

## Diagnóstico por laboratorio de la infección por Arenavirus del Nuevo Mundo

Junio 07 de 2024

### Introducción

Los arenavirus pertenecen a dos géneros de la familia *Arenaviridae*: el género *Mammarenavirus* (arenavirus que infectan a mamíferos) y el género *Reptarenavirus* (arenavirus que infectan a reptiles)<sup>1</sup>. Los arenavirus poseen un genoma ARN monocatenario negativo (grupo V de la clasificación de Baltimore). El género *Mammarenavirus* está dividido en dos grupos que difieren genéticamente y por su distribución geográfica: los arenavirus del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo. Al menos 8 de estos arenavirus son capaces de causar fiebres hemorrágicas en humanos, y de estos, 5 pertenecen al clado B de los arenavirus del Nuevo Mundo y son de relevancia para la Región de las Américas (Cuadro 1). Estos virus tienen como reservorio a roedores y su modo principal de transmisión a humanos es a través de las secreciones de los mismos. Además, se han reportado casos de transmisión entre humanos del virus Machupo<sup>2, 3</sup> y de una cepa nueva del virus Chapare identificada recientemente en Bolivia<sup>4</sup>. Los reservorios de los virus Chapare y Sabiá se desconocen aún.

**Cuadro 1. Arenavirus del Nuevo Mundo causantes de fiebres hemorrágicas.**

Virus	Enfermedad	Reservorio	Distribución geográfica
Chapare (CHPV)	Fiebre hemorrágica Chapare	ratón arrocero pigmeo de orejas pequeñas ( <i>Oligoryzomys microtis</i> ) (Putativo)	Bolivia
Guanarito (GTOV)	Fiebre hemorrágica venezolana	ratón de la caña de azúcar ( <i>Zygodontomys brevicauda</i> )	Venezuela
Junín (JUNV)	Fiebre hemorrágica argentina	ratón maicero ( <i>Calomys musculus</i> )	Argentina
Machupo (MACV)	Fiebre hemorrágica boliviana	laucha campestre ( <i>Calomys callosus</i> )	Bolivia
Sabiá (SABV)	Fiebre hemorrágica brasileña	desconocido	Brasil

### 1. Consideraciones de bioseguridad

Toda muestra biológica (sangre total, suero, coágulo, semen, hisopado/aspirado respiratorio o tejido fresco) debe considerarse como potencialmente infecciosa. La infección por arenavirus puede ocurrir por exposición a aerosoles provenientes de las muestras, por lo que se deben tomar medidas adicionales para proteger las vías respiratorias (incluyendo el uso de mascarillas N95) y disminuyendo al máximo los procedimientos que generen aerosoles. Asimismo, se recomienda realizar cualquier procedimiento dentro de cabinas de bioseguridad clase II certificadas, extremando las medidas para evitar accidentes



por punción o derrame. Además, se debe considerar realizar la inactivación de las muestras (como paso previo a la extracción de ácidos nucleicos para el diagnóstico molecular o a los métodos serológicos) bajo condiciones de bioseguridad BSL-3. Las muestras pueden inactivarse térmicamente (60 °C por no menos de 30 minutos) y/o químicamente (por adición de  $\beta$ -propiolactona, de una mezcla de 0.5% de Tritón X-100 y 0.5% de Tween-20 o a través de la extracción de ARN)<sup>5, 6</sup>. Durante la extracción de ARN, la etapa de lisis (con soluciones que contienen isotiocinato de guanidina) seguida de la adición de etanol permite la inactivación química de las muestras<sup>5, 7</sup>. Para manejo de muestras en condiciones de bioseguridad BSL-2 se recomienda la inactivación térmica, seguida por una inactivación química. Las muestras también pueden inactivarse por irradiación gama. El intento de aislamiento viral y el cultivo celular de arenavirus sólo debe ser realizado bajo condiciones de bioseguridad BSL-4<sup>8</sup>. En el caso de virus Junín, el aislamiento, la producción de antígenos y la neutralización pueden realizarse bajo condiciones de bioseguridad BSL-3 ya que se cuenta con una vacuna preventiva (Candid#1) y tratamiento con plasma de convalescente en el caso de infección.

Todo el personal de laboratorio deberá implementar las técnicas microbiológicas apropiadas de la OMS así como usar los elementos de protección personal adecuados<sup>9</sup>. Es importante recordar que se han descrito varios casos de infección en laboratorio por estos virus, algunos de ellos fatales. Los laboratorios que no cuenten con las condiciones descritas anteriormente deberán enviar las muestras a un laboratorio de referencia (ver abajo *Toma y envío de muestras*).

## 2. Procedimientos de laboratorio

Como en la mayoría de las enfermedades virales agudas, el diagnóstico por laboratorio de la infección por arenavirus puede realizarse mediante la detección directa del virus o de sus componentes (diagnóstico virológico) o mediante la detección de la respuesta inmune generada por la infección (diagnóstico serológico). Sin embargo, la dinámica de la infección por arenavirus del Nuevo Mundo aún no se ha establecido completamente (Figura 1), lo cual genera limitaciones en las técnicas y desafíos adicionales para la interpretación de los resultados.

### 2.1 Diagnóstico virológico

El diagnóstico en la fase aguda de la enfermedad se realiza mediante métodos virológicos: detección del material genético (ARN) viral por Transcripción Reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR por sus siglas en inglés), PCR en tiempo real, detección de antígenos virales por Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) o inmunohistoquímica y/o por aislamiento viral. Aunque la duración de la viremia no ha sido plenamente establecida, se ha documentado la detección hasta por 10 días después de iniciados los síntomas, dependiendo del virus y condiciones del paciente.

#### 2.1.1 Diagnóstico molecular

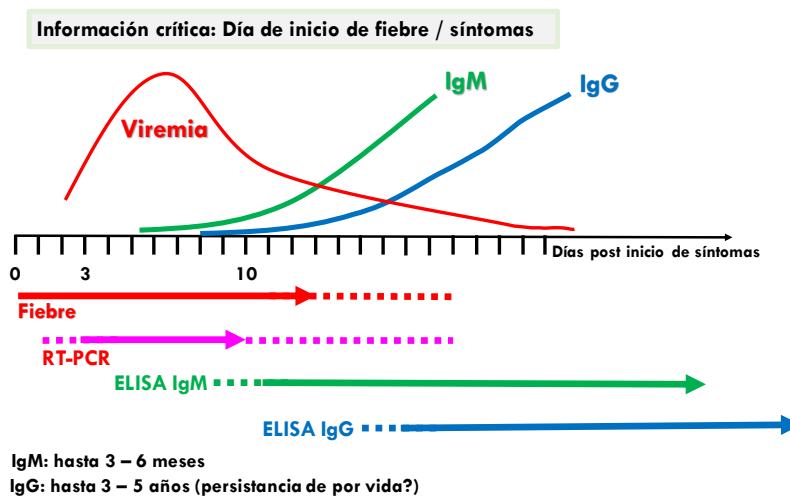
El ARN viral de los 5 virus se puede detectar por RT-PCR principalmente en suero, sangre total y tejidos. Asimismo, el ARN viral puede ser detectado en otros tipos de muestras como el hisopado nasofaríngeo, pero aún no se ha establecido durante cuánto tiempo se puede realizar la detección. Existen protocolos de RT-PCR convencional (punto final) para la detección universal de los arenavirus del Nuevo Mundo del clado B que incluye los 5 virus de interés<sup>10-12</sup>, con lectura en gel de agarosa, lo cual puede disminuir la sensibilidad de la detección. En estos casos, la confirmación de la detección y la identificación del virus se realizan por secuenciación del producto de amplificación de la RT-PCR convencional. En cuanto a ensayos específicos para cada virus, existe una RT-PCR convencional para JUNV<sup>13</sup> y varios ensayos en tiempo real para GTOV, JUNV, MACV y SABV<sup>11, 14-16</sup>. Sin embargo, solo se ha publicado un ensayo para CHPV<sup>15</sup> y hay pocos datos sobre el desempeño de los ensayos universales antes mencionados<sup>10-12</sup> con este virus. En general, es importante notar que la mayoría de los ensayos de RT-PCR para arenavirus han sido validados con pocas muestras de pacientes o solamente con cultivos virales. Para estos ensayos se recomienda la inactivación térmica de las muestras, seguida por una inactivación química a través de la extracción del ARN.

### 2.1.2 Detección de antígenos virales

La detección de antígenos virales en suero se puede realizar por ELISA de captura de antígeno, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas de los arenavirus. Se ha descrito un anticuerpo específico para JUNV así como otros que reconocen los 5 arenavirus de interés<sup>17</sup>. Para estos ensayos se recomienda usar muestras inactivadas térmica y químicamente por adición de  $\beta$ -propiolactona o de Tritón X-100 y Tween-20.

En los casos fatales, también se pueden detectar los antígenos virales por inmunohistoquímica en tejido (hígado, bazo, riñón, pulmón, nódulos linfáticos)<sup>18</sup>. Los tejidos fijados en formaldehído (formol) o glutaraldehído se consideran inactivados<sup>5</sup>.

**Figura 1. Dinámica de la infección por arenavirus y de la respuesta inmune\*.**



\*Adaptado de: *Viral Special Pathogens Branch, CDC, Atlanta, 2019*

### 2.1.3 Aislamiento viral

Generalmente, los arenavirus pueden aislarse por cultivo en células Vero o BHK21, o por inoculación intracerebral en ratones o hámsteres<sup>6</sup>. El aislamiento y cultivo de estos virus solo se puede realizar en laboratorios con nivel de bioseguridad BSL-4 con la excepción del virus Junín (ver arriba). Además, la cepa vacunal de JUNV Candid #1<sup>19</sup>, que puede ser manejada en nivel de bioseguridad BSL-2<sup>8</sup>. Por lo tanto, el aislamiento viral como método diagnóstico constituye una opción limitada en la gran mayoría de los países de la Región.

## 2.2 Diagnóstico serológico

Varios ensayos serológicos pueden usarse para el diagnóstico de las fiebres hemorrágicas causadas por los arenavirus del Nuevo Mundo. Estos ensayos son útiles en muestras agudas (días 1 a 5 después del inicio de síntomas) pareadas con muestras convalecientes (más de una o dos semanas después del inicio de síntomas). Una seroconversión o un aumento de títulos de más de 4 veces entre muestra aguda y convaleciente confirma la infección por arenavirus<sup>6</sup>. En muestras convalecientes no pareadas, la presencia de anticuerpos tipo IgM es presuntiva de infección reciente. Los ensayos serológicos tienen como limitante la reactividad cruzada entre los anticuerpos que se generan ante una infección<sup>6</sup>. En efecto, los 5 arenavirus de interés pertenecen al mismo serogrupo, por lo que la presencia en las muestras de pacientes de anticuerpos capaces de detectar uno de ellos no implica necesariamente una infección con este virus, sino que puede resultar de una infección con otros virus del serogrupo. Los ensayos de neutralización presentan una mayor especificidad<sup>20</sup>. En la actualidad, los ensayos serológicos para estos arenavirus son caseros y no existen estuches comerciales.

### 2.2.1 Inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es uno de los ensayos serológicos utilizados para el diagnóstico de infecciones por arenavirus<sup>21</sup>. En este ensayo, los anticuerpos presentes en las muestras reconocen antígenos virales presentes en células infectadas, inactivadas y fijadas sobre las láminas de IFI y a su vez se detectan con anticuerpos específicos. Para estos ensayos serológicos se recomienda usar muestras inactivadas térmica y químicamente por adición de  $\beta$ -propiolactona o de Triton X-100 y Tween-20.

### 2.2.2 ELISAs IgM e IgG

Los anticuerpos de tipo IgM o IgG presentes en las muestras se pueden detectar a través de la técnica de ELISA, utilizando antígenos virales<sup>6</sup>. Tradicionalmente, se desarrollaron ensayos con cultivos virales inactivados<sup>22</sup> para los que se necesitaba cultivar grandes cantidades de virus en nivel de bioseguridad BSL-4. Sin embargo, en la actualidad existen ensayos que utilizan proteínas recombinantes lo que facilita su uso, como por ejemplo un ELISA IgG par JUNV<sup>23</sup>. Para estos ensayos serológicos se recomienda usar muestras inactivadas térmica y químicamente.

### 2.2.2 Ensayos de neutralización

En los ensayos de neutralización, los anticuerpos presentes en las muestras inhiben la infección de cultivos celulares con cepas virales. Estos ensayos tienen como ventaja una mayor especificidad que las demás técnicas serológicas<sup>6</sup>. Sin embargo, los arenavirus en cultivo no causan (o causan poco) efecto citopático, por lo que para detectar el virus se necesita realizar tinción por rojo neutro o inmunofluorescencia. Además, estas técnicas tienen que realizarse en nivel de bioseguridad BSL-4<sup>8</sup> con la excepción del virus Junín (ver arriba) y de ensayos que usan pseudovirus de tipo VSV (virus de la estomatitis vesicular) con proteínas recombinantes de arenavirus<sup>21</sup>.

### 2.3 Aplicación de las técnicas diagnósticas en el contexto de la Región

En resumen, para los laboratorios de salud pública de la Región que no tienen estandarizado los protocolos serológicos y que no poseen áreas de nivel de bioseguridad 4, los ensayos de RT-PCR y RT-PCR en tiempo real en suero y tejidos podrían constituir la opción diagnóstica más viable.

## 3. Toma y envío de muestras

Para la toma de muestras hemáticas se deberán seguir las recomendaciones publicadas por la OPS<sup>24</sup>. Para pacientes fallecidos, se recomienda la obtención de sangre por punción cardiaca. Asimismo, las muestras de tejido (hígado, bazo, riñón, pulmón, tracto respiratorio, nódulos linfáticos), frescas o conservadas en formol (siempre en recipientes de tapa rosca, preferiblemente plásticos), resultan útiles para la detección molecular y para análisis histopatológicos, siempre y cuando se cuente con las condiciones adecuadas para realizar la autopsia, en particular la protección respiratoria. Las muestras tomadas deberán enviarse de inmediato (refrigeradas en caso de suero, coágulo o sangre entera y congeladas en el caso de tejido fresco) al laboratorio de referencia regional o nacional designado para estas enfermedades. Dependiendo de su capacidad, el laboratorio podrá realizar las pruebas diagnósticas indicadas y/o enviar las muestras a un laboratorio de referencia fuera del país. Las muestras deberán enviarse con triple empaque y siguiendo las recomendaciones de la OPS y la OMS para muestras de Categoría A<sup>25, 26</sup>. En la región de las Américas, existen dos Centros colaboradores de la OMS para fiebres hemorrágicas por arenavirus: la Rama de Patógenos Virales Especiales (Viral Special Pathogens Branch) de los CDC de los Estados Unidos y el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" (INEVH) en Argentina, que pueden ser contactados a través de la OPS/OMS.



## 4. Referencias

1. Radoshitzky SR, Bao Y, Buchmeier MJ, et al. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch Virol* 2015;160(7):1851-74.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Arenaviruses; 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov/vhf/virus-families/arenaviridae.html>.
3. Heymann DL, Editor. *Control of Communicable Diseases Manual 20th Edition*. Washington, DC: American Public Health Association; 2015.
4. Loayza Mafayle R., Morales-Betoulle ME., *et al.* (2022) Chapare Hemorrhagic Fever and Virus Detection in Rodents in Bolivia in 2019. *The New England Journal of Medicine* 386;24: 2283-2294.
5. Haddock E, Feldmann F, Feldmann H. Effective Chemical Inactivation of Ebola Virus. *Emerg Infect Dis* 2016;22(7):1292-4.
6. Gonzalez J, Sauvage F. Machupo, Guanarito, Sabia, and Chapare Viruses. In: Liu D, ed. *Molecular Detection of Human Viral Pathogens*. Boca Raton: CRC Press; 2010.
7. Smither SJ, Weller SA, Phelps A, et al. Buffer AVL Alone Does Not Inactivate Ebola Virus in a Representative Clinical Sample Type. *J Clin Microbiol* 2015;53(10):3148-54.
8. United States Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 5th Edition*: U.S. Government Printing Office; 2009. Disponible en: <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/>.
9. Organización Mundial de la Salud. *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. – 3a ed. Ginebra; 2005. Disponible en: [www.who.int/topics/medical\\_waste/manual\\_bioseguridad\\_laboratorio.pdf](http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf).
10. Lozano ME, Posik DM, Albarino CG, et al. Characterization of arenaviruses using a family-specific primer set for RT-PCR amplification and RFLP analysis. Its potential use for detection of uncharacterized arenaviruses. *Virus Res* 1997;49(1):79-89.
11. Vieth S, Drosten C, Charrel R, Feldmann H, Gunther S. Establishment of conventional and fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assays for detection of pathogenic New World arenaviruses. *J Clin Virol* 2005;32(3):229-35.
12. Bowen MD, Peters CJ, Nichol ST. The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology* 1996;219(1):285-90.
13. Lozano ME, Enria D, Maiztegui JI, Grau O, Romanowski V. Rapid diagnosis of Argentine hemorrhagic fever by reverse transcriptase PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 1995;33(5):1327-32.
14. Fajfr M, Neubauerova V, Pajer P, Kubickova P, Ruzek D. Detection panel for identification of twelve hemorrhagic viruses using real-time RT-PCR. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2014;63(3):238-44.
15. Pang Z, Li A, Li J, et al. Comprehensive multiplex one-step real-time TaqMan qRT-PCR assays for detection and quantification of hemorrhagic fever viruses. *PLoS One* 2014;9(4):e95635.
16. Trombley AR, Wachter L, Garrison J, et al. Comprehensive panel of real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for detection and absolute quantification of filoviruses, arenaviruses, and New World hantaviruses. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82(5):954-60.
17. Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, et al. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(8):1132-8.
18. Maiztegui JI, Laguens RP, Cossio PM, et al. Ultrastructural and immunohistochemical studies in five cases of Argentine hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1975;132(1):35-53.
19. Ambrosio A, Saavedra M, Mariani M, Gamboa G, Maiza A. Argentine hemorrhagic fever vaccines. *Hum Vaccin* 2011;7(6):694-700.
20. Iowa State University. *Viral Hemorrhagic Fevers Caused by Arenaviruses*; 2010. Disponible en: [www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/viral\\_hemorrhagic\\_fever\\_arenavirus.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/viral_hemorrhagic_fever_arenavirus.pdf).



21. Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Saijo M, Morikawa S. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses* 2012;4(10):2097-114.
22. Riera LM, Feuillade MR, Saavedra MC, Ambrosio AM. Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of Argentine haemorrhagic fever. *Acta Virol* 1997;41(6):305-10.
23. Ure AE, Ghiringhelli PD, Possee RD, Morikawa S, Romanowski V. Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junin virus N protein. *J Med Virol* 2008;80(12):2127-33.
24. Organización Panamericana de la Salud. Recomendaciones para la toma segura y manipulación apropiada de muestras potencialmente infecciosas con agentes altamente patógenos. Washington, DC; 2014. Disponible en: [www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=27951&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=27951&lang=es).
25. Organización Mundial de la Salud. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2017–2018; 2017. Disponible en: [www.who.int/ihr/publications/WHO-WHE-CPI-2017.8/en/](http://www.who.int/ihr/publications/WHO-WHE-CPI-2017.8/en/).
26. Organización Panamericana de la Salud. Recomendaciones para el embalaje y envío apropiado por vía terrestre de muestras potencialmente infecciosas con agentes altamente patógenos. Washington, DC; 2014. Disponible en: [www.who.int/csr/resources/publications/envio-muestras-es.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/envio-muestras-es.pdf).