

Diagnóstico por laboratorio de la infección por Virus de la Fiebre Amarilla

Septiembre de 2018

El virus de la fiebre amarilla pertenece al género *Flavivirus* y se encuentra relacionado a otros virus del mismo género como los del dengue, Zika, encefalitis japonesa y encefalitis del Nilo Occidental. Puede ser transmitido al humano principalmente por vectores selváticos, mosquitos de los géneros *Haemagogus* y *Sabethes*, así como también por el mosquito *Aedes aegypti* (1-3). El espectro clínico de la fiebre amarilla varía desde una infección asintomática o leve hasta un cuadro grave con hemorragia e ictericia que puede resultar fatal (1-4). La sospecha diagnóstica de fiebre amarilla se basa en las características clínicas, los lugares y fechas de viaje del paciente (si el paciente es de un país o área no endémica), las actividades y la historia epidemiológica del lugar donde posiblemente ocurrió la infección. Sin embargo, el diagnóstico específico y la confirmación de casos requieren el análisis de laboratorio.

La medida más importante de prevención de la fiebre amarilla es la vacunación. Los ensayos clínicos muestran que 80-100% de los vacunados desarrollan una inmunidad efectiva al cabo de 10 días, y 99% lo hacen al cabo de 30 días. Si bien la vacuna contra la fiebre amarilla es segura y raramente causa efectos adversos, deben respetarse las contraindicaciones y prácticas seguras de inmunización (1-3).

Procedimientos de laboratorio

El diagnóstico de fiebre amarilla se realiza mediante métodos virológicos (en general, detección del genoma viral, antígenos o aislamiento viral) y/o serológicos (ELISA, PRNT) (5-7). Al igual que con cualquier prueba de laboratorio, los resultados deben considerarse en el contexto epidemiológico y teniendo en cuenta los criterios clínicos.

Consideraciones de bioseguridad

Todas las muestras biológicas (sangre total, suero o tejido fresco) se consideran potencialmente infecciosas (8). Todo el personal de laboratorio que entre en contacto con la muestra deberá estar vacunado contra la fiebre amarilla y utilizar los elementos de protección personal adecuados. Asimismo, se recomienda realizar cualquier procedimiento dentro de cabinas de bioseguridad de clase II certificadas, extremando las medidas para evitar accidentes por punción. Para el manejo de muestras de primates no humanos se debe realizar una estricta evaluación del riesgo según las regulaciones nacionales y los manuales de bioseguridad de cada laboratorio, considerando además el uso de cabinas de seguridad de clase III.

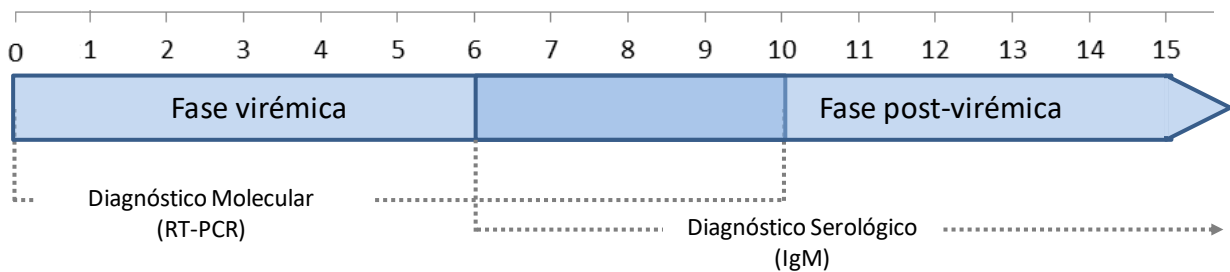
Diagnóstico virológico

- **Diagnóstico molecular:** Durante los primeros 10 días desde el inicio de síntomas (fase virémica), o incluso por más de 10 días en casos severos, es posible realizar la detección del ARN viral en muestras de suero mediante métodos moleculares como la Transcripción Reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) convencional (punto final) o tiempo real (Figura 1). Un resultado positivo por pruebas moleculares (haciendo uso de los controles e interpretación adecuados) confirma el diagnóstico de fiebre amarilla.



- **Aislamiento viral:** El aislamiento viral puede realizarse por inoculación intracerebral en ratones o en cultivo celular (células Vero o C6/36; puede ser realizado en contención BSL 2). Por su complejidad, esta metodología se utiliza poco como herramienta diagnóstica de primera línea. Sin embargo, la capacidad de aislamiento viral es importante para la caracterización de cepas circulantes, para producir reactivos de diagnóstico y para estudios de investigación.
- **Inmunohistoquímica:** El estudio histopatológico con inmunohistoquímica en cortes de hígado (y otros tejidos) constituye el “método de oro” para el diagnóstico de fiebre amarilla en casos fatales. Adicionalmente, los métodos moleculares a partir de muestras de tejido fresco o fijado en formalina (embebidos en parafina) pueden también ser utilizados para la confirmación de casos fatales.

Figura 1. Indicaciones para el diagnóstico según el número de días desde el inicio de los síntomas



Diagnóstico serológico

- **Detección de IgM:** Los anticuerpos IgM contra el virus de la fiebre amarilla pueden detectarse por ELISA (principalmente, el ELISA de captura de IgM, MAC-ELISA por sus siglas en inglés) o cualquier otro inmunoensayo (por ejemplo, la inmunofluorescencia indirecta). Actualmente, no existen estuches comerciales de ELISA de IgM validados para la detección de fiebre amarilla. Por esto, procedimientos “caseros” (*in-house*) utilizando antígenos completos purificados son ampliamente utilizados (7, 9). **Se ha descrito una reactividad cruzada significativa de los ensayos de IgM de fiebre amarilla con otros flavivirus, en particular en las infecciones secundarias por flavivirus. Así, en las áreas donde otros flavivirus co-circulan (en particular los virus del dengue y del Zika), la probabilidad de reactividad cruzada es alta.** Además, como con cualquier prueba de IgM, un resultado positivo en una sola muestra es sólo **presuntivo** de una infección aguda. La confirmación de laboratorio requiere seroconversión en muestras pareadas (agudas y convalecientes tomadas con al menos una semana de diferencia) en la ausencia de seroconversión para otros flavivirus relevantes (ver abajo). Finalmente, en áreas donde se llevan a cabo campañas activas de vacunación, puede ocurrir la detección de anticuerpos post-vacunales, por lo que el diagnóstico debe ser cuidadosamente interpretado (ver abajo la sección *Respuesta inmune post-vacunal*).
- **Otras técnicas serológicas:** Estos métodos incluyen la detección de anticuerpos IgG por ELISA y de anticuerpos neutralizantes por la técnica de neutralización por reducción de placas (PRNT, por sus siglas en inglés). En general, el PRNT ofrece mejor especificidad que la detección de

anticuerpos IgM e IgG totales. Sin embargo, **también se ha documentado reactividad cruzada entre los flavivirus en los ensayos de neutralización**, y la utilidad del PRNT podría ser limitada en áreas donde múltiples flavivirus han circulado recientemente o son endémicos (10). Por lo tanto, se recomienda realizar esta técnica con un panel de flavivirus. La confirmación por laboratorio requiere una seroconversión específica de fiebre amarilla o un aumento de más de 4 veces en los títulos de anticuerpos en muestras pareadas (ver abajo). También puede ocurrir la detección de anticuerpos inducidos por la vacuna y las pruebas de laboratorio deben interpretarse cuidadosamente (ver abajo la sección *Respuesta inmune post-vacunal*).

Algoritmo diagnóstico, interpretación de resultados por serología y diagnóstico diferencial

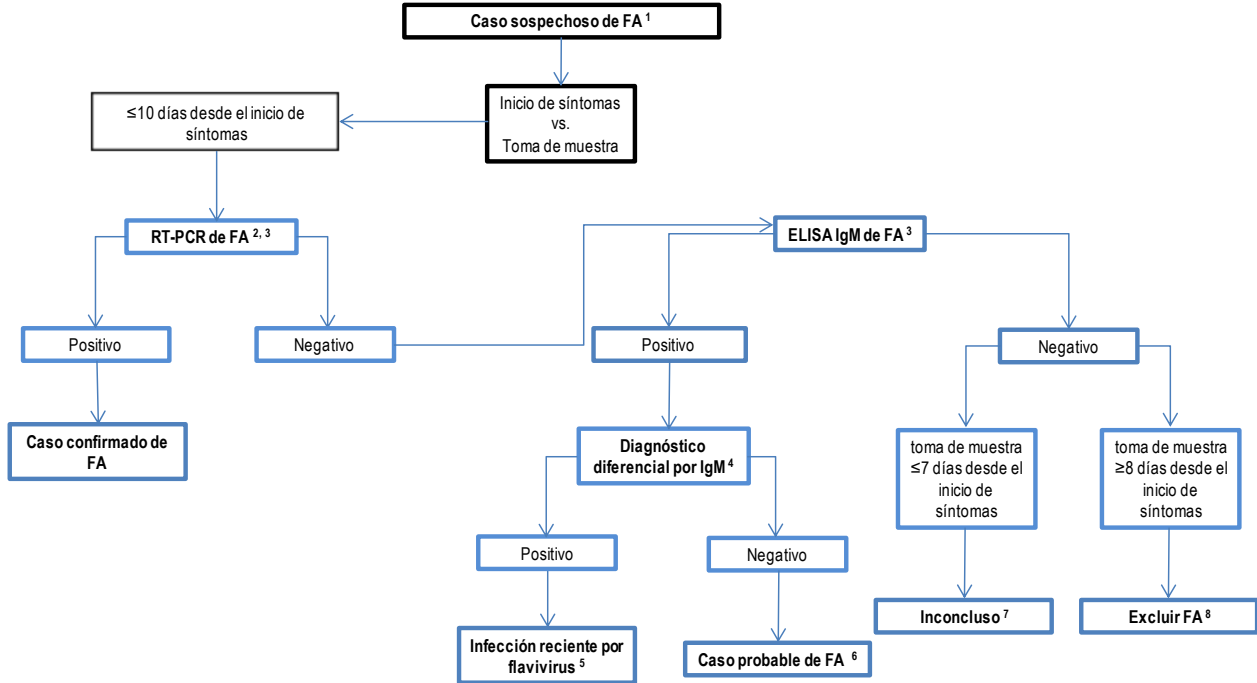
Las técnicas serológicas presentan a menudo reactividad cruzada en las infecciones por flavivirus (en particular, en infecciones secundarias). Por lo tanto, **el uso de la RT-PCR debe ser priorizado** (Figura 2). Sin embargo, un resultado negativo por RT-PCR no descarta la infección, por lo que la muestra debe analizarse posteriormente por serología.

Las muestras con resultado positivo por IgM deben ser analizadas por pruebas diferenciales de IgM, en particular en áreas donde la co-circulación del virus de la fiebre amarilla con otros flavivirus (dengue, encefalitis de St. Louis, Zika, y otros del complejo encefalitis japonesa) está documentada y existe la probabilidad de que la población haya sido previamente infectada con uno o varios de estos virus.

Una prueba diferencial positiva no permite confirmar o descartar una infección por el virus de la fiebre amarilla; sin embargo, tampoco la descarta. Por lo tanto, en áreas no endémicas o en áreas donde no se ha descrito una circulación reciente del virus de la fiebre amarilla, estos casos deberán ser investigados. Un resultado positivo de IgM de fiebre amarilla con pruebas diferenciales negativas debe ser interpretada como un probable caso de fiebre amarilla. La confirmación por serología de estos casos se puede obtener usando muestras pareadas. Una prueba negativa de IgM de fiebre amarilla no es concluyente para las muestras tomadas hasta el día 7 después de la aparición de los síntomas. La fiebre amarilla puede descartarse si la prueba de IgM es negativa en una muestra tomada partir del día 8 después de la aparición de los síntomas

Por otro lado, el diagnóstico diferencial de la fiebre amarilla debe 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 (1).

Figura 2. Algoritmo para confirmación por laboratorio de casos de Fiebre Amarilla (FA)



¹ Sin historial de vacunación de FA en los últimos 30 días o con historial de vacunación desconocido.
² Los laboratorios que sólo tengan la capacidad de realizar RT-PCR o ELISA IgM deben procesar las muestras con la técnica disponible. Los resultados deben interpretarse de acuerdo al algoritmo.
³ La sensibilidad de la RT-PCR es mayor en los primeros 10 días desde el inicio de los síntomas. Sin embargo, se ha descrito la detección hasta 14 días, en particular en casos graves (y fatales).
⁴ Debe incluir el virus del dengue así como otros flavivirus dependiendo de la situación epidemiológica de la zona / país.
⁵ Considerar la posibilidad de realizar PRNT en un laboratorio de referencia. Este resultado no descarta la fiebre amarilla. Por lo tanto, en áreas donde no se ha descrito circulación reciente de FA, este resultado debe ser investigado.
⁶ Un resultado positivo por IgM en una muestra única no es confirmatorio. Deben usarse criterios clínicos y epidemiológicos adicionales para la interpretación final del caso, en particular en áreas donde no se ha descrito circulación reciente de FA.
⁷ Solicitar una segunda muestra y procesarla de acuerdo con el algoritmo.
⁸ Investigar los casos y realizar el diagnóstico clínico diferencial.

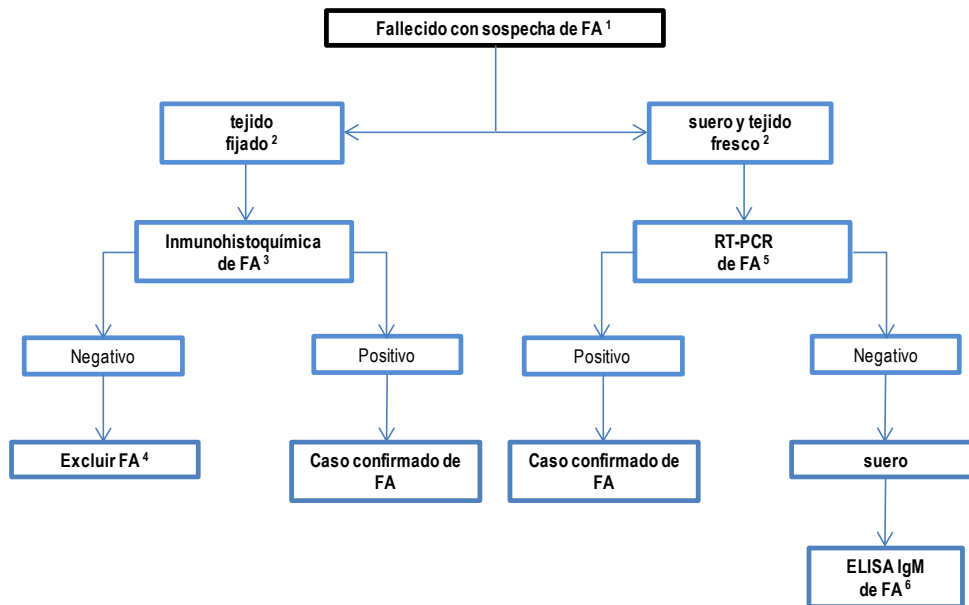
Casos fatales sospechosos de fiebre amarilla

En los casos fatales sospechosos de fiebre amarilla, las siguientes muestras deben ser tomadas independientemente del tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas:

- Suero para análisis molecular y serológico
- Tejido fresco para ensayos moleculares (se debe garantizar tejido de hígado y de riñón, además se puede recolectar tejido de bazo, pulmón, cerebro y corazón)
- Tejido fijado para inmunohistoquímica (mismos tejidos que los anteriores)

El algoritmo para confirmar casos fatales se muestra en la Figura 3.

Figura 3. Algoritmo para confirmación por laboratorio de casos fatales de Fiebre Amarilla (FA)



- ¹ Sin historial de vacunación de FA en los últimos 30 días o con historial de vacunación desconocido.
- ² Muestras de tejido fresco y fijado deben ser tomadas (en particular, hígado y riñón).
- ³ La inmunohistoquímica debe ser realizada en tejido hepático y renal y, de ser posible, en otros tejidos.
- ⁴ Investigar los casos y realizar el diagnóstico clínico diferencial.
- ⁵ La RT-PCR debe realizarse con ARN extraído a partir suero y tejido fresco.
- ⁶ Seguir la interpretación descrita en el algoritmo para confirmación por laboratorio de casos de Fiebre Amarilla (Figura 2).

Respuesta inmune post-vacunal

La vacunación induce una viremia relativamente baja que disminuye después de 4 a 7 días. Simultáneamente, se desarrolla una respuesta de tipo IgM que no puede ser diferenciada de la respuesta IgM inducida por una infección natural. Aproximadamente 10 días después de la vacunación, se considera que la persona está protegida contra una infección natural. Así, la respuesta IgM vacunal se podrá detectar alrededor del día 5 en adelante con un pico que se produce generalmente 2 semanas después de la vacunación. Posteriormente, los niveles de estos anticuerpos tienden a disminuir. En una proporción significativa de personas vacunadas la respuesta IgM se puede detectar hasta por un mes después de la vacunación, y en algunos casos hasta por 3-4 años (11). Por otro lado, los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación se pueden detectar por varias décadas. Con todo esto, **la interpretación de los resultados serológicos en personas vacunadas resulta compleja, en particular aquellas que han sido vacunadas recientemente por lo cual los resultados deben ser evaluados cuidadosamente.**

En las personas vacunadas recientemente (<30 días) que desarrollan síntomas clásicos de fiebre amarilla, la vigilancia debe enfocarse en diferenciar entre infecciones con virus salvaje y con cepa vacunal (12-14). Los eventos supuestamente atribuibles a la vacunación o inmunización (ESAVI) graves asociados a la vacuna contra la fiebre amarilla son raros (~ 1,6 casos por cada 100.000 dosis de vacuna). Los ESAVI más comunes son las enfermedades viscerotrópicas (EVT), las enfermedades neurológicas y las reacciones de hipersensibilidad severa. En las zonas endémicas de la fiebre amarilla, la diferenciación entre las infecciones de tipo salvaje y los ESAVI requiere la confirmación de la presencia del virus de la

vacuna de la fiebre amarilla (cepa 17D) por secuenciación, técnica que generalmente sólo está disponible en los laboratorios de referencia. Existen directrices para la confirmación de los eventos graves asociados a la vacuna de la fiebre amarilla (12-14).

Conservación de la muestra

- Mantener la sangre total (tomada en tubo con EDTA) o el suero (tomado en tubo seco) refrigerados (2 – 8 °C) si serán procesados (o enviados a un laboratorio de referencia) dentro de 48 horas.
- Mantener el suero congelado (-10 a -20 °C) si será procesado después de 48 horas o en un periodo no mayor de 7 días.
- Mantener el suero congelado (-70 °C) si será procesado más de una semana después de la toma. La muestra se conserva adecuadamente a -70 °C durante periodos prolongados de tiempo. Se recomienda separar las muestras en al menos dos alícuotas.
- Evitar múltiples ciclos de congelación – descongelación.
- Las muestras de tejido fresco (aproximadamente 1 cm³) pueden ser utilizados para diagnóstico molecular. Congelar a -70 °C y enviar a un laboratorio de referencia en hielo seco. De no ser posible, enviar el tejido fresco en seco con geles refrigerantes. Las muestras de tejido fresco también pueden almacenarse en una solución estabilizadora de ARN y enviarse a temperatura ambiente.
- Para el estudio histopatológico y por inmunohistoquímica, la muestra de tejido (aproximadamente 1 cm³) debe ser conservada en formol tamponado y enviada al laboratorio de patología a temperatura ambiente. Las de tejido hepático y renal son las muestras de elección para histopatología e inmunohistoquímica. Muestras de bazo, cerebro, pulmón, corazón y nódulos linfáticos también pueden ser útiles.

Envío de la muestra por vía aérea al laboratorio de referencia

A continuación, algunos aspectos a considerar para el envío de la muestra por vía aérea (15):

- Garantizar la cadena de frío con hielo seco preferiblemente o con geles refrigerantes. Utilizar siempre triple empaque.
- Enviar las muestras preferentemente dentro de las primeras 48 horas.
- Las muestras originales deben ser empacadas, marcadas, etiquetadas apropiadamente y documentadas como **categoría B**.
- Acompañar el envío con la ficha clínica y epidemiológica completa.
- Los tejidos fijados en formalina se deben empaquetar por separado de los tejidos frescos y las muestras de sangre, ya que la formalina es volátil.

Referencias

1. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Guía práctica para el control de la fiebre amarilla, 2005. Disponible en:
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/OPS-Guia-practica-fiebreamarilla-2005.pdf>
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual for the monitoring of yellow fever virus infection. Avril 2004. Disponible en:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68715/1/WHO_IVB_04.08.pdf
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Travelers' Health. Yellow Fever prevention, content updated January 4 2017. Disponible en:
<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/yellow-fever>
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Yellow Fever: Symptoms and Treatment. 13 de agosto de 2015. Disponible en:
<https://www.cdc.gov/yellowfever/symptoms/index.html>
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Yellow Fever: Clinical & Laboratory Evaluation. 21 de agosto de 2015. Disponible en:
<https://www.cdc.gov/yellowfever/healthcareproviders/healthcareproviders-clinlabeval.html>
6. Organización Mundial de la Salud (OMS). Yellow fever laboratory diagnostic testing in Africa. Interim guidance. Geneva: World Health Organization; 2016. Disponible en:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246226/1/WHO-OHE-YF-LAB-16.1-eng.pdf>
7. Domingo et al. Yellow fever in the diagnostics laboratory. Emerg Microbes Infect. 2018 Jul 12;7(1):129. doi: 10.1038/s41426-018-0128-8. Disponible en:
<https://www.nature.com/articles/s41426-018-0128-8>
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition, 2009. Disponible en:
<https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pdf>
9. Basile et al. Development and validation of an ELISA kit (YF MAC-HD) to detect IgM to yellow fever virus. J Virol Methods. 2015 Dec 1;225:41-8. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.08.025. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093415003055>
10. Lindsey et al. Ability To Serologically Confirm Recent Zika Virus Infection in Areas with Varying Past Incidence of Dengue Virus Infection in the United States and U.S. Territories in 2016. J Clin Microbiol. 2017 Dec 26;56(1). pii: e01115-17. doi: 10.1128/JCM.01115-17. Disponible en:
<http://jcm.asm.org/content/56/1/e01115-17.long>



11. Gibney, et al. Detection of Anti-Yellow Fever Virus Immunoglobulin M Antibodies at 3–4 Years Following Yellow Fever Vaccination (2012). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 87(6), 1112–1115. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3516084/pdf/tropmed-87-1112.pdf>
12. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Enfermedad viscerotrópica asociada a la vacunación contra la fiebre amarilla: Casos de estudio. Versión del Participante. 2013. Disponible en:
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/173266/1/Enfermedad viscerotropica asociada a la vacunacion.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/173266/1/Enfermedad_viscerotropica_asociada_a_la_vacunacion.pdf)
13. Organización Mundial de la Salud (OMS). Detection and investigation of serious adverse events following yellow fever vaccination. Guidance from an informal consultation of experts, 2010. Disponible en:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70251/1/WHO_HSE_GAR_ERI_2010.2_eng.pdf
14. Gershman et al. Viscerotropic disease: Case definition and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine* 30 (2012) 5038– 5058. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X12006135>
15. International Air Transport Association (IATA). Dangerous Goods Regulations, 56th Edition. 2015. Disponible en:
<https://www.iata.org/whatwedo/cargo/dgr/Documents/infectious-substance-classification-DGR56-en.pdf>