



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Diagnóstico microbiológico de arbovirosis y robovirosis emergentes

Ana Isabel Negredo Antón^{a,*}, Fernando de Ory Manchón^a, M. Paz Sánchez-Seco Fariñas^a, Leticia Franco Narváez^a, M. Isabel Gegúndez Cámara^b, José M. Navarro Mari^c y Antonio Tenorio Matanzo^a

^a Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

^b Departamento de Biomedicina y Biotecnología, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España

^c Servicio de Microbiología y Parasitología UGC, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 8 de julio de 2013

Aceptado el 10 de julio de 2013

On-line el 16 de octubre de 2013

Palabras clave:

Arbovirosis

Robovirosis

Virus emergentes

Diagnóstico virológico

Virus transmitidos por vector

R E S U M E N

Los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) y los transmitidos por roedores (robovirus) o por otros animales se engloban en el epígrafe «virus transmitidos por vector» (VTV). En nuestro entorno son 3 los principales VTV autóctonos que causan enfermedad: los virus Toscana, West Nile y de la coriomeningitis linfocitaria; además, se diagnostican enfermedades por VTV importados (virus dengue, chikungunya) que actualmente suponen un riesgo de asentamiento por la circulación de vectores competentes de transmisión en nuestro territorio, como es el mosquito *Aedes albopictus*. La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica se ha hecho eco de la emergencia de las enfermedades por VTV y ha redactado un procedimiento sobre diagnóstico microbiológico de arbovirosis y robovirosis emergentes que supone una actualización sobre los VTV con mayor sospecha diagnóstica en nuestro entorno y los métodos de detección disponibles para el diagnóstico de las enfermedades que producen.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Microbiological diagnosis of emerging arboviral and rodent borne diseases

A B S T R A C T

Vector borne viruses (VBV) include viruses transmitted by arthropods, rodents and other animals. In Spain the three main autochthonous VBVs causing human diseases are: Toscana, West Nile and Lymphocytic Choriomeningitis viruses. There are also other imported viruses that are potential threats to our public health, due to the presence of competent transmission vectors (dengue and chikungunya viruses in areas infested with *Aedes albopictus*), or due to the potential person-to-person transmission (Lassa and other viruses causing haemorrhagic fever). The Spanish Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology has responded to the emergence of VBVs by publishing a special issue of Microbiological Proceedings focused on the diagnosis of those emerging vector borne viruses of major concern in our country.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

Los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) y los transmitidos por roedores (robovirus) o por otros animales se engloban bajo el epígrafe «virus transmitidos por vector» (VTV). La mayoría de los VTV no utilizan a los humanos en su ciclo de vida, aunque algunos de ellos pueden infectarlo y causar enfermedad de distinta gravedad, que abarca desde la infección asintomática al síndrome febril, acompañado o no de enfermedad neurológica, hepática, renal, pulmonar y/o hemorrágica. Son 3 los principales

virus autóctonos transmitidos por vector que producen enfermedad humana en nuestro país: el virus Toscana (TOSV), el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) y el virus West Nile (WNV). Los 3 se han asociado a enfermedad neurológica aguda y son transmitidos por vectores con una distribución geográfica específica en nuestro territorio (flebotomos, ratón común y mosquitos *Culex*, respectivamente). Existen otros VTV adaptados a nuestra especie capaces de producir ciclos urbanos de transmisión; se trata de los virus dengue (DENV), de la fiebre amarilla (YFV) y chikungunya (CHIKV), que todavía no circulan en nuestro país pero de los que existe un riesgo potencial de asentamiento debido a su presencia a través de viajeros infectados procedentes de zonas endémicas (tabla 1) y a la circulación de una de las especies de mosquito que

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: anabelnegredo@isciii.es (A.I. Negredo Antón).

Tabla 1
Principales síndromes clínicos producidos por los virus transmitidos por vector, presencia en España y zonas endémicas

	Género	Virus	España	Europa	Asia	Australia/ Oceanía	África	América Central y del Sur	América del Norte	Riesgo biológico ^a	Vector
Fiebre hemorrá- gica/compromiso hepático	<i>Arenavirus</i>	Lassa					•			4	Roedores
		Lujo					•			4	Roedores
		Junín						•		4	Roedores
		Machupo						•		4	Roedores
		Guanarito						•		4	Roedores
		Sabiá						•		4	Roedores
		Chaparé						•		4	Roedores
	<i>Fam. Filoviridae</i>	Ebola					•			4	Desconocido
		Marburg					•			4	Desconocido
		Lloviu (patogenicidad desconocida)	•							4	Desconocido
	<i>Nairovirus</i>	Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo	•	•	•		•			4	Garrapatas
	<i>Rhabdovirus</i>	Bas-Congo					•			4	Desconocido
	<i>Phlebovirus</i>	Huaiyangshan			•					4	Garrapatas
		Fiebre del valle del Rift			•		•			3	Mosquitos
	<i>Flavivirus</i>	Dengue			•	•	•	•	•	3	Mosquitos
		Fiebre amarilla					•	•		3	Mosquitos
		Fiebre hemorrágica de Omsk			•					3	Garrapatas
		Fiebre hemorrágica del Bosque de Kyasanur			•					3	Garrapatas
		Hantaan			•					3	Roedores
Neurológico	<i>Hantavirus</i>	Dobrava-Belgrado		•						3	Roedores
		Seoul		•	•	•	•	•	•	3	Roedores
		Puumala		•						2	Roedores
	<i>Henipavirus</i>	Hendra				•				4	Equinos
		Nipah			•					4	Quirópteros y porcino
	<i>Flavivirus</i>	West Nile	•	•	•	•	•	•	•	3	Mosquitos
		Encefalitis japonesa			•					3	Mosquitos
		Encefalitis del valle de Murray				•				3	Mosquitos
		Encefalitis de St. Louis						•		3	Mosquitos
		Usutu	•	•			•			3	Mosquitos
		Encefalitis transmitida por garrapatas		•	•					3*	Garrapatas
		Encefalitis de Powassan							•	3	Garrapatas
		Encefalitis equina venezolana						•	•	3	Mosquitos
	<i>Alphavirus</i>	Encefalitis equina del este						•	•	3	Mosquitos
		Encefalitis equina del oeste						•	•	3	Mosquitos
		Encefalitis de California							•	3	Mosquitos
	<i>Orthobunyavirus</i>	Tahyna		•	•					3	Mosquitos
		Fiebre del valle del Rift			•		•			3	Mosquitos
	<i>Phlebovirus</i>	Toscana	•	•						2	Flebótomos
		Granada	•							2	Flebótomos
		Nápoles		•						3	Flebótomos

Tabla 1 (continuación)

Género	Virus	España	Europa	Asia	Australia/ Oceanía	África	América del Sur	América del Norte	Riesgo biológico ^a	Vector
Renal	<i>Sicilia</i>		•						3	Flebotomos
	<i>Arenavirus</i>					•		•	3	Roedores
	<i>Rhabdovirus</i>	•	•	•	•	•	•	•	3*	Mamíferos
	<i>Hantavirus</i>	•	•	•	•	•			3	Roedores
Pulmonar	<i>Puumala</i>		•						2	Roedores
	<i>Seoul</i>		•						3	Roedores
	<i>Andes</i>			•		•	•	•	3	Roedores
	<i>Sin nombre</i>							•	3	Roedores
Artritis	<i>Chikungunya</i>			•		•			3*	Mosquitos
	<i>O'nyong-nyong</i>			•		•			2	Mosquitos
	<i>Sindbis</i>			•		•			2	Mosquitos
	<i>Barmah Forest</i>		•		•	•			2	Mosquitos
	<i>Ross River</i>				•				2	Mosquitos
	<i>Mayaro</i>						•		3	Mosquitos

^a Definiciones de riesgo biológico:

Riesgo biológico 1: microorganismos cuyo riesgo de producir enfermedad en el trabajador es poco probable, no presentan riesgo de propagación a la colectividad y para los que no es necesario disponer de medidas profilácticas o terapéuticas adecuadas.

Riesgo biológico 2: microorganismos que pueden causar una enfermedad y constituir un riesgo para los trabajadores, el riesgo de propagación a la colectividad es poco probable y para los que hay disponibles medidas profilácticas o terapéuticas en la mayoría de los casos.

Riesgo biológico 3: microorganismos que pueden provocar una enfermedad grave y constituir un grave peligro para los trabajadores, el riesgo de propagación a la colectividad es probable y para los que hay disponibles medidas profilácticas o terapéuticas en la mayoría de los casos.

Riesgo biológico 3*: aun siendo de riesgo biológico 3, normalmente no se disemina por vía aérea.

Riesgo biológico 4: microorganismos que provocan una enfermedad grave y constituyen un serio problema para los trabajadores, el riesgo de propagación a la colectividad es elevado y no hay disponible profilaxis o tratamiento eficaz.

le sirven como vector, *Aedes albopictus*, ampliamente distribuida por la zona del mediterráneo, incluida las Islas Baleares. Un tercer grupo de los VTV engloba a los de alto riesgo biológico, productores de fiebres hemorrágicas, cuya sospecha supone una situación de alerta debido a la gravedad de la patología que producen siendo capaces de transmitirse por contacto interpersonal.

Los cambios introducidos por nuestra especie en los ecosistemas que ocupan estos virus, los cambios en el clima, y la velocidad y la frecuencia con la que viajan actualmente las personas y las mercancías están favoreciendo la rápida dispersión de los VTV, lo que provoca frecuentes amenazas a la salud pública.

Diagnóstico de las arbovirosis y robovirosis

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

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

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

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

El papel del microbiólogo en los hospitales es esencial para reforzar no solo el diagnóstico, sino la vigilancia y el control de estas enfermedades. Dada la importancia de la vigilancia microbiológica de las enfermedades víricas transmitidas por vector, el CNM ha

Tabla 2

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

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

LBA: lavado bronco alveolar.

(1) El estudio de esta muestra puede ser necesario para establecer el diagnóstico etiológico final si los resultados obtenidos en la fase aguda de la enfermedad no fueran concluyentes.

(2) Suero y LCR deben obtenerse simultáneamente para poder estudiar la producción intratecal de anticuerpos. Este estudio es necesario en determinadas situaciones, como la presencia de una patología neurológica asociada a la vacunación frente a la fiebre amarilla.

(3) Las muestras obtenidas se enviarán urgentemente al CNM siguiendo la normativa de materiales biológicos clase A. El laboratorio recomienda tomar las siguientes muestras, que servirán para la detección urgente de virus de elevado biológico, y de antígenos de plasmodio y de leptospira y para la realización de estudios complementarios posteriores: sangre anticoagulada con citrato: 2 viales de 10 ml; sangre coagulada: 2 viales de 10 ml (no centrifugar para evitar la formación de aerosoles en el laboratorio); orina: 2 viales con 10 ml, y en caso de enfermedad que afecte preferentemente a un órgano, consultar con el CNM.

puesto en marcha un programa que no tiene coste para el hospital, basado en el estudio de los casos sospechosos.

Recogida y transporte de muestras

La muestra de elección es el suero, y las muestras adicionales que resultan apropiadas para la investigación de los VTV se seleccionarán en función del síndrome clínico observado (tabla 2). El estudio de muestras tomadas en la fase convaleciente puede ayudar en algunos casos a establecer un diagnóstico.

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

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

Aislamiento mediante cultivo

El aislamiento en el laboratorio de los VTV a partir de las muestras clínicas se puede realizar mediante técnicas de cultivo

celular en los laboratorios con instalaciones de seguridad biológica adecuadas para el virus sospechado. Así, el cultivo de los WNV, LCMV, DENV y CHIKV analizados en este documento requiere disponer de un laboratorio de nivel 3 de bioseguridad (tablas 1 y 3). Sin embargo, la manipulación de muestras clínicas que no implique la replicación de los virus se puede realizar en un laboratorio de nivel 2 de bioseguridad, con prácticas adecuadas. El aislamiento del virus en cultivo, aparte de su interés diagnóstico permite realizar estudios de caracterización biológica, antigénica, molecular y genética de los nuevos virus que hayan sido detectados.

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

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

Virus West Nile

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

Tabla 3

Arbovirus y robivirus, nivel de riesgo biológico, líneas celulares y tiempo de observación del efecto citopático

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

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

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

^a Según el laboratorio fabricante.

Virus Toscana

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

Virus dengue

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

Virus chikungunya

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

Detección de antígeno

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

Los métodos basados en la detección de antígeno presentan la ventaja de permitir obtener un resultado rápido. Como contrapartida, estos resultados pueden ser difíciles de interpretar debido a

la reactividad antigénica cruzada que existe entre las especies del mismo género viral como se ha comentado anteriormente, interpretación de resultados que se complica si distintas especies del mismo género viral circulan en la misma zona geográfica (tabla 1).

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

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

Para la detección de antígeno del WNV también se ha desarrollado un sistema dirigido a la proteína E basado en el reconocimiento a partir de un nanobiosensor electroquímico utilizando una membrana de alúmina, y se ha observado que el límite de detección lo hace comparable a las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

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

Detección de ácidos nucleicos

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

Tabla 5
Métodos moleculares basados en la amplificación de genoma viral

Virus	Región del genoma	Método	Sensibilidad	Especificidad ensayada	Muestras clínicas, procedencia	Referencia
WNV	3'UTR linajes 1 y 2	TaqMan (One step)	10 cop/reacc	DENV3 y SLEV	Clínicas	1
	3'UTR linajes 1 y 2	TaqMan (One step)	10 ⁻² -10 ⁻³ PFU/ml	USUV, YFV y DENV	Clínicas	2
	5'UTR linajes 1 y 2	TaqMan (One step)	2 PFU/ml	JEV, SLEV, TBEV, DENV 1-4 y YFV	No	3
	5'UTR linajes 1 y 2	TaqMan (One step)	0,3-1,1 cop/reacc	JEV, YFV y TBEV	No	4
	NS5	TaqMan (One step)	0,007cop/ml	YFV y DENV1-4	Clínicas	5
	NS2a/NS5	RT-PCR Ligasa	> 100cop/ml	TBEV, POWV, SLEV, YFV DENV 1-4, MVEV y JEV	Clínicas	6
	NS2a	TaqMan (One step)	0,3-1,1 cop/reacc	MVEV, YFV y TBEV	No	4
TOSV	E Segmento L	RT-LAMP Nested	0,1 PFU/reacc 1-10 cop/reacc	DENV2, JEV y SLEV SFNV, SFSV, AGUV, PTV y RVFV	Clínicas Italia y España	7 8
	Segmento S	TaqMan	7 cop/reacc	SFNV, SFSV, RVFV, ARBV, CHCV, MV, E30, Influenza A/B	España	9
LCMV	Segmento S	TaqMan (One step)	10-100 moléculas	ND	No	10
	Segmento S (gen N)	Nested	ND	ND	No	11
	Segmento S (gen N)	TaqMan (One step)	< 50 cop/reacc	LASV, TACV, MACV, WWAV, LATV y PICV	Clínicas	12
DENV	E/NS1	Nested	100 cop/reacc	No especificado	Clínicas	13
	C/preM	Nested	< 10 ³ TCDI50	WNV, JEV, SLEV, YFV y EGV	Puerto Rico y Sudeste Asiático	14
	C	Nested	1-50 PFU/ml	DENV 1-4	Clínicas	15
CHIKV	3'NCR	TaqMan	0,4-1,2 × 10 ⁶ PFU/ml	JEV, SLEV WNV, YFV, VEEV, EEEV EEEV y WEEV	No	16
	3'NCR	TaqMan	100-5.000 cop/reacc	WNV, YFV, LIV y JEV	Clínicas	17
	3'NCR	TaqMan	0-8.000 cop/ml	ND	Clínicas	18
	E1	RT-PCR convencional	100 cop/ml	ND	India	19
	nsP4	TaqMan	10,5 cop/ml	RRV, ONNV, MAYV, SFV, SINV, WEEV, EEEV y VEEV	India, África e islas del Indico	19,20
	E1	RT-LAMP	20 cop	DENV1-4, JEV, WNV y SLEV	India	21
	E1	TaqMan (One step)	3 cop/reacc	EV, HIV, HCV, HBV CMV, EBV, HSV, VZV, DENV y WNV	Clínicas	20
	nsP1	SybrGreen.	1 PFU/ml	ND	No	22
	E1, nsP1, 5'NTR, nsP2	TaqMan (One step)	28 PFU 0,3 PFU 0,3 PFU 0,3 PFU	SINV, SFV, MAYV, UNAV, OCKV, AURAV, RRV, NDUV, VEEV y EEV	No	23
	nsP1	TaqMan	3,8-5,3 cop/reacc	RRV, SINV, SFV, MAYV, VEEV, WEEV, EEEV, ONNV y BFV	Clínicas	24 a
YFV	Gen E	Seminested	89 PFU/ml	DENV y SLEV	Brasil	25
	NS5	SybrGreen (One Step)	8,9 PFU/ml	DENV y SLEV	Brasil	25
	NS5	TaqMan (One step)	12 cop/reacc	DENV, TBEV y JEV	No	26
	5'UTR	TaqMan	25,9 PFU/ml	ND	Costa de Marfil y Brasil	27
	5'UTR	TaqMan (One Step)	10 cop/reacc	DENV, WNV, JEV, TBEV, VEEV, WEEV, CHIKV y ONNV	No	28

AGUV: Aguacate virus; ARBV: Arbia virus; AURAV: Aura virus; BFV: Barmah Forest virus; CHCV: Chagres virus; CMV: citomegalovirus; E30: echovirus 30; EBV: Epstein-Barr virus; EHV: Edge Hill virus; EV: enterovirus; HBV: hepatitis B virus; HCV: hepatitis C virus; HSV: herpes simplex virus; ATV: Latino virus; LIV: Louping ill virus; MACV: Machupo virus; MV: Mumps virus; MYV: Mayaro virus; ND: no hay datos disponibles; NDUV: Ndumu virus; OCKV: Ockelbo virus; PICV: Pichinde virus; POWV: Powasan virus; PTV: Punta Toro virus; RRV: Ros River virus; SFV: Semliki Forest virus; SINV: Sindbis virus; TACV: Tacaribe virus; TBEV: Tick-borne encephalitis virus; UNA: Una virus; VZV: varicella-zoster virus; WWAV: Whitewater arroyo virus.

^a Método comercializado (RealStar CHIKV RT-PCR; Astra Diagnostics, Hamburg Germany).

viremia que caracteriza a la mayoría de las infecciones producidas por este grupo de virus.

Se han desarrollado numerosos métodos basados en la PCR, tanto en el formato PCR convencional o tiempo final como en el

formato PCR en tiempo real. Para ambos tipos de métodos se requiere un paso de transcripción reversa, dado que se trata de virus con genoma de ARN. Este paso se puede acoplar a la PCR (*one-step*) o bien puede realizarse independientemente, en una reacción

Tabla 6
Métodos comerciales serológicos basados en la detección de anticuerpos

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

(c) captura; (i) indirecto; IB inmunoblot.

^a Detección simultánea de IgG e IgM.^b Detección simultánea de IgG, IgM y antígeno NS1.

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

Hay disponibles métodos comerciales de PCR en tiempo real para los WNV, DENV, CHIKV, JEV, hantavirus y virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, entre otros. La mayoría de ellos utilizan sondas de hibridación TaqMan como sistema de marcaje específico del producto amplificado; sin embargo, la mayoría de los métodos desarrollados siguen siendo técnicas «caseras» que ofrecen resultados óptimos de sensibilidad y especificidad. Aunque para el diagnóstico en el laboratorio la PCR en tiempo real se ha impuesto a las clásicas técnicas de PCR, para la realización de estudios de epidemiología molecular y variabilidad genética es preferible la utilización de la PCR convencional que permite la obtención de fragmentos genómicos de mayor tamaño portadores de información filogenética de contrastada calidad.

Otras estrategias metodológicas desarrolladas para la detección de genoma de los VTV utilizan técnicas de amplificación isotérmica tales como *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification* (NASBA), *Transcription-Mediated Amplification* (TMA) y *Retrotranscription Loop-mediated isothermal AMplification* (RT-LAMP). Las técnicas NASBA y TMA consisten en la amplificación del genoma

durante un proceso isotérmico, a una temperatura entre 41 y 60 °C, en presencia de 3 enzimas: transcriptasa, polimerasa y RNAasa. La técnica LAMP consiste también en un proceso isotérmico en el que la síntesis de nuevas cadenas se consigue utilizando una enzima con capacidad de desplazar la hebra de ADN y 4 cebadores cuyo diseño permite la obtención de una horquilla o *loop* de ADN. Alguna de esta metodología se ha desarrollado para detectar los WNV, DENV y CHIKV. En Estados Unidos se ha comercializado una TMA para el análisis de la presencia de genoma del WNV en muestras de donantes de sangre y de órganos, y recientemente esta metodología se está ensayando para la detección del DENV en donantes de sangre en Puerto Rico. En la [tabla 5](#) se muestra una selección de métodos de detección de ácidos nucleicos para los virus mencionados en el documento.

Detección de respuesta inmunológica humoral

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

la respuesta de anticuerpos es el método diagnóstico de elección.

La muestra más adecuada para hacer el diagnóstico serológico es el suero, aunque en ocasiones se puede realizar sobre muestra de plasma. La detección de IgM es el marcador elegido para el diagnóstico de una infección reciente, en tanto que la respuesta IgG aislada es un indicador de una infección pasada, o de vacunación en su caso, siendo el marcador de aplicación para estudios de seroprevalencia. Cuando las muestras son tomadas muy cerca del comienzo de la enfermedad es frecuente la ausencia de respuesta detectable de IgM, por lo que es preciso analizar otra muestra tomada 7-10 días después; analizando las muestras pareadas se confirma la infección demostrando seroconversión de IgM o IgG específica. La respuesta IgM puede ser detectable varios meses después de la infección por los TOSV, WNV, DENV y CHIKV, lo que origina dificultades para interpretar el resultado como una infección aguda. Los flavivirus muestran un alto grado de reacción cruzada, y la intensidad de esta reactividad depende del grado de purificación del antígeno empleado, lo que supone que con frecuencia se puedan detectar reactividades múltiples. En la interpretación de los resultados serológicos frente a los flavivirus además ha de considerarse el antecedente de vacunación frente a alguno de ellos (JEV, Tick-borne encephalitis virus [TBEV] y YFV). En estas situaciones son especialmente útiles los ensayos de avidez de IgG, de aplicación para el WNV y el DENV. De cualquier forma, para la caracterización última de la respuesta serológica específica es preciso realizar la técnica de neutralización tanto para los flavivirus como para el TOSV y los alphavirus, considerando en este último grupo de virus que tanto el CHIKV como el ONNV pueden ocasionar síndromes articulares. La técnica de neutralización se debe realizar en laboratorios expertos y adecuadamente equipados en términos de seguridad biológica, dado el nivel 3 de riesgo biológico en el que se incluyen la mayoría de estos virus (tablas 1 y 3).

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

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

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

mediante estudios de validación realizados en laboratorios experimentados.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Tang Y, Anne Hapip C, Liu B, Fang CT. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *J Clin Virol.* 2006;36:177–82.
2. Jimenez-Clavero M, Aguero M, Rojo G, Gomez-Tejedor C. A new fluorogenic real-time RT-PCR assay for detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile viruses. *J Vet Diagn Invest.* 2006;18:459–62.
3. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods.* 2007;146:355–8.
4. Eiden M, Vina-Rodriguez A, Hoffmann B, Ziegler U, Groschup MH. Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:748–53.
5. Zaayman D, Human S, Venter M. A highly sensitive method for the detection and genotyping of West Nile virus by real-time PCR. *J Virol Methods.* 2009;157:155–60.
6. Yeh JY, Lee JH, Seo HJ, Park JY, Moon JS, Cho IS, et al. Fast duplex one-step reverse transcriptase PCR for rapid differential detection of West Nile and Japanese encephalitis viruses. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4010–4.
7. Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Saxena P, Ambuj S, et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4172–8.
8. Sánchez-Seco MP, Echevarría JM, Hernández L, Estévez D, Navarro-Marí JM, Tenorio A. Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol.* 2003;71:140–9.
9. 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.
10. Weidmann M, Sanchez-Seco MP, Sall AA, Ly PO, Thiongane Y, Lô MM, et al. Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *J Clin Virol.* 2008;41:138–42.
11. Ledesma J, Fedele CG, Carro F, Lledó L, Sánchez-Seco MP, Tenorio A., et al. Independent lineage of lymphocytic choriomeningitis virus in wood mice (*Apodemus sylvaticus*), Spain. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1677–80.
12. Cordey S, Sahli R, Moraz ML, Estrade C, Morandi L, Cherpillod P, et al. Analytical validation of a lymphocytic choriomeningitis virus real-time RT-PCR assay. *J Virol Methods.* 2011;177:118–22.
13. Domingo C, Patel P, Linke S, Achazi K, Niedrig M. Molecular diagnosis of Flaviviruses. *Future Virol.* 2011;6:1059–74.
14. Lanciotti R, Calisher C, Gubler D, Chang G, Vorndam A. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30:545–51.
15. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2634–9.
16. Johnson B, Russell B, Lanciotti R. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4977–83.
17. Leparc-Goffart I, Baragatti M, Temmam S, Tuiskunen A, Moureau G, Charrel R, et al. Development and validation of real-time one-step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. *J Clin Virol.* 2009;45:61–6.
18. Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2323–30.
19. Reddy V, Ravi V, Desai A, Parida M, Powers A, Johnson B. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. *J Med Virol.* 2012;84:1771–8.
20. Laurent P, Le Roux K, Grivard P, Bertil G, Naze F, Picard M, et al. Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus. *Clin Chem.* 2007;53:1408–14.
21. Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, et al. Rapid and real-time detection of chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol.* 2007;45:351–7.
22. Yang CF, Chen CF, Su CL, Teng HJ, Lu LC, Lin C, et al. Screening of mosquitoes using SYBR Green I-based real-time RT-PCR with group-specific primers for detection of Flaviviruses and Alphaviruses in Taiwan. *J Virol Methods.* 2010;168:147–51.
23. Smith DR, Lee JS, Jahrling J, Kulesh DA, Turell MJ, Groebner JL, et al. Development of field-based real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for detection of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses in mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:679–84.
24. Panning M, Hess M, Fischer W, Grywna K, Pfeffer M, Drosten C. Performance of the RealStar Chikungunya virus real-time reverse transcription-PCR kit. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3014–6.

25. Nunes MR, Palacios G, Nunes KN, Casseb SM, Martins LC, Quaresma JA, et al. Evaluation of two molecular methods for the detection of Yellow fever virus genome. *J Virol Methods*. 2011;174:29–34.
26. Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerd-Chambaz Y, Colombani S, Moste C, et al. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J Virol Methods*. 2008;151:40–6.
27. Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Méndez JA, Nakouné ER, et al. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol*. 2012;50:4054–60.
28. Weidmann M, Faye O, Faye O, Kranaster R, Marx A, Nunes MR, et al. Improved LNA probe-based assay for the detection of African and South American yellow fever virus strains. *J Clin Virol*. 2010;48:187–92.