales serológicos, y en términos generales, los métodos enzimáticos (ELISA) son los más utilizados. La investigación serológica requiere la toma de al menos un par de muestras de suero obtenidas en un intervalo de 2 a 3 semanas. El diagnóstico reciente de infección puede ser respaldado por una seroconversión o un aumento de cuatro veces el título de anticuerpos en muestras pareadas. Los resultados serológicos se pueden confirmar con la técnica de neutralización viral (NT), que detectan anticuerpos neutralizantes frente al virus, siendo la prueba serológica más específica. Un aspecto importante a considerar en el diagnóstico serológico de VZIK es la reactividad cruzada descrita entre algunos *Flavivirus* que dificulta la identificación específica del virus causante de la infección, esto es muy importante para diferenciar entre los virus Zika y dengue, al producir cuadros clínicos similares y circular en las mismas áreas geográficas. Así, la interpretación de los resultados serológicos debe tener sistemáticamente en cuenta el estado del individuo (mujeres embarazadas, recién nacidos, inmunodeprimidos) y la posibilidad de infecciones o vacunaciones previas a *Flavivirus* (por ejemplo, vacunación contra la fiebre amarilla o contra la encefalitis japonesa). La técnica de NT debe hacerse también frente a los posibles *Flavivirus* circulantes en la zona y tener en cuenta la diferencia de cuatro veces el título frente a los diferentes virus ensayados para poder dar un resultado concluyente. Sin embargo, las limitaciones inherentes a los ensayos de NT (laboriosidad, necesidad de manipular cultivos virales, tiempo hasta el resultado) hacen que estos métodos se empleen muy poco en los servicios de microbiología hospitalarios y generalmente se lleven a cabo en laboratorios de referencia o especializados.

#### 4.4.3. Cinética de los marcadores de infección y aplicabilidad de las técnicas diagnósticas a las muestras clínicas

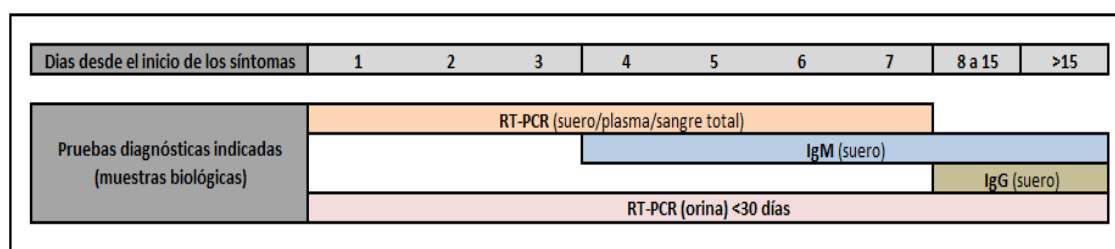
En general, la viremia se detecta durante la primera semana de la enfermedad. En pacientes asintomáticos, la duración y nivel de viremia aún se desconoce y en mujeres embarazadas puede detectarse el virus en sangre hasta 9 semanas tras el inicio de síntomas. Debido a que la viremia disminuye por lo general rápidamente tras 5 días del inicio de síntomas, una prueba de RT-PCR negativa en sangre recogida 5–7 días del inicio de síntomas no excluye la infección por el virus y, por lo tanto, el diagnóstico debe complementarse

con pruebas serológicas. Los anticuerpos IgM se pueden detectar a los 4-7 días del inicio de síntomas y hasta los 2-3 meses, pero a veces incluso durante un período de tiempo mucho más prolongado. Los anticuerpos IgG aparecen más tarde, generalmente entre 8 a 10 días del inicio de síntomas y permanecen detectables durante meses e incluso años. Las técnicas de neutralización viral pueden emplearse una vez que se detectan anticuerpos IgM.

El VZIK se ha detectado en sangre completa, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y amniótico, semen, exudado vaginal, leche materna y saliva. La muestra de saliva no parece aportar beneficios respecto a la muestra de suero. Se recomienda el análisis principalmente en muestras de sangre, suero y orina, debido a que es donde se ha visto mayor carga viral y de mayor duración. Las muestras de orina pueden extender el período de detección viral hasta un mes tras el inicio de los síntomas. La persistencia del virus en semen, en los casos en los que ocurre, dura hasta tres meses desde el inicio de los síntomas, aunque hay casos aislados donde la detección en este fluido es más prolongada. En algunos casos, la muestra de semen puede contribuir al diagnóstico del VZIK, si bien no es una muestra “estándar” en el diagnóstico microbiológico de la infección. Igualmente, se ha detectado persistencia a largo plazo del virus en el líquido amniótico y en tejidos fetales. Se recomienda analizar muestras de LCR por métodos serológicos y moleculares ante la sospecha de infección neurológica por VZIK.

En la figura 3 se recogen las pruebas diagnósticas indicadas en los respectivos tipos de muestra en relación al tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. En la tabla 3 se indican los criterios de laboratorio para clasificar los casos de infección por VZIK.

**Figura 3. Pruebas indicadas para el diagnóstico de Zika en relación al tiempo desde el inicio de los síntomas**



#### Observaciones

Las pruebas de RT-PCR pueden intentarse en muestras de saliva en la primera semana; y en orina y semen, ya que en algunos casos, es posible detectar el genoma viral más allá de la fase virémica

Las pruebas de detección de anticuerpos pueden presentar reacciones cruzadas ante una exposición a otros flavivirus relacionados

Ante la sospecha de cuadro neurológico por Zika, realizar pruebas moleculares y serológicas en muestra de líquido cefalorraquídeo

**Tabla 3. Criterios diagnósticos de laboratorio para la clasificación de casos de Zika**

**Zika confirmado:** al menos uno de los siguientes:

1. Aislamiento del virus en cultivo celular de muestra clínica
2. Detección del genoma viral en muestra clínica
3. Detección de antígeno en muestra clínica
4. Presencia de anticuerpos IgM específicos en muestra de suero confirmado por neutralización viral
5. Seroconversión o aumento de cuatro veces el título de anticuerpos contra Zika en muestras pareadas (con anticuerpos negativos frente a otros flavivirus)

**Zika probable:**

1. Detección de anticuerpos IgM en una muestra de suero

## 5. VIRUS DEL NILO OCCIDENTAL (WEST NILE)

### 5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El virus West Nile (VWN) o virus del Nilo Occidental, es un arbovirus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* y se incluye en el serocomplejo del virus de la encefalitis japonesa. Fue descrito por primera vez en el distrito West Nile de Uganda en 1937.

Es un virus de unos 50 nm de diámetro con envoltura, cuyo genoma consiste en una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva que codifica una única poliproteína que, mediante la acción de proteasas víricas y celulares, da lugar a 3 proteínas estructurales (cápside, premembrana y envoltura) y 7 proteínas no estructurales implicadas en la replicación. Se han descrito hasta 8 linajes genéticos del VWN, si bien los linajes 1 y 2 son los principales que afectan al ser humano.

El VWN se transmite por la picadura de mosquitos del género *Culex*. El virus se mantiene en la naturaleza en un ciclo selvático o rural en el que circula entre aves y mosquitos. Las aves passeriformes, en las que el virus alcanza elevados niveles de viremia, están eficazmente implicadas en la transmisión del virus. Ocasionalmente, relacionado con cambios climáticos, se produce el “salto” a un ciclo urbano en el que los mosquitos actúan como “puente” entre las aves y los mamíferos. En estas circunstancias se producen las graves epidemias con elevada incidencia en humanos y en caballos. Éstos son hospedadores accidentales del virus ya que los niveles de viremia que se alcanzan en ellos no son suficientes para infectar a un nuevo mosquito.

La época de máxima incidencia de infección por VWN coincide con el pico de actividad de las poblaciones de mosquitos, que en las regiones templadas tiene lugar del verano al otoño. A final de otoño hay mayor riesgo de transmisión a mamíferos, al producirse durante el verano varios ciclos de replicación en aves y mosquitos, por lo que un elevado número de mosquitos estarían infectados. Se ha descrito la transmisión de VWN a través de transfusiones o trasplantes de órganos de donantes infectados y la transmisión de madre a hijo.

Actualmente, en nuestro país existe un Plan Nacional para la Vigilancia de la Fiebre del Nilo Occidental (FNO) que se activa desde marzo-abril hasta finales de noviembre. Los objetivos del plan de vigilancia son: detectar circulación del virus en una zona y disponer de la información para valorar el riesgo de enfermedad desde el punto de vista de la sanidad animal y de la salud pública, para así adoptar las medidas específicas de control.

### 5.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

A mediados de los años 90 se introdujo el VWN en Europa por aves migratorias desde África, cuando se documentó un brote de casos de encefalitis en Rumanía. Fue en 1999 cuando se declaró una gran epidemia en Nueva York. Desde entonces, el virus se ha diseminado a través de diversos países de Europa y América.

El linaje 1 presenta distribución mundial. Los virus del linaje 2 se localizaban en África Subsahariana y Madagascar, hasta que, a partir del 2004, aparecen en Europa (Hungría, Rusia, Rumania, Grecia) ocasionando grandes brotes con numerosos casos de enfermedad neuroinvasiva. Se ha descrito un linaje 3 en República Checa en mosquitos, sin que se haya detectado patogenicidad en mamíferos, y un linaje 4 en garrapatas de la región del Cáucaso. En la India se han encontrado cepas pertenecientes al linaje 5 en fuentes diversas (mosquito, murciélago, humano). En 2010, se propuso un nuevo linaje para un virus detectado en mosquitos en España.

El informe anual del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) de 2018, demuestra casos autóctonos de infección por VWN en humanos en 11 países europeos.

La primera vez que se detectó VWN en España fue en 2004 en aves, fecha en la cual, de forma retrospectiva también se notificó un caso humano en Cataluña. Posteriormente, se han notificado dos casos en 2010 y 3 casos en 2016 en Andalucía, coincidiendo con brotes de enfermedad en caballos en diferentes fincas de las provincias de Sevilla, Huelva, Cádiz, Málaga y Córdoba. Desde 2016, no se ha notificado ningún caso humano de infección por VWN aunque sí que han seguido apareciendo brotes equinos en este área.

### 5.3. CUADRO CLÍNICO

El periodo de incubación de la infección es de 2-14 días tras la picadura del mosquito. La mayoría de las infecciones por VWN en humanos son asintomáticas. Tan sólo un 20% desarrollan un cuadro clínico, generalmente leve y autolimitado, que cursa como un síndrome gripal con signos y síntomas inespecíficos. La forma neuroinvasiva de la enfermedad se presenta en menos del 1% de los infectados, aproximadamente en 1 de cada 150 casos. Los tres síndromes más frecuentes asociados a la enfermedad neuroinvasiva son: encefalitis (50-60%), meningitis (35-40%) pseudopoliomielitis (5-10%). Otras presentaciones asociadas a la enfermedad neuroinvasiva por VWN son: cerebelitis, neuropatía craneal, polineuropatía, radiculopatía, coriorretinitis, rabdomiolisis y neuritis óptica. Aunque muy infrecuentemente, se han descrito casos extra-neurológicos como pancreatitis, hepatitis, uveítis, miocarditis, orquitis y vitritis.

La mayoría de los pacientes con encefalitis o meningitis por VWN se recuperan en un periodo variable entre días y varios meses, dependiendo del cuadro clínico (tienen peor pronóstico los casos de encefalitis) y condiciones predisponentes (inmunodepresión, trasplante).

### 5.4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de laboratorio de la infección por VWN se basa en la sospecha clínica (síndromes febriles y cuadros neurológicos) y en la confirmación por pruebas diagnósticas de laboratorio. Las pruebas de detección genómica ofrecen un diagnóstico de confirmación mientras que las pruebas de detección de anticuerpos deben interpretarse con cautela, debido a la posible reacción cruzada con anticuerpos contra otros *flavivirus*.

#### 5.4.1. Diagnóstico directo

Para el **aislamiento** del virus en cultivo celular se pueden utilizar diversas líneas celulares de mamíferos como BHK-1, BHK-21 y Vero. El VWN también se propaga en células de embrión de pollo y en líneas celulares de mosquito. No obstante, el virus no se propaga fácilmente en cultivos celulares y requiere un mínimo de 7 días para la observación del efecto citopático. Por tanto, con fines diagnósticos, el cultivo viral posee más inconvenientes que ventajas comparado con la RT-PCR, dada su menor sensibilidad fundamentalmente. Además, dados los niveles de contención de riesgo 3 requeridos, el cultivo celular queda restringido a laboratorios dotados con estos niveles de bioseguridad. El aislamiento del virus en cultivo proporciona cepas virales de gran interés epidemiológico.

La **detección molecular** de ARN del VWN en cualquiera de las muestras clínicas representa un diagnóstico de confirmación de la infección. Para la detección de VWN mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos las muestras de suero y LCR se deben tomar en los primeros días de la infección. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos han demostrado mayor rendimiento en un contexto de epidemia en cuanto a la vigilancia de la FNO, dado que la sospecha esporádica de infección neurológica por VWN puede ser tardía y las muestras son recogidas más allá de la fase aguda de la enfermedad. La técnica más usada es la RT-PCR, especialmente en tiempo real. Existen métodos comerciales disponibles para la detección de ARN del VWN, pero no suelen diferenciar entre los linajes del virus. La determinación del linaje del virus tiene fundamentalmente fines epidemiológicos y está imitada a laboratorios de referencia. Dada la frecuencia de infecciones asintomáticas y la posibilidad de contagio por transfusión, existen métodos

de cribado comerciales disponibles para bancos de sangre. También es útil disponer de otras técnicas para detección genérica de *flavivirus*, basadas en RT-PCR convencional o RT-PCR-*nested*. La RT-PCR genérica presenta como ventaja frente a la RT-PCR en tiempo real específica que permite la detección de otros *Flavivirus* además del VWN y puede alcanzar una buena sensibilidad. Sin embargo, necesita de una secuenciación posterior para la identificación, alargando el tiempo de procesamiento.

La **detección de antígeno** no representa una técnica diagnóstica rutinaria, aunque puede realizarse en muestras de tejido mediante inmunohistoquímica.

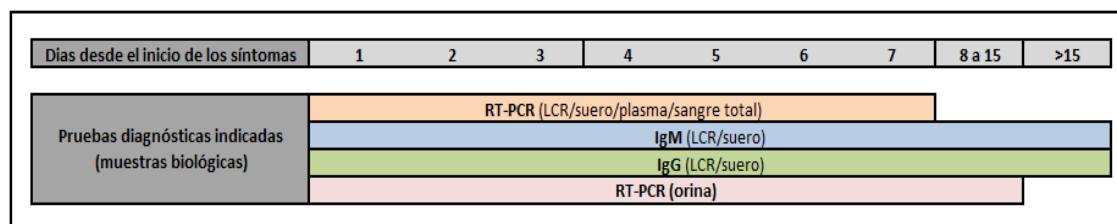
#### 5.4.2. Diagnóstico indirecto

El diagnóstico indirecto de VWN se basa en la detección de anticuerpos IgM/IgG en suero y/o LCR y constituye un pilar fundamental en el diagnóstico de la infección. Los métodos comerciales más utilizados y principalmente recomendados para la detección de anticuerpos IgM e IgG frente a VWN en muestras clínicas humanas se basan sobre todo en técnicas de ELISA de captura y también pueden utilizarse técnicas de inmunofluorescencia. El mayor inconveniente de la serología para diagnóstico de infección por VWN, es la especificidad, dada la posibilidad de reacciones cruzadas con otros *Flavivirus* con los que el VWN está estrechamente relacionado (fiebre amarilla, Usutu, encefalitis japonesa). La detección de IgM contra VWN de síntesis intratecal es diagnóstica de la infección neurológica, mientras que la detección aislada de IgM anti-VWN en una muestra de suero cumple el criterio de caso probable pero no confirma el diagnóstico. La confirmación serológica se ha de llevar a cabo mediante ensayos de neutralización. Es conveniente excluir la presencia de anticuerpos contra otros *Flavivirus* incluso en los ensayos de neutralización. Estos ensayos son laboriosos y requieren de cultivo viral, por lo que deben ser realizados en un laboratorio con nivel de bioseguridad 3.

#### 5.4.3. Cinética de los marcadores de infección y aplicabilidad de las técnicas diagnósticas a las muestras clínicas

Las muestras principales para el diagnóstico son la sangre y el LCR (en infecciones neurológicas). En la infección neuroinvasiva es posible detectar el virus en muestras de LCR, aunque una RT-PCR negativa en este fluido no excluye la infección. En los últimos años, se ha demostrado excreción prolongada del virus en orina y, por tanto, es una muestra útil para detección de ARN de VWN. Igualmente, algunos estudios recientes indican que la muestra de sangre total podría ser superior al suero para la detección del virus por RT-PCR. La detección de anticuerpos en LCR y en suero debe realizarse en paralelo a las técnicas moleculares, teniendo en cuenta que muestras obtenidas en la fase aguda pueden resultar negativas para anticuerpos. Durante la primera semana de la enfermedad es posible generalmente detectar IgMs, mientras que a partir del octavo día del inicio de síntomas se pueden detectar IgGs contra el virus. La detección de una IgM aislada debe monitorizarse para valorar la seroconversión IgG posterior y confirmarse por ensayos de neutralización. Se ha descrito la persistencia de anticuerpos IgM durante periodos prolongados de tiempo (meses e incluso años) por lo que la detección de IgM no siempre es indicativa de una infección reciente. La figura 4 recoge las pruebas diagnósticas indicadas en los respectivos tipos de muestra en relación al tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. En la tabla 4 se indican los criterios de laboratorio para clasificar los casos de infección por VWN.

**Figura 4. Pruebas indicadas para el diagnóstico del virus del VWN en relación al tiempo desde el inicio de los síntomas**



##### Observaciones

Las detección viral por RT-PCR en LCR es diagnóstica de enfermedad neurológica por VWN, y por ello debe intentarse en los casos sospechosos aunque con frecuencia el diagnóstico sea serológico  
 La detección de anticuerpos generalmente debe confirmarse por ensayos de neutralización y exclusión de anticuerpos contra otros posibles flavivirus  
 En ocasiones puede detectarse el virus por RT-PCR en sangre total u orina durante periodos prolongados tras la fase aguda de la enfermedad

**Tabla 4. Criterios diagnósticos de laboratorio para la clasificación de casos de VWN**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>VWN confirmado:</b> al menos uno de los siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aislamiento del virus en cultivo celular de muestra clínica</li> <li>2. Detección del genoma viral en muestra clínica</li> <li>3. Presencia de anticuerpos IgM específicos en muestra de LCR</li> <li>4. IgM e IgG positivas confirmadas por neutralización</li> </ol> <p><b>VWN probable:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Serología positiva en suero</li> </ol> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## 6. VIRUS TOSCANA

### 6.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El virus Toscana (VTOS) es un virus que se transmite por la picadura de un flebótomo del género *Phlebotomus* spp. El nombre del virus hace referencia a la región donde se aisló por primera vez en 1971 (Monte Argentario, Italia), a partir de flebótomos de la especie *P. perniciosus*. Unos años más tarde se informan los primeros casos de infección por VTOS en turistas con meningitis, procedentes de Italia y otros países mediterráneos. Desde el punto de vista taxonómico, VTOS pertenece al género *Phlebovirus*, dentro de la familia *Phenuiviridae* (orden *Bunyavirales*).

Es un virus esférico, envuelto, que contiene ARN monocatenario de polaridad negativa dispuesto en 3 segmentos genómicos, designados como L (*large*), M (*medium*) y S (*small*). El segmento L (6404 nt) contiene un único marco de lectura abierto y codifica la RNA polimerasa. El segmento M (4215 nt) codifica una proteína precursora de las glicoproteínas G1 y G2 de la envoltura y la proteína no estructural NSm. El segmento S (1869 nt) codifica la proteína N y una proteína no estructural NSs, usando una estrategia de codificación en ambos sentidos.

Los primeros estudios genéticos demostraron la existencia de dos genotipos de VTOS, el genotipo A que fue el originalmente descrito en Italia y el genotipo B que se describió en España. Más recientemente se ha descrito un tercer genotipo, el C en Croacia. Esta variabilidad genética puede tener implicaciones desde el punto de vista diagnóstico cuando se utilizan técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

### 6.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los casos de infección por VTOS se han descrito casi exclusivamente en países de la cuenca mediterránea y en turistas procedentes de estas áreas endémicas. Se han demostrado elevadas tasas de seroprevalencia frente a VTOS en estos países que oscilan entre un 15% y un 25% y de más de un 70% en áreas riesgo ocupacional. En España la seroprevalencia va desde un 5-7% en la Comunidad de Madrid hasta un 25% en la provincia de Granada. En los estudios realizados en ambas áreas geográficas, se observa un aumento de la seroprevalencia dependiente de la edad, lo cual demuestra que la población de esas regiones está expuesta al virus durante gran parte de su vida. En España, se han descrito casos de infección neurológica por VTOS en Madrid y provincias mediterráneas de la península Ibérica así como en Baleares.

### 6.3. CUADRO CLÍNICO

La mayoría de infecciones por VTOS se consideran asintomáticas, pudiendo causar también cuadros de síndrome febril indiferenciado. Es un virus neurotrópico y en algunas regiones de España puede llegar a representar uno de los principales agentes etiológicos de meningitis vírica, precedido sólo por enterovirus.

La mayoría de los casos se dan durante las estaciones templadas del año, sobre todo en verano, cuando el vector está circulando, con un pico máximo de incidencia en agosto, coincidiendo con el periodo de máxima circulación del flebotomo. El cuadro clínico más común es la meningitis aséptica, que suele ser leve y autolimitada. El periodo de incubación va desde pocos días después de la picadura del flebotomo vector hasta las 2 semanas. Tras ésta, la meningitis aséptica cursa de forma abrupta, con cefalea (100% de los casos), fiebre (76-97%), náuseas y vómitos (67-88%) y rigidez de nuca (53-95%). La bioquímica del LCR es típica de meningitis vírica, con pleocitosis discreta (50-500 leucocitos/ $\mu$ l) de predominio linfocitario, niveles de glucorraquia normales y de proteinorraquia normales o levemente elevados. Aunque raramente, se han descrito infecciones más graves como encefalitis y meningoencefalitis con secuelas posteriores. Algunas de estas complicaciones descritas son: isquemia, sordera, hepatoesplenomegalia, coagulopatía grave y coma.

## 6.4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Es probable que la infección neurológica por VTOS esté infradiagnosticada en nuestro país, dado que la mayoría de los laboratorios clínicos no llevan a cabo el diagnóstico específico de este patógeno. El VTOS está clasificado como microorganismo de riesgo biológico 2, lo que implica el procesamiento de la muestra clínica y manejo de los cultivos celulares en cabina de seguridad biológica 2A usando medidas de protección personal. Las pruebas moleculares y serológicas, como para la mayoría de arbovirosis, son las herramientas fundamentales para el diagnóstico microbiológico.

### 6.4.1. Diagnóstico directo

El **aislamiento** de VTOS en cultivo celular se puede realizar a partir de muestras de LCR y en menor medida de muestras de suero. Existe una variedad de líneas celulares derivadas de epitelio de riñón animal, en las que replica eficientemente y en las que produce un efecto citopático (ECP) característico, como son la línea celular Vero y CV-1 (mono verde africano), BHK-21 (hámster). También se ha visto que puede crecer en cultivo de otras líneas celulares como rabiomiosarcoma o LKLC-MK2 (riñón de mono Rhesus), aunque en éstas, el ECP se demora unos días. Las más comúnmente usadas para el cultivo con las células Vero. Tras la aparición del ECP, la confirmación del crecimiento se puede llevar a cabo mediante inmunofluorescencia sobre la monocapa celular, usando anticuerpos específicos frente a VTOS, con pruebas bioquímicas como la sensibilidad al ácido clorhídrico y a disolventes orgánicos, o con RT-PCR del sobrenadante del cultivo. El cultivo celular se suele mantener durante 14 días hasta considerarlo negativo. Hoy día el cultivo celular no se suele usar con fines diagnósticos para detección de VTOS por los inconvenientes asociados a este procedimiento que son principalmente el tiempo prolongado para la obtención de resultados y que el manejo de cultivos celulares requiere infraestructura y equipamiento especial así como personal entrenado. Por ello, se suele restringir a laboratorios de referencia y/o con fines epidemiológicos (caracterización de cepas, genotipado, etc).

Las pruebas de **detección molecular** en muestras de LCR han demostrado ser el método de elección para diagnóstico de infección neurológica por VTOS, dada su mayor rapidez para la obtención de resultados, mayor sensibilidad con respecto al cultivo y mayor especificidad con respecto a la serología. El diseño de métodos de amplificación de ácidos nucleicos para detección específica de VTOS tiene que tener en cuenta la variabilidad genética del virus según el genotipo circulante en el área geográfica de que se trate. De hecho, los primeros protocolos de RT-PCR *nested* descritos para el genotipo A de VTOS descrito en Italia no amplificaban los virus del genotipo B de España, debido a desapareamientos (*mismatches*) en la región de hibridación de los cebadores. Hoy día, el método más ampliamente usado en laboratorios clínicos es la RT-PCR en tiempo real usando sondas de hidrólisis tipo Taqman. Existen 3 protocolos de qRT-PCR publicados que han demostrado una sensibilidad y especificidad muy elevadas. Los 3 métodos amplifican un fragmento conservado del segmento genómico S que permite la detección de los diferentes genotipos de VTOS.

Hay también disponibles algunos *kits* comerciales para la detección de VTOS en muestras clínicas, ya sea como amplificación única del virus o como parte de un panel sindrómico para el diagnóstico de meningitis y encefalitis agudas de etiología vírica.

#### 6.4.2. Diagnóstico indirecto

La infección por VTOS se puede diagnosticar por serología mediante detección de IgM específica en el LCR o suero durante la fase aguda, o mediante demostración de seroconversión o incremento de 4 veces el título de anticuerpos IgG entre los sueros de fase aguda y de fase convaleciente. La IgG positiva en una única muestra de suero de fase aguda no es diagnóstica en nuestra área geográfica, endémica para este virus, por lo que se utiliza sólo en estudios de seroprevalencia. La producción de anticuerpos IgG intratecales específicos demostrados mediante comparación de los índices anticuerpos en LCR y suero junto con el índice de albúmina (para detectar alteración de la barrera hematoencefálica) también son diagnósticos de la infección neurológica. El principal antígeno diana de las técnicas serológicas para detección de anticuerpos frente a VTOS es la nucleoproteína viral, que ha demostrado ser altamente inmunógena. El reactivo más usado es el ELISA de la casa comercial Diesse, que emplea nucleoproteína recombinante como antígeno de VTOS. Existen otros *kits* comerciales para serología de VTOS usando inmunofluorescencia indirecta e inmunoblot, de Euroimmun y Mikrogen, respectivamente. El principal inconveniente de la serología es la posibilidad de reacciones cruzadas con otros flebovirus con los que VTOS comparte vector de transmisión y área geográfica.

#### 6.4.3. Cinética de los marcadores de infección y aplicabilidad de las técnicas diagnósticas a las muestras clínicas

En infecciones neurológicas, la muestra de LCR debe obtenerse durante los primeros días (<1 semana) tras la aparición de los síntomas, para evitar la posibilidad de obtener falsos resultados negativos. El suero es útil también para diagnóstico de la infección mediante serología IgG e IgM. Se ha demostrado ARN de VTOS en plasma y orina en los 3 primeros días tras el inicio de síntomas en pacientes con meningoencefalitis con resultado negativo en LCR; por lo que estas muestras podrían también ser útiles para diagnóstico de infección por VTOS. La confirmación de los resultados serológicos se puede llevar a cabo por técnicas de neutralización, que sólo están disponibles en centros de referencia.

En la figura 5 se recogen las pruebas diagnósticas indicadas en los respectivos tipos de muestra en relación al tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. En la tabla 5 se indican los criterios de laboratorio para clasificar los casos de infección por VTOS.

**Figura 5. Pruebas indicadas para el diagnóstico del virus del VTOS en relación al tiempo desde el inicio de los síntomas**

| Días desde el inicio de los síntomas                    | 1                                            | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 a 15 | >15 |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|--------|-----|
| Pruebas diagnósticas indicadas<br>(muestras biológicas) | RT-PCR (LCR/suero/plasma/sangre total/orina) |   |   |   |   |   |   |        |     |
|                                                         | IgM (suero/LCR)                              |   |   |   |   |   |   |        |     |
|                                                         | IgG (suero/LCR)                              |   |   |   |   |   |   |        |     |

##### Observaciones

Las detección viral por RT-PCR en LCR es diagnóstica de enfermedad neurológica por VTOS, y por ello debe intentarse en los casos sospechosos

En algunos casos de encefalitis puede detectarse el virus en muestras de orina pero no en LCR

**Tabla 5. Criterios diagnósticos de laboratorio para la clasificación de casos de VTOS**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>VTOS confirmado:</b> al menos uno de los siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aislamiento del virus en cultivo celular de muestra clínica</li> <li>2. Detección del genoma viral en muestra clínica</li> <li>3. Presencia de anticuerpos IgM específicos en muestra de LCR</li> <li>4. IgM e IgG positivas confirmadas por neutralización</li> </ol> <p><b>VTOS probable:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Serología positiva en suero</li> </ol> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## 7. VIRUS DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA DE CRIMEA-CONGO

### 7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC) se ha identificado como una de las enfermedades prioritarias de la OMS. El virus causante de la FHCC (VFHCC) pertenece al género *Orthonairovirus* en la familia *Nairoviridae*. Es esférico, de unos 90-100 nm de diámetro, y tiene dos glicoproteínas (Gc y Gn) que se proyectan desde la envuelta. Estas glicoproteínas están codificadas en uno de los tres segmentos (M de *medium*) que componen el genoma del virus: tres moléculas de ARN de polaridad negativa. Los otros segmentos son el más grande (L de *large*) que codifica la polimerasa viral y el pequeño (S de *small*) que codifica la nucleoproteína, NP. Estudios filogenéticos utilizando el segmento S han permitido describir 7 genotipos o linajes que se asocian mayoritariamente a regiones geográficas determinadas. El virus se transmite por la picadura de garrapatas infectadas o a través del contacto directo con animales o personas infectadas. Las garrapatas actúan como vector y como reservorio permaneciendo infectadas de por vida. El vector principal son garrapatas del género *Hyalomma* y animales tanto domésticos como salvajes actúan de huéspedes asintomáticos amplificadores.

### 7.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La FHCC es la enfermedad viral transmitida por garrapatas más ampliamente distribuida en el mundo. Se considera un virus emergente a nivel global y existe preocupación sobre su expansión debido a cambios en el uso de la tierra, prácticas agrícolas y de caza, movimientos de ganado y otros cambios climáticos o medioambientales que puedan influir las dinámicas de vector-huésped-virus y la epidemiología de la enfermedad. Se reconoció en Crimea en 1944, circulando en la actualidad desde China, a través del Sudeste Asiático a Oriente Medio, algunas regiones de Europa y África.

En algunos países, como Rusia o Turquía, se han reconocido focos hiperendémicos con una incidencia hasta diez veces mayor que en otras áreas. Además, parece haber diferentes tasas de seroprevalencia entre los países afectados habiéndose descrito en Turquía niveles del 10% frente a sólo 0,4-4% en algunas zonas de Rusia. Una de las explicaciones posibles a estas diferencias es la calidad y durabilidad de la respuesta de anticuerpos frente a diferentes cepas y/o clados genéticos del VFHCC. En España se han descrito recientemente casos autóctonos de forma muy esporádica.

### 7.3. CUADRO CLÍNICO

La FHCC tiene cuatro fases típicas: incubación, pre-hemorrágica, hemorrágica, y convalecencia. El periodo de incubación dura 2-7 días: 1-5 si la transmisión se produce por picadura de garrapata y de 5-7 días si se produce por contacto con tejidos infectados. La fase pre-hemorrágica comienza por una aparición brusca de

fiebre y síntomas no específicos como fiebre alta, dolor de cabeza y de espalda, mialgias y artralgias, mareo, conjuntivitis, fotofobia, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, de garganta, taquicardia, agrandamiento de nódulos linfáticos y petequias en el paladar o la piel. Puede aparecer hepatomegalia y en los casos graves, cambios sensoriales y de humor. Dura alrededor de 4-5 días.

La fase hemorrágica dura unas 2 semanas y se caracteriza por hematomas, epistaxis y hemorragia subconjuntival, hematemesis, hemoptisis y sangre en orina y heces. Los casos graves experimentan un deterioro rápido, shock y fallo multiorgánico. La tasa media de mortalidad en pacientes hospitalizados llega al 30% y la muerte suele aparecer en la segunda semana de la enfermedad. La recuperación suele comenzar 10-20 días tras el inicio de la enfermedad y se completa en aproximadamente un año.

## 7.4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

### 7.4.1. Diagnóstico directo

El **aislamiento** de virus en cultivo celular sólo debe realizarse en condiciones de máxima bioseguridad en un laboratorio de bioseguridad de nivel 4 (NB4), sólo disponible en centros de referencia. El diagnóstico directo de elección se basa en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos.

Las pruebas de **detección molecular** del genoma del virus están, en su mayoría, diseñadas para el gen de la NP en el segmento S por ser la región más conservada, ya que uno de los aspectos clave del diagnóstico molecular es tener métodos adaptados a las variantes que se quieren detectar teniendo en cuenta la gran variabilidad genética de este virus. Gruber y cols (2019) han realizado un estudio de la variabilidad genética de los iniciadores utilizados para detección de VFHCC en las distintas técnicas de PCR disponibles en la literatura. La conclusión es, una vez más, que no hay un método eficaz para la detección de todas las variantes de VFHCC por lo que se han de combinar diferentes métodos si se quiere conseguir la amplificación de cualquier cepa independientemente de su origen. Hay que resaltar que el problema asociado a la pérdida de sensibilidad por desapareamientos en posiciones clave de los iniciadores es más grave cuando la viremia es más baja. Hay disponibles métodos comerciales para detección molecular del virus, algunos con marcado CE-IVD, pero ninguno aporta información sobre los iniciadores utilizados ni información suficiente sobre el proceso de validación o su comparación con otras técnicas. Los métodos comerciales no estarían por tanto exentos de las limitaciones anteriormente citadas a la hora de reconocer la variabilidad genética del virus. Esta dificultad diagnóstica, unido a la gravedad de la infección y las implicaciones en salud pública del VFHCC, hacen que el diagnóstico de laboratorio deba ser realizado por laboratorios especializados con experiencia en el campo y disponibilidad de varios métodos moleculares.

Se han desarrollado algunas pruebas de **detección de antígeno**, pero su utilización es inferior a la de las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos.

### 7.4.2. Diagnóstico indirecto

Los métodos serológicos permiten obtener respuestas de amplio espectro obviando el problema asociado a la variabilidad genética que presentan los métodos moleculares. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos puede ser débil a menudo resultando en un inicio de la respuesta inmune retrasada en el tiempo o incluso inexistente en algunos casos mortales. La IgM alcanza valores máximos hacia las dos semanas tras la aparición de los síntomas y puede detectarse durante 4 meses, mientras que la IgG puede mantenerse a niveles detectables hasta más de 5 años después de la infección. Aunque existen varios métodos comerciales disponibles sólo hay evaluaciones de funcionamiento para dos (Vector-Best CCHF ELISA y Euroimmun CCHF IFA). La sensibilidad de la IgM para ELISA y para IFI descritas son del 87,8% y 93,9%, respectivamente. Para la IgG, las sensibilidades descritas son 80,4% y 86,1% (ELISA e IFI, respectivamente). La especificidad en todos los casos se describe en torno al 100%.

Los ensayos de neutralización no son útiles para el diagnóstico del virus ya que se producen niveles bajos de anticuerpos neutralizantes y, además, el virus requiere ser cultivado en un laboratorio de NB4 y se requieren 5-7 días para obtener los resultados.

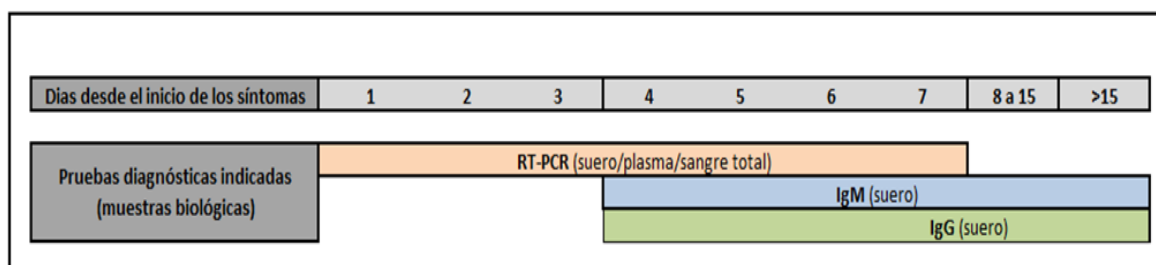
### 7.4.3. Cinética de los marcadores de infección y aplicabilidad de las técnicas diagnósticas a las muestras clínicas

La mayoría de los laboratorios europeos dedicados al diagnóstico de este virus utilizan una combinación de métodos serológicos y moleculares ya que, en algunos casos en los que los métodos moleculares no son los óptimos para la detección de la variante del virus, la detección serológica puede complementar el diagnóstico.

La viremia parece no ser detectable durante el periodo de incubación, alcanza los niveles más altos durante la primera semana tras la aparición de los síntomas y suele durar entre 1-9 días, aunque se han descrito casos con viremia detectable hasta 30 días del inicio de síntomas. La carga viral puede ser un indicador pronóstico. Se considera que en casos leves los niveles son alrededor de  $10^2$ - $10^4$  copias/ml teniendo un desenlace fatal la mayoría de los que se presentan con  $\geq 10^8$  copias/ml.

Se ha detectado virus en saliva en algunos pacientes 10 días después del inicio de síntomas y en orina hasta 25 días. También se ha detectado el virus por RT-PCR en exudados conjuntivales, rectales y vaginales pero la excreción del virus necesita estudiarse con mayor profundidad para poder alcanzar conclusiones sólidas sobre la presencia del virus en diferentes fluidos corporales. En la figura 6 se recogen las pruebas diagnósticas indicadas en los respectivos tipos de muestra en relación al tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. En la tabla 6 se indican los criterios de laboratorio para clasificar los casos de infección por VFHCC.

**Figura 6. Pruebas indicadas para el diagnóstico del VFHCC en relación al tiempo desde el inicio de los síntomas**



Observaciones

**Tabla 6. Criterios diagnósticos de laboratorio para la clasificación de casos de FHCC**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>FHCC confirmado:</b> al menos uno de los siguientes</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aislamiento y caracterización de virus de FHCC en muestra clínica (sólo realizable en NB4).</li> <li>2. Detección de secuencias de ácido nucleico viral en muestra clínica.</li> <li>3. Detección de anticuerpos específicos, IgM o seroconversión IgG.</li> <li>4. Detección de antígenos virales.</li> </ol> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## 8. OTROS ARBOVIRUS DE INTERÉS

Hay otros muchos arbovirus patógenos para el ser humano, pero en este apartado se tratarán otros tres *Flavivirus* que constituyen una amenaza para la salud pública debido a su emergencia e importancia sanitaria: el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la fiebre amarilla. La detección temprana y el diagnóstico adecuado de estas enfermedades emergentes es crítica para la vigilancia, programas de control y prevención de una mayor propagación. Para los tres virus existen vacunas disponibles.

Ninguno de estos tres virus está presente actualmente en España, pero hay que tenerlos en cuenta en el diagnóstico diferencial de otras enfermedades en viajeros procedentes de zonas endémicas. El diagnóstico confirmado de estos arbovirus es importante para la comunicación y estrategias de gestión del riesgo, incluyendo actividades como el control local de vectores, medidas de seguridad transfusional y campañas de vacunación.

### 8.1. VIRUS DE LA ENCEFALITIS TRANSMITIDA POR GARRAPATAS (*TICK BORNE ENCEPHALITIS VIRUS*)

El virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (VETG, o TBEV por sus siglas en inglés) es endémico en muchas partes de Europa y Asia, donde está en expansión, y se transmite por la picadura de garrapatas infectadas del género *Ixodes* (principalmente *Ixodes ricinus* e *I. persulcatus*) o por el consumo de productos infectados sin pasteurizar. El hospedador amplificador son vertebrados salvajes como roedores, erizos y topos. Se reconocen tres subtipos del virus, de los cuales el subtipo europeo es endémico en el norte, centro y este de Europa. El VETG se ha convertido en un desafío creciente para la salud pública en Europa y otras partes del mundo, habiendo aumentado el número de casos humanos en todas las regiones endémicas de Europa en casi un 400% en los últimos 30 años, ampliando además las áreas de riesgo y descubriéndose nuevos focos. La combinación de factores socioeconómicos, ecológicos y climáticos, así como la presencia de huéspedes más susceptibles, han contribuido activamente al creciente número de casos. Es una causa importante de infección del sistema nervioso central que puede provocar secuelas neurológicas a largo plazo e incluso la muerte. La enfermedad se manifiesta con frecuencia en dos fases, tras un periodo de incubación de unos 8 días (rango de 4-28 días) si es por picadura de garrapata, o menor, de unos 4 días si es por la ingestión de algún alimento contaminado. La primera es la fase aguda de la enfermedad la cual presenta síntomas inespecíficos como fiebre, fatiga, dolor de cabeza, dolor muscular y náuseas. A continuación hay un intervalo asintomático de una semana de media (rango de 1-33 días) que precede a la segunda fase caracterizada por enfermedad neuroinvasiva (alrededor del 33% de los infectados), con síntomas de meningitis (50%), encefalitis (40%) y/o meningoencefalomielitis (10%).

El diagnóstico se basa principalmente en la alta sospecha clínica confirmada por **ensayos serológicos y/o moleculares** tanto en suero como en LCR con un papel auxiliar para las pruebas de neuroimagen. Debido a que el curso de la enfermedad es a menudo bifásico, los periodos ventana de detección molecular en suero y LCR a menudo se pierden, ya que el diagnóstico generalmente se solicita durante la segunda fase de la enfermedad. Una vez que se manifiestan los síntomas neurológicos y aparece la respuesta inmune específica, el genoma viral rara vez se detecta en sangre y LCR. El diagnóstico en la primera fase se basa en la detección del genoma viral mediante técnicas moleculares (RT-PCR y sobre todo RT-PCR en tiempo real), mientras que en la segunda fase, cuando los síntomas neurológicos se han manifestado, la RT-PCR puede usarse con menor sensibilidad en LCR y en suero para detectar casos de enfermedad progresiva. En esta segunda fase los anticuerpos IgM específicos y usualmente los IgG están presentes en el suero. Los anticuerpos IgM e IgG pueden detectarse en LCR también, pero aparecen más tarde que en el suero. Para llevar a cabo la detección serológica se usan principalmente técnicas de ELISA, pero también IFI e inmunoblot. Los anticuerpos IgM aparecen a los 6 días tras el inicio de los síntomas, generalmente ya son detectables cuando hay síntomas neurológicos, y pueden persistir hasta 10 meses en vacunados o individuos que adquirieron la infección naturalmente. Suele darse reacción cruzada de anticuerpos IgG con otros

*flavivirus*, por lo que los resultados serológicos deben interpretarse de acuerdo con la exposición previa a otras infecciones por *Flavivirus* y el estado de vacunación contra los mismos. Los casos positivos en tales situaciones deben validarse mediante un ensayo de neutralización u otros ensayos equivalentes.

Actualmente no hay un tratamiento antivírico específico disponible, y puede ser necesario un tratamiento de apoyo, así como cuidados intensivos y ventilación asistida en formas graves. Debido a la opción limitada para el tratamiento, es de crucial importancia la vacunación en algunas áreas endémicas para prevenir la morbilidad. Al igual que otras enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas, el riesgo se puede reducir mediante el uso de repelentes de insectos y ropa protectora para prevenir las picaduras de garrapatas. Además, hay que evitar el consumo de productos sin pasteurizar en áreas de riesgo.

## 8.2. VIRUS DE LA ENCEFALITIS JAPONESA (*JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS*)

El virus de la encefalitis japonesa (VEJ, o JEV por sus siglas en inglés) da nombre al serocomplejo al cual pertenecen otros *Flavivirus* de importancia médica para el hombre como el virus *West Nile*. El virus está presente en Asia, desde Japón hasta India, Pakistán, Papua Nueva Guinea y el norte de Australia, y su distribución está vinculada a los campos de arroz de regadío combinados con la cría de cerdos. Se desconoce la incidencia global general de la enfermedad, pero es una de las principales causas de encefalitis viral con 30-50,000 casos registrados anualmente y se estima que hay aproximadamente de 14,000 a 20,000 casos fatales de enfermedad aguda y 14,000 a 27,000 supervivientes con secuelas neuropsicológicas a largo plazo. Los brotes son impredecibles y limitados espacial y temporalmente, y parecen estar disminuyendo, debido posiblemente a la vacunación generalizada (en niños) y los cambios en las prácticas agrícolas y comportamientos humanos. Se han identificado cinco genotipos distintos, y el virus se mantiene en un ciclo enzoótico entre mosquitos del género *Culex* y aves acuáticas. Las condiciones ambientales pueden favorecer una alta amplificación del virus con el paso a los cerdos y cuando las poblaciones de mosquitos alcanzan alta densidad, pueden infectar a humanos y caballos, los cuales son susceptibles a la infección pudiendo desarrollar encefalitis. La mayoría de las infecciones humanas son asintomáticas o solo producen síntomas leves. Sin embargo, una persona de cada 200 infectados desarrolla una enfermedad neuroinvasiva severa que se caracteriza por la aparición rápida de dolor de cabeza, fiebre alta, rigidez de cuello, desorientación, coma, temblores y convulsiones. También pueden presentarse formas más leves de enfermedad, como meningitis aséptica o enfermedad febril no diferenciada. No existe un tratamiento específico disponible y la tasa de letalidad en pacientes con enfermedad grave es del 20-30%, y aproximadamente el 30% de los pacientes que sobreviven tienen secuelas neurológicas significativas (paresia motora, espasticidad, trastornos del movimiento, convulsiones crónicas y retraso del desarrollo).

El período de incubación suele ser de 5 a 15 días y la viremia en humanos es baja y de corta duración, por lo que no se recomiendan los **ensayos moleculares** para el diagnóstico de rutina al ser poco sensibles. El virus suele ser indetectable por RT-PCR y generalmente solo se encuentra en muestras de LCR en casos fatales. Los intentos de aislar el virus de las muestras clínicas generalmente no tienen éxito, probablemente debido a los bajos títulos virales y la rápida producción de anticuerpos neutralizantes. En ocasiones se pueden obtener aislamientos de LCR o de tejido cerebral (ya sea en una necropsia o en una biopsia). Así, el diagnóstico de la infección por el JEV se basa en el **diagnóstico serológico**, siendo la técnica de ELISA la más utilizada, aunque actualmente hay muy pocos ensayos de diagnóstico comerciales disponibles. Los anticuerpos comienzan a aparecer poco después del inicio de síntomas, siendo el pico de detección a partir de los días 7-10. La sensibilidad para la detección de IgM específica en suero es aproximadamente la misma que para el LCR. Los estudios serológicos deben incluir otros *Flavivirus* estrechamente relacionados (por ejemplo, West Nile, Usutu, dengue, VETG) para comparar e interpretar los resultados, teniendo en cuenta el historial de vacunación del paciente (por ejemplo, VETG y VFA) y su estancia previa en zonas endémicas para estos virus. Para confirmar estos resultados serológicos se utiliza el ensayo de neutralización viral. Este ensayo se considera más preciso que el ELISA para diferenciar entre diferentes *flavivirus*, pero requiere mucho tiempo y trabajo realizarlo, por lo que se recomienda su uso solo en laboratorios de referencia con experiencia en este ensayo y para muestras que no se puedan diferenciar fácilmente mediante métodos ELISA.

### 8.3. VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA (YELLOW FEVER VIRUS)

El virus de la fiebre amarilla (VFA, o YFV por sus siglas en inglés) es endémico en más de 44 países de América Latina y África y más de 900 millones de habitantes y viajeros están en riesgo de adquirir la enfermedad. Hasta la fecha no se ha detectado en Asia. En zonas rurales de África, se han registrado epidemias catastróficas, con decenas de miles de muertes. Produce una enfermedad zoonótica que se transmite de monos a humanos (fiebre amarilla selvática) y entre humanos (fiebre amarilla urbana), a través de mosquitos, principalmente de los géneros *Aedes* (sobre todo *Ae. aegypti*) y *Haemagogus*. El vector urbano de la enfermedad, *Ae. aegypti*, fue endémico en Europa y responsable de grandes epidemias de VFA y dengue hasta su desaparición después de la Segunda Guerra Mundial. Debido a las condiciones climatológicas existentes, si *Ae. aegypti* se introdujese es posible que pueda asentarse, como ha sucedido en los últimos años con *Ae. albopictus*.

El período de incubación dura generalmente de 3 a 6 días. Muchas personas no experimentan síntomas (infección asintomática), pero cuando estos ocurren, el inicio es repentino con fiebre, dolor de cabeza, anorexia, náuseas y dolores musculares. Los síntomas que suelen resolverse dentro de una semana. Un porcentaje bajo de pacientes entran en la denominada fase tóxica a las 2-48 horas de la remisión inicial y desarrollan síntomas severos (con fiebre alta, elevación de las transaminasas, ictericia, hemorragia y daño renal). Más de la mitad de los pacientes que entran en esta fase tóxica mueren debido a que actualmente no hay ningún tratamiento antivírico específico, pero el desenlace mejora con el manejo del cuadro febril, la deshidratación y la insuficiencia hepática y renal. La convalecencia es larga, a menudo con secuelas graves. Por lo tanto, la vacunación y el control de mosquitos son las medidas más importantes para prevenir la enfermedad. La vacuna (virus atenuado) es segura, protege de por vida y raramente causa efectos adversos graves (~ 1,6 casos por cada 100.000 dosis de vacuna). Deben respetarse las contraindicaciones y prácticas seguras de inmunización, ya que se han descrito algunos casos graves adversos tras la vacunación, particularmente en pacientes con enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias u otras afecciones subyacentes relacionadas, y también entre los ancianos. Los efectos adversos graves más comunes incluyen la enfermedad viscerotrópica, la enfermedad neurológica y las reacciones de hipersensibilidad severa. En las zonas endémicas, la diferenciación entre las infecciones naturales y post-vacunales requiere la confirmación de la presencia del virus salvaje por secuenciación.

La enfermedad es difícil de diagnosticar, especialmente durante las primeras etapas. La sospecha diagnóstica se basa en las características clínicas y antecedentes de viaje a zona endémica. Sin embargo, el diagnóstico específico y la confirmación de casos requieren el análisis de laboratorio. La viremia alcanza títulos altos desde el día anterior al inicio de los síntomas. El diagnóstico se realiza mediante métodos virológicos (detección del genoma viral, antígenos o aislamiento del virus) y/o serológicos (ELISA, NT). El diagnóstico molecular se puede llevar a cabo durante los primeros 10 días desde el inicio de síntomas (fase virémica), o incluso posteriormente en casos severos, mediante la detección del ARN viral en muestras de suero (mediante RT-PCR o RT-PCR en tiempo real). Un resultado positivo es confirmatorio. El aislamiento viral puede realizarse por inoculación intracerebral en ratones o en cultivo celular (células Vero o C6/36). Por su complejidad, el cultivo se utiliza poco como herramienta diagnóstica pero es importante para la caracterización de las cepas circulantes, producir reactivos de diagnóstico y para estudios de investigación. El estudio histopatológico con inmunohistoquímica en cortes de hígado (y otros tejidos) constituye el método de elección para el diagnóstico en casos fatales, aunque también pueden utilizarse métodos moleculares a partir de muestras de tejido fresco o fijado en parafina. Para el diagnóstico serológico, los anticuerpos IgM pueden detectarse por ELISA o IFI en muestras de suero a partir de 8 días tras el inicio de síntomas. Se ha descrito una reactividad cruzada significativa de los ensayos de IgM con otros *flavivirus*, en particular en las infecciones secundarias. Así, en las áreas donde otros *Flavivirus* co-circulan (en particular los virus del dengue y Zika), la probabilidad de reactividad cruzada es alta. Por lo tanto, un resultado positivo en una sola muestra es sólo presuntivo de una infección aguda. La confirmación serológica requiere seroconversión en muestras pareadas (aguda y convaleciente tomadas con al menos una semana de diferencia) en ausencia de seroconversión para otros *Flavivirus* relevantes. Finalmente, en áreas donde se llevan a cabo campañas activas de vacunación, pueden existir anticuerpos post-vacunales, por lo que el diagnóstico debe ser cuidadosamente interpretado. Otras técnicas serológicas incluyen la detección de anticuerpos

IgG y de anticuerpos neutralizantes por la técnica de NT viral. En general, la NT ofrece mejor especificidad que la detección de anticuerpos IgM e IgG, sin embargo, también se ha documentado reactividad cruzada entre los *Flavivirus* y su utilidad podría ser limitada en áreas donde múltiples *Flavivirus* han circulado recientemente o son endémicos. Por lo tanto, se recomienda realizar esta técnica con un panel de *flavivirus*. La confirmación por el laboratorio requiere una seroconversión específica al virus o un aumento de más de 4 veces en los títulos de anticuerpos en muestras pareadas. Debido a la reactividad cruzada de las técnicas serológicas en las infecciones por *flavivirus*, en particular en infecciones secundarias, se debe priorizar el uso de métodos moleculares. Sin embargo, un resultado negativo por RT-PCR no descarta la infección, por lo que la muestra debe analizarse posteriormente por serología. Por otro lado, en el diagnóstico diferencial de la fiebre amarilla se deben incluir otros síndromes febriles y febriles-ictéricos como dengue, leptospirosis, malaria, fiebre tifoidea, infecciones por rickettsias, hepatitis tóxica o viral, y las fiebres hemorrágicas boliviana, brasileña, argentina y venezolana, entre otras, dependiendo del perfil epidemiológico del país o área afectada.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ayhan N, Charrel RN. An update on Toscana virus distribution, genetics, medical and diagnostic aspects. Clin Microbiol Infect. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2019.12.015>
2. Bartolini B, Gruber CE, Koopmans M, Avšič T, Bino S, Christova I, Grunow R, Hewson R, Korukluoglu G, Lemos CM, Mirazimi A, Papa A, Sanchez-Seco MP, Sauer A V, Zeller H, Nisii C, Capobianchi MR, Ippolito G, Reusken CB, Di Caro A. Laboratory management of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infections: perspectives from two European networks. Eurosurveillance 2019; 24 (5). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.5.1800093>
3. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. Antiviral Res. 2013; 100: 159-89. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.006>
4. Bialosuknia SM, Tan Y, Zink SD, Koetzner CA, Maffei JG, Halpin RA, Mueller EA, Novotny M, Shilts M, Fedorova NB, Amedeo P, Das SR, Pickett B, Kramer LD, Ciota AT. Evolutionary dynamics and molecular epidemiology of West Nile virus in New York State: 1999–2015. Virus Evol. 2019; 5 (2). <https://doi.org/10.1093/ve/vez035>
5. Brisbarre N, Plumet S, Cotteaux-Lautard C, Emonet SF, Pages F, Leparç-Goffart I. A rapid and specific real time RT-PCR assay for diagnosis of Toscana virus infection. J. Clin. Virol. 2015; 66:107-11. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.03.007>
6. Camp J V, Nowotny N. The knowns and unknowns of West Nile virus in Europe: what did we learn from the 2018 outbreak? Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 2020; 18:145-54. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1713751>
7. De Ory-Manchón F, Sanz-Moreno JC, Aranguez-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; 25:187-9. <https://doi.org/10.1157/13099371>
8. Ergunay K, Kaplan B, Okar S, Akkutay-Yoldar Z, Kurne A, Arsava EM, Ozkul A. Urinary detection of toscana virus nucleic acids in neuroinvasive infections. J. Clin. Virol. 2015; 70:89–92. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.07.297>
9. Ergunay K, Tkachev S, Kozlova I, Růžek D. A review of methods for detecting tick-borne encephalitis virus infection in tick, animal, and human specimens. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2016; 16:4–12. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1896>
10. Escadafal C, Ölschläger S, Avšič-Županc T, Papa A, Vanhomwegen J, Wölfel R, Mirazimi A, Teichmann A, Donoso-Mantke O, Niedrig M. First international external quality assessment of molecular detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6 (6):e1706. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001706>
11. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid Risk Assessment, 2019. Zika virus disease in Var department, France.
12. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019. Annual epidemiological report - Tick-borne encephalitis.
13. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2018. West Nile virus infection - Annual Epidemiological Report for 2018.
14. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2013. West Nile virus risk assessment tool.
15. Gruber CEM, Bartolini B, Castilletti C, et al. Geographical variability affects CCHFV detection by RT-PCR: a tool

- for In-silico evaluation of molecular assays. *Viruses* 2019; 11:953. <https://doi.org/10.3390/v11100953>
16. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8 (12 Suppl):S7-16. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2460>
  17. Halstead S. Recent advances in understanding dengue. *F1000Research* 2019; 8, 1279. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19197.1>
  18. Kading RC, Abworo EO, Hamer GL. Rift Valley fever virus, Japanese encephalitis virus, and African swine fever virus: three transboundary, vector-borne, veterinary biothreats with diverse surveillance, and response capacity needs. *Front Vet Sci.* 2019; 6: 458. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00458>
  19. Liu D. Molecular detection of human viral pathogens. CRC Press 2011.
  20. López-Ruiz N, Montañó-Remacha MC, Durán-Pla E, Pérez-Ruiz M, Navarro-Marí JM, Salamanca-Rivera C, Miranda B, Oyonarte-Gómez S, Ruiz-Fernández J. West Nile virus outbreak in humans and epidemiological surveillance, west Andalusia, Spain, 2016. *Eurosurveillance* 2018; 23(14):17-00261. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.14.17-00261>
  21. Musso D, Gubler DJ. Zika virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29:487–524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>
  22. Natrajan MS, Rojas A, Waggoner JJ. Beyond fever and pain: diagnostic methods for chikungunya virus. *J Clin Microbiol.* 2019; 57(6):e00350-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00350-19>
  23. Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de la Salud, 2018. Diagnóstico por laboratorio de la infección por virus de la fiebre amarilla.
  24. Pérez-Ruiz M, Collao X, Navarro-Marí JM, Tenorio A. Reverse transcription, real-time PCR assay for detection of Toscana virus. *J Clin Virol.* 2007; 39:276-81. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.05.003>
  25. Pezzi L, Diallo M, Rosa-Freitas MG, et al. GloPID-R report on chikungunya, o'nyong-nyong and Mayaro virus, part 5: entomological aspects. *Antiviral Res.* 2020; 174:104670. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104670>
  26. Riccardi N, Antonello RM, Luzzati R, Zajkowska J, Di Bella S, Giacobbe DR. Tick-borne encephalitis in Europe: a brief update on epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *Eur J Intern Med.* 2019; 62: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.01.004>
  27. Sambri V, Capobianchi M, Cavrini F, et al. Diagnosis of West Nile virus human infections: overview and proposal of diagnostic protocols considering the results of external quality assessment studies. *Viruses* 2013; 5:2329-48. <https://doi.org/10.3390/v5102329>
  28. Sanbonmatsu-Gámez S, Pérez-Ruiz M, Collao X, Sánchez-Seco MP, Morillas-Márquez F, de la Rosa-Fraile M, Navarro-Marí JM, Tenorio A. Toscana virus in Spain. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:1701-7. <https://doi.org/10.3201/eid1111.050851>
  29. Sharma V, Sharma M, Dhull D, Sharma Y, Kaushik Sulochana, Kaushik Samander. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. *Can J Microbiol.* 2020; 66:87-98. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0331>
  30. Silva JVJ, Ludwig-Begall LF, Oliveira-Filho EF, et al. A scoping review of chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta Trop.* 2018; 188: 213-24. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.003>
  31. Singh RK, Dhama K, Karthik K, et al. Advances in diagnosis, surveillance, and monitoring of Zika virus: an update. *Front Microbiol.* 2018; 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02677>
  32. Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012; 10:895–907. <https://doi.org/10.1586/eri.12.76>
  33. Vázquez A, Herrero L, Negredo A, Hernández L, Sánchez-Seco MP, Tenorio A. Real time PCR assay for detection of all known lineages of West Nile virus. *J. Virol. Methods* 2016; 236:266-70. <https://doi.org/10.1016/j.jviro-met.2016.07.026>
  34. Waggoner JJ, Rojas A, Pinsky BA. Yellow fever virus: diagnostics for a persistent arboviral threat. *J Clin Microbiol.* 2018; 56(10):e00827-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00827-18>
  35. Weidmann M, Sanchez-Seco MP, Sall AA, Ly PO, Thiongane Y, Lô MM, Schley H, Hufert FT. Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *J Clin Virol.* 2008; 41:138-42. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.10.001>
  36. World Health Organization. (2009). n.d. World Health Organization. (2009). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.
  37. World Health Organization, 2007. Manual for the laboratory diagnosis of Japanese encephalitis virus infection.

---

**Anexo I****Anexo I.1. Técnicas comerciales disponibles para el diagnóstico de las arbovirosis**

En la tabla 1 se recoge un amplio listado de diferentes métodos comerciales disponibles para el diagnóstico de las principales infecciones causadas por arbovirus en el ser humano. Dado el gran número de métodos disponibles, en negrita se resaltan aquellos métodos con los que los autores del documento tienen mayor experiencia, sin que esto indique necesariamente una mayor rentabilidad diagnóstica de los mismos.

Tabla 1. Métodos comerciales para el diagnóstico de arbovirosis en el ser humano

| VIRUS                                          | FABRICANTE                | ENSAYO                                                                                         | MARCADOR                         | MUESTRA                  |
|------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| <b>VWN</b>                                     | <b>Focus</b>              | <b>ELISA</b>                                                                                   | <b>IgM/IgG</b>                   | <b>Suero</b>             |
| VWN                                            | Panbio                    | ELISA                                                                                          | IgM/IgG                          | Suero                    |
| VWN                                            | Panbio                    | IFI                                                                                            | IgM/IgG                          | Suero                    |
| VWN                                            | Euroimmun                 | IFI                                                                                            | IgM/IgG                          | Suero                    |
| VWN                                            | Euroimmun                 | ELISA                                                                                          | IgM/IgG                          | Suero                    |
| VWN                                            | Vircell                   | CLIA                                                                                           | IgM/IgG                          | Suero, plasma            |
| VWN                                            | InBios                    | ELISA                                                                                          | IgM/IgG                          | Suero                    |
| VWN                                            | Vector-best               | ELISA                                                                                          | IgM/IgG                          | Suero                    |
| VWN                                            | Vector-best               | ELISA                                                                                          | IgG avidez                       | Suero                    |
| VWN                                            | CerTest                   | RT-PCR a tiempo real                                                                           | Genoma viral                     | Muestras clínicas        |
| VWN                                            | Altona                    | RT-PCR a tiempo real                                                                           | Genoma viral linajes 1 y 2       | Muestras clínicas        |
| VWN                                            | Vivantis                  | RT-PCR a tiempo real                                                                           | Genoma viral                     | Muestras clínicas        |
| VWN                                            | Fast-Track Diagnostics    | RT-PCR a tiempo real                                                                           | Genoma viral multiplex           | Muestras clínicas        |
| <b>VTOS</b>                                    | <b>Diesse</b>             | <b>ELISA</b>                                                                                   | <b>IgM/IgG</b>                   | <b>Suero</b>             |
| VTOS                                           | Vitro S.A                 | RT-PCR a tiempo real (panel múltiple sindrómico junto con: VHS, VVZ, EV, PeV, VTOS, VEB y CMV) | Genoma viral                     | LCR                      |
| VTOS                                           | Mikrogen                  | IB                                                                                             | IgM/IgG                          |                          |
| Phlebovirus: Sicilian, Naples, Toscana, Cyprus | Euroimmun                 | IFI                                                                                            | IgM/IgG                          | Suero                    |
| <b>CCHFV</b>                                   | <b>Euroimmun</b>          | <b>IFI</b>                                                                                     | <b>IgG/IgM, proteínas GPC/N</b>  | <b>Suero</b>             |
| <b>CCHFV</b>                                   | <b>Vector-best</b>        | <b>ELISA</b>                                                                                   | <b>IgM/IgG</b>                   | <b>Suero</b>             |
| CCHFV                                          | Vector-best               | ELISA                                                                                          | Antígeno                         | Suero                    |
| CCHFV                                          | CerTest                   | RT-PCR a tiempo real                                                                           | Genoma viral                     | Muestras clínicas        |
| <b>CCHFV</b>                                   | <b>Altona</b>             | <b>RT-PCR a tiempo real</b>                                                                    | <b>Genoma viral</b>              | <b>Muestras clínicas</b> |
| CCHFV                                          | Vivantis                  | RT-PCR a tiempo real                                                                           | Genoma viral                     | Muestras clínicas        |
| CHKV                                           | Panbio/Abbott             | ELISA                                                                                          | IgM                              | Suero                    |
| CHKV                                           | Panbio/Abbott             | ICT                                                                                            | IgM                              | Sangre, suero y plasma   |
| <b>CHKV</b>                                    | <b>Euroimmun</b>          | <b>IFI</b>                                                                                     | <b>IgM/ IgG</b>                  | <b>Suero</b>             |
| CHKV                                           | Euroimmun                 | ELISA                                                                                          | IgM/ IgG                         | Suero                    |
| CHKV                                           | InBios                    | ELISA                                                                                          | IgM/IgG                          | Suero                    |
| CHKV                                           | Diesse                    | ELISA                                                                                          | IgM/ IgG                         | Suero                    |
| CHKV                                           | Vircell                   | CLIA                                                                                           | IgM/IgG                          | Suero, plasma            |
| CHKV                                           | Vircell                   | ELISA                                                                                          | IgM/IgG                          | Suero, plasma            |
| CHKV                                           | CerTest                   | RT-PCR a tiempo real                                                                           | Genoma viral                     | Muestras clínicas        |
| CHKV                                           | Altona                    | RT-PCR a tiempo real                                                                           | Genoma viral                     | Muestras clínicas        |
| CHKV                                           | Vivantis                  | RT-PCR a tiempo real                                                                           | Genoma viral                     | Muestras clínicas        |
| VMAY                                           | Euroimmun                 | ELISA                                                                                          | IgM/ IgG                         | Suero                    |
| VMAY                                           | CerTest                   | RT-PCR a tiempo real                                                                           | Genoma viral                     | Muestras clínicas        |
| VDEN                                           | Panbio/Abbott             | ELISA                                                                                          | Antígeno NS1                     | Suero                    |
| VDEN                                           | Panbio/Abbott             | ICT                                                                                            | NS1                              | Sangre, suero y plasma   |
| <b>VDEN</b>                                    | <b>Biorad</b>             | <b>ELISA</b>                                                                                   | <b>NS1</b>                       | <b>Suero y plasma</b>    |
| VDEN                                           | InBios                    | ELISA                                                                                          | NS1                              | Suero                    |
| VDEN                                           | Focus                     | ELISA                                                                                          | NS1                              | Suero                    |
| VDEN                                           | Standard Diagnostics (SD) | ICT                                                                                            | IgM/IgG/NS1                      | Sangre, suero y plasma   |
| VDEN                                           | SD Biosensor              | ICT                                                                                            | NS1                              | Sangre, suero y plasma   |
| VDEN                                           | Nal von Minden            | ICT                                                                                            | NS1                              | Sangre, suero y plasma   |
| VDEN                                           | Panbio/Abbott             | ICT                                                                                            | IgG/IgM                          | Sangre, suero y plasma   |
| VDEN                                           | Euroimmun                 | IFI                                                                                            | IgM/IgG                          | Suero                    |
| VDEN                                           | Euroimmun                 | ELISA                                                                                          | IgM/IgG                          | Suero                    |
| VDEN/VZIK/CHKV                                 | Mikrogen                  | Inmunoblot                                                                                     | IgM/IgG recomLine Tropical Fever | Suero, plasma            |
| VDEN/VZIK/CHKV                                 | Vircell                   | IFI                                                                                            | IgM/IgG                          | Suero, plasma            |

Tabla 1. continuación. Métodos comerciales para el diagnóstico de arbovirosis en el ser humano

| VIRUS                                                        | FABRICANTE                   | ENSAYO                      | MARCADOR                                 | MUESTRA                  |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------|--------------------------|
| <b>VDEN</b>                                                  | <b>Panbio/Abbott</b>         | <b>ELISA</b>                | <b>IgM (SD Dengue IgM Capture ELISA)</b> | <b>Suero</b>             |
| VDEN                                                         | InBios                       | ELISA                       | IgM                                      | Suero                    |
| VDEN                                                         | InBios                       | ELISA                       | IgG                                      | Suero                    |
| VDEN                                                         | Focus                        | ELISA                       | IgM/IgG                                  | Suero                    |
| VDEN                                                         | Vircell                      | CLIA                        | IgM/IgG                                  | Suero, plasma            |
| VDEN                                                         | Vircell                      | ELISA                       | IgM/IgG                                  | Suero, plasma            |
| <b>VDEN</b>                                                  | <b>Panbio/Abbott</b>         | <b>ELISA</b>                | <b>IgG (SD Dengue IgG Capture ELISA)</b> | <b>Suero</b>             |
| VDEN                                                         | Altona                       | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral                             | Muestras clínicas        |
| VDEN                                                         | CerTest                      | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral                             | Muestras clínicas        |
| VDEN                                                         | Vivantis                     | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral                             | Muestras clínicas        |
| VDEN (Serotipado 1-4)                                        | CerTest                      | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral multiplex                   | Muestras clínicas        |
| VZIK                                                         | Euroimmun                    | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral                             | Suero y orina            |
| VZIK                                                         | Euroimmun                    | IFI                         | IgM/IgG                                  | Suero                    |
| <b>VZIK</b>                                                  | <b>Euroimmun</b>             | <b>ELISA</b>                | <b>IgM/IgG</b>                           | <b>Suero</b>             |
| VZIK                                                         | InBios                       | ELISA                       | IgM                                      | Suero                    |
| VZIK                                                         | InBios                       | ELISA                       | Antígeno NS1                             | Suero                    |
| VZIK Virclia                                                 | Vircell                      | CLIA                        | IgM/IgG                                  | Suero, plasma            |
| VZIK                                                         | Vircell                      | ELISA                       | IgM/IgG                                  | Suero, plasma            |
| VZIK                                                         | CerTest                      | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral                             | Muestras clínicas        |
| VZIK                                                         | Altona                       | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral                             | Muestras clínicas        |
| VZIK                                                         | Vivantis                     | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral                             | Muestras clínicas        |
| <b>VZIK, VDEN, CHKV</b>                                      | <b>Roche</b>                 | <b>RT-PCR a tiempo real</b> | <b>Genoma viral multiplex</b>            | <b>Muestras clínicas</b> |
| CHKV, VDEN, VZIK                                             | Biorad                       | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral multiplex                   | Muestras clínicas        |
| VZIK, VDEN y VCHIK                                           | CerTest                      | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral multiplex                   | Muestras clínicas        |
| CHKV, VDEN, VZIK                                             | Genesig                      | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral multiplex                   | Muestras clínicas        |
| CHKV, VDEN, VZIK                                             | Fast-Track Diagnostics (FTD) | RT-PCR a tiempo real        | Genoma viral multiplex                   | Muestras clínicas        |
| Arbovirus (VESL, VEEQ, VEEE, CEV)                            | Focus                        | IFI                         | IgM/IgG                                  | Suero                    |
| Flavivirus Mosaic 1 (VETG, VWN, VEJ, VFA)                    | Euroimmun                    | IFI                         | IgM/IgG                                  | Suero                    |
| Flavivirus Profile 2 (VETG, VWN, VEJ, VFA, VDEN)             | Euroimmun                    | IFI                         | IgM/IgG                                  | Suero                    |
| Arbovirus Mosaic America 2 (VESL, VLAC, VEEE, VEEQ)          | Euroimmun                    | IFI                         | IgM/IgG                                  | Suero                    |
| Arbovirus Mosaic Australia 2 (VEVM, VRR, VBB)                | Euroimmun                    | IFI                         | IgM/IgG                                  | Suero                    |
| Arbovirus Fever Mosaic 2 VZIK, VCHIK, VDEN)                  | Euroimmun                    | IFI                         | IgM/IgG                                  | Suero                    |
| Arbovirus Profile 3 (VZIK, VCHIK, VDEN, VETG, VWN, VEJ, VFA) | Euroimmun                    | IFI                         | IgM/IgG                                  | Suero                    |
| Arbovirus Fever Mosaic 1 (VCHIK, VEJ, VDEN)                  | Euroimmun                    | IFI                         | IgM/IgG                                  | Suero                    |

Tabla 1. continuación. Métodos comerciales para el diagnóstico de arbovirosis en el ser humano

| VIRUS                                                       | FABRICANTE                   | ENSAYO               | MARCADOR                     | MUESTRA             |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|---------------------|
| VZIK, VDEN, VCHIK, VWN, VFA, VMAY                           | CerTest                      | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral multiplex       | Muestras clínicas   |
| VFVR                                                        | Euroimmun                    | IFI                  | IgM/IgG                      | Suero               |
| VSIN                                                        | Euroimmun                    | IFI                  | IgM/IgG                      | Suero               |
| VEJ                                                         | Euroimmun                    | IFI                  | IgM/IgG                      | Suero               |
| <b>VEJ</b>                                                  | <b>Euroimmun</b>             | <b>ELISA</b>         | <b>IgM/IgG</b>               | <b>Suero</b>        |
| VEJ                                                         | InBios                       | ELISA                | IgM/IgG                      | Suero               |
| VEJ                                                         | CerTest                      | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral                 | Sangre, LCR         |
| VEJ                                                         | Vivantis                     | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral                 | Muestras clínicas   |
| VEJ                                                         | Fast-Track Diagnostics (FTD) | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral multiplex       | Muestras clínicas   |
| <b>VUSU</b>                                                 | <b>Euroimmun</b>             | <b>ELISA</b>         | <b>IgG</b>                   | <b>Suero</b>        |
| VETG                                                        | Euroimmun                    | IFI                  | IgM/IgG                      | Suero               |
| VETG                                                        | Euroimmun                    | ELISA                | IgM/IgG                      | Suero               |
| VETG                                                        | Serion                       | ELISA                | IgM/IgG                      | Suero, plasma o LCR |
| VETG                                                        | Progen                       | ELISA                | IgM/IgG                      | Suero, LCR          |
| VETG                                                        | R-Biopharm                   | ELISA                | IgM/IgG                      | Suero               |
| VETG                                                        | Reagent                      | ELISA                | IgM/IgG                      | Suero y LCR         |
| VETG                                                        | Reagent                      |                      | IgM<br>Test rápido           | Suero y LCR         |
| <b>VETG</b>                                                 | <b>Siemens</b>               | <b>ELISA</b>         | <b>IgM/IgG<br/>Enzygnost</b> | <b>Suero</b>        |
| VETG                                                        | IBL                          | ELISA                | IgM/IgG                      | Suero, plasma, LCR  |
| VETG Virclia                                                | Vircell                      | CLIA                 | IgM/IgG                      | Suero, plasma       |
| VETG                                                        | Vector-best                  | ELISA                | IgM/IgG                      |                     |
| VETG                                                        | Vector-best                  | ELISA                | Antígeno                     |                     |
| VETG                                                        | Vector-best                  | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral                 |                     |
| Enfermedades transmitidas por garrapatas (VETG y bacterias) | CerTest                      | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral multiplex       | Muestras clínicas   |
| <b>VFA</b>                                                  | <b>Euroimmun</b>             | <b>IFI</b>           | <b>IgM/IgG</b>               | <b>Suero</b>        |
| VFA                                                         | CerTest                      | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral                 | Muestras clínicas   |
| VFA                                                         | Altona                       | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral                 | Muestras clínicas   |
| VFA                                                         | Genekam                      | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral                 | Muestras clínicas   |
| VFA                                                         | Genesig                      | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral                 | Muestras clínicas   |
| VFA                                                         | Vivantis                     | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral                 | Muestras clínicas   |
| VFA                                                         | PCRmax                       | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral                 | Muestras clínicas   |
| VFA                                                         | Fast-Track Diagnostics (FTD) | RT-PCR a tiempo real | Genoma viral multiplex       | Muestras clínicas   |

---

**Abreviaturas:**

**CHKV:** virus chikungunya  
**CLIA:** inmunoensayo quimioluminiscente  
**ELISA:** ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas  
**IB:** inmunoblot  
**ICT:** inmunocromatografía  
**IFI:** inmunofluorescencia indirecta  
**VBB:** virus del bosque de Barmah  
**VDEN:** virus dengue  
**VEEE:** virus de la encefalitis equina del Este  
**VEEO:** virus de la encefalitis equina del Oeste  
**VEJ:** virus de la encefalitis japonesa  
**VESL:** virus de la encefalitis de Sant Louis  
**VETG:** virus de la encefalitis transmitida por garrapatas  
**VEVM:** virus de la encefalitis del valle del Murray  
**VFA:** virus de la fiebre amarilla  
**VFVR:** virus de la fiebre del valle del Rift  
**VLAC:** virus de la encefalitis de La Crosse  
**VMAY:** virus Mayaro  
**VRR:** virus del río Ross  
**VSIN:** virus Sindbis  
**VTOS:** virus Toscana  
**VUSU:** virus Usutu  
**VWN:** virus West Nile  
**VZIK:** virus Zika

**Anexo I.2. Procedimientos normalizados de trabajo (PNTs) de técnicas comerciales**

En el Procedimiento en Microbiología Clínica nº 47 de la SEIMC, titulado “Diagnóstico microbiológico de arbovirosis y robovirosis emergentes” publicado en 2013, se describen 5 PNTs que recogen los procedimientos para la realización de algunos de los métodos comerciales más utilizados como sigue:

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

|                                                     |                                              |               |               |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | PNT-ARBOV-06<br>Cultivo celular de arbovirus | PNT-ARBOV-06  |               |
|                                                     |                                              | Edición N° 01 | Página 1 de 9 |

## PNT-ARBOV-06 Cultivo celular de arbovirus

| ELABORADO      |       | REVISADO Y APROBADO |       |
|----------------|-------|---------------------|-------|
| 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 / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | PNT-ARBOV-06<br>Cultivo celular de arbovirus | PNT-ARBOV-06  |               |
|                                                     |                                              | Edición N° 01 | Página 2 de 9 |

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este procedimiento es describir el procesamiento de muestras clínicas para cultivo celular de arbovirus. El manejo de cultivos celulares de estos virus requiere diferentes niveles de contención de riesgo biológico, según se trate de microorganismos clasificados como de riesgo biológico 2 (virus Toscana y virus Zika), 3 (virus dengue y virus *West Nile*) o 4 (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea Congo). Sólo el manejo de cultivos celulares de los arbovirus clasificados como agentes de riesgo biológico 2 y 3 son el objeto de este procedimiento.

## 2. FUNDAMENTO

Los virus son parásitos intracelulares obligados, por tanto, su cultivo *in vitro* ha de realizarse en líneas celulares apropiadas que permitan su replicación. El aislamiento de un virus en cultivo celular permite obtener cepas virales, muy útiles para estudios fenotípicos y genotípicos relacionados con la epidemiología, patogenicidad, virulencia y resistencia a antivirales de los virus, así como para realizar técnicas serológicas de confirmación basadas en ensayos de neutralización del efecto citopático (ECP).

Los arbovirus objeto de este procedimiento crecen bien en un periodo comprendido entre 5 y 14 días, dependiendo del virus, en diferentes líneas celulares, aunque la más ampliamente utilizada por su facilidad de manejo y por su versatilidad para permitir el crecimiento de cualquiera de ellos es la línea celular Vero, derivada de riñón de mono verde africano. El crecimiento del virus en cultivo celular se hace evidente por la aparición de un ECP que no es específico de cada arbovirus.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimientos generales de cada laboratorio en cuanto a recepción de muestras, sistema informático del laboratorio (SIL), normas de seguridad, control de vertidos y accidentes, uso del área con nivel 3 de contención de riesgo biológico, mantenimiento de cultivos y preparación de tubos para la inoculación de muestras.
- Procedimientos específicos de Uso del Área con nivel 3 de contención de riesgo biológico
- Directiva (UE) 2019/1833 de la Comisión de 24 de octubre de 2019 por la que se modifican los anexos I, III, V y VI de la Directiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (<https://www.boe.es/doue/2019/279/L00054-00079.pdf>).

## 4. MUESTRAS

Las muestras a tomar para la investigación de cada virus serán las recomendadas en los protocolos de vigilancia de cada uno de ellos para cultivo.

Dado que el cultivo de estos virus no es una herramienta diagnóstica de primera línea en los laboratorios clínicos, se suele llevar a cabo a partir de las muestras clínicas en las que se ha demostrado la presencia del virus por detección de algunos de sus componentes como ARN mediante RT-PCR y/o antígenos virales. En general, las muestras recomendadas para los arbovirus objeto de este procedimiento son sangre, suero, orina, biopsias y LCR. Las muestras de sangre y suero se enviarán en su tubo primario. Las demás muestras líquidas se recogen en contenedores estériles con tapón a rosca sin medio de transporte. Las biopsias se enviarán en tubos con 2 ml de medio de transporte de virus.

|                                                     |                                              |              |               |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | PNT-ARBOV-06<br>Cultivo celular de arbovirus | PNT-ARBOV-06 |               |
|                                                     |                                              | Edición N°1  | Página 3 de 9 |

## 4.2. CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Las muestras se deben enviar de inmediato al laboratorio del Servicio de Microbiología. Si no es posible el envío inmediato, hay que conservar a 2-8°C hasta 48 horas o a -80°C si van a ser periodos más prolongados. Para envío de la muestra se debe utilizar un sistema triple básico de embalaje, compuesto por los tres niveles de contención recomendados por la OMS para este tipo de muestras (categoría B):

- **Recipiente primario:** contiene la muestra clínica y debe ser estanco, a prueba de filtraciones y estar etiquetado. Este recipiente se envuelve en material absorbente para retener todo el fluido en caso de ruptura.
- **Embalaje/envase secundario:** un segundo recipiente estanco, a prueba de filtraciones, que encierra y protege al primario. Debe incluir tapa de cierre hermético y puede ir también envuelto en material absorbente. Los formularios de datos, historia clínica etc. deben estar en el exterior de este recipiente.
- **Embalaje/envase exterior:** los embalajes/envases secundarios se colocan en embalajes/envases exteriores de expedición con un material amortiguador adecuado. Los embalajes exteriores protegen el contenido de los elementos exteriores, como daños físicos, mientras el bulto se encuentra en tránsito. Cada embalaje/envase preparado para su expedición deberá estar correctamente marcado y etiquetado e ir acompañado de una copia del formulario de petición debidamente cumplimentado, que se colocará en el compartimento exterior entre el embalaje secundario y el embalaje exterior.

**Criterios de rechazo:** muestras que incumplan las normas generales de recogida, transporte y conservación de muestras (muestra derramada, mal identificada, en contenedor inadecuado, etc.).

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

### 5.1. REACTIVOS

- *Minimum Essential Medium (EMEM)* en polvo
- L- glutamina al 3%
- HEPES 1M
- CO<sub>3</sub>HNa 7,5% (con rojo fenol al 0,4%)
- Suero fetal bovino
- Solución de disgregación de células tripsina-EDTA:
  - Solución EDTA
    - EDTA 0,40 g
    - PBS pH=7,5 c.s.p. 1000 ml
  - Solución de tripsina
    - Tripsina. 2,5 g
    - PBS pH=7,5 c.s.p. 1000 ml

Mezclar ambas soluciones y alicuotar en frascos de cristal a razón de 50-100 ml por frasco. Mantener congelada a -20°C hasta su uso.

- Solución de vancomicina (50 mg/mL)
- Solución de gentamicina (40 mg/mL)
- Solución de anfotericina B (0,25 mg/mL)
- Línea celular Vero
- Solución acuosa de azul tripán al 0,1%

|                                                     |                                              |              |               |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | PNT-ARBOV-06<br>Cultivo celular de arbovirus | PNT-ARBOV-06 |               |
|                                                     |                                              | Edición N° 1 | Página 4 de 9 |

- Mezcla antibiótica para descontaminación de muestras:

Mezclar 50 ml de la solución de vancomicina con 13 ml de la solución de gentamicina y filtrar (filtro de 0,45 µm) en contenedor estéril. Filtrar (filtro de 0,45 µm) 250 ml de la solución de anfotericina en un frasco estéril. Mezclar en un frasco estéril ambas soluciones.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

### 6.1. APARATOS

- Cabina de flujo laminar horizontal para preparación y mantenimiento de las líneas celulares
- Frigorífico\*
- Congelador de -20°C
- Contenedor de nitrógeno líquido
- Bomba para pipeta de 10 ml
- Bomba para esterilización de medios de cultivo mediante filtrado
- Cámara de 35-37°C para incubación de cultivos celulares
- Cabina de seguridad biológica IIA\*
- Microscopio invertido\*
- Congeladores\*
- Centrífuga de rotor basculante\*
- Microcentrífuga\*
- Cámara de incubación a 35-37°C para incubación de tubos con muestras\*
- Pipeta automática regulable de 50 - 200 µl\*
- Pipeta automática regulable de 1000 µl\*

\*Equipamiento que también deberá estar incluido en el área P3 para cultivo de virus de riesgo biológico 3 (ver procedimientos específicos de Uso del Área con nivel 3 de contención de riesgo biológico).

### 6.2. MATERIAL

- Frascos de cultivo celular de 250 ml
- Frascos de cultivo celular de 75 ml
- Tubos para cultivo celular
- Jeringas de 5, 10 y 20 ml
- Filtros Millipore de 0,22 µm
- Pipetas de 10 ml con filtro
- Criotubos para separación de muestras y congelación de muestras y células
- Puntas de pipeta Pasteur desechables estériles
- Puntas de pipeta con filtro de 200 µl estériles libres de DNAsas y RNAsas
- Puntas de pipeta con filtro de 1000 µl estériles libres de DNAsas y RNAsas

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

En general, los medios para cultivar las líneas celulares que posteriormente se utilizarán para el aislamiento de virus se preparan en dos fases, con una semana de separación entre ellas. La primera semana se

|                                                     |                                              |              |               |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | PNT-ARBOV-06<br>Cultivo celular de arbovirus | PNT-ARBOV-06 |               |
|                                                     |                                              | Edición N°1  | Página 5 de 9 |

preparan las bases, partiendo de medio en polvo, debidamente tamponadas con HEPES y bicarbonato. En la segunda semana se adicionarán antibióticos, L-glutamina y suero fetal bovino a su concentración correspondiente.

#### 7.1.1. Preparación de bases (primera semana)

- En un matraz añadir 450 ml de agua purificada por cada frasco de 500 ml de base que se quiera preparar.
- Añadir MEM (*Minimum Essential Medium* de Eagle) en polvo a razón de 4,8 g por cada volumen de 450 ml de agua añadido al matraz, disuelto previamente en agua (para cada 4,8 ml de polvo 25 ml de agua).
- Repartir esterilizando por filtración a través de filtros de 0,22 µm en frascos de cristal estériles, a razón de 475 ml por frasco.
- Añadir, filtrando, a cada frasco:
 

|                                                   |       |
|---------------------------------------------------|-------|
| HEPES 1 M                                         | 10 mL |
| CO <sub>3</sub> HNa 7,5% (con rojo fenol al 0,4%) | 5 mL  |

 Comprobar por tono y color del indicador que el pH está entre 7,3 y 7,5 (naranja rosado)
- Dejar a temperatura ambiente durante 24 horas.
- Hacer un control de esterilidad:
- Introducir una torunda estéril en el medio a controlar e inocular con ella 2 placas de agar sangre. Incubar a temperatura de 35°C y en CO<sub>2</sub>.
- Añadir 1 ml de medio a un tubo de tioglicolato e incubar a 35°C.
- Realizar la lectura de las placas y del tioglicolato tras 7 días de incubación.

Guardar los frascos a temperatura ambiente en oscuridad durante una semana.

#### 7.1.2. Preparación de los medios (segunda semana)

- Elegir, entre las bases preparadas la semana anterior, aquellas que superen todos los controles.
- Los medios de cultivo que se van a usar son:
- MEM 10% para crecimiento de la línea celular en frasco y tubos para inoculación de muestras.
- MEM 1% para inoculación de la muestra y mantenimiento de los cultivos celulares sin inocular.
- Añadir a cada frasco de 500 mL:
 

|                               |                                                  |
|-------------------------------|--------------------------------------------------|
| Vancomicina 50 mg/mL.....     | 0,5 mL                                           |
| Gentamicina 40 mg/mL.....     | 0,5 mL                                           |
| Anfotericina B 0,25 mg/mL.... | 5 mL (sólo a medio de inoculación/mantenimiento) |
- Descongelar suero fetal bovino (SFB) y mantener en baño de 56°C durante 30 minutos para descomplementar. Si ya se descomplementó en días anteriores, mantener sólo 10 minutos para atemperarlo.
- Añadir SFB a cada frasco, según la concentración deseada y rotular convenientemente:
 

|         |              |
|---------|--------------|
| MEM 1%  | 5 ml de SFB  |
| MEM 10% | 50 ml de SFB |
- Realizar un control de esterilidad cada vez que se le adicione algún suplemento a los medios de cultivo:
- Introducir una torunda estéril en el medio a controlar e inocular con ella 2 placas de agar sangre. Incubar a temperatura ambiente a 35°C y en CO<sub>2</sub>.
- Añadir 1 ml de medio a un tubo de tioglicolato e incubar a 35°C.
- Realizar la lectura de las placas y del tioglicolato tras 7 días de incubación.
- Siempre que se vaya a utilizar un frasco de medio de cultivo por primera vez, añadir a cada 500 ml, 5 ml de L-glutamina al 3% filtrada con filtro de 0,22 µm.
- Anotar en la etiqueta del frasco "+ glutamina" y la fecha en la que se añade. A partir de ese momento la

|                                                     |                                              |              |               |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | PNT-ARBOV-06<br>Cultivo celular de arbovirus | PNT-ARBOV-06 |               |
|                                                     |                                              | Edición N°1  | Página 6 de 9 |

caducidad del medio es de 30 días. Después de este periodo hay que volver a añadir glutamina al medio de cultivo (la cantidad proporcional que corresponda según el volumen que quede de medio).

## 7.2. CULTIVOS CELULARES

### 7.2.1. Recepción y procesamiento de frascos comerciales de cultivo celular

Los frascos se reciben en el laboratorio totalmente llenos de medio. Examinar los frascos de cultivo al llegar al laboratorio:

- a) Temperatura
- b) Adecuado envasado. El medio debe cubrir las células.
- c) La monocapa debe ser confluyente
- d) Calidad de la monocapa
- e) pH del medio
- f) Contaminación
- Vaciar la mayor parte del medio de los frascos comerciales, dejando suficiente cantidad de medio como para cubrir perfectamente la monocapa.
- Incubar a 37°C un mínimo de 24 horas
- Si la monocapa persiste confluyente, dar pase a nuevos frascos atendiendo al tipo de célula de que se trate y a la concentración celular adecuada en cada caso.
- Cuando se consiga un suficiente número de frascos, parte de ellos se congelarán en nitrógeno líquido, y el resto se dejarán para la rutina diaria.

### 7.2.2. Preparación de frascos de cultivo celular

- Comprobar la monocapa de los frascos de cultivo celular.
- Seleccionar los frascos que cumplan las condiciones requeridas para dar el pase.
- Tripsinizar:
  - La mezcla tripsina-EDTA se mantendrá a 37°C, una vez descongelada. No utilizar si lleva más de 24 horas descongelada.
  - Vaciar el medio de los frascos a tripsinizar
  - Enjuagar 2 veces las células con tripsina-EDTA, una vez filtrada a través de filtro de 0,22µm.
  - Añadir tripsina y dejarla en contacto con las células 1 minuto (ocasionalmente es necesario más tiempo, depende del tipo de células que se estén procesando)
  - Al observar que las células se están desprendiendo del frasco, o que la tripsina se enturbia, se retirará toda la tripsina del frasco.
  - Golpear el frasco con la mano para que se desprendan todas las células y arrastrarlas con la tripsina que haya quedado. Dejar 2-4 minutos hasta que esté completamente suelta la monocapa.
  - Añadir 10 ml del medio de cultivo correspondiente según el tipo celular.
  - Pasar por pipeta de cristal estéril unas 20 veces como mínimo para homogeneizar las células.
  - Tomar 1 ml de células y añadirlo a un tubo de recuento con 0,2 ml de azul tripán al 0,1%.
  - Montar una cámara de recuento y contar el número de células en los cuadros laterales, hallando la media.
  - Calcular el volumen de MEM 10% que hay que añadir al frasco para obtener el recuento de 150.000 células/ml.

|                                                     |                                              |              |               |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | PNT-ARBOV-06<br>Cultivo celular de arbovirus | PNT-ARBOV-06 |               |
|                                                     |                                              | Edición N°1  | Página 7 de 9 |

Emplear la siguiente fórmula para calcular el volumen de medio a añadir:

$$\text{Volumen a añadir} = \frac{\text{Recuento} \times 10 \times 12.000}{150.000}$$

- Distribuir el volumen final, tras homogeneizar, en el número de frascos apropiados (30 ml por frasco grande de 250 ml y 10 ml si se utilizan frascos pequeños).
- Incubar a 35°C, observando cada día.

### 7.2.3. Preparación de tubos de cultivo celular

- Colocar los tubos en una gradilla especial que permita la incubación horizontal (15° de inclinación), de manera que la señal nos indique el lugar contrario al de formación de la monocapa.
- Pegar en la gradilla una etiqueta indicando tipo de línea celular y fecha de preparación.
- Distribuir 1 ml de la suspensión por tubo; el exceso de suspensión se repartirá en frascos de cultivo a razón de 30 ml por frasco grande o 10 ml por frasco pequeño.
- Rotular los tubos con la inicial del nombre de la línea celular y el día de preparación y hacer una señal en la zona del tubo que quedará hacia arriba en la gradilla de incubación.
- Incubar los tubos horizontalmente (15° de inclinación) a 35°C.
- Al día siguiente comprobar la monocapa, y si es semiconfluente, cambiar el medio de crecimiento por el de mantenimiento (MEM 1%).
- Observar cada día. Las células no deben utilizarse pasados 7 días desde su preparación.

## 7.3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA CULTIVO CELULAR

Todos los pasos de preparación de muestras para cultivo celular así como aquellos que impliquen manipulación de los cultivos una vez inoculadas las muestras deben realizarse en cabina de seguridad biológica (CSB) IIA y con equipos de protección individual recomendados para los arbovirus que se van a manejar de riesgo biológico 2. El manejo de los cultivos de arbovirus clasificados como patógenos de riesgo biológico 3 debe llevarse a cabo en CSB IIA en el área P3 cumpliendo estrictamente las normas de uso de ésta (ver Procedimiento General de Uso del Área con nivel 3 de contención de riesgo biológico).

### 7.3.1. Preparación de las muestras para cultivo celular

#### Muestras en escobillón:

Se deben recibir en el laboratorio en tubo con medio de transporte para virus.

- Añadir a cada tubo una bola de cristal estéril y agitar el tubo durante unos segundos en el vortex.
- Retirar el escobillón con pinza estéril.
- Añadir a la muestra un 10% de mezcla antibiótica (por cada mililitro de muestra se añaden 100 µl de mezcla antibiótica). Si se trata de saliva añadir también 100 µl de suero fetal bovino por cada ml de muestra). Mantener a 4°C durante 30 minutos.

#### Biopsia:

- Añadir 1 ml de MEM 0% y 3 bolas de cristal estériles al envase en el que se recibe la muestra.
- Agitar 1 minuto en vortex.
- Extraer la suspensión resultante y pasarla a un tubo de centrifuga estéril. Centrifugar a 2.000 rpm durante 10 minutos. Recoger el sobrenadante para procesarlo.

|                                                     |                                              |              |               |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | PNT-ARBOV-06<br>Cultivo celular de arbovirus | PNT-ARBOV-06 |               |
|                                                     |                                              | Edición N°1  | Página 8 de 9 |

- Añadir al sobrenadante un 10% de mezcla antibiótica y dejar 30 minutos a 4°C.
- Inocular los tubos de Vero con 0,2 ml de la muestra.

#### Orina:

- Separar 10 ml de la muestra en un tubo de centrifuga estéril con tapón de rosca para procesarla.
- Centrifugar el tubo con los 10 ml de orina a 2.000 rpm durante 10 minutos.
- Decantar dejando en el tubo unos 2 ml de muestra.
- Comprobar el pH de la muestra, y si es ácido neutralizar con unas gotas de NaOH 0,5N (no añadir más de 3-4 gotas).
- Añadir 0,2 ml de mezcla antibiótica y 0,2 ml de suero fetal bovino manteniendo la muestra a 4°C durante 30 minutos. Homogeneizar la muestra.

#### Líquidos estériles:

Incluye LCR, suero y/o sangre. No requiere preparación de la muestra antes de su inoculación.

### **7.3.2. Inoculación de las muestras en tubos de cultivo celular**

- Inocular 0,2 ml de la muestra sobre la monocapa una vez retirado el medio de mantenimiento.
- Dejar adsorber a 37°C unos 90 minutos.
- Añadir medio de inoculación (MEM 1%) e incubar a 35-37°C en gradillas horizontalmente con inclinación del 15%.

Se recomienda utilizar como sustrato de los virus líneas celulares de pase reciente (menor de 7 días); la utilización de células metabólicamente activas favorece la infección vírica.

### **7.3.3. Detección de efecto citopático**

Observar los cultivos diariamente para detección de ECP en microscopio invertido. Los arbovirus a los que se refiere este procedimiento crecen en línea celular Vero produciendo un ECP generalizado de toda la monocapa celular. Utilizar un tubo sin inocular preparado el mismo día que el usado para la inoculación de la muestra como control negativo y un control positivo con una cepa patrón del virus a aislar, para diferenciar el ECP producido por el virus del generado por el envejecimiento de la monocapa.

## **8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

En caso de aparición de ECP, realizar un subcultivo ("dar un pase") a otro tubo para promover la amplificación *in vivo* del virus y descartar ECP inespecífico en el tubo de origen por envejecimiento de la monocapa celular, comparando con el control negativo y positivo, a los que también se les da pase en paralelo.

Los cultivos se leerán hasta 15 días consecutivos para descartar un resultado negativo. Una vez transcurrido el periodo de incubación final o bien cuando se identifique el virus aislado, se emitirá en informe:

- Resultado negativo: "No desarrollo de virus en cultivo celular tras finalizar el periodo de incubación."
- Resultado positivo: "Desarrollo de .....(virus aislado).... en cultivo celular."

Las arbovirosis a las que hace referencia este procedimiento son Enfermedades de Declaración Obligatoria, de modo que los resultados deben informarse a los servicios de Epidemiología o Medicina Preventiva

|                                                     |                                              |              |               |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | PNT-ARBOV-06<br>Cultivo celular de arbovirus | PNT-ARBOV-06 |               |
|                                                     |                                              | Edición N°1  | Página 9 de 9 |

correspondientes, utilizando las vías de declaración urgentes u ordinaria, según el virus detectado. Como los arbovirus están sujetos a programas de vigilancia, se tiene que garantizar la emisión del informe al médico peticionario así como a las instituciones de Salud Pública implicadas en estos programas.

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico, realizando una adecuada segregación de los residuos. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

El cultivo celular no suele tener rentabilidad diagnóstica, es por ello que habitualmente se utiliza para obtener aislados de muestras previamente positivas mediante técnicas directas. Por ello, se suele realizar en laboratorios de referencia y con personal entrenado en manipulación de líneas celulares y cultivos celulares de muestras clínicas con sospecha de arbovirus de riesgo biológico 2 y 3.

## 11. LIMITACIONES AL PROCEDIMIENTO

El cultivo celular requiere virus viables por lo que es fundamental seguir estrictamente las recomendaciones de toma de muestra, conservación y transporte al laboratorio, así como el procesamiento inmediato de la misma o su correcta conservación en caso de demora.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Beaty BJ, Calisher CH, Shope RS. Arboviruses. En: Schmidt NJ, Emmons RW (eds). Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, 6th edition. Washington DC: American Public Health Association; 1989.
2. Hsiung GD, Fong CKY, Landry ML. En: Hsiung's Diagnostic virology as illustrated by light and electron microscopy, 4th edition. New Haven: Yale University Press; 1994.
3. Knipe DM, Howley PM. En: Field's Virology, 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

|                                                     |                                                                        |              |               |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Detección de anticuerpos neutralizantes<br>frente a arbovirus en suero | PNT-ARBOV-07 |               |
|                                                     |                                                                        | Edición N° 1 | Página 1 de 7 |

**PNT-ARBOV-07**  
**Detección de anticuerpos neutralizantes**  
**frente a arbovirus en suero**

| ELABORADO      |       | REVISADO Y APROBADO |       |
|----------------|-------|---------------------|-------|
| 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 / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Detección de anticuerpos neutralizantes<br>frente a arbovirus en suero | PNT-ARBOV-07  |               |
|                                                     |                                                                        | Edición N° 01 | Página 2 de 7 |

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describe el método a seguir para llevar a cabo la detección de anticuerpos neutralizantes frente a un arbovirus determinado en una muestra de suero humano mediante la técnica de neutralización viral en placa de 96 pocillos (microneutralización). Como este proceso implica el manejo de cultivos celulares de estos virus, se requieren diferentes niveles de contención de riesgo biológico, según se trate de arbovirus clasificados como de riesgo biológico 2 (como los virus Toscana y Zika) o 3 (como los virus dengue, chikungunya y *West Nile*).

## 2. FUNDAMENTO

Este ensayo permite la titulación de anticuerpos neutralizantes en una muestra de suero humano frente a un determinado virus. Estos anticuerpos son muy específicos y los produce el sistema inmunitario del hospedador tras la infección y son muy importantes al ser protectores, ya que van a bloquear el progreso de la infección.

La seroneutralización o neutralización viral se considera la técnica *gold*-estándar que mejor refleja la correlación virus-anticuerpos *in vivo* e *in vitro*. Se trata de una técnica cuantitativa, por lo que se llevan a cabo diluciones seriadas del suero problema y se añade una cantidad constante de virus. Tras un periodo de incubación para que se lleve a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, se añaden las células, donde el virus no neutralizado puede producir un efecto citopático reconocible entre 3 a 12 días dependiendo de cada virus. El punto final es la dilución que inhibe el crecimiento en un 50% (TCID<sub>50</sub>) o 90% (TDCI<sub>90</sub>) de inhibición, y este último puede ser más específico. La línea celular Vero (derivada de riñón de mono verde africano) es la más utilizada en el caso de las arbovirosis, debido principalmente a su facilidad de manejo y por su versatilidad para permitir el crecimiento de cualquiera de ellos. Se necesita que el crecimiento del virus en el cultivo celular se haga evidente por la aparición de efecto citopático (ECP) para la posterior interpretación de los resultados, lo que dificulta su uso e interpretación en aquellos casos en los que el ECP del virus no es muy evidente.

Esta técnica es laboriosa y más lenta que otras técnicas de detección de anticuerpos como las técnicas de *screening* de inmunofluorescencia (IFI) o inmunoenzimática (ELISA), pero es muy específica y sensible y se considera prueba de referencia para cualquier valoración serológica.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Pérez Saénz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Directiva (UE) 2019/1833 de la Comisión de 24 de octubre de 2019 por la que se modifican los anexos I, III, V y VI de la Directiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (<https://www.boe.es/doue/2019/279/L00054-00079.pdf>).
4. Procedimiento General de Uso del Área con nivel 3 de contención de riesgo biológico.
5. Protocolos del Laboratorio de Virus para la preparación de medios de cultivo y reactivos

|                                                     |                                                                        |               |               |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Detección de anticuerpos neutralizantes<br>frente a arbovirus en suero | PNT-ARBOV-07  |               |
|                                                     |                                                                        | Edición N° 01 | Página 3 de 7 |

## 4. MUESTRAS

### 4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA Y CONSERVACIÓN

La muestra de elección para realizar esta técnica es suero, principalmente en aquellos que se haya detectado previamente la presencia de anticuerpos IgM o IgG. Las muestras de suero deben tomarse asépticamente por punción venosa. El suero se obtiene dejando que se produzca la coagulación espontáneamente en un tubo, preferentemente de vidrio, en el que no se ha puesto anticoagulante y después centrifugando para separar el coágulo. No se deben analizar muestras hiperlipémicas, contaminadas, hemolizadas, ictericas, ni inactivadas por calor. El rendimiento de la técnica depende de la correcta manipulación y conservación de las muestras antes de su análisis. 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.

### 4.2. REACTIVOS

Las muestras se ensayarán puras o se diluirán a partir de 1/2. Antes de ensayar o realizar la dilución de la muestra, éstas deben ser homogeneizadas en agitador vórtex y posteriormente se descomplementarán incubando durante 30 minutos a 56°C.

Se requiere en el ensayo de al menos un duplicado para cada dilución de suero (diluciones seriadas realizadas en medio de cultivo sin suero).

Criterios de rechazo: Muestras que incumplan las normas generales de recogida, transporte y conservación de muestras (muestra derramada, mal identificada, en contenedor inadecuado, etc.)

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- DMEM (*dulbecco modified Eagles minimal essential medium*) suplementado con 1% antibióticos y Glutamina
- Penicilina-Estreptomicina 10.000 U penicilina/μl
- Glutamina 200 mM
- Suero bovino fetal (SBF)
- DMEM + 10% SBF
- Sueros inactivados
- Virus titulado
- Línea celular Vero
- PBS
- Solución de disgregación de células tripsina-EDTA:
  - Solución EDTA
 

|                   |         |
|-------------------|---------|
| EDTA              | 0,40 g  |
| PBS pH=7,5 c.s.p. | 1000 ml |
  - Solución Tripsina
 

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Tripsin           | 2,5 g   |
| PBS pH=7,5 c.s.p. | 1000 ml |

Mezclar ambas soluciones y alicuotar en frascos de cristal a razón de 50-100 ml por frasco. Mantener congelada a -20°C hasta su uso.

- Naftol Blue (1 g de Naftol Blue Black, 13,6 g de acetato de sodio y 60 ml de ácido acético glacial (añadirlo lentamente y en la cabina de gases). Enrasar hasta un volumen final de 1 litro

|                                                     |                                                                        |               |               |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Detección de anticuerpos neutralizantes<br>frente a arbovirus en suero | PNT-ARBOV-07  |               |
|                                                     |                                                                        | Edición N° 01 | Página 4 de 7 |

## 6. APARATOS Y MATERIAL

### 6.1. APARATOS

- Cabina de seguridad biológica
- Termobloque
- Microcentrífuga
- Frigorífico
- Congelador de -20°C
- Cámara de 33-37°C para incubación de cultivos celulares
- Microscopio invertido
- Cabina de gases

### 6.2. MATERIAL

- Cubetas para líquido estériles
- Micropipetas y multicanal
- Puntas de micropipeta de “calidad molecular” con filtro.
- Gradillas para tubos sarstedt o similares.
- Agitador tipo vórtex.
- Tubos de reacción de 1,5 ml de “calidad molecular” (tipo sarstedt).
- Bandeja con hielo
- Contenedores de residuos
- Tubos para cultivo celular
- Pipetas de 5 y 10 ml con filtro
- Puntas de pipeta Pasteur desechables estériles
- Bolsas herméticas

## 7. PROCEDIMIENTO

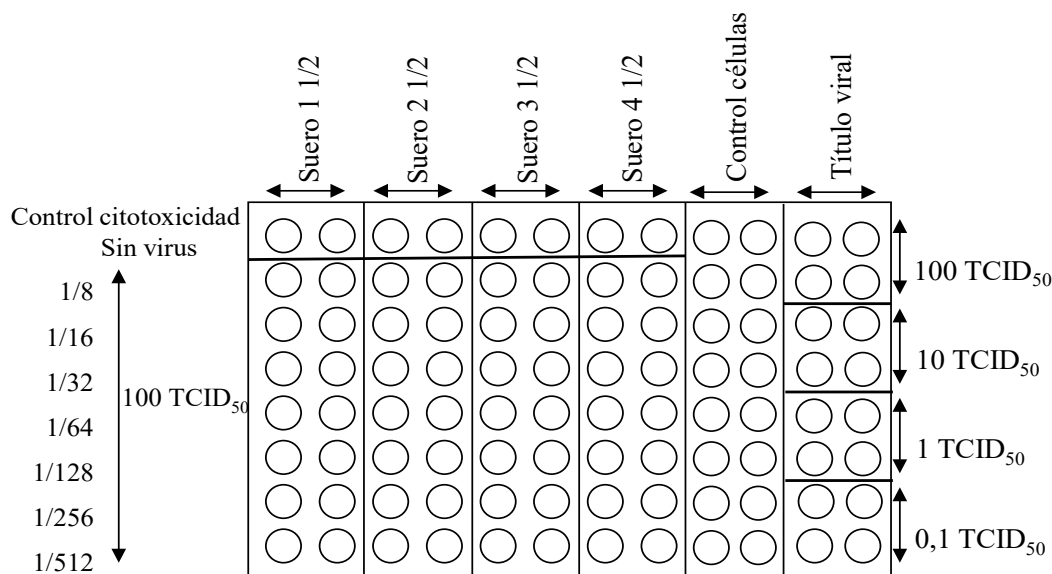
Antes de comenzar con el protocolo hay que tener en cuenta que se va a necesitar durante el mismo algunos controles de:

- o Neutralización: suero neutralizante
- o No neutralización: suero no neutralizante
- o Viabilidad celular: células sin suero y sin virus
- o Citotoxicidad del suero: células con cada suero y sin virus
- o Infectividad viral: células sin suero con 100 TCID<sub>50</sub>, 10 TCID<sub>50</sub>, 1 TCID<sub>50</sub> y 0,1 TCID<sub>50</sub>.

1. Los sueros problema se diluyen a partir de 1 / 2 en PBS (60 µl PBS + 60 µl suero), aunque puede variar dependiendo del virus a analizar, y se descomplementan a 56°C durante 30 minutos
2. Descongelar el vial de virus titulado y preparar la dilución que contiene 100 TCID<sub>50</sub>/25 µl. Preparar también diluciones seriadas en base 10 que contengan 10 TCID<sub>50</sub>/25 µl, 1 TCID<sub>50</sub>/25 µl y 0,1 TCID<sub>50</sub>/25 µl.
3. Añadir los siguientes volúmenes de:
  - 25 µl de DMEM sin suero a todos los pocillos de la placa
  - 25 µl de DMEM sin suero a los pocillos en los que se pondrá el control de células
  - 25 µl de cada suero en pocillos duplicados en las filas A y B (la primera fila sirve como control de citotoxicidad del suero y la segunda como la primera dilución del ensayo)

|                                                     |                                                                        |               |               |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Detección de anticuerpos neutralizantes<br>frente a arbovirus en suero | PNT-ARBOV-07  |               |
|                                                     |                                                                        | Edición N° 01 | Página 5 de 7 |

4. Realizar diluciones seriadas 1/2 partiendo de la fila B, transfiriendo 25 µl al siguiente pocillo. Cambiar de punta de pipeta en cada paso. Tirar el volumen después de hacer la última fila.
5. Añadir 25 µl del virus en los pocillos control: 0,1; 1; 10 y 100 TCID<sub>50</sub>/pocillo.
6. Añadir 25 µl del virus (100 TCID<sub>50</sub>/pocillo) a todos los pocillos en los que hay sueros a ensayar.



7. Incubar las placas 1 hora a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.
8. Preparar una suspensión celular con aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/ml en DMEM al 10% de SBF. Para ello las monocapas celulares se tripsinizan con tripsina-EDTA (tripsina-verseno) y se resuspenden en el correspondiente volumen de DMEM al 10% de SBF.
9. Añadir 50 µl de la suspensión celular recién obtenida a cada pocillo. Las diluciones de los sueros que se quedarían en la placa si se parte de una dilución inicial de 1/2 tras añadir el virus y las células son de 1/8 a 1/512.
10. Incubar las placas durante 4-7 días (según el virus ensayado) en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.
11. Examinar las placas en el microscopio y registrar la presencia o ausencia de ECP (efecto citopático) o, directamente, teñir para células viables como sigue:

#### Tinción de las placas

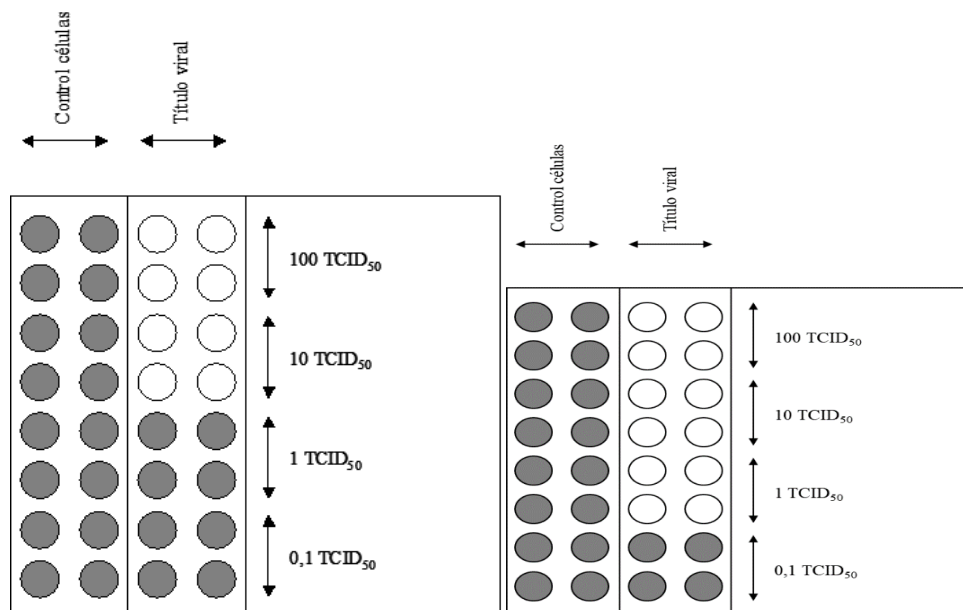
- \* Descartar el sobrenadante
- \* Añadir a cada pocillo 200 µl de naftol blue e introducir la placa en una bolsa hermética que contenga naftol blue
- \* Incubar las placas durante 15 minutos
- \* Lavar las placas introduciéndolas boca abajo en un cubo que contenga agua del grifo
- \* Dejar secar a temperatura ambiente

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Las monocapas celulares destruidas no se tiñen, mientras que las intactas adquieren un color azul. Comprobar:

|                                                     |                                                                        |              |               |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Detección de anticuerpos neutralizantes<br>frente a arbovirus en suero | PNT-ARBOV-07 |               |
|                                                     |                                                                        | Edición N°1  | Página 6 de 7 |

- a) Que el control de células, los controles con anticuerpos neutralizantes (en el título esperado), y los controles de citotoxicidad de los sueros se tiñen de azul
- b) Que la cantidad de virus añadida a cada pocillo está entre  $10^{1,5}$  and  $10^{2,5}$  TCID<sub>50</sub> (aunque lo ideal es que el 50% de los pocillos con 1 TCID<sub>50</sub>, estén infectados, el ensayo es válido también entre los siguientes límites):



Una dilución de suero se considera neutralizante si el 100% de la monocapa celular está intacta. La mayor dilución de suero que da neutralización completa en ambos pocillos de ensayo es el título neutralizante del suero.

Una dilución de suero se considera no neutralizante si todos los pocillos ensayados presentan monocapa celular destruida y por lo tanto no teñida de azul.

Se considera que hay una infección aguda si entre los sueros de fase aguda y convaleciente hay un aumento de al menos cuatro veces en el título neutralizante obtenido.

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico, realizando una adecuada segregación de los residuos. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de Microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

|                                                     |                                                                        |               |               |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|
| Servicio / Unidad de Microbiología<br>Hospital..... | Detección de anticuerpos neutralizantes<br>frente a arbovirus en suero | PNT-ARBOV-07  |               |
|                                                     |                                                                        | Edición N° 01 | Página 7 de 7 |

Es importante considerar que para la realización de esta técnica en muchas ocasiones debe realizarse en laboratorios de bioseguridad clase 3, ya que los virus frente a los cuales se hace el ensayo requieren de estas condiciones de bioseguridad para su manejo al ser un cultivo celular.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En la interpretación de los resultados serológicos ha de considerarse el alto grado de reacción cruzada entre diferentes virus del mismo género viral, los antecedentes de vacunación frente a los mismos y su co-circulación en grandes áreas. Así, para confirmar la infección por un virus, si en esa área co-circula con otros del mismo género viral (por ejemplo, dengue y zika), se recomienda llevar a cabo los ensayos de neutralización frente a esos virus y el diagnóstico confirmatorio es aquel para el que se observe un título de anticuerpos neutralizantes 4 veces mayor que para el resto.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Laboratory tests used in the diagnostic and research of dengue virus: present and future. Juan Samuel Sulca Herencia. Libro: "Dengue Fever". DOI: 10.5772/intechopen.80519. DOI: 10.5772/intechopen.73901. ISBN: 978-1-78985-000-0. eBook (PDF) ISBN: 978-1-83881-761-9.