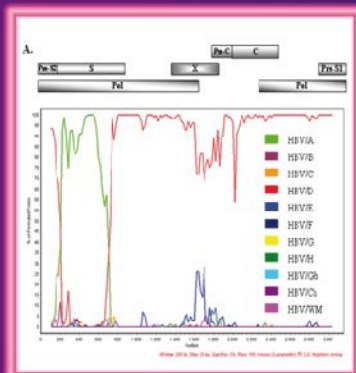
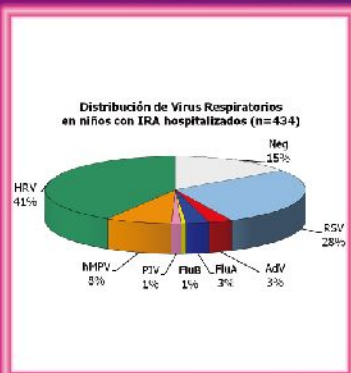
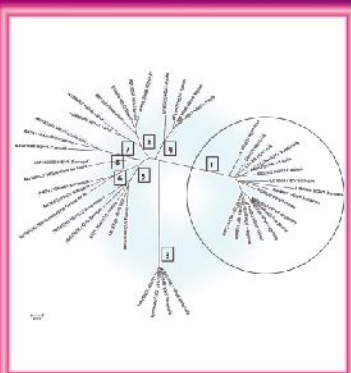
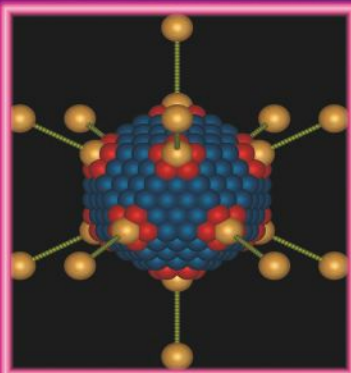
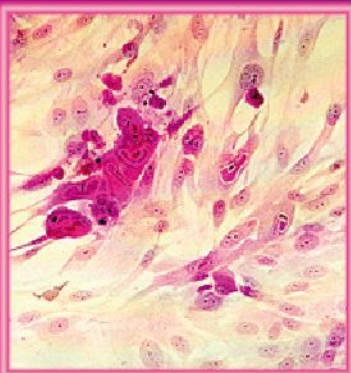
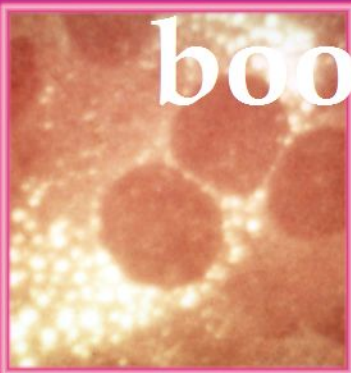


GUADALUPE CARBALLAL - JOSÉ RAÚL OUBIÑA

VIROLOGÍA MÉDICA



booksmedicos.org



VIROLOGÍA MÉDICA

VIROLOGÍA MÉDICA

**GUADALUPE CARBALLAL
JOSÉ RAÚL OUBIÑA**



www.corpuslibros.com

La presente es una publicación de:



www.corpuslibros.com

Carballal, Guadalupe
Virología médica / Guadalupe Carballal y José Raúl Oubiña.
4a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Corpus Libros Médicos y Científicos, 2014.
792 p.; 20 x 28 cm.

ISBN 978-987-1860-10-4

1. Medicina. 2. Virología. I. Oubiña, José Raúl. II. Título.
CDD 616.019 4

DERECHOS RESERVADOS

© 2014 Corpus Editorial y Distribuidora

editorial@corpuslibros.com

virologiamedica@corpuslibros.com

www.corpuslibros.com

Tucumán 2180 - Tel/Fax: (011) 4371-7914 / 4373-5128

(C1050AAR) Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina

Editor: Esteban Oscar Mestre

Tirada: 1000 ejemplares

Se terminó de imprimir en Marzo de 2014

Rosario - Argentina

ISBN: 978-987-1860-10-4

Imágenes de tapa (de izquierda a derecha):

Fila superior: **1** - Células BHK persistentemente infectadas con virus Junín. Inmunofluorescencia indirecta para detección de anticuerpos en suero de pacientes infectados. Dra. G Carballal. Laboratorio de Virología, CEMIC. **2** - Radiografía de tórax de un paciente con síndrome pulmonar por hantavirus Andes, asistido en el Hospital Zonal Bariloche: se observa un infiltrado intersticial difuso bilateral correspondiente a la fase cardiopulmonar. Fuente: cortesía de la Dra. María E. Lázaro, Htal. Zonal de Bariloche. **3** - Detección temprana de antígeno p72 de citomegalovirus humano en núcleos de fibroblastos de prepucio humano en cultivo rápido (shell vial).

Fila media: **1** - Acción citopática de citomegalovirus humano en cultivo de fibroblastos humanos. Hematoxilina-eosina. **2** - Esquema de la estructura de una partícula de adenovirus. **3** - Partículas del virus causante de la influenza pandémica 2009, observadas al microscopio electrónico. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention, USA. Sitio web: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/images.htm>

Fila inferior: **1** - Análisis filogenético de las primeras secuencias nucleotídicas del virus Hepatitis D caracterizadas en Argentina. Fuente: cortesía de la Lic. Cecilia Delfino y las Dras. Verónica L. Mathet y Mirna Biglione. Instituto UBA-CONICET de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS) e Instituto UBA-CONICET de Investigaciones en Microbiología e y Parasitología Médica (IMPAM). **2** - Frecuencias de virus respiratorios en muestras respiratorias de niños con infección respiratoria aguda en Buenos Aires, Argentina. Los HRV (rinovirus humanos) se detectaron por RT-PCR en tiempo real. El resto de los virus se detectó por inmunofluorescencia indirecta. Fuente: cortesía de la Bioq. Débora Marcone. Unidad de Virología, CEMIC. **3** - Caracterización mediante *Bootscanning* del primer genoma completo recombinante D/A del virus Hepatitis B detectado en América. Fuente: cortesía de la Dra. Julieta Trinks. IMPAM UBA-CONICET.

**LA FOTOCOPIA
MATA AL LIBRO
Y ES UN DELITO**



No está permitida la reproducción total o parcial de esta obra, ni su tratamiento o transmisión por cualquier medio o método, sin autorización escrita de la Editorial.

NOTA

La medicina es una ciencia en constante desarrollo. Conforme surjan nuevos conocimientos, se requerirán cambios de la terapéutica. Los autores y los editores se han esforzado para que los cuadros de dosificación medicamentosa sean precisos y acordes con los establecidos en la fecha de publicación. Sin embargo, ante los posibles errores humanos y cambios en la medicina, ni los editores, ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación de la obra garantizan que la información contenida en ella sea precisa o completa.

Convendría recurrir a otras fuentes de datos, por ejemplo, y de manera particular, habrá que consultar la hoja de información que se adjunta con cada medicamento, para tener certeza de que la información de esta obra es precisa y no se han introducido cambios en la dosis recomendada o en las contraindicaciones para su administración. Esto es de particular importancia con respecto a fármacos nuevos o de uso no frecuente. También deberá consultarse a los organismos de control de medicamentos de cada país para obtener información sobre los valores normales y medicamentos permitidos o recomendados.

DEDICATORIAS

*A nuestras familias,
a la memoria de nuestros maestros,
a nuestros alumnos.*

CARBALLAL, GUADALUPE

Médica. Doctora de la Universidad de Buenos Aires
Profesora Titular de Microbiología I y II, Escuela de Medicina,
Instituto Universitario CEMIC (IUC)
Investigadora Principal, Instituto de Investigaciones, IUC
Profesora Asociada de la Carrera de Especialistas en Infectología
y Maestría en Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud,
Universidad Católica Argentina
Profesora Asociada, Especialidad Infectología, IUC
Asesora en Virología Clínica, Centro de Investigación Médica
e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno" (CEMIC)
Ex Profesora Titular, Departamento de Microbiología, Parasitología
e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires
Ex Profesora Titular, Cátedra de Microbiología, Facultad de
Medicina, Universidad del Salvador
Ex Investigadora del CONICET
Ex Representante para Latinoamérica de la *Pan American Society
for Clinical Virology*, EE. UU.
Premio Konex 2013 en Microbiología, Bacteriología y Virología

OUBIÑA, JOSÉ RAÚL

Médico. Doctor en Medicina de la Universidad de Buenos Aires
Profesor Regular Titular, Departamento de Microbiología,
Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad
de Buenos Aires
Ex Director del Departamento de Microbiología, Parasitología e
Inmunología (2010 - 2013), Facultad de Medicina, Universidad de
Buenos Aires
Vicedirector de la Maestría en Biología Molecular Médica,
Universidad de Buenos Aires
Profesor de Virología Molecular en la Maestría en Biología
Molecular Médica, Universidad de Buenos Aires
Ex Profesor Titular, Cátedra de Biología Molecular, Facultad de
Medicina, Universidad del Salvador (USal, Buenos Aires)
Investigador del CONICET

COLABORADORES

Alonio Lidia Virginia. Dra. en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires. Jefa del Depto. Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán". Buenos Aires.

Ávila María Mercedes. Licenciada en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Investigadora del CONICET.

Barcán Laura. Médica Infectóloga. Jefa de la Sección Infectología del Hospital Italiano, Buenos Aires. Profesora Asociada de Infectología, Instituto Universitario, Hospital Italiano.

Baumeinster Elsa. Bioquímica, Universidad de Bs. As. Jefa del Servicio de Virus Respiratorios, INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán". Buenos Aires.

Benetucci Jorge A. Médico. Doctor en Ciencias Médicas, Universidad de Buenos Aires. Ex Jefe del Departamento de Infecciosas, Hospital de Infecciosas "Dr. Francisco J. Muñiz". Profesor Regular Titular de Infectología, Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

Berini Carolina A. Licenciada en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Dra. en Biología, Universidad de Buenos Aires. Becaria posdoctoral de CONICET. Ayudante de 1ra. Depto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Berría María I. Médica. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Ex Profesora Regular Titular y actual Profesora Titular Consulta del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Ex Investigadora del CONICET

Biglione Mirna. Médica. Dra. en Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Ex Jefa de Trabajos Prácticos del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Investigadora del CONICET.

Blejer Jorgelina L. Licenciada en Ciencias Biológicas. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Ex Jefa de Trabajos Prácticos del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Jefa del Área Serología, Sección Medicina Transfusional, Fundación Favaloro, Buenos Aires.

Bonvehí Pablo. Médico Infectólogo. Jefe de la Sección Infectología, CEMIC. Profesor Asociado de Medicina I y II, Especialización en Medicina Interna. Director de la Carrera Universitaria de Especialización en Infectología, Instituto Universitario CEMIC.

Bouzas María Belén. Bioquímica. Jefa de la Unidad de Virología, Hospital de Infecciosas "Dr. Francisco Javier Muñiz". Coordinadora de la Red de Virología del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires.

Caillou Susana. Bioquímica. Profesora Asociada de Virología. Instituto de Microbiología, Cátedra de Virología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán.

Campos Rodolfo H. Bioquímico. Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Profesor Regular Titular de la Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Investigador del CONICET.

Candurra Nélica. Doctora en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Profesora Adjunta de Microbiología y Virología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Carobene Mauricio G. Licenciado en Genética. Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Investigador del CONICET.

Castilla Viviana. Doctora en Ciencias Biológicas. Jefa de Trabajos Prácticos de Microbiología y Virología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Cisterna Daniel M. Bioquímico. Laboratorio Nacional de Referencia de Rabia Servicio de Neurovirosis, INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires.

Corti Marcelo. Médico. Jefe de División HIV/Sida, Hospital de Enfermedades Infecciosas "F. J. Muñiz". Profesor Regular Adjunto, Departamento de Medicina, Orientación Enfermedades Infecciosas, Universidad de Buenos Aires. Profesor Adjunto de Infectología, Facultad de Medicina, USAL.

Cuestas María Luján. Bioquímica. Dra. de la Universidad de Buenos Aires. Investigadora del CONICET. Jefa de Trabajos Prácticos del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Damonte Elsa B. Doctora en Ciencias Químicas. Profesora Titular de Microbiología y Virología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Investigadora del CONICET.

Distéfano Angélica L. Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Magister en Microbiología Molecular (USAM) Jefa de Servicio "Virosis Congénitas Perinatales y Transmisión Sexual" INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán". Buenos Aires.

Dolcini Guillermina. Médica veterinaria. Doctora en Ciencias animales de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA). *Docteur au Microbiologie de la Université Paris XI*, Francia. Profesora Adjunta del Área Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA.

Echavarría Marcela. Bioquímica. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Investigadora del CONICET. Coordinadora del Área Molecular, Laboratorio de Virología Clínica, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno" (CEMIC). Profesora Asistente de Microbiología, Parasitología y Virología, Instituto Universitario CEMIC.

Eirin María E. Licenciada en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Enria Delia A. Doctora en Ciencias Médicas. Directora del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" (INEVH), Pergamino, Provincia de Buenos Aires.

Fellner María Dolores. Bioquímica. Profesional de Planta. Servicio de Virus Oncogénicos, Depto. Virología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, INEI-ANLIS "Carlos G Malbrán". Buenos Aires.

Ferrés Garrido Marcela. Médica Infectóloga Pediatra. Máster en Epidemiología, Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento de Pediatría. Directora del Laboratorio de Infectología y Virología Molecular. Profesora Asociada.

Freire María Cecilia. Médica. Jefa del Servicio Neurovirosis, Departamento de Virología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Buenos Aires. Docente Adjunta de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Austral.

Galiano Mónica. Bioquímica. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Ex becaria de la Comunidad Económica Europea. *Clinical Scientist, Respiratory Virus Unit, Virus Reference Division, Centre for Infections, Health Protection Agency*, Londres, Reino Unido.

Gómez Carrillo Manuel. Licenciado en Ciencias Biológicas. Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Vice Director del Centro Nacional de Referencia para el SIDA (actualmente, INBIRS). Docente Adscripto del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Miembro de la Carrera del Profesional y Técnico de Apoyo del CONICET.

Herrera Fabián. Médico Infectólogo, Sección Infectología, Departamento de Medicina Interna, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC). Profesor Asistente, Departamento de Medicina, Instituto Universitario CEMIC. Profesor Adjunto, Departamento de Medicina, Universidad Favaloro.

Kajon Adriana. Bioquímica. Dra. de la Universidad de Buenos Aires. *Ph.D. Associate Scientist, Lovelace Respiratory Research Institute, Infectious Disease Program*, Albuquerque, EE.UU.

Lázaro María E. Médica. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Hospital Zonal Bariloche, San Carlos de Bariloche, Provincia de Río Negro.

Levis Silvana del C. Doctora en Ciencias Biológicas, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Jefa del Depto. de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" (INEVH), Pergamino, Provincia de Buenos Aires.

Livellara Beatriz. Bioquímica. Jefa de Biología Molecular, Laboratorio Central, Hospital Italiano. Profesora Adjunta, Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, Hospital Italiano.

López Camelo Jorge. Doctor en Genética, Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil. Investigador del CONICET, CEMIC e Instituto Multidisciplinario en Biología Celular (IMBICE), La Plata, Buenos Aires. Director de Investigación, CEMIC.

López de Caillou María Susana. Bioquímica. Profesora Asociada de la Cátedra de Virología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán.

Mangano Andrea. Bioquímica del Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Investigadora del CONICET. Profesora Adjunta de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Marcone Débora. Bioquímica, Doctora de la Universidad de Bue-

nos Aires. Becaria postdoctoral del CONICET en el Laboratorio de Virología Clínica del Hospital Universitario CEMIC.

Martínez Alfredo. Bioquímico, Universidad Nacional de Tucumán. Coordinador del Área Asistencial, Laboratorio de Virología Clínica, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno" (CEMIC). Jefe de Serología de Bancos de Sangre CEMIC y FLENI. Coordinador Docente de la Carrera de Especialización en Bioquímica Clínica, CEMIC.

Martínez Peralta Liliana. Médica. Doctora de la Universidad Nacional de La Plata. Profesora Regular Titular del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Investigadora Clínica del CONICET.

Mathet Verónica L. Licenciada en Ciencias Biológicas. Magíster en Biotecnología y Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Docente Autorizada del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Investigadora del CONICET.

Mbayed Viviana. Bioquímica. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Profesora Adjunta de la Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Investigadora del CONICET.

Mersich Susana E. Doctora en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ex Profesora Adjunta de Microbiología y Virología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Minassian María Laura. Bioquímica. Dra. en Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Ex Becaria del CONICET. Docente del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Mistchenko Alicia. Médica, Dra. en Medicina. Investigadora de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC). Jefa del Laboratorio de Virología, Hospital de Pediatría "R. Gutiérrez", Buenos Aires.

Morales María Alejandra. Bioquímica. Jefa de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Introducción a Química Inorgánica de UNNOBA. Profesional del Depto. Investigación INEVH "Dr. Julio I. Maiztegui". Coordinadora de la Red Nacional de Laboratorios para diagnóstico de dengue y otros arbovirus.

Mykietiuik Analía. Doctora en Ciencias Médicas, Universidad de Barcelona, España. Médica Infectóloga, Sección Infectología, Departamento de Medicina Interna, CEMIC. Servicio de Infectología Hospital Interzonal General de Agudos "Profesor Dr. R. Rossi".

Nates Silvia V. Doctora en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Instituto de Virología "Dr. J.M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Jefa del Laboratorio de gastroenteritis virales y sarampión. Profesora Asociada.

Padula Paula J. Doctora en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Jefa del Laboratorio de Referencia para el diagnóstico e investigación de hantavirus, Instituto de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires. Profesora Adjunta, Cátedra Virología, Universidad CAECE. Investigadora del CONICET.

† **Paganini Hugo.** Médico Infectólogo. Médico Principal, Servicio de Control Epidemiológico e Infectología, Hospital "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Médico Infectólogo de FUNCEI y Hospital Alemán. Profesor Asociado, Instituto Universitario CEMIC.

Pando María de los Ángeles. Licenciada en Ciencias Biológicas. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Investigadora del CONICET. Docente del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Pérez Celeste. Bioquímica. Dra. de la Universidad de Buenos Aires. Magíster en Microbiología Molecular, Universidad Nacional de San Martín. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán", Servicio Cultivo de Tejidos, Departamento Virología. Buenos Aires.

Picconi M. Alejandra. Bioquímica. Jefa Servicio Virus Oncogénicos. Laboratorio de Referencia de Papilomavirus, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán". Buenos Aires.

Poletta Fernando. Licenciado en Genética. Investigador del CONICET en el Laboratorio de Genética del Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno", CEMIC.

Rivero Cintia W. Licenciada en Biotecnología y Dra. de la Universidad de Quilmes. Investigadora del CONICET. Instructora de Química II, Universidad Nacional de Quilmes.

Romanowski Víctor. Químico. Licenciado en Bioquímica. Doctor en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional de La Plata. Profesor Regular Titular, Área Biotecnología y Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Sabattini Marta S. Ex Profesora Titular y Directora del Instituto de Virología "J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Asesora Científica del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. J.I. Maiztegui", Pergamino. Académica de número, Academia de Ciencias Médicas, Córdoba.

Salomón Horacio. Bioquímico. Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Director del Centro Nacional de Referencia para el SIDA (actualmente, INBIRS). Jefe de Trabajos Prácticos y Docente Autorizado del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Investigador del CONICET.

Sanjuan Norberto A. Médico. Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Profesor Regular Titular. Ex Director del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Investigador del CONICET.

Savy Vilma Lidia. Bioquímica y Licenciada en Análisis clínicos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ex Jefa del Servicio de Virus respiratorios, INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán", Buenos Aires.

Sen Luisa. Médica. Dra. de la Universidad de Buenos Aires Jefa del Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus, Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Investigadora del CONICET.

Temporiti Elena R. Médica Infectóloga, Sección Infectología, Departamento de Medicina Interna, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC).

Teysió Angélica. Bioquímica. Ex Jefa del Departamento de Virología, Instituto Nacional de Microbiología INEI-ANLIS "Carlos G. Malbrán". Ex Investigadora del CONICET.

Torres Marta. Licenciada en Ciencias Químicas, Universidad de Buenos Aires. Directora Técnica del Programa Buenos Aires de Control de Calidad Externo para Laboratorios Clínicos, CIRHE-CEMIC. Especialista en Bioquímica endocrinológica, ABA-SAEM.

Trento Alfonsina. Bioquímica. Ex Jefa de Residentes de Bioquímica clínica, CEMIC. Doctorado en el Instituto Carlos Tercero, Majadahonda, España.

Trinks Julieta. Médica. Investigadora del CONICET, Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano. Profesora asistente de Medicina Molecular, Hospital Italiano. Profesora de Microbiología, Universidad del Salvador, Buenos Aires.

Uez Osvaldo. Bioquímico. Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Jefe del Servicio de Virología, Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara", Centro Nacional de Referencia para la vigilancia epidemiológica del virus influenza, Mar del Plata.

Videla Cristina M. Licenciada en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Coordinadora del Área Asistencial, Laboratorio de Virología Clínica, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno" (CEMIC). Profesora Titular, Microbiología, Parasitología y Virología, Instituto Universitario CEMIC.

Zapata Marta T. Doctora en Ciencias Químicas. Ex Profesora Titular Consulta, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Ex Directora del Instituto de Virología "J.M. Vanella".

ÍNDICE GENERAL

PRÓLOGO / 29

Guadalupe Carballal - José Raúl Oubiña

PRÓLOGO A LA 4ª EDICIÓN / 31

Mercedes Weissenbacher

PARTE 1: INICIACIÓN A LA VIROLOGÍA MÉDICA: ASPECTOS GENERALES

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA VIROLOGÍA HUMANA

Guadalupe Carballal

1. EL DESARROLLO DE LA VIROLOGÍA COMO CIENCIA / 35

1.1 IMPACTO DE LAS ENFERMEDADES VIRALES EN LA HISTORIA HUMANA / 35

1.2 BREVE HISTORIA DE LA VIROLOGÍA / 35

2. ¿QUÉ SON LOS VIRUS? / 36

2.1 TAMAÑO / 36

2.2 ESTRUCTURA, FUNCIONES Y PROPIEDADES / 36

2.3 DIFERENCIAS CON EUBACTERIAS, CLAMIDIAS, MICOPLASMAS Y RICKETTSIAS / 37

2.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS VIRUS / 38

2.5 CONCEPTO DE SIMETRÍA: HELICOIDAL, ICOSAÉDRICA, COMPLEJA Y BINARIA / 39

3. ¿CÓMO SE REPLICAN LOS VIRUS? / 40

3.1 INTERACCIÓN DE LOS VIRUS CON SUS HOSPEDADORES / 41

3.2 NOCIONES DE BACTERIOFAGOS / 41

3.3 LOS VIRUS: ¿SON SERES VIVOS? / 41

4. INTRODUCCIÓN A LA PATOGENESIS VIRAL / 41

4.1 INTERACCIÓN DE LOS VIRUS CON LA CÉLULA HOSPEDADORA / 41

4.2 INTERACCIÓN DE LOS VIRUS CON EL ORGANISMO INMUNOCOMPETENTE / 42

5. FUNDAMENTOS DE LA CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LOS VIRUS / 42

6. LOS VIRUS NO SON LOS AGENTES PATÓGENOS MÁS PEQUEÑOS: ¿QUÉ SON LOS VIRIONES, LOS VIROIDES Y LOS PRIONES? / 43

7. ¿CÓMO PUEDEN INACTIVARSE LOS VIRUS? EFECTO DE LOS AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS / 43

8. NOCIONES DE ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN / 45

9. NOMENCLATURA DE LOS VIRUS / 46

CAPÍTULO 2 REPLICACIÓN VIRAL

Viviana Castilla - Elsa B. Damonte

1. INTRODUCCIÓN / 47

2. CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL / 47

2.1 ADSORCIÓN / 47

2.2 PENETRACIÓN / 47

2.3 DESNUDAMIENTO / 48

2.4 EXPRESIÓN Y REPLICACIÓN DEL GENOMA / 48

2.5 ENSAMBLAJE Y LIBERACIÓN / 49

2.6 CURVA DE CRECIMIENTO DE UN SOLO CICLO / 50

CAPÍTULO 3 ¿CÓMO SE ESTUDIAN LOS VIRUS?

Susana Mersich - Nélica Candurra

1. PROCEDIMIENTOS FÍSICOQUÍMICOS / 53

1.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA: VISUALIZACIÓN Y ENUMERACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES / 53

1.2 DETECCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES POR HEMAGLUTINACIÓN / 54

1.3 PROTEÍNAS VIRALES / 54

1.4 LOS ÁCIDOS NUCLEICOS: TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN, PCR Y SECUENCIAMIENTO NUCLEOTÍDICO / 55

2. PROCEDIMIENTOS DE DETECCIÓN DE INFECTIVIDAD:

AISLAMIENTO VIRAL / 56

2.1 REQUERIMIENTOS PARA UN LABORATORIO DE CULTIVOS / 56

2.2 AISLAMIENTO DE VIRUS / 56

CAPÍTULO 4 GENÉTICA VIRAL

Víctor Romanowski

1. INTRODUCCIÓN A LA TERMINOLOGÍA / 63

2. BASES MOLECULARES DE LOS CAMBIOS EN LOS GENOMAS / 63

2.1 MUTACIONES / 63

3. INTERACCIONES GENÉTICAS ENTRE VIRUS / 65

3.1 RECOMBINACIÓN / 65

3.2 REASOCIACIÓN DE SEGMENTOS GENÓMICOS (REASSORTMENT) / 65

3.3 COMPLEMENTACIÓN / 66

4. INTERACCIONES NO GENÉTICAS ENTRE VIRUS / 67

4.1 HETEROCIGOSIS / 67

4.2 INTERFERENCIA / 67

4.3 MEZCLA FENOTÍPICA / 68

5. INTERACCIONES GENÉTICAS ENTRE LOS VIRUS Y LA CÉLULA HOSPEDERA / 68

5.1 TRANSFORMACIÓN / 68

5.2 INTEGRACIÓN / 69

5.3 INFECCIÓN PERSISTENTE / 69

6. EVOLUCIÓN VIRAL / 69

7. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA EL ANÁLISIS DE GENOMAS / 70

8. VIRUS COMO VECTORES DE EXPRESIÓN DE GENES / 71

CAPÍTULO 5 PATOGENIA DE LAS INFECCIONES VIRALES

Verónica Lidia Mathet - José Raúl Oubiña

1. INTRODUCCIÓN / 73

1.1 UNA APROXIMACIÓN AL VOCABULARIO / 73

2. PUERTAS DE ENTRADA / 74

2.1 PIEL / 74

2.2 OROFARINGE Y TRACTO RESPIRATORIO / 76

2.3 OROFARINGE Y TRACTO ENTÉRICO / 78

2.4 APARATO GÉNITO-URINARIO / 80

2.5 VÍA CONJUNTIVAL / 82

3. VÍAS DE DISEMINACIÓN EN EL ORGANISMO / 82

3.1 DISEMINACIÓN SOBRE SUPERFICIES EPITELIALES / 82

3.2 INVASIÓN SUBEPITELIAL Y DISEMINACIÓN LINFÁTICA / 83

- 3.3 **DISEMINACIÓN SANGUÍNEA E INVASIÓN TISULAR** / 83
- 3.4 **DISEMINACIÓN NEURAL** / 88
- 4. **TRANSMISIÓN DE VIRUS AL EXTERIOR DEL ORGANISMO** / 89
- 5. **EFFECTOS DE LA INFECCIÓN VIRAL SOBRE LAS CÉLULAS** / 90
 - 5.1. **INFECCIÓN PRODUCTIVA** / 91
 - 5.2. **INFECCIÓN NO PRODUCTIVA** / 93
 - 5.3. **INFECCIÓN VIRAL CON ESCASA Y CONTINUA PRODUCCIÓN VIRAL** / 94
- 6. **ALGUNOS ASPECTOS DE LA RELACIÓN VIRUS-CÉLULA** / 94
 - 6.1. **CONCEPTOS INTRODUCTORIOS** / 94
 - 6.2. **¿CÓMO INGRESA UN VIRUS A UNA CÉLULA? ¿QUÉ HACE EN ELLA?** / 94
 - 6.3. **MECANISMOS DIRECTOS DE LESIÓN CELULAR** / 100
 - 6.4. **MECANISMOS INDIRECTOS DE LESIÓN CELULAR** / 121
- 7. **MODELOS DE INFECCIÓN** / 127
 - 7.1. **INFECCIONES AGUDAS** / 127
 - 7.2. **INFECCIONES PERSISTENTES** / 127
- 8. **CONCLUSIONES** / 128

CAPÍTULO 6 ONCOGÉNESIS VIRAL

Norberto A. Sanjuan

INTRODUCCIÓN / 131

MECANISMOS ONCOGÉNICOS / 131

EL VIRUS PAPILOMA HUMANO: SU PARTICIPACIÓN EN LA ONCOGÉNESIS / 132

CAPÍTULO 7 MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR FRENTE A LAS INFECCIONES VIRALES

José Raúl Oubiña - María Laura Minassian - Verónica Lidia Mathet

- 1. **INTRODUCCIÓN** / 135
 - 1.1. **HISTORIA** / 135
 - 1.2. **GENERALIDADES** / 135
- 2. **RESISTENCIA INESPECÍFICA E INMUNIDAD INNATA** / 137
 - 2.1. **CÉLULAS QUE PARTICIPAN EN LA INMUNIDAD INNATA** / 138
 - 2.2. **FACTORES SOLUBLES QUE PARTICIPAN EN LA INMUNIDAD INNATA** / 147
 - 2.3. **RNA INTERFERENTES: MIRNA Y siRNA** / 155
- 3. **INMUNIDAD ADAPTATIVA** / 157
 - 3.1. **INMUNIDAD HUMORAL** / 158
 - 3.2. **INMUNIDAD CELULAR ADAPTATIVA** / 164
- 4. **INTERACCIONES PROTEÍNA-GLICANOS EN EL CONTROL DE LAS RESPUESTAS INNATA Y ADAPTATIVA: ROL DE LAS GALECTINAS** / 167
 - 4.1. **FUNCIÓN DE LAS GALECTINAS** / 168
 - 4.2. **ESPECIFICIDAD Y AFINIDAD DE LA UNIÓN A GLICANOS** / 169
 - 4.3. **GALECTINA-1** / 169
 - 4.4. **GALECTINA-3** / 169
 - 4.5. **GALECTINA-9** / 170
- 5. **APOPTOSIS** / 170
 - 5.1. **FAMILIA DE LAS CASPASAS** / 171
 - 5.2. **FAMILIA DE PROTEÍNAS Bcl-2** / 172
 - 5.3. **VÍA INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS** / 174
 - 5.4. **VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS** / 176
- 6. **CONTROL DE LA INFECCIÓN VIRAL** / 178

CAPÍTULO 8 EVASIÓN VIRAL A LA RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR

Verónica Lidia Mathet - José Raúl Oubiña

- 1. **ALTERACIÓN DEL RECONOCIMIENTO POR PARTE DEL SISTEMA INMUNE** / 181
 - 1.1. **VARIACIÓN ANTIGÉNICA** / 181
 - 1.2. **DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA VIRAL** / 186
 - 1.3. **DISOCIACIÓN TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA** / 186
- 2. **ALTERACIÓN DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR** / 187
 - 2.1 **INHIBICIÓN DE LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA** / 187

- 2.2. **INHIBICIÓN O MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA INTERFERÓN (IFN)** / 187
- 2.3 **MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD MEDIADA POR OTRAS CITOQUINAS** / 192
- 2.4. **INFECCIÓN DE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE O ACCIÓN SOBRE LAS MISMAS** / 192
- 2.5. **REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS** / 199
- 2.6. **MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO** / 202
- 2.7. **SOBRE-EXPRESIÓN DE RECEPTORES PARA Fc Y CONSIGUIENTE UNIÓN DE Igs** / 202
- 2.8. **INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES CON RECEPTORES/ CORRECEPTORES CELULARES –MOLÉCULAS CD–** / 203
- 3. **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS** / 203

CAPÍTULO 9 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

Guadalupe Carballal, José Raúl Oubiña

- 1. **CONCEPTOS INTRODUCTORIOS** / 205
 - 1.1 **IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO** / 205
 - 1.2 **FUNDAMENTOS DE LA UTILIZACIÓN DE MÉTODOS DIRECTOS E INDIRECTOS O SEROLÓGICOS** / 205
 - 1.3. **CONCEPTO DE MÉTODOS DIRECTOS E INDIRECTOS** / 206
- 2. **MUESTRAS** / 207
 - 2.1. **OBTENCIÓN** / 207
 - 2.2. **OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA AISLAMIENTO VIRAL** / 207
 - 2.3 **OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA DIVERSOS PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS** / 207
 - 2.4 **CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE AL LABORATORIO** / 209
- 3. **MÉTODOS INDIRECTOS O SEROLÓGICOS** / 212
 - 3.1 **FUNDAMENTO Y APLICACIONES** / 212
 - 3.2 **DETERMINACIÓN DEL ESTADO INMUNE** / 213
 - 3.3 **DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN RECIENTE** / 213
 - 3.4 **TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO** / 213
 - 3.5 **TÉCNICAS CONFIRMATORIAS O SUPLEMENTARIAS: WESTERN BLOT E IMMUNOBLOT** / 215
- 4. **MÉTODOS DIRECTOS CLÁSICOS: AISLAMIENTO VIRAL** / 216
 - 4.1 **FUNDAMENTO Y APLICACIONES** / 216
 - 4.2. **AISLAMIENTO EN CULTIVOS CELULARES** / 217
 - 4.3 **AISLAMIENTO EN ANIMALES Y HUEVOS EMBRIONADOS** / 217
 - 4.4 **IDENTIFICACIÓN DE LOS VIRUS AISLADOS** / 217
 - 4.5 **AISLAMIENTO POR CULTIVO RÁPIDO (SHELL VIAL)** / 219
 - 4.6 **MEZCLAS DE LÍNEAS CELULARES** / 219
 - 4.7 **LÍNEAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE** / 219
 - 4.8 **CUANTIFICACIÓN DE VIRUS** / 220
- 5. **DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES** / 220
 - 5.1 **FUNDAMENTOS Y APLICACIONES** / 220
 - 5.2 **INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD) E INDIRECTA (IFI) PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES** / 221
 - 5.3 **RADIOINMUNOENSAYO (RIA)** / 221
 - 5.4 **ENZIMOINMUNOENSAYOS (EIA Y ELISA)** / 221
 - 5.5 **ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA** / 222
 - 5.6 **INMUNOPEROXIDASA (IP Y PAP)** / 223
- 6. **HISTOPATOLOGÍA Y CITOLOGÍA EXFOLIATIVA** / 223
- 7. **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)** / 224
- 8. **DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES** / 224
 - 8.1 **FUNDAMENTO Y APLICACIONES** / 224
 - 8.2 **HIBRIDACIÓN CON SONDAS** / 225
 - 8.3 **AMPLIFICACIÓN SELECTIVA DE ÁCIDOS NUCLEICOS** / 226
 - 8.4 **ANÁLISIS MEDIANTE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN: POLIMORFISMO DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS (RFLP)** / 233
 - 8.5 **SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA** / 233
 - 8.6 **MICRODISPOSICIONES DE DNA O MICROARRAYS** / 237
 - 8.7 **CARGA VIRAL** / 239
- 9. **RESPONSABILIDAD MÉDICA EN LA CONSERVACIÓN, MANIPULACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS** / 240
- 10. **SÍNTESIS Y PERSPECTIVAS** / 240

CAPÍTULO 10 ENSAYOS AUTOMATIZADOS PARA EL DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

Alfredo Martínez

- 1. INTRODUCCIÓN** / 241
 - 1.1 ENZIMOINMUNOENSAYO (EIE o ELISA) / 241
 - 1.2 QUIMIOLUMINISCENCIA / 241
- 2. ENSAYOS AUTOMATIZADOS: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN** / 242
 - 2.1 ENSAYOS AUTOMATIZADOS CUALITATIVOS / 242
 - 2.2 ENSAYOS AUTOMATIZADOS CUANTITATIVOS / 243
- 3. CALIFICACIÓN DEL INSTRUMENTAL** / 243
- 4. VALIDACIÓN Y/O VERIFICACIÓN DE LOS ENSAYOS** / 243
 - 4.1 ESTANDARIZACIÓN / 243
 - 4.2 CONTROLES, CALIBRADORES Y ESTÁNDARES / 243
- 5. CONCLUSIONES** / 243

CAPÍTULO 11 INTRODUCCIÓN AL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD Y CONTROL DE LA CALIDAD EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA CLÍNICA

Cristina M. Videla - Marta Torres

- 1. INTRODUCCIÓN** / 245
- 2. DEFINICIONES** / 245
- 3. CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA** / 246
 - 3.1 CONTROL DE CALIDAD INTERNO / 246
 - 3.2 CONTROL DE CALIDAD EXTERNO / 248
- 4. ELECCIÓN DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y SU VALIDACIÓN** / 249

CAPÍTULO 12 CONCEPTOS SOBRE EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES VIRALES

Jorge López Camelo - Fernando Poletta

- 1. ¿QUE ES LA EPIDEMIOLOGÍA?** / 253
- 2. DISEÑOS E INDICADORES DE EFECTO** / 253
 - 2.1. TIPOS DE ESTUDIOS EN EPIDEMIOLOGÍA / 253
 - 2.2. INDICADORES DE EFECTO / 255
- 3. EPIDEMIOLOGÍA DE INFECCIONES VIRALES** / 255
- 4. LÍNEAS DE TIEMPO DE LA INFECCIÓN** / 255
- 5. PROBABILIDAD DE TRANSMISIÓN** / 256
 - 5.1. ESTIMACIÓN DE LA PROBABILIDAD DE TRANSMISIÓN / 256
 - 5.2. TASA DE ATAQUE SECUNDARIA / 256
 - 5.3. EL MODELO BINOMIAL / 256
- 6. NÚMERO BÁSICO DE REPRODUCCIÓN** / 257
 - 6.1. ESTIMANDO EL NÚMERO BÁSICO DE REPRODUCCIÓN / 257
- 7. LA TASA DE INCIDENCIA COMO FUNCIÓN DE LA PREVALENCIA Y LA TASA DE CONTACTO** / 257
 - 7.1. TASAS DE CONTACTO Y MODELOS / 257
- 8. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA** / 257

PARTE 2: LOS PATÓGENOS VIRALES HUMANOS

CAPÍTULO 13 INFECCIONES RESPIRATORIAS DE ORIGEN VIRAL: IMPACTO Y DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

Guadalupe Carballal - Marcela Echavarría

- 1. DEFINICIONES** / 261
 - 1.1 IMPACTO / 261
- 2. VIRUS RESPIRATORIOS QUE AFECTAN AL SER HUMANO Y NOCIONES DE EPIDEMIOLOGÍA** / 261
- 3. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO** / 263
- 4. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS** / 263

- 4.1 EL COMIENZO DE UNA NUEVA ERA EN EL DIAGNÓSTICO Y LA EPIDEMIOLOGÍA DE LOS VIRUS RESPIRATORIOS / 263
- 4.2 MUESTRAS: OBTENCIÓN / 264
- 4.3 CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS / 265
- 4.4 TIEMPO DE ESPERA DE RESULTADOS / 266
- 5. AISLAMIENTO EN CULTIVO** / 266
 - 5.1 EN CULTIVO CLÁSICO / 266
 - 5.2 AISLAMIENTO EN CULTIVO RÁPIDO / 266
- 6. MÉTODOS DIRECTOS Y RÁPIDOS: DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES** / 267
 - 6.1 INMUNOFLUORESCENCIA (IF) / 267
 - 6.2 ENZIMOINMUNOENSAYOS (ELISAs) / 268
 - 6.3 OTROS NUEVOS MÉTODOS RÁPIDOS: ELISA DE MEMBRANA, INMUNOENSAYOS ÓPTICOS (OIA); INMUNOCROMATOGRAFÍA / 268
- 7. TÉCNICAS MOLECULARES** / 269
 - 7.1 PCR INDIVIDUALES / 269
 - 7.2 PCR MÚLTIPLES / 269
 - 7.3 PCR EN TIEMPO REAL / 270
- 8. SEROLOGÍA** / 272
- 9. CONCLUSIONES** / 272

CAPÍTULO 14 ORTHOMYXOVIRUS

Vilma L. Savy - Elsa G. Baumeister

- 1. INTRODUCCIÓN** / 273
- 2. ESTRUCTURA** / 273
 - 2.1 MORFOLOGÍA / 273
 - 2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA / 273
 - 2.3 ÁCIDO NUCLEICO / 273
 - 2.4 PROTEÍNAS / 274
- 3. CICLO REPLICATIVO** / 276
 - 3.1 ENTRADA / 276
 - 3.2 TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN / 276
 - 3.3 ENSAMBLE Y LIBERACIÓN DE LOS VIRIONES / 276
- 4. PATOGENIA E INMUNIDAD** / 276
 - 4.1 PUERTA DE ENTRADA Y TRANSMISIÓN / 278
 - 4.2 PATOGENIA / 278
 - 4.3 RESPUESTA INMUNE / 279
- 5. CUADROS CLÍNICOS** / 279
 - 5.1 COMPLICACIONES / 280
- 6. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO** / 281
 - 6.1 DIAGNÓSTICO RÁPIDO / 281
 - 6.2 CULTIVO / 281
 - 6.3 SUBTIPIFICACIÓN / 281
 - 6.4 DETECCIÓN DE RNA VIRAL / 282
 - 6.5 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO / 282
- 7. PROFILAXIS** / 282
 - 7.1 VACUNAS INACTIVADAS / 282
 - 7.2 VACUNAS A VIRUS VIVOS / 283
 - 7.3 VACUNAS PARA LA PREVENCIÓN DE LA INFLUENZA PANDÉMICA / 283
- 8. TRATAMIENTO ANTIVIRAL** / 284
- 9. EPIDEMIOLOGÍA** / 284
 - 9.1 VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA / 284
- 10. INFLUENZA PANDÉMICA** / 285
 - 10.1. LA PANDEMIA DE INFLUENZA A H1N1 / 286

CAPÍTULO 15 PARAMYXOVIRUS

Guadalupe Carballal - Mónica Galiano - Alicia Mistchenko - Cristina M. Videla

CAPÍTULO 15.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA PARAMYXOVIRIDAE

Guadalupe Carballal - Cristina M. Videla

- 1. TAXONOMÍA** / 290
- 2. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA ANTIGÉNICA** / 290
- 3. CULTIVO** / 291
- 4. CICLO REPLICATIVO** / 292

CAPÍTULO 15.2 VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (RSV)

Guadalupe Carballal - Cristina M. Videla

1. **CARACTERÍSTICAS** / 294
2. **ESTRUCTURA ANTIGÉNICA** / 295
3. **GENOTIPOS** / 295
4. **CUADROS CLÍNICOS** / 295
5. **PATOGENIA** / 295
6. **EPIDEMIOLOGÍA** / 296
 - 6.1 **EPIDEMIOLOGÍA EN ARGENTINA** / 296
7. **PROFILAXIS Y TRATAMIENTO** / 297
 - 7.1 **TRATAMIENTO** / 297
 - 7.2 **PROFILAXIS PASIVA** / 297
 - 7.3 **VACUNAS** / 298
8. **DIAGNÓSTICO** / 298
 - 8.1 **AISLAMIENTO** / 299
 - 8.2 **PROCEDIMIENTOS RÁPIDOS** / 299
 - 8.3 **TÉCNICAS MOLECULARES** / 299
 - 8.4 **SEROLOGÍA** / 299

CAPÍTULO 15.3 VIRUS PARAINFLUENZA Y VIRUS DE PAROTIDITIS

Cristina M. Videla

1. **VIRUS PARAINFLUENZA** / 300
 - 1.1 **CUADROS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLOGÍA** / 300
 - 1.2 **DIAGNÓSTICO** / 300
 - 1.3 **TRATAMIENTO Y PROFILAXIS** / 300
2. **VIRUS PAROTIDITIS** / 301
 - 2.1 **CUADROS CLÍNICOS Y COMPLICACIONES** / 301
 - 2.2 **PATOGÉNESIS** / 301
 - 2.3 **DIAGNÓSTICO** / 301
 - 2.4 **EPIDEMIOLOGÍA Y PROFILAXIS** / 301

CAPÍTULO 15.4 METAPNEUMOVIRUS HUMANO

Guadalupe Carballal - Mónica Galiano - Cristina M. Videla

1. **HISTORIA DE SU DESCUBRIMIENTO** / 303
2. **ESTRUCTURA** / 303
3. **PATOGENIA** / 303
4. **CUADROS CLÍNICOS** / 303
 - 4.1 **EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA** / 303
 - 4.2 **EN POBLACIÓN ADULTA** / 304
5. **DIAGNÓSTICO** / 304
6. **PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO** / 304
7. **EPIDEMIOLOGÍA** / 304
8. **PRIMEROS ESTUDIOS SOBRE HMPV EN ARGENTINA** / 304

CAPÍTULO 15.5 SARAMPIÓN

Alicia S. Mistchenko

1. **ESTRUCTURA VIRAL** / 306
2. **PATOGENIA** / 306
3. **CUADROS CLÍNICOS** / 307
 - 3.1 **INFECCIÓN PERSISTENTE** / 307
4. **DIAGNÓSTICO** / 307
 - 4.1 **DETECCIÓN DEL VIRUS** / 307
 - 4.2 **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS** / 307
 - 4.3 **DETECCIÓN DE ANTICUERPOS** / 308
5. **EPIDEMIOLOGÍA** / 308
6. **TRATAMIENTO Y PROFILAXIS** / 308

CAPÍTULO 16 ADENOVIRUS

Marcela Echavarría

1. **GENERALIDADES** / 309
 - 1.1 **TAXONOMÍA** / 309
 - 1.2 **ESTRUCTURA** / 309

- 1.3 **CLASIFICACIÓN DE LOS ADENOVIRUS HUMANOS** / 310
- 1.4 **REPLICACIÓN** / 311
- 1.5 **RESISTENCIA A AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS** / 311
- 1.6 **MODOS DE TRANSMISIÓN** / 311

2. **CUADROS CLÍNICOS** / 312
 - 2.1 **INFECCIONES RESPIRATORIAS** / 312
 - 2.2 **INFECCIONES OCULARES** / 312
 - 2.3 **INFECCIONES GASTROINTESTINALES** / 312
 - 2.4 **INFECCIONES EN PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS** / 313
3. **EPIDEMIOLOGÍA** / 313
 - 3.1 **INFECCIONES RESPIRATORIAS EN NIÑOS DE ARGENTINA** / 314
4. **PATOGÉNESIS** / 314
 - 4.1 **LATENCIA Y PERSISTENCIA** / 314
 - 4.2 **ONCOGENICIDAD** / 315
5. **RESPUESTA INMUNE** / 315
6. **DIAGNÓSTICO** / 315
 - 6.1 **MÉTODOS DIRECTOS** / 315
 - 6.2 **MÉTODOS INDIRECTOS O SEROLÓGICOS** / 317
7. **PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO** / 317
 - 7.1 **VACUNAS** / 317
 - 7.2 **TRATAMIENTO** / 317
8. **ADENOVIRUS COMO VECTORES** / 317

CAPÍTULO 17 VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LAS VIROSIS RESPIRATORIAS EN ARGENTINA

Oswaldo Uez

1. **SISTEMA DE NOTIFICACIÓN OBLIGATORIA DE CASOS** / 319
2. **VIGILANCIA VIROLÓGICA** / 319
3. **VIGILANCIA POR EL SISTEMA DE MÉDICOS CENTINELAS** / 319
4. **VIGILANCIA POR EL SISTEMA DE UNIDADES CENTINELAS** / 320
5. **IMPORTANCIA DE LA TIPIFICACIÓN Y SUBTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE INFLUENZA EN RELACIÓN A LA FÓRMULA VACUNAL** / 320

CAPÍTULO 18 RUBÉOLA

Marta T. Zapata

1. **CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS RUBÉOLA** / 323
 - 1.1 **MORFOLOGÍA Y CULTIVO** / 323
 - 1.2 **PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Y NO ESTRUCTURALES** / 323
 - 1.3 **COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA Y GENOTIPOS** / 323
2. **CUADROS CLÍNICOS Y ETIOPATOGENIA** / 324
 - 2.1 **RUBÉOLA POST-NATAL** / 324
 - 2.2 **RUBÉOLA CONGÉNITA** / 325
3. **EPIDEMIOLOGÍA** / 327
 - 3.1 **EPIDEMIOLOGÍA EN ARGENTINA** / 327
 - 3.2 **DISTRIBUCIÓN ETARIA Y PREVALENCIA** / 328
4. **DIAGNÓSTICO** / 328
 - 4.1 **MÉTODOS DIAGNÓSTICOS** / 328
 - 4.2 **SITUACIONES DIAGNÓSTICAS** / 329
5. **PROFILAXIS Y VACUNACIÓN** / 329

CAPÍTULO 19 PARVOVIRUS

Guadalupe Carballal - José Raúl Oubiña

1. **EL DESCUBRIMIENTO DE ERYTHROVIRUS Y BOCAVIRUS HUMANOS** / 331
2. **ESTRUCTURA** / 332
3. **REPLICACIÓN** / 333
4. **PATOGÉNESIS** / 334
5. **CUADROS CLÍNICOS** / 334
6. **DIAGNÓSTICO** / 336
 - 6.1 **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA** / 336
 - 6.2 **AISLAMIENTO DEL B19** / 336
 - 6.3 **DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS** / 336
 - 6.4 **SEROLOGÍA** / 336

- 7. **EPIDEMIOLOGÍA** / 336
- 8. **TRATAMIENTO Y PROFILAXIS** / 336

CAPÍTULO 20 ENTEROVIRUS

María Cecilia Freire

- 1. **CARACTERÍSTICAS GENERALES** / 339
- 2. **ESTRUCTURA** / 339
- 3. **PATOGENIA** / 340
- 4. **CUADROS CLÍNICOS** / 341
 - 4.1 **POLIOMIELITIS** / 341
 - 4.2 **SÍNDROME POST-POLIO** / 341
 - 4.3 **MENINGITIS Y ENCEFALITIS** / 341
 - 4.4 **ENFERMEDAD CARDÍACA** / 342
 - 4.5 **ENFERMEDAD MUSCULAR Y PLEURODINIA** / 342
 - 4.6 **DIABETES** / 342
 - 4.7 **INFECCIONES OCULARES** / 342
 - 4.8 **INFECCIONES RESPIRATORIAS, HERPANGINA, ENFERMEDAD MANO-PIE-BOCA** / 342
 - 4.9 **ENFERMEDAD NEONATAL** / 342
- 5. **DIAGNÓSTICO** / 342
 - 5.1 **TOMA DE LA MUESTRA** / 343
 - 5.2 **MÉTODOS DIRECTOS** / 343
 - 5.3 **MÉTODOS INDIRECTOS** / 344
- 6. **TRATAMIENTO** / 344
- 7. **PROFILAXIS** / 344
- 8. **EPIDEMIOLOGÍA** / 345
 - 8.1 **EPIDEMIOLOGÍA EN ARGENTINA** / 345
- 9. **PROGRAMA DE ERRADICACIÓN DEL VIRUS POLIO SALVAJE** / 345

CAPÍTULO 21 VIRUS PRODUCTORES DE DIARREA

Silvia V. Nates

- 1. **IMPACTO DE LAS DIARREAS VIRALES EN SALUD** / 347
 - 1.1 **VIRUS PRODUCTORES DE DIARREAS EN HUMANOS** / 347
 - 1.2 **VIRUS DEL ESCENARIO ENDÉMICO Y EPIDÉMICO** / 347
- 2. **VIRUS DEL ESCENARIO ENDÉMICO** / 348
- 3. **ROTAVIRUS** / 349
 - 3.1 **CLASIFICACIÓN** / 349
 - 3.2 **PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS** / 349
 - 3.3 **ESTRUCTURA DE LOS ROTAVIRUS GRUPO A** / 349
 - 3.4 **GENOMA VIRAL** / 350
 - 3.5 **ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS VIRALES** / 350
 - 3.6 **REPLICACIÓN VIRAL** / 352
 - 3.7 **PATOGÉNESIS VIRAL** / 353
 - 3.8 **HISTORIA NATURAL Y CURSO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS** / 353
 - 3.9 **EPIDEMIOLOGÍA** / 353
 - 3.10 **INMUNIDAD Y RESISTENCIA DEL HOSPEDADOR** / 354
 - 3.11 **DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS** / 354
 - 3.12 **TRATAMIENTO** / 355
 - 3.13 **PROFILAXIS** / 355
- 4. **VIRUS DEL ESCENARIO EPIDÉMICO** / 356

CAPÍTULO 22 RETROVIRUS

María Mercedes Ávila - Mirna Biglione - María Belén Bouzas - Manuel Gómez Carrillo - Guillermina Dolcini - María de los Ángeles Pando - Liliana Martínez Peralta - Luisa Sen

CAPÍTULO 22.1 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV)

Manuel Gómez Carrillo

- 1. **VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA** / 360
 - 1.1 **ESTRUCTURA VIRAL** / 360
 - 1.2 **REPLICACIÓN** / 362
 - 1.3 **ENTRADA** / 362

- 1.4 **SÍNTESIS DE DNA PROVIRAL** / 362
- 1.5 **INTEGRACIÓN** / 364
- 1.6 **EXPRESIÓN Y TRANSPORTE DE RNA** / 364
- 1.7 **ENSAMBLE, EGRESO Y MADURACIÓN** / 364

- 2. **ORIGEN, VARIABILIDAD Y DIVERSIDAD DEL HIV** / 364
 - 2.1 **VARIABILIDAD** / 365
 - 2.2 **TIPOS, SUBTIPOS Y RECOMBINANTES** / 365
- 3. **EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL HIV-1** / 365

CAPÍTULO 22.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR HIV

María Mercedes Ávila - María de los Ángeles Pando

- 1. **HIV/SIDA EN EL MUNDO** / 367
- 2. **HIV/SIDA EN LA ARGENTINA** / 368

CAPÍTULO 22.3 PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR HIV-1

Luisa Sen - Andrea Mangano

- 1. **CURSO DE LA INFECCIÓN POR EL HIV-1. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN** / 371
 - 1.1 **INFECCIÓN AGUDA PRIMARIA** / 371
 - 1.2 **LATENCIA CLÍNICA ASINTOMÁTICA Y SIDA ENFERMEDAD** / 371
- 2. **CATEGORÍAS CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS** / 372
- 3. **ENTRADA DEL HIV-1** / 372
 - 3.1 **EL RECEPTOR PRIMARIO CD4** / 373
 - 3.2 **CORRECEPTORES Y QUIMIOQUINAS** / 373
- 4. **HIV-1 Y RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE** / 374
 - 4.1 **RESPUESTA ESPECÍFICA CELULAR** / 374
 - 4.2 **RESPUESTA ESPECÍFICA HUMORAL** / 375
 - 4.3 **RESPUESTA ANTIVIRAL DE LA INMUNIDAD INNATA** / 375
- 5. **INMUNOPATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR EL HIV-1** / 375

CAPÍTULO 22.4 DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR HIV-1/2

María Belén Bouzas

- 1. **INTRODUCCIÓN** / 377
- 2. **ENSAYOS DE TAMIZAJE** / 377
 - 2.1 **ENZIMOINMUNOENSAYOS (ELISAs)** / 377
 - 2.2 **OTROS ENSAYOS DE TAMIZAJE** / 378
- 3. **ENSAYOS SUPLEMENTARIOS** / 379
- 4. **ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO** / 380
- 5. **ANTÍGENO P24 Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS** / 380
 - 5.1 **ANTÍGENO P 24** / 380
 - 5.2 **DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS** / 381
 - 5.3 **CUANTIFICACIÓN DE RNA DE HIV EN PLASMA** / 381
- 6. **DIAGNÓSTICO PEDIÁTRICO** / 382
- 7. **CONCLUSIONES** / 382

CAPÍTULO 22.5 TRANSMISIÓN MADRE-HIJO DEL HIV

Guillermina Dolcini - Liliana Martínez Peralta

- 1. **INTRODUCCIÓN** / 384
- 2. **EMBARAZO Y PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR HIV** / 384
- 3. **MODOS DE TRANSMISIÓN MADRE-HIJO Y FACTORES DE RIESGO** / 384
- 4. **PUERTAS DE ENTRADA Y PREVENCIÓN** / 385
- 5. **DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN PEDIÁTRICA** / 385

CAPÍTULO 22.6 VACUNAS PARA EL HIV/SIDA

Liliana Martínez Peralta

- 1. DIFICULTADES PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA PREVENTIVA / 387**
- 2. VACUNAS ATENUADAS / 387**
- 3. VACUNAS INACTIVADAS / 387**
- 4. PARTÍCULAS VIRUS-SÍMIL / 387**
- 5. VACUNAS A SUBUNIDADES / 388**
 - 5.1. BASADAS EN ENVOLTURA / 388**
 - 5.2. VACUNA A SUBUNIDADES DE PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES / 388**
- 6. VACUNAS A DNA Y VECTORES VACUNALES / 388**
- 7. EL DESARROLLO DE LAS COMBINACIONES PRIMERA VACUNA-REFUERZO / 388**
- 8. PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y PÉPTIDOS / 388**
- 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS / 388**

CAPÍTULO 22.7 VIRUS LINFOTRÓPICO T HUMANO I Y II (HTLV-I/II)

María E. Eirin - Carolina A. Berini - Mirna M. Biglione

- 1. HISTORIA Y CLASIFICACIÓN / 390**
- 2. ORGANIZACIÓN DEL VIRIÓN / 390**
 - 2.1 ESTRUCTURA GENÓMICA / 390**
- 3. VÍAS DE TRANSMISIÓN / 390**
- 4. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS / 391**
- 5. PATOGENIA / 391**
 - 5.1. ENFERMEDADES ASOCIADAS AL HTLV-I / 391**
 - 5.2 HTLV-II Y ENFERMEDAD / 391**
- 6. ASPECTOS MOLECULARES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA / 392**
- 7. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR HTLV-I/II / 392**

CAPÍTULO 23 HERPESVIRUS

Virginia Alonio - Guadalupe Carballal - Dolores Fellner - Marcela Ferrés - Beatriz Livellara - Celeste Pérez - Alejandra Piconi - Cristina M. Videla

CAPÍTULO 23.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA HERPESVIRIDAE

Marcela Ferrés

- 1. ESTRUCTURA / 394**
- 2. REPLICACIÓN / 395**

CAPÍTULO 23.2 VIRUS HERPES SIMPLEX: HERPESVIRUS HUMANO (HHV) 1 Y HHV-2

Marcela Ferrés

- 1. ESTRUCTURA / 396**
- 2. INFECCIÓN AGUDA, LATENCIA Y REACTIVACIÓN / 396**
- 3. PUERTA DE ENTRADA Y CUADROS CLÍNICOS / 398**
 - 3.1 INFECCIÓN ORO-FACIAL / 398**
 - 3.2 HERPES GENITAL / 399**
 - 3.3 ENCEFALITIS HERPÉTICA / 399**
 - 3.4. INFECCIÓN DEL RECIÉN NACIDO / 399**
- 4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO / 399**
- 5. TRATAMIENTO / 400**

CAPÍTULO 23.3 VIRUS VARICELA-ZÓSTER (VZV) o HHV-3

Marcela Ferrés

- 1. INFECCIÓN AGUDA, LATENCIA Y REACTIVACIÓN / 401**
- 2. PUERTA DE ENTRADA Y DISEMINACIÓN / 401**
- 3. CUADROS CLÍNICOS / 401**
- 4. DIAGNÓSTICO / 402**
- 5. EPIDEMIOLOGÍA / 402**

- 6. TRATAMIENTO / 402**

- 7. PREVENCIÓN / 402**

CAPÍTULO 23.4 CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HERPESVIRUS HUMANO 5 o HHV-5)

Guadalupe Carballal - Cristina M. Videla

INTRODUCCIÓN / 404

- 1. ESTRUCTURA / 404**
- 2. REPLICACIÓN / 405**
- 3. PATOGENIA / 405**
 - 3.1 CONTROL DEL CMV POR EL SISTEMA INMUNE / 405**
 - 3.2 MECANISMOS DE INTERFERENCIA CON LA RESPUESTA INNUNME / 406**
- 4. VÍAS DE INFECCIÓN / 406**
- 5. CUADROS CLÍNICOS / 406**
 - 5.1 EN INMUNOCOMPETENTES / 406**
 - 5.2 EN INMUNOCOMPROMETIDOS / 406**
 - 5.3 INFECCIÓN CONGÉNITA / 407**
- 6. DIAGNÓSTICO / 407**
 - 6.1 SEROLOGÍA / 407**
 - 6.2 MÉTODOS DIRECTOS / 407**
- 7. VALOR DIAGNÓSTICO DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DIRECTOS / 413**
- 8. EPIDEMIOLOGÍA Y PREVENCIÓN / 413**
- 9. VACUNAS EN DESARROLLO PARA CITOMEGALOVIRUS / 414**
- 10. TRATAMIENTO / 414**
- 11. RESISTENCIA A ANTIVIRALES Y ENSAYOS DE DETECCIÓN / 414**

CAPÍTULO 23.5 HERPESVIRUS HUMANO 6 (HHV-6) Y HERPESVIRUS HUMANO 7 (HHV-7)

Beatriz I. Livellara

- 1. INTRODUCCIÓN / 416**
- 2. BIOLOGÍA / 416**
 - 2.1 MORFOLOGÍA / 416**
 - 2.2 GENOMA / 416**
- 3. TAXONOMÍA / 417**
- 4. CICLO REPLICATIVO / 417**
- 5. TROPISMO CELULAR / 418**
- 6. EPIDEMIOLOGÍA / 418**
- 7. TRANSMISIÓN / 418**
- 8. ASPECTOS CLÍNICOS Y PATOGENESIS / 418**
- 9. TERAPIA ANTIVIRAL / 419**
- 10. DIAGNÓSTICO / 419**
- 11. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL HHV-6 Y AL HHV-7 / 419**
- 12. OPORTUNIDAD DEL MUESTREO PARA HHV-6 Y HHV-7 / 421**

CAPÍTULO 23.6 VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV) o HHV-4

M. Dolores Fellner - M. Alejandra Picconi

- 1. GENERALIDADES / 422**
- 2. CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA / 422**
- 3. INFECCIÓN VIRAL / 422**
 - 3.1 IN VITRO / 422**
 - 3.2 EN EL HOSPEDADOR NATURAL / 424**
- 4. EPIDEMIOLOGÍA / 426**
- 5. PATOLOGÍAS ASOCIADAS / 426**
- 6. DIAGNÓSTICO / 427**
 - 6.1 MÉTODOS INDIRECTOS / 427**
 - 6.2 MÉTODOS DIRECTOS / 427**
- 7. TERAPÉUTICA Y PERSPECTIVAS PARA UNA FUTURA VACUNA / 428**
- 8. CONCLUSIONES / 428**

CAPÍTULO 23.7 HERPESVIRUS HUMANO 8 (HHV-8)

Luisa V. Alonio - Celeste Pérez

- 1. INTRODUCCIÓN** / 429
- 2. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS** / 429
 - 2.1 ESTRUCTURA / 429
- 3. TRANSMISIÓN Y SEROPREVALENCIA** / 429
- 4. PATOGENIA** / 430
 - 4.1 PATOLOGÍAS MALIGNAS INDUCIDAS POR EL HHV-8 / 430
- 5. DIAGNÓSTICO** / 431
 - 5.1 SEROLOGÍA / 431
 - 5.2 DETECCIÓN DE DNA VIRAL EN FLUIDOS CORPORALES / 432
- 6. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO** / 432
 - 6.1 PREVENCIÓN / 432
 - 6.2 TRATAMIENTO / 432

CAPÍTULO 24 HEPATITIS VIRALES

María Luján Cuestas - Verónica Lidia Mathet - María Laura Minassian - José Raúl Oubiña - Cintia Wanda Rivero - Julieta Trinks

CAPÍTULO 24.1 HEPATITIS VIRALES

José Raúl Oubiña

- 1. INTRODUCCIÓN** / 434
- 2. EL HÍGADO COMO BLANCO DE INFECCIÓN Y ÓRGANO INMUNOLÓGICO** / 436
- 3. REGISTRO DE HEPATITIS VIRALES EN ARGENTINA** / 439

CAPÍTULO 24.2 HEPATITIS A

Julieta Trinks - José Raúl Oubiña

- 1. MORFOLOGÍA** / 441
- 2. ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL VIRUS** / 441
- 3. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL** / 441
- 4. PATOGENIA** / 443
- 5. EPIDEMIOLOGÍA** / 445
- 6. CUADRO CLÍNICO** / 447
- 7. DIAGNÓSTICO** / 447
- 8. PROFILAXIS** / 448

CAPÍTULO 24.3 VIRUS HEPATITIS B

Verónica Lidia Mathet - María Luján Cuestas - José Raúl Oubiña

- 1. MORFOLOGÍA** / 450
- 2. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL** / 450
 - 2.1 INTRODUCCIÓN / 450
 - 2.2 GENOMA / 450
 - 2.3 PROTEÍNAS VIRALES / 453
- 3. ÚNICO TIPO, MÚLTIPLES SUBTIPOS SEROLÓGICOS, GENOTIPOS Y SUBGENOTIPOS** / 457
 - 3.1 GENOTIPOS VIRALES / 459
 - 3.2 SUBGENOTIPOS, CLUSTERS Y RECOMBINANTES INTERGENOTÍPICAS / 459
 - 3.3 IMPORTANCIA MÉDICA DE LA DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS DEL HBV / 459
- 4. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN POR HBV** / 459
 - 4.1 ADSORCIÓN A LA MEMBRANA Y PENETRACIÓN / 459
 - 4.2 INFECCIÓN PRODUCTIVA / 460
 - 4.3 INFECCIÓN LATENTE / 464
 - 4.4 INTEGRACIÓN VIRAL / 464
- 5. ANTÍGENOS VIRALES Y RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR** / 464
 - 5.1 RESPUESTA INMUNE INNATA / 464
 - 5.2 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA / 464
- 6. PATOGENIA** / 467

6.1 EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA INFECCIÓN POR HBV Y SU CORRELACIÓN CON LOS MARCADORES SEROLÓGICOS Y VIROLÓGICOS / 469

- 7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS** / 478
 - 7.1 MARCADORES SEROLÓGICOS A SOLICITAR / 478
 - 7.2 APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR / 480
 - 7.3 INFECCIÓN OCULTA CON HBV / 482
 - 7.4 CAUSAS DE SERONEGATIVIDAD PARA HBs Ag EN INDIVIDUOS VIRÉMICOS / 482
 - 7.5 CAUSAS DE CODETECCIÓN DE HBs Ag Y ANTICUERPOS ANTI-HBs / 482
- 8. EPIDEMIOLOGÍA** / 482
 - 8.1 RESERVORIO / 482
 - 8.2 FUENTES DE INFECCIÓN / 482
 - 8.3 VÍAS DE TRANSMISIÓN / 482
 - 8.4 PREVALENCIA E INCIDENCIA / 483
 - 8.5 MORTALIDAD / 483
 - 8.6 CONTROL / 483
- 9. PROFILAXIS** / 483
 - 9.1 PROFILAXIS ACTIVA / 483
 - 9.2 PROFILAXIS PASIVA / 486
- 10. TRATAMIENTO ANTIVIRAL** / 487
- 11. PERSPECTIVAS** / 490

CAPÍTULO 24.4 HEPATITIS D

Julieta Trinks - José Raúl Oubiña

- 1. INTRODUCCIÓN** / 492
- 2. MORFOLOGÍA** / 492
- 3. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN FUNCIONAL** / 492
 - 3.1 GENOMA VIRAL / 493
 - 3.2 PROTEÍNAS / 494
 - 3.3 REPLICACIÓN / 495
- 4. PATOGENIA** / 495
- 5. EPIDEMIOLOGÍA** / 497
 - 5.1 VÍAS DE TRANSMISIÓN / 497
 - 5.2 PREVALENCIA E INCIDENCIA / 497
 - 5.3 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR / 498
- 6. CUADRO CLÍNICO** / 498
 - 6.1 SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS GENOTIPOS DEL HDV / 499
- 7. DIAGNÓSTICO** / 499
- 8. PROFILAXIS** / 500
- 9. TRATAMIENTO** / 501

CAPÍTULO 24.5 HEPATITIS C

María Laura Minassian - Cintia Wanda Rivero - José Raúl Oubiña

- 1. ASPECTOS HISTÓRICOS** / 504
- 2. EVOLUCIÓN NATURAL DE LA INFECCIÓN** / 504
- 3. AGENTE ETIOLÓGICO** / 504
 - 3.1 MORFOLOGÍA / 504
 - 3.2 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL / 504
- 4. REPLICACIÓN VIRAL** / 505
- 5. DIVERSIDAD, VARIABILIDAD GENÓMICA Y SUS IMPLICANCIAS CLÍNICO-PATOGÉNICAS** / 508
- 6. PATOGÉNESIS MOLECULAR** / 509
 - 6.1 INFECCIÓN AGUDA / 510
 - 6.2 INFECCIÓN CRÓNICA / 513
 - 6.3 INFECCIÓN OCULTA / 517
 - 6.4 MANIFESTACIONES EXTRA-HEPÁTICAS / 518
- 7. DIAGNÓSTICO** / 519
 - 7.1 MÉTODOS INDIRECTOS: DETECCIÓN DE ANTICUERPOS / 519
 - 7.2 MÉTODOS DIRECTOS: DETECCIÓN DEL GENOMA VIRAL Y DEL ANTÍGENO DEL CORE. / 519
- 8. EPIDEMIOLOGÍA** / 523
 - 8.1 RESERVORIO / 523

8.2. FUENTE DE INFECCIÓN / 524

8.3. PREVALENCIA E INCIDENCIA / 524

9. PREVENCIÓN / 526

10. TRATAMIENTO / 528

CAPÍTULO 24.6 HEPATITIS E

Julieta Trinks - José Raúl Oubiña

1. INTRODUCCIÓN / 530

2. MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS DEL HEV / 530

3. PATOGENIA / 531

4. EPIDEMIOLOGÍA / 531

4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES / 531

4.2 RESERVORIOS DEL VIRUS / 532

4.3 VÍAS DE TRANSMISIÓN / 532

4.4 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR / 533

5. CUADRO CLÍNICO / 533

5.1 SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS GENOTIPOS VIRALES / 533

6. DIAGNÓSTICO / 533

7. PROFILAXIS / 533

CAPÍTULO 24.7 OTROS VIRUS QUE FUERON POSTULADOS INICIALMENTE COMO POTENCIALES AGENTES ETIOLÓGICOS DE HEPATITIS

Julieta Trinks - José Raúl Oubiña

1. VIRUS DE LA HEPATITIS FRANCESA (HFV) / 535

2. VIRUS GB TIPO C (GBV-C) / VIRUS HEPATITIS G (HGV) / 535

3. VIRUS TT (TTV) / 535

4. VIRUS SEN (SENV) / 536

CAPÍTULO 25 FIEBRES HEMORRÁGICAS DE ORIGEN VIRAL

Guadalupe Carballal - José Raúl Oubiña

CAPÍTULO 25.1 FAMILIA ARENAVIRIDAE

Guadalupe Carballal - José Raúl Oubiña

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES / 538

1.1 ARENAVIRUS Y SUS RESERVORIOS / 539

1.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y REPLICACIÓN / 539

2. BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DE LA PERSISTENCIA VIRAL / 546

3. ARENAVIRUS DEL NUEVO MUNDO O COMPLEJO TACARIBE / 547

3.1 VIRUS JUNÍN: FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA (FHA) / 547

3.2 VIRUS MACHUPO: FIEBRE HEMORRÁGICA BOLIVIANA / 557

3.3 VIRUS GUANARITO: FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA (FHV) / 557

3.4 VIRUS SABIÁ / 557

3.5 VIRUS CHAPARE / 557

4. ARENAVIRUS DEL VIEJO MUNDO / 558

4.1 VIRUS DE LA CORIOMENINGITIS LINFOCITARIA (LCM, LYMPHOCYTIC CHORIOMENINGITIS VIRUS) / 558

4.2 VIRUS LASSA: FIEBRE HEMORRÁGICA AFRICANA / 558

5. PERSPECTIVAS / 559

CAPÍTULO 25.2 OTRAS FIEBRES HEMORRÁGICAS DE ORIGEN VIRAL

Guadalupe Carballal

1. INTRODUCCIÓN / 560

2. FILOVIRUS: FIEBRES HEMORRÁGICAS POR VIRUS MARBURG Y ÉBOLA / 560

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA FILOVIRIDAE / 560

2.2 TRANSMISIÓN Y CUADROS CLÍNICOS / 560

2.3 EPIDEMIOLOGÍA / 560

2.4 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO / 561

2.5 PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO / 562

3. FIEBRES HEMORRÁGICAS CON COMPROMISO RENAL: HANTAVIRUS / 562

3.1 CARACTERÍSTICAS Y NOCIONES DE EPIDEMIOLOGÍA / 562

3.2 SÍNDROME PULMONAR POR HANTAVIRUS / 562

CAPÍTULO 26 VIRUS DE LA RABIA

Daniel M. Cisterna

1. GENERALIDADES / 565

1.1. CLASIFICACIÓN / 565

1.2. ESTRUCTURA / 565

1.3. REPLICACIÓN / 565

1.4. PROPIEDADES BIOLÓGICAS / 566

1.5. INACTIVACIÓN POR AGENTES QUÍMICOS Y FÍSICOS / 566

2. CUADROS CLÍNICOS / 566

3. PATOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNE / 566

4. EPIDEMIOLOGÍA / 567

4.1. CICLOS DE LA RABIA / 568

5. DIAGNÓSTICO / 568

6. PROFILAXIS PRE-EXPOSICIÓN DE LA RABIA HUMANA / 569

7. PROFILAXIS POST-EXPOSICIÓN / 569

7.1. ACCIONAR LOCAL EN LAS HERIDAS CON POSIBLE EXPOSICIÓN AL VIRUS DE LA RABIA: MEDIDAS RECOMENDADAS EN TODOS LOS CASOS / 570

8. MEDIDAS A EJECUTAR CON EL ANIMAL AGRESOR / 570

9. CONTROL DE LA RABIA ANIMAL / 570

CAPÍTULO 27 VIRUS TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODOS

Marta S. Sabattini

1. DEFINICIÓN / 573

2. CICLOS SILVESTRES / 573

3. CICLOS URBANOS / 573

4. CLASIFICACIÓN / 573

4.1 SEROLÓGICA / 573

4.2 TAXONÓMICA / 574

5. NOMENCLATURA / 575

6. ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES / 575

7. DIAGNÓSTICO Y ENSAYO VIRAL / 575

7.1 DETECCIÓN DE VIRUS / 575

7.2 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS / 577

7.3 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DIAGNÓSTICOS / 578

8. EPIDEMIOLOGÍA / 578

9. PREVENCIÓN Y CONTROL / 579

CAPÍTULO 28 FAMILIA POXVIRIDAE

Guadalupe Carballal - Susana Mersich

1. LOS VIRUS POX QUE PUEDEN INFECTAR AL HOMBRE / 581

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS / 581

1.2 MORFOLOGÍA DE LOS VIRUS POX / 582

1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA / 582

1.4 REPLICACIÓN / 582

1.5 INTERACCIÓN CON LA CÉLULA HOSPEDADORA / 583

2. VIRUELA / 583

2.1 VÍA DE INFECCIÓN Y FORMAS CLÍNICAS / 583

2.2 PATOGENIA / 583

2.3 DIAGNÓSTICO / 583

2.4 TRATAMIENTO / 584

2.5 EPIDEMIOLOGÍA / 584

3. EL ÉXITO DEL PROGRAMA DE ERRADICACIÓN DE LA VIRUELA DEL PLANETA / 584

3.1 VACUNA ANTIVARIÓLICA / 586

3.2 INDICACIONES DE LA VACUNACIÓN ANTIVARIÓLICA / 586

3.3 CONTRAINDICACIONES / 586

4. ELIMINACIÓN DEFINITIVA DE LA ESPECIE VIRUELA / 586

5. CONCEPTOS SOBRE BIOTERRORISMO / 586

6. EL VIRUS VACCINIA COMO VECTOR / 587
7. VIRUS DEL MOLUSCO CONTAGIOSO / 587

CAPÍTULO 29 PAPILOMAVIRUS HUMANOS (HPV)

María Alejandra Picconi - Angélica Teysyá

1. INTRODUCCIÓN / 589
2. TAXONOMÍA / 589
3. TROPISMO / 589
4. ESTRUCTURA / 589
5. CLASIFICACIÓN EN GENOTIPOS / 590
 - 5.1 ¿CUÁNDO SE HABLA DE UN NUEVO TIPO VIRAL? / 590
 - 5.2 TIPOS VIRALES DE ALTO Y DE BAJO RIESGO, ¿CUÁL ES LA DIFERENCIA? / 590
6. CICLO DE REPLICACIÓN DEL HPV. DISTINTOS TIPOS DE INFECCIONES / 590
 - 6.1 INFECCIÓN LATENTE / 590
 - 6.2 INFECCIÓN PRODUCTIVA / 590
7. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGENIA / 591
 - 7.1 LESIONES CUTÁNEAS / 591
 - 7.2 PAPILOMA LARÍNGEO / 591
 - 7.3 LESIONES ANOGENITALES / 592
8. RESPUESTA INMUNE / 593
9. EL HPV EN LA GÉNESIS DEL CÁNCER / 593
10. COFACTORES ASOCIADOS A LA CARCINOGENÉISIS INDUCIDA POR HPV / 594
11. DIAGNÓSTICO DEL HPV EN EL LABORATORIO: ¿CUÁNDO Y CÓMO? / 594
 - 11.1 APLICACIÓN CLÍNICA DE LA DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DEL HPV / 595
 - 11.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR: DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS VIRALES / 595
 - 11.3 SEROLOGÍA / 596
12. PREVENCIÓN Y CONTROL / 597
13. CONCLUSIONES / 597

CAPÍTULO 30 POLIOMAVIRUS: VIRUS BK Y JC

Marcela Echavarría - Guadalupe Carballal

1. INTRODUCCIÓN / 599
 - 1.1 ESTRUCTURA / 599
 - 1.2 GENOMA / 599
 - 1.3 REPLICACIÓN / 599
2. VIRUS BK / 600
 - 2.1 CUADROS CLÍNICOS / 600
 - 2.2 DIAGNÓSTICO / 600
3. VIRUS JC / 601
 - 3.1 CUADROS CLÍNICOS / 601
 - 3.2 DIAGNÓSTICO / 601

CAPÍTULO 31 ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES

María I. Berría

1. INTRODUCCIÓN / 603
2. EETs EN ANIMALES / 603
 - 2.1. OVINA (SCRAPIE) / 603
 - 2.2. BOVINA / 603
3. EETs EN HUMANOS / 604
 - 3.1. ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT-JAKOB / 604
 - 3.2. SÍNDROME DE GERSTMANN-STRAÜSSLER-SCHENKER / 604
 - 3.3. INSOMNIO FAMILIAR FATAL / 604
 - 3.4. ADQUIRIDAS / 604
4. ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA DE LA PrP / 604
5. PATOGENIA DE LA PrP / 605
6. DIAGNÓSTICO / 605
7. PREVENCIÓN DE LA TRANSMISIÓN ACCIDENTAL / 605
 - 7.1. ENFERMEDAD ANIMAL / 605
 - 7.2. ENFERMEDAD HUMANA / 605
8. TRATAMIENTO / 605

PARTE 3: VIROSIS EMERGENTES Y RE-EMERGENTES

CAPÍTULO 32 VIRUS EMERGENTES Y RE-EMERGENTES

Guadalupe Carballal

1. DENGUE / 610
2. INFLUENZA DE ORIGEN AVIARIO CON POTENCIAL PANDEMICO / 610
3. CONCLUSIÓN / 610

CAPÍTULO 33 DENGUE

Delia A. Enría - María A. Morales

1. INTRODUCCIÓN / 615
2. ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN VIRAL / 615
3. EPIDEMIOLOGÍA / 615
 - 3.1. ORIGEN E HISTORIA NATURAL / 615
 - 3.2. SITUACIÓN MUNDIAL / 615
 - 3.3. SITUACIÓN EN ARGENTINA / 616
4. CUADRO CLÍNICO / 616
5. PATOGENIA / 616
6. TRATAMIENTO / 617
7. DIAGNÓSTICO / 617
8. PREVENCIÓN / 618

CAPÍTULO 34 VIRUS DEL NILO OCCIDENTAL (WEST NILE VIRUS)

Delia A. Enría - María A. Morales

1. INTRODUCCIÓN / 619
2. ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN VIRAL / 619
3. EPIDEMIOLOGÍA / 619
4. CUADRO CLÍNICO / 620
5. PATOGENIA / 620
6. DIAGNÓSTICO / 621
7. PROFILAXIS / 621
8. TRATAMIENTO / 621

CAPÍTULO 35 HANTAVIRUS

Delia A. Enría - María E. Lázaro - Silvana del C. Levis

1. INTRODUCCIÓN / 623
2. ESTRUCTURA / 623
3. REPLICACIÓN / 623
4. EPIDEMIOLOGÍA / 623
 - 4.1. HOSPEDADORES RESERVORIOS / 623
 - 4.2. INFECCIÓN EN EL HOMBRE / 624
 - 4.3. SÍNDROME PULMONAR POR HANTAVIRUS (SPH) EN ARGENTINA / 624
5. CUADRO CLÍNICO / 624
 - 5.1. FIEBRE HEMORRÁGICA CON SÍNDROME RENAL / 624
 - 5.2. SÍNDROME PULMONAR POR HANTAVIRUS / 624
6. PATOGENIA / 625
7. TRATAMIENTO / 625
8. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO / 626
9. PROFILAXIS / 626

CAPÍTULO 36 SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO GRAVE

Julieta Trinks - José Raúl Oubiña

1. RESEÑA HISTÓRICA / 627
2. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO / 627
 - 2.1. AISLAMIENTO EN CULTIVOS CELULARES / 627
 - 2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA / 627
 - 2.3. ANÁLISIS MOLECULAR / 627
 - 2.4. ESTRUCTURA DEL GENOMA VIRAL / 628

- 3. PATOGÉNESIS / 628**
 - 3.1. TROPISMO VIRAL Y RECEPTORES CELULARES / 628
 - 3.2. EFECTO CITOPÁTICO VIRAL: ROL DE LAS PROTEÍNAS VIRALES / 629
 - 3.3. RESPUESTA INMUNE / 629
 - 3.4. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA DEL HOSPEDERO / 631
- 4. CUADRO CLÍNICO Y LABORATORIO / 631**
- 5. EPIDEMIOLOGÍA / 632**
 - 5.1. VÍAS DE TRANSMISIÓN / 632
 - 5.2. RESERVORIOS DEL VIRUS / 632
 - 5.3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR / 632
- 6. DIAGNÓSTICO / 633**
 - 6.1. DIAGNÓSTICO DIRECTO / 633
 - 6.2. DIAGNÓSTICO INDIRECTO / 634
- 7. PROFILAXIS / 634**
 - 7.1. MEDIDAS GENERALES DE PREVENCIÓN / 634
 - 7.2. PROFILAXIS ACTIVA / 634
 - 7.3. PROFILAXIS PASIVA (POST-EXPOSICIÓN) / 634
- 8. TRATAMIENTO / 634**
- 9. DESAFÍOS FUTUROS / 635**

PARTE 4: INFECCIONES VIRALES POR SISTEMAS

CAPÍTULO 37 INFECCIONES RESPIRATORIAS EN PEDIATRÍA

Hugo Paganini †

- 1. INTRODUCCIÓN / 639**
- 2. EPIDEMIOLOGÍA / 639**
- 3. AGENTES ETIOLÓGICOS / 639**
- 4. SÍNDROMES CLÍNICOS / 640**
- 5. TRATAMIENTO / 640**
- 6. PREVENCIÓN / 640**

CAPÍTULO 38 INFECCIONES RESPIRATORIAS EN ADULTOS

Pablo Bonvehí

- 1. INTRODUCCIÓN / 643**
- 2. RESFRÍO COMÚN O RINITIS AGUDA / 643**
 - 2.1 PRESENTACIÓN CLÍNICA / 643
 - 2.2 EPIDEMIOLOGÍA Y AGENTES ETIOLÓGICOS / 643
 - 2.3 TRATAMIENTO / 643
 - 2.4 PREVENCIÓN / 643
 - 2.5 COMPLICACIONES / 644
- 3. INFLUENZA / 644**
 - 3.1 PRESENTACIÓN CLÍNICA / 644
 - 3.2 COMPLICACIONES / 644
 - 3.3 TRATAMIENTO ANTIVIRAL / 645
 - 3.4 VACUNACIÓN ANTIGRIPEAL / 645
- 4. OTROS VIRUS RESPIRATORIOS EN ADULTOS / 645**
 - 4.1 CORONAVIRUS / 645
 - 4.2 PARAINFLUENZA / 646
 - 4.3 VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO / 646
 - 4.4 METAPNEUMOVIRUS HUMANO (HMPV) / 646

CAPÍTULO 39 INFECCIONES VIRALES DE PIEL Y MUCOSAS

Elena R. Temporiti

- 1. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN VIRAL EN LA PIEL / 647**
- 2. RESPUESTA INMUNE / 647**
- 3. EXANTEMAS: CLASIFICACIÓN / 647**
 - 3.1 ERUPCIONES MÁCULO-PAPULOSAS DE DISTRIBUCIÓN CENTRAL / 647
 - 3.2 ERUPCIONES MÁCULO-PAPULOSAS DE DISTRIBUCIÓN PERIFÉRICA / 649
 - 3.3 ERUPCIONES VESÍCULO-COSTROSAS / 649
 - 3.4 ERUPCIONES URTICARIANAS / 649

- 3.5 ERUPCIONES PURPÚRICAS / 650
- 3.6 ERUPCIONES PAPULARES Y NODULARES / 650

4. CONCLUSIONES / 650

CAPÍTULO 40 DIAGNÓSTICO DE GASTROENTERITIS VIRALES

Alfredo Martínez

INTRODUCCIÓN / 651

- 1. AGENTES VIRALES PRODUCTORES DE DIARREA / 651**
 - 1.1 DIARREAS EN INMUNOCOMPETENTES / 651
 - 1.2 DIARREAS EN INMUNOCOMPROMETIDOS / 651
 - 1.3 AGENTES VIRALES / 651
- 2. DIAGNÓSTICO DE LAS DIARREAS VIRALES / 651**

CAPÍTULO 41 HEPATITIS VIRALES: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Alfredo Martínez

- 1. INTRODUCCIÓN / 653**
- 2. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN AGUDA / 653**
 - 2.1 HEPATITIS A AGUDA / 653
 - 2.2 HEPATITIS B AGUDA / 653
 - 2.3 HEPATITIS D AGUDA / 654
 - 2.4 INFECCIÓN AGUDA POR HCV / 654
 - 2.5 INFECCIÓN AGUDA POR HEV / 654
- 3. INFECCIÓN PERSISTENTE / 654**
- 4. ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS VIRAL / 654**

CAPÍTULO 42 INFECCIONES GENITOURINARIAS DE ORIGEN VIRAL

Analia Mykietiuik

- 1. INTRODUCCIÓN / 657**
- 2. INFECCIONES GENITALES VIRALES / 657**
 - 2.1 HERPES GENITAL / 657
 - 2.2 PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) / 658
- 3. INFECCIONES URINARIAS DE ORIGEN VIRAL / 659**
 - 3.1. CISTITIS HEMORRÁGICA / 659

CAPÍTULO 43 INFECCIONES VIRALES EN LA EMBARAZADA Y EL RECIÉN NACIDO

Angélica L. Distéfano

- 1. INTRODUCCIÓN / 661**
- 2. FACTORES QUE DETERMINAN LA APARICIÓN Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD EN LA EMBARAZADA Y EL EMBRIÓN O FETO / 661**
- 3. VÍAS DE TRANSMISIÓN / 661**
 - 3.1 INFECCIONES TRANSPLENTARIAS O CONGÉNITAS (ASCENDENTES O NO) / 661
 - 3.2 INFECCIONES PERINATALES / 662
- 4. DIAGNÓSTICO / 662**
 - 4.1 EL DIAGNÓSTICO EN LA EMBARAZADA / 662
 - 4.2 EL DIAGNÓSTICO EN EL RECIÉN NACIDO / 662
- 5. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES VIRALES CONGÉNITAS EN ARGENTINA / 663**
- 6. CONCLUSIONES / 664**

CAPÍTULO 44 INFECCIONES VIRALES TRANSMISIBLES POR VÍA TRANSFUSIONAL

Jorgelina L. Blejer

- 1. INTRODUCCIÓN / 665**
- 2. INFECCIONES POR HBV, HCV Y OTROS VIRUS CAUSANTES DE HEPATITIS / 665**
 - 2.1. VIRUS HEPATITIS B / 665
 - 2.2. VIRUS HEPATITIS C / 665
 - 2.3. OTROS VIRUS CAUSANTES DE HEPATITIS / 666
- 3. INFECCIONES POR RETROVIRUS / 666**

- 3.1. HIV / 666
- 3.2. HTLV- I y II / 666
- 4. **INFECCIONES POR OTROS VIRUS** / 666
 - 4.1. CITOMEGALOVIRUS (CMV) / 666
 - 4.2. PARVOVIRUS B19 / 666
- 5. **INFECCIONES POR VIRUS EMERGENTES** / 666
 - 5.1. VIRUS GB-C (GBV-C) / 666
 - 5.2. TTV / 667
 - 5.3. SEN-V / 667
 - 5.4. HERPESVIRUS HUMANO-8 (HHV-8) / 667
 - 5.5. CORONAVIRUS ASOCIADO AL SARS / 667
 - 5.6. VIRUS DEL OESTE DEL NILO (WEST NILE VIRUS [WNV]) / 667
- 6. **TÉCNICAS PARA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (NAT) EN MEDICINA TRANSFUSIONAL** / 667

CAPÍTULO 45 INFECCIONES VIRALES EN PACIENTES CON INMUNOSUPRESIÓN POST-TRASPLANTE

Laura Barcán - Fabián Herrera

- 1. **INTRODUCCIÓN** / 669
 - 1.1 INFECCIONES EN TRASPLANTES DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS (TCPH) / 669
 - 1.2 INFECCIONES EN TRASPLANTES DE ÓRGANO SÓLIDO (TOS) / 669
- 2. **CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV)** / 669
 - 2.1 TCPH / 669
 - 2.2 TOS / 670
- 3. **VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV)** / 671
 - 3.1. TCPH / 671
 - 3.2 TOS / 672
- 4. **VIRUS HERPES SIMPLEX (HSV)** / 672
 - 4.1. TCPH / 672
 - 4.2. TOS / 673
- 5. **VIRUS VARICELA-ZÓSTER (VZV)** / 673
 - 5.1. TCPH / 673
 - 5.2 TOS / 673
- 6. **HERPESVIRUS HUMANO 6 (HHV-6)** / 673
 - 6.1. TCPH / 673
 - 6.2 TOS / 674
- 7. **HERPESVIRUS HUMANO 7 (HHV-7)** / 674
- 8. **HERPESVIRUS HUMANO 8 (HHV-8)** / 674
- 9. **VIRUS RESPIRATORIOS** / 674
 - 9.1 TCPH / 674
 - 9.2 TOS / 675
- 10. **VIRUS HEPATITIS B (HBV)** / 676
 - 10.1. TCPH / 676
 - 10.2 TOS / 676
- 11. **VIRUS HEPATITIS C (HCV)** / 676
 - 11.1 TPCH / 676
 - 11.2 TOS / 677
- 12. **OTROS VIRUS** / 677
 - 12.1 VIRUS BK / 677
 - 12.2 VIRUS JC / 677
 - 12.3 PARVOVIRUS B19 / 678
 - 12.4 ADENOVIRUS / 678

CAPÍTULO 46 INFECCIONES VIRALES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL / 679

Jorge A. Benetucci - Marcelo Corti

CAPÍTULO 47 INFECCIONES OPORTUNISTAS VIRALES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD HIV/SIDA

Jorge A. Benetucci - Marcelo Corti

- 1. **CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV)** / 683
 - 1.1 ENFERMEDAD OCULAR / 683
 - 1.2 ENFERMEDAD GASTROINTESTINAL / 683
 - 1.3 ENFERMEDAD NEUROLÓGICA / 683

- 2. **HERPES SIMPLEX (HSV)** / 683
 - 2.1 ENFERMEDAD OCULAR / 683
 - 2.2 ENFERMEDAD MUCOCUTÁNEA / 684
 - 2.3 ENFERMEDAD NEUROLÓGICA / 684
 - 2.4 ENFERMEDAD GASTROINTESTINAL / 684
- 3. **VIRUS VARICELA-ZÓSTER (VZV)** / 684
 - 3.1 ENFERMEDAD OCULAR / 684
 - 3.2 ENFERMEDAD NEUROLÓGICA / 684
 - 3.3 ENFERMEDAD CUTÁNEA / 684
- 4. **POLIOMAVIRUS JC** / 684
 - 4.1 LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA (LEMP) / 684
- 5. **VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV)** / 685
 - 5.1 LEUCOPLASIA ORAL VELLOSA / 685
 - 5.2 LINFOMAS PRIMARIOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (LPSNC) / 685
- 6. **VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV)** / 685

PARTE 5: PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES VIRALES

CAPÍTULO 48 VACUNAS VIRALES

Guadalupe Carballal - José Raúl Oubiña

INTRODUCCIÓN / 689

- 1. **ASPECTOS HISTÓRICOS** / 690
- 2. **FACTORES ESENCIALES A CONSIDERAR EN LA PREPARACIÓN DE VACUNAS** / 690
 - 2.1 INDUCCIÓN DE INMUNIDAD CON LOS DIFERENTES TIPOS DE VACUNAS / 691
 - 2.2 DESARROLLO DE MODELOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN / 691
 - 2.3 CEPA VIRAL / 691
 - 2.4 SUSTRATO / 692
 - 2.5 MÉTODOS DE INACTIVACIÓN Y DE ATENUACIÓN / 692
 - 2.6 BASES GENÉTICAS DE LA ATENUACIÓN / 694
 - 2.7 PURIFICACIÓN / 694
 - 2.8 EL USO DE ADYUVANTES PARA AUMENTAR LA INMUNOGENICIDAD / 694
- 3. **BENEFICIOS VERSUS RIESGOS EN LA VACUNACIÓN** / 695
- 4. **VACUNAS A VIRUS INACTIVADO** / 695
 - 4.1 A VIRUS COMPLETO / 695
 - 4.2 VACUNAS INACTIVADAS CON FRACCIÓN ANTIGÉNICA, A SUBUNIDADES Y VLPs / 696
 - VLPs (Virus Like Particles) / 697
 - 4.3 ETAPAS EN LA PREPARACIÓN DE UNA VACUNA A VIRUS INACTIVADO / 698
- 5. **VACUNAS A VIRUS VIVO Y ATENUADO** / 698
 - VENTAJAS / 698
 - DESVENTAJAS / 698
 - 5.1 ETAPAS EN LA OBTENCIÓN DE VACUNAS A VIRUS VIVO Y ATENUADO / 699
- 6. **VACUNAS DE USO ACTUAL EN ADULTOS Y NIÑOS: CALENDARIO OFICIAL DE VACUNACIÓN EN ARGENTINA** / 699
 - VACUNAS OBLIGATORIAS PARA NIÑOS, SEGÚN EL CALENDARIO OFICIAL DE VACUNACIÓN EN ARGENTINA Y OTRAS VACUNAS NO OBLIGATORIAS / 699
- 7. **PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO** / 700
 - 7.1 EL POTENCIAL USO DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS (ODN) CON ISLAS CpG / 700
 - 7.2 VACUNAS A DNA / 700
 - 7.3 VACUNAS A VIRUS RECOMBINANTES / 703
 - 7.4 PLANTAS TRANSGÉNICAS / 705
 - 7.5 NUEVAS APROXIMACIONES PARA LA ATENUACIÓN VIRAL / 705
 - 7.6 CONCLUSIONES / 705

CAPÍTULO 49 AGENTES ANTIVIRALES

Elsa B. Damonte - Susana E. Mersich

1. **INTRODUCCIÓN** / 707
2. **ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO Y LA APROBACIÓN DE UNA DROGA ANTIVIRAL** / 707
3. **PROBABLES BLANCOS DE ATAQUE POR ANTIVIRALES EN EL CICLO DE MULTIPLICACIÓN VIRAL** / 708
4. **PRINCIPALES ANTIVIRALES EN USO CLÍNICO** / 709
 - 4.1 **INFECCIONES POR HERPESVIRUS** / 709
 - 4.2 **HEPATITIS VIRALES** / 712
 - 4.3 **INFECCIONES RESPIRATORIAS** / 713
5. **PERSPECTIVAS FUTURAS: APLICACIÓN DE LA GENÓMICA PARA EL DISEÑO DE ANTIVIRALES** / 714

CAPÍTULO 50 INTRODUCCIÓN AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL Y RESISTENCIA EN LA INFECCIÓN POR HIV-1

Mauricio G. Carobene - Horacio Salomón

1. **TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL** / 717
 - 1.1 **INHIBIDORES DE LA ENTRADA Y LA FUSIÓN (FIs)** / 717
 - 1.2 **INHIBIDORES NUCLEOSÍDICOS DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA (NRTIs, NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS)** / 717
 - 1.3 **INHIBIDORES NUCLEOTÍDICOS DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA** / 717
 - 1.4 **INHIBIDORES NO NUCLEOSÍDICOS DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA (NNRTIs, NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS)** / 717
 - 1.5 **INHIBIDORES DE LA INTEGRASA VIRAL (INs, INTEGRASE INHIBITORS)** / 718
 - 1.6 **INHIBIDORES DE LA ENTRADA VIRAL (EIs, ENTRY INHIBITORS)** / 718
 - 1.7 **INHIBIDORES DE LA MADURACIÓN VIRAL (MIs, MATURATION INHIBITORS)** / 718
 - 1.8 **INHIBIDORES DE LA PROTEASA VIRAL (PIs, PROTEASE INHIBITORS)** / 718
 - 1.9 **TRATAMIENTOS COMBINADOS** / 718
2. **VARIABILIDAD DEL HIV** / 718
 - 2.1 **MUTACIÓN** / 718
 - 2.2 **INSERCIÓNES Y DELECCIONES** / 718
 - 2.3 **RECOMBINACIÓN** / 719
3. **CUASIESPECIES Y RESISTENCIA A DROGAS. CONCEPTO DE FITNESS VIRAL** / 719
4. **RESISTENCIA A DROGAS ANTIRRETROVIRALES** / 719
 - 4.1 **GENOTIPO Y FENOTIPO** / 719
 - 4.2 **MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL HIV-1 A DROGAS ANTIRRETROVIRALES** / 719
 - 4.3 **FENÓMENOS ASOCIADOS A LA RESISTENCIA** / 720
 - 4.4 **MUTACIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES** / 720
5. **ENSAYOS DE RESISTENCIA DEL HIV-1 A DROGAS ANTIRRETROVIRALES** / 720
 - 5.1 **ENSAYOS FENOTÍPICOS** / 720
 - 5.2 **ENSAYOS GENOTÍPICOS** / 721
 - 5.3 **PROBLEMAS INHERENTES A LOS SISTEMAS DE GENOTIPIFICACIÓN** / 721
 - 5.4 **ENSAYOS GENOTÍPICOS VERSUS FENOTÍPICOS PARA EL ESTUDIO DE LA RESISTENCIA** / 722
6. **LA RESISTENCIA DEL HIV-1 A ANTIRRETROVIRALES COMO CAUSA DE FALLA AL TRATAMIENTO** / 722
7. **GENOTIPO/FENOTIPO VIRAL E IMPLEMENTACIÓN DE TRATAMIENTO** / 722
8. **CONCLUSIONES** / 723

CAPÍTULO 51 VIROLOGÍA AMBIENTAL: VIRUS TRANSMITIDOS POR AGUA Y ALIMENTOS

María Susana López de Caillou

1. **AGUA: RECURSO ESTRATÉGICO DEL SIGLO XXI** / 725
2. **VIRUS TRANSMITIDOS POR AGUA Y ALIMENTOS** / 725
3. **CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS EN MUESTRAS AMBIENTALES** / 726

4. **VIABILIDAD DE LOS VIRUS ENTÉRICOS** / 726
5. **MÉTODOS PARA CONCENTRAR VIRUS ENTÉRICOS** / 726
6. **EPIDEMIOLOGÍA DE ENFERMEDADES VIRALES TRANSMITIDAS POR AGUA Y ALIMENTOS** / 726
7. **CONTROL DE VIRUS ENTÉRICOS EN AGUA Y ALIMENTOS** / 727
8. **PERSPECTIVAS** / 727

PARTE 6: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ALGUNAS INFECCIONES VIRALES EN ARGENTINA

CAPÍTULO 52 EVOLUCIÓN VIRAL

Rodolfo H. Campos - Viviana Mbayed

1. **INTRODUCCIÓN** / 731
2. **MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE LOS VIRUS** / 731
3. **EL PROCESO EVOLUTIVO** / 733
4. **LOS VIRUS Y SU ENTORNO. PRESIONES SELECTIVAS** / 734
5. **RESPUESTA DE LOS VIRUS A LAS PRESIONES DEL ENTORNO** / 734
6. **GENERACIÓN DE HETEROGENEIDAD VIRAL** / 734
 - 6.1. **MUTACIÓN** / 734
 - 6.2. **REASOCIACIÓN EN GENOMAS FRAGMENTADOS** / 735
 - 6.3. **RECOMBINACIÓN** / 735
7. **LIMITACIONES DEL PROCESO EVOLUTIVO VIRAL** / 736
8. **COEVOLUCIÓN HOSPEDADOR-PARÁSITO** / 736
9. **ORIGEN DE LOS VIRUS: TEORÍAS** / 737
10. **CONCLUSIONES FINALES** / 737

CAPÍTULO 53 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS SINICIAL RESPIRATORIO EN ARGENTINA

Mónica Galiano - Alfonsina Trento - Cristina Videla

CAPÍTULO 54 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL METAPNEUMOVIRUS HUMANO

Mónica Galiano - Alfonsina Trento - Cristina Videla

CAPÍTULO 55 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS POR ADENOVIRUS

Adriana E. Kajon

1. **INTRODUCCIÓN** / 745
2. **GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN** / 745
3. **ENSAYOS MOLECULARES PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIE Y SEROTIPO DE CEPAS DE ADENOVIRUS** / 745
4. **EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA BAJA EN HOSPITALES DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES Y ALREDEDORES** / 746

CAPÍTULO 56 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE HANTAVIRUS

Paula J. Padula

PARTE 7: BIOSEGURIDAD

CAPÍTULO 57 BIOSEGURIDAD EN LA PRÁCTICA BIOMÉDICA Y EN EL LABORATORIO

Liliana Martínez Peralta

1. **INTRODUCCIÓN** / 753
2. **PRINCIPIOS DE BIOSEGURIDAD** / 753

- 2.1 BARRERAS PRIMARIAS: PRÁCTICAS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO / 754
- 2.2 BARRERAS PRIMARIAS: EQUIPO DE SEGURIDAD / 754
- 2.3 BARRERAS SECUNDARIAS: DISEÑO DE LAS INSTALACIONES / 755
- 3. NIVELES DE BIOSEGURIDAD / 755
 - 3.1. NIVEL 1 (BSL 1) / 755
 - 3.2. NIVEL 2 (BSL 2) / 755
 - 3.3. NIVEL 3 (BSL 3) / 756
 - 3.4. NIVEL 4 (BSL 4) / 757
 - 3.5. BIOTERIOS DE ANIMALES / 757
- 4. INMUNIZACIÓN Y TRATAMIENTO DEL PERSONAL / 757

PARTE 8: NUEVOS VIRUS RESPIRATORIOS EMERGENTES INCLUYENDO EL VIRUS DE LA INFLUENZA PANDEMICA H1N1 (2009)

CAPÍTULO 58 VIRUS RESPIRATORIOS EMERGENTES Y EL NUEVO IMPACTO DE LOS RINOVIRUS POR MEDIO DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Guadalupe Carballal - Débora N. Marcone - Cristina M. Videla

INTRODUCCIÓN / 761

- 1. Los nuevos parvovirus humanos / 761
 - 1.1. EL DESCUBRIMIENTO DEL BOCAVIRUS HUMANO (HBoV) / 761
 - 1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA PARVOVIRIDAE Y LA INCLUSIÓN DEL HBoV EN ELLA / 762
- 2. Bocavirus humano (HBoV) / 762
 - 2.1 FRECUENCIA Y CUADROS CLÍNICOS / 762
 - 2.2 HBoV Y DIARREA: ¿UN NUEVO PATÓGENO ENTÉRICO? / 763
 - 2.3 DIAGNÓSTICO / 763
 - 2.4 CONCLUSIONES / 763
- 3. PARV4: ¿UN NUEVO VIRUS EMERGENTE DE PROBABLE TRANSMISIÓN POR SANGRE? / 764
- 4. CORONAVIRUS / 764
 - 4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA CORONAVIRIDAE / 764
 - 4.2 CORONAVIRUS CLÁSICOS / 764
 - 4.3 LOS NUEVOS CORONAVIRUS RESPIRATORIOS / 764
- 5. POLIOMAVIRUS RESPIRATORIOS: KI Y WU / 765
- 6. RINOVIRUS / 765
 - 6.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS RINOVIRUS / 765
 - 6.2 CUADROS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLOGÍA / 766
 - 6.3 PATOGENIA DE LOS RINOVIRUS / 766
 - 6.4 DIAGNÓSTICO / 767
 - 6.5 EL NUEVO IMPACTO DE LOS RINOVIRUS EN LAS IRA ALTAS Y BAJAS EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA POR MEDIO DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR / 768
 - 6.6 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN / 768
 - 6.7 CONCLUSIONES / 768

CAPÍTULO 59 LOS COMIENZOS DE LA PANDEMIA POR UNA NUEVA CEPA DE INFLUENZA A (H1N1), 2009

Guadalupe Carballal - Débora Marcone - Osvaldo Uez

- 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS INFLUENZA A Y EL POTENCIAL PANDEMICO DE LAS CEPAS DE INFLUENZA AVIAR / 771
 - 1.1. LAS PANDEMIAS DEL SIGLO XX / 771
- 2. LOS INICIOS DE LA PANDEMIA POR EL NUEVO VIRUS INFLUENZA A (H1N1) / 771

- 3. FASES DE ALERTA DE PANDEMIA: DEFINICIONES / 772
- 4. EL VIRUS: SU NOMBRE Y PATOGENESIS / 772
 - 4.1. PATOGENESIS / 772
- 5. TRANSMISIÓN VIRAL Y PERÍODO DE CONTAGIO / 774
 - 5.1 PERÍODO DE CONTAGIO / 774
- 6. CUADRO CLÍNICO Y DEFINICIONES / 774
 - 6.1 DEFINICIONES DE CASO PROBABLE, SOSPECHOSO Y CONFIRMADO / 774
 - 6.2 DEFINICIONES DE CASO PARA INFLUENZA A (H1N1) / 774
- 7. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO / 775
 - 7.1. MUESTRAS RESPIRATORIAS / 775
 - 7.2 PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN / 775
 - 7.3 ALMACENAMIENTO Y ENVÍO DE MUESTRAS EN CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD / 775
 - 7.4 INSUMOS PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS / 776
- 8. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO: METODOLOGÍA / 776
 - 8.1 DETECCIÓN DEL RNA VIRAL POR RT-PCR EN TIEMPO REAL / 776
 - 8.2 AISLAMIENTO EN CULTIVO / 776
 - 8.3 DETECCIÓN DE ANTÍGENO VIRAL POR INMUNOFLORESCENCIA U OTROS MÉTODOS RÁPIDOS / 776
- 9. NOCIONES DE TRATAMIENTO / 777
 - 9.1 RESISTENCIA A ANTIVIRALES / 777
- 10. PREVENCIÓN / 777
- 11. DATOS INICIALES DEL NUEVO VIRUS INFLUENZA A H1N1 EN ARGENTINA / 777

CAPÍTULO 59.1 VACUNAS PARA EL VIRUS DE INFLUENZA PANDEMICA A H1N1, 2009

Débora N. Marcone, Guadalupe Carballal

INFLUENZA PANDEMICA / 782

- 1. DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA INFLUENZA PANDEMICA / 782
 - 1.1 OBJETIVOS DE LA CAMPAÑA NACIONAL DE VACUNACIÓN 2010 EN ARGENTINA / 782
 - 1.2 INDICACIONES DE LA VACUNACIÓN CONTRA INFLUENZA PANDEMICA DURANTE EL AÑO 2010 / 783
 - 1.3 INDICACIONES DE LA VACUNACIÓN CONTRA INFLUENZA A PARTIR DEL AÑO 2011 / 783
- 2. VACUNA MONOVALENTE INACTIVADA PARA GRIPE PANDEMICA / 783
 - 2.1 COMPOSICIÓN / 783
 - 2.2 DOSIS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN / 783
 - 2.3 CONSIDERACIONES PARA EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA / 784
 - 2.4 CONSERVACIÓN, PRESENTACIÓN Y VACUNACIÓN SEGURA / 784
 - 2.5 CONTRAINDICACIONES PARA LA VACUNACIÓN / 784
- 3. VACUNA TRIVALENTE PARA GRIPE PANDEMICA / 784
 - 3.1 COMPOSICIÓN / 784
 - 3.2 PRESENTACIÓN, DOSIS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN / 784
- 4. VACUNA INTRANASAL A VIRUS VIVO Y ATENUADO / 784
- 5. EFICACIA Y SEGURIDAD DE LAS VACUNAS PARA INFLUENZA / 784
 - 5.1 EFICACIA / 784
 - 5.2 VACUNACIÓN SEGURA / 784
- 6. VIGILANCIA Y NOTIFICACIÓN DE EFECTOS ADVERSOS SUPUESTAMENTE ATRIBUIDOS A VACUNACIÓN (ESAVI) / 785
 - 6.1 VIGILANCIA Y NOTIFICACIÓN / 785
 - 6.2 CLASIFICACIÓN / 785
 - 6.3 ESAVI EN RELACIÓN A VACUNAS INACTIVADAS PARA GRIPE PANDEMICA / 785
 - 6.4 ESAVI NOTIFICADOS EN RELACIÓN A LA VACUNA ANTI-INFLUENZA / 785
- 7. CONCLUSIÓN / 785

Todo tiene su belleza, pero no todos pueden verla.

Confucio

PRÓLOGO

Dado el éxito editorial de la 1ª edición de *Virología Médica*, publicada en 1991 por Editorial El Ateneo, debimos actualizar este libro en 1996 (2ª edición) y –nuevamente– en 1998 (3ª edición). Este texto fue de utilidad para miles de estudiantes de grado de las carreras de Medicina, Bioquímica y Biología en Argentina, así como en muchos otros países de América Latina. A nivel posgrado, fue consultado por médicos clínicos, pediatras e infectólogos.

Las infecciones virales son una de las más importantes causas de enfermedad humana en la actualidad. Hasta hace pocas décadas los virus estaban relegados en la práctica médica debido a las dificultades inherentes a su diagnóstico y a la ausencia de tratamientos específicos. Estos dos factores se modificaron sustancialmente. En la actualidad, es posible el diagnóstico rápido y preciso de numerosos virus, para varios de los cuales existen tratamientos efectivos, cuyo éxito debe ser monitoreado.

En los últimos años, la expansión de la Virología Médica ha sido vertiginosa. Se descubrieron nuevos virus (bocavirus, metapneumovirus humano, entre otros), se produjeron casos humanos asociados a la emergencia de nuevos virus (coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo grave, influenza A/H5N1 asociado a la gripe aviaria, etc.). En el 2009, se registró una pandemia por un nuevo virus influenza A/H1N1, se detectó la re-emergencia de algunos virus que se creían erradicados en Argentina (los agentes de la fiebre amarilla y el dengue); se profundizó el estudio de los genomas virales y de su epidemiología molecular; se avanzó en el conocimiento de los mecanismos patogénicos moleculares y de la interacción virus-hospedador; se desarrollaron nuevos métodos moleculares de exquisita sensibilidad y especificidad que hoy resultan imprescindibles en el diagnóstico y en el monitoreo de tratamientos antivirales de las infecciones por HIV, virus hepatitis B, virus hepatitis C y citomegalovirus humano; se desarrollaron nuevos antivirales y nuevas vacunas con procedimientos totalmente innovadores, como las desarrolladas para prevenir las diarreas por rotavirus y el cáncer por algunos tipos genómicos de papilomavirus humanos.

Estos avances, así como los registrados en las áreas de Inmunología y Biología Molecular en relación a la Virología, nos condujeron a escribir esta nueva edición de *Virología Médica* con el objetivo de ofrecer información actualizada sobre diagnóstico, patogenia y prevención de las enfermedades virales.

El diseño de este texto ha sido totalmente reestructurado, y se añadieron capítulos sobre Infecciones Virales por sistemas, virosis emergentes y re-emergentes y profilaxis y tratamiento de las infecciones virales.

Deseamos que esta obra permita a cada alumno descubrir un mundo fascinante por el que prohombres de la talla de Louis Pasteur y muchos sabios de nuestro tiempo dedicaron su vida y nos legaron su entusiasmo.

Finalmente, queremos agradecer el valiosísimo aporte de todos los coautores que colaboraron en la redacción de diferentes capítulos, entregando lo mejor de sí mismos. Deseamos también dar gracias a nuestros Maestros por permitirnos conocer sus indelebles huellas, a los alumnos de grado y posgrado que con sus preguntas nos obligaron a estudiar e investigar para acercarnos juntos a la verdad y, muy especialmente, a Ma. Belén Kisielnicki y a Juan Simón Saavedra diseñadores de *Corpus Editorial*, quienes realizaron una excelente labor.

PRÓLOGO

En primer lugar deseo agradecer a los autores por haberme brindado el honor y el placer de redactar el prólogo de la cuarta edición de este libro. La solicitud de escribirlo, además de ser un indicador de estima, me llevó a recordar las amables conversaciones, el intercambio de ideas y las interesantes discusiones científicas con los profesores Guadalupe Carballal y José Raúl Oubiña, así como con otros investigadores y docentes, lo cual constituyó una de mis grandes satisfacciones en el quehacer de la investigación. En el transcurrir de las mismas en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y durante muchos años, surgieron ideas que luego evolucionaron a proyectos de investigación sobre diversas enfermedades virales de gran importancia en la salud pública de la Argentina, tales como la fiebre hemorrágica argentina, las infecciones respiratorias agudas, las infecciones por hantavirus, las hepatitis virales y el HIV/SIDA. Durante décadas, con bastante esfuerzo y dedicación se implementaron diversas líneas de investigación focalizadas en las enfermedades virales mencionadas, cuyos resultados luego se plasmaron en numerosas publicaciones científicas en colaboración y, en algunas áreas, los conocimientos obtenidos sentaron las bases científicas para su utilización en el campo de la salud en la Argentina.

En 1991 los profesores Guadalupe Carballal y José Raúl Oubiña identificaron la necesidad de recopilar y hacer accesible en un solo libro y con un enfoque integrado, el material científico existente relacionado a todas las enfermedades virales humanas. Ellos sabían que no hay esfuerzo más rentable que la calidad en la capacitación y formación médica. Así nació la primera edición de *Virología médica* cuyos destinatarios preferenciales fueron los estudiantes de ciencias médicas y los profesionales del equipo de salud.

Transcurridos cinco años, los autores consideraron indispensable actualizar esta obra en una segunda edición debido a la numerosa información científica que surgió en el período, lo que también los motivó para ampliar sustancialmente *Virología médica* en una tercera edición publicada en 1998.

Años más tarde, debido a la avalancha de nuevos conocimientos científicos y creativos desarrollos tecnológicos, así como a la creciente emergencia y diseminación de nuevas enfermedades virales humanas, se tornó imprescindible la realización de la cuarta edición de *Virología Médica*. Ésta surgió como en las ediciones previas, gracias al conocimiento, esfuerzo, compromiso y dedicación de los coautores de los distintos capítulos. En muchos capítulos, destacados virólogos profesionales del área de la medicina, química, biología o bioquímica, contribuyeron directamente al progreso científico en su área de trabajo a través de sus propias investigaciones. La mayoría de los capítulos tiene un enfoque interdisciplinario del tema desde los aspectos básicos de la virología y de la terapia antiviral hasta la etiopatogenia de la enfermedad, aspectos relevantes de clínica, epidemiología, prevención y fundamentalmente del diagnóstico de laboratorio.

Creo que los autores tuvieron un objetivo ambicioso al crear esta edición de *Virología médica* y sin duda lo han alcanzado. Consiguieron describir de un modo claro y didáctico el complejo mundo de las infecciones virales humanas expresado en un sencillo lenguaje científico, lo cual revela un profundo conocimiento y calidad docente para transmitirlo.

Han sabido seleccionar y agrupar los temas de manera llevadera sin excesiva sistematización, como se vislumbra al hojear las páginas del índice y se corrobora durante el avance en la lectura del contenido. Todo esto permite agilizar la lectura, una mejor comprensión del texto, coordinar el conocimiento y apreciarlo como conjunto.

En esta edición se incorporan nuevos capítulos y se realiza una importante modificación y ampliación de otros en relación con la edición anterior. Su contenido de alrededor de 800 páginas está distribuido didácticamente en 8 partes y 59 capítulos que abarcan las áreas más relevantes de la virología médica. El espacio asignado a las diversas áreas del texto está perfectamente relacionado a la importancia que las mismas tienen en la salud humana. En la Parte 1 se ofrece una descripción general de la replicación y genética viral, patogenia de las infecciones virales, mecanismos de defensa del hospedador, conceptos sobre epidemiología de las infecciones virales y diagnóstico virológico, que incluye el aseguramiento y control de la calidad del mismo. La Parte 2 describe en forma exhaustiva todos los virus de interés médico y para cada uno de ellos se especifican las características del virus, su forma de trasmisión, patogenia, cuadro clínico, diagnóstico, tratamiento y prevención. Un aspecto valioso e interesante fue la inclusión de la epidemiología de las enfermedades virales en la Argentina. En la Parte 3 se tratan específicamente las enfermedades virales emergentes y re-emergentes, área de gran importancia actual y futura por su impacto en la salud pública. En la Parte 4 se describen las infecciones virales agrupadas por sistemas, las infecciones de las embarazadas y recién nacidos, las trasmisibles por vía transfusional y las infecciones virales prevalentes en pacientes inmunosuprimidos. Esta agrupación, sin duda, brindará al lector un conocimiento útil para el diagnóstico diferencial de dichas infecciones virales. En la Parte 5 se describen diferentes tipos de vacunas virales en uso y las perspectivas para la elaboración de futuras vacunas con tecnologías innovadoras. Se profundiza en el área de las drogas antivirales y los mecanismos de resistencia a las mismas, así como las herramientas disponibles para detectar dicha resistencia y optimizar la terapia.

Las Partes 6, 7 y 8, contienen capítulos que enfocan la epidemiología molecular de algunas infecciones virales en la Argentina y la bioseguridad en la práctica biomédica así como en el laboratorio. El último de estos capítulos está dedicado a los nuevos virus respiratorios emergentes, tema de gran relevancia actual.

En las últimas décadas se pudo observar la aparición de nuevas epidemias virales sin antecedentes históricos y también un sorprendente salto al pasado debido a la reaparición de viejas enfermedades epidémicas.

En los distintos capítulos se describen los notables cambios observados en la historia natural de las enfermedades virales humanas en el mundo. A través de vacunas eficaces se logró erradicar la viruela y controlar otras enfermedades virales, tales como el sarampión,

la poliomielitis y la rubéola. Surgieron enfermedades virales oportunistas para el ser humano, como consecuencia del incremento de la inmunosupresión por diversas causas. Emergieron nuevas enfermedades epidémicas ocasionadas por virus desconocidas hasta ese momento como el de la inmunodeficiencia humana, los hantavirus o los arenavirus que recibieron el nombre de enfermedades emergentes. Finalmente, algunas enfermedades como el dengue o la fiebre amarilla recrudescieron después de haber disminuido significativamente y fueron llamadas enfermedades re-emergentes.

La frecuente aparición y la rápida diseminación de algunas enfermedades emergentes o re-emergentes, se pueden atribuir entre otras causas, a actividades humanas tales como la deforestación, la construcción de represas, las dislocaciones en la estructura social, el incremento de los viajes que se realizan cada vez con mayor rapidez y llegan a una mayor cantidad de destinos. El intercambio global y creciente de personas, animales y productos de consumo, induce también a la globalización de las enfermedades infecciosas al favorecer un más rápido y eficiente contacto entre el ser humano y los agentes patógenos que producen enfermedades. También influenciado por las actividades del ser humano, el cambio climático con sus consecuentes sequías, deshielos e inundaciones, entre otros factores, se incluye entre las causas que pueden originar la emergencia de nuevas enfermedades.

Los autores desarrollaron y entrelazaron en varios capítulos el tema de las enfermedades virales emergentes y reemergentes, las cuales se convirtieron en uno de los mayores desafíos a enfrentar ahora y en el futuro inmediato.

Se destaca la relevancia de la investigación científica para el control de estas nuevas infecciones virales y se enfatiza que la rápida detección de la aparición de las enfermedades emergentes y de sus agentes etiológicos, así como de los aspectos clínicos y epidemiológicos son de vital importancia para el posterior desarrollo de herramientas de diagnóstico, prevención y tratamiento de las mismas. Esto dependerá tanto de la eficacia y celeridad de las investigaciones como de la eficacia y celeridad con que el sistema de salud utilice los resultados obtenidos.

Para resumir, la madre naturaleza, muchas veces ayudada por errores humanos, nos proporciona cíclicamente organismos patógenos peligrosos, pero también nos provee de científicos habilitados para descubrirlos y controlarlos.

Creo que el propósito de los autores al proyectar y escribir esta edición fue entrelazar los aspectos básicos y médicos de la virología humana que en primer lugar sea útil para estudiantes de medicina y de las ciencias relacionadas y que sea utilizado como libro de referencia por graduados de las diferentes profesiones que integran el equipo de salud. Así, los médicos residentes, clínicos, infectólogos, sanitaristas y otras especialidades médicas, profesionales que realizan atención primaria de la salud y aquellos involucrados en el diagnóstico de laboratorio de enfermedades virales, así como investigadores científicos, pueden ser receptores naturales de esta obra. También podría ser utilizada como complemento científico global por el personal técnico en sectores específicos del amplio espectro de la virología médica.

Estamos viviendo una maravillosa era de desarrollo científico y tecnológico inigualado y de un crecimiento exponencial en el conocimiento básico de los virus que causan enfermedades humanas. La biotecnología, a través de la biología molecular, la ingeniería genética, la recombinación del DNA, incrementa día a día su relevancia en los arrolladores avances médicos en general y en virología médica en especial. A través de la ingeniería genética se obtienen organismos vivos capaces de producir antígenos para la elaboración de vacunas preventivas de diversas enfermedades virales, antígenos o anticuerpos para las pruebas de diagnóstico, así como agentes terapéuticos. Es decir, el desarrollo biotecnológico se vertió en un amplio espectro de innovaciones prácticas para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades virales, lo cual ha sido incluido en forma muy representativa en los capítulos de la presente edición. Los coautores de los mismos supieron traducir, resumir y transmitir la información basada en la evidencia científica, necesaria para la compilación de la presente obra.

La información metodológica esencial en la práctica médica, presentada de manera clara y científica, facilitará al profesional el diagnóstico de las enfermedades virales, especialmente en lo vinculado a las pruebas de laboratorio y a la interpretación clínica de las mismas. Sabemos que el conocimiento etiológico de la enfermedad es el elemento clave para la consiguiente orientación terapéutica.

Las tablas y figuras que acompañan al texto en casi todas sus páginas y que evidentemente fueron objeto de una cuidadosa elaboración y selección, facilitarán notablemente la comprensión del contenido. Todos los capítulos incluyen una seleccionada bibliografía con artículos de referencia que permitirá al lector estudioso ahondar en los temas de su interés.

Los coautores de los capítulos de esta nueva edición, son todos especialistas en el tema, profesores o investigadores que escribieron esta obra con amplitud y profundidad y de manera concisa y didáctica que se corresponde con su amplio conocimiento y experiencia cotidiana en el campo de la virología médica, ya sea en el ámbito asistencial, docente o de investigación.

Gracias al esfuerzo concertado y espíritu de cooperación de quienes participaron en esta cuarta edición se logró consolidar esta obra que seguramente contribuirá a la capacitación y formación de sus destinatarios preferenciales: estudiantes y profesionales que busquen una fuente asequible de información general y abarcadora, pero a la vez focalizada en detalles necesarios para una más profunda comprensión de algunos temas en el diverso y complejo mundo de las enfermedades virales humanas.

Las distintas ediciones de este libro de texto tuvieron la virtud de captar a través de sus autores el conocimiento del tema en un período determinado. En un área cambiante y de rápida evolución como la virología médica, quiero advertir para preparar a los coautores de los diversos capítulos, que no es difícil predecir que se verán obligados a actualizar esta obra con nuevas ediciones a intervalos cada vez más cortos, es casi decir, que sin descanso tendrían que ir disponiendo permanentemente para la próxima edición, los numerosos cambios científicos y tecnológicos que se producirán en el tema.

A pesar de la persistencia por siglos de algunas virosis humanas y de la aparición de graves epidemias de enfermedades virales emergentes y reemergentes se están encontrando diversos caminos hacia respuestas adecuadas para el control tanto de las viejas como de las nuevas enfermedades virales humanas. Estoy convencida que este libro es un ladrillo más que ayuda a construir el camino hacia esa respuesta.

Vaya al equipo de coautores de los capítulos de esta obra, coordinados por los profesores Guadalupe Carballal y José Raúl Oubiña, mi profundo aprecio, admiración y respeto.

**Iniciación a la Virología Médica:
Aspectos Generales**

Introducción al estudio de la Virología humana

Guadalupe Carballal

1. EL DESARROLLO DE LA VIROLOGÍA COMO CIENCIA

Las enfermedades virales son una de las causas más frecuentes de morbilidad en humanos. Los virus pueden afectar a todos los seres vivos incluyendo animales, vegetales, hongos y bacterias. La Virología es una ciencia más joven que la Bacteriología debido a que los virus, a diferencia de las bacterias, poseen un pequeño tamaño que no permite observarlos con el microscopio óptico y, además, no pueden ser cultivados en medios inertes carentes de células vivas (medios axénicos) como los que se emplean para cultivar a las bacterias.

El uso del microscopio electrónico para observar ultraestructuras cuyos tamaños oscilan en el orden de los nanómetros y el desarrollo de los cultivos celulares fueron dos hitos que ocurrieron recién a mediados del siglo XX.

1.1 IMPACTO DE LAS ENFERMEDADES VIRALES EN LA HISTORIA HUMANA

El impacto de las enfermedades virales en la historia humana es enorme. Aunque no existen registros de las epidemias producidas por virus en las épocas antigua y medieval, muchas de estas enfermedades eran conocidas por las civilizaciones greco-latinas. Evidencias arqueológicas en momias del Antiguo Egipto y en antiguos grabados muestran lesiones características de viruela y poliomielitis. La rabia, la influenza y la poliomielitis también fueron conocidas por las antiguas civilizaciones, si bien el concepto de enfermedad infecciosa no existía y estas enfermedades se atribuían a efectos de los planetas o bien al enojo de los dioses ante las conductas humanas. Las epidemias de viruela durante la Edad Media en Europa presentaron alta mortalidad y produjeron cambios económicos, políticos y religiosos. La conquista de América por colonizadores europeos introdujo numerosas enfermedades infecciosas, entre ellas algunas de origen viral como el sarampión, que diezmaron a los nativos carentes de inmunidad frente a ese virus.

En el siglo XX ocurrieron tres pandemias por diferentes subtipos de virus influenza A. La primera y más importante se registró en 1918 y fue producida por una cepa del subtipo H1N1. Esta enfermedad, denominada gripe española, se diseminó a todo el planeta y produjo aproximadamente 50 millones de muertes.

A fines del siglo XX, los sistemas de vigilancia epidemiológica alertaron sobre la amenaza de una nueva pandemia de influenza, probablemente de origen aviario (subtipo H5N1) proveniente de Asia. Contrariamente a esa hipótesis, la primer pandemia del siglo XXI comenzó en abril de 2009 y fue causada por la emergencia de una nueva cepa de influenza A H1N1, originada en América y que fue inicialmente mal denominada gripe porcina. El estudio genómico de este nuevo virus demostró que es un triple recombinante y que contiene dos genes de influenza origen porcino, un gen de origen aviario y un gen de influenza humana. Este virus se diseminó rápidamente a todo el planeta y la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el máximo nivel de alerta de pandemia (Fase 6) el 11 de julio de 2009. La pandemia produjo un alto impacto a nivel mundial ya que se registraron en ese año millones de casos de infección respiratoria por el nuevo virus, de los cuales 18.000 fueron fatales.

La disminución de la morbi-mortalidad de algunas enfermedades virales mediante el desarrollo y aplicación de vacunas

efectivas constituye uno de los mayores logros de la ciencia moderna. En 1980, se logró erradicar la viruela del planeta Tierra gracias a los esfuerzos de cooperación mundial, a la inexistencia de reservorios animales y al arma más valiosa desarrollada, la vacunación anti-variólica. Asimismo, el control de la poliomielitis fue logrado mediante la vacunación y la cloración del agua, aunque no pudo ser aún erradicada en algunos países en vías de desarrollo.

A pesar de los extraordinarios avances en el conocimiento de muchas enfermedades virales existen otras que aún continúan desafiando los esfuerzos de los científicos, como por ejemplo las pandemias de HIV, de hepatitis B y hepatitis C, y los brotes epidémicos de virus emergentes o re-emergentes como los causados por los virus del dengue, West Nile, influenza y hantavirus, entre muchas otras.

En conclusión, la amenaza que representan los virus, ya sean nuevos (emergentes), re-emergentes o productos del bioterrorismo continúa aún vigente en la actualidad.

1.2 BREVE HISTORIA DE LA VIROLOGÍA

En 1673, el holandés A. van Leuwenhoek inventó el microscopio óptico y así, por primera vez, pudieron observarse bacterias, protozoarios y algas. Pero fue recién a mediados del siglo XIX que la Bacteriología emergió como una nueva disciplina. Las investigaciones de Louis Pasteur y Robert Koch demostraron que la vida no se origina espontáneamente (*teoría de la generación espontánea*) sino que se desarrolla a partir de *gérmenes*. Durante sus estudios sobre ántrax en el ganado, R. Koch fue el primero en demostrar que la enfermedad infecciosa resultaba de la infección con microorganismos, los que podían ser cultivados en medios artificiales y luego ser inoculados en nuevos hospedadores en los que reproducían la enfermedad. Esta teoría está expuesta en los *Postulados de Koch* y constituye el fundamento de la asignación etiológica de las enfermedades infecciosas.

También en el siglo XIX un discípulo de L. Pasteur, Charles Chamberlain, desarrolló un filtro de porcelana que permitía retener las bacterias, pero no a otros agentes más pequeños que podían atravesar esos filtros. De allí una de las primitivas denominaciones de los virus, llamados *virus filtrables*.

En 1898, un microbiólogo holandés M. W. Beijerinck presentó a la Academia de Ciencias de Amsterdam sus investigaciones sobre el agente del *mosaico del tabaco*, enfermedad que afecta las hojas de plantas de tabaco. Beijerinck describió al agente causal como un *contagium vivum fluidum* en contraposición a la teoría en boga en la época que postulaba la naturaleza *corpúscular* como causa de las enfermedades infecciosas. El fundamento de su fascinante descubrimiento fue que ese nuevo agente (un virus) podría atravesar los filtros de porcelana desarrollados por Chamberlain y que ese *contagium vivum fluidum* era capaz de provocar enfermedad al ser inoculado en plantas de tabaco previamente sanas.

Beijerinck también postuló que el virus se convertía en *parte del metabolismo celular*, que interaccionaba con éste y que existía una *forma submicroscópica de vida* que no podía ser observada al microscopio óptico. Así, la palabra virus adquirió un nuevo significado que lo diferenciaba de los microbios observables microscópicamente. Éste era un concepto totalmente nuevo en contraposición a las ideas en vigencia que postulaban que "todos los virus eran microbios".

Por ello, la identificación del virus del mosaico del tabaco se reconoce como la fundación de la Virología como una disciplina diferente de la Bacteriología. Sin embargo, como estas nuevas ideas se contraponían con las teorías vigentes en esa época, transcurrieron muchos años para que la Virología se estableciera como una ciencia separada.

El virus del mosaico del tabaco fue también el primer virus que pudo ser observado al microscopio electrónico por W. Stanley en EE. UU., hallazgo por el que le otorgaron el premio Nobel en Química en 1946. Stanley postulaba que ese agente era una proteína autocatalítica y, aunque posteriormente se descubrió que este virus no era un enzima, su hallazgo y la posterior caracterización del virus como un complejo de proteínas y ácidos nucleicos por investigadores ingleses constituyeron un hito fundamental en la comprensión de los virus como verdaderas entidades físico-químicas y, ulteriormente, como entidades genéticas.

El desarrollo de la microscopía electrónica que comenzó en 1930 contribuyó a eliminar el misterio de estos nuevos agentes que habían estado ocultos más allá de las fronteras del microscopio óptico.

Debido a su pequeño tamaño y a su parasitismo intracelular obligado, que impide su multiplicación en medios axénicos (carentes de células vivas), los virus pudieron ser estudiados recién en el siglo XX, cuando se desarrollaron los cultivos celulares y el microscopio electrónico. El desarrollo de células vivas en cultivo fue posible a partir de la década de 1940, cuando se comenzaron a emplear los antibióticos, lo que permitió mantener a las células en cultivo libres de contaminación bacteriana. Así comenzó la edad moderna de la Virología cuando en 1948, Seller y Enders lograron por primera vez la replicación de un virus en cultivo.

La historia de la Virología ilustra, una vez más, cómo los conceptos en ciencia se desarrollan por ensayo y error. Los hallazgos iniciales en Virología, junto con el modelo de la doble hélice del ácido desoxirribonucleico (DNA) propuesta por Watson y Crick, en 1953, sentaron las bases fundacionales de la Biología molecular.

Durante los siglos XX y XXI se desarrollaron exquisitas técnicas moleculares para identificar, clonar y expresar secuencias nucleotídicas, lo que permitió extraordinarios avances en el conocimiento de la patogenia, en el desarrollo de nuevos y eficaces métodos diagnósticos para las enfermedades virales y, aún más, hizo posible identificar mediante métodos moleculares a virus que no replican adecuadamente en cultivos celulares, como el virus hepatitis C.

2. ¿QUÉ SON LOS VIRUS?

Etimológicamente, *virus* significa veneno en latín. Podríamos definir a un virus como un programa, o un complejo informacional macromolecular. Las características de los virus son:

- pequeño tamaño, 20 a 250 nanómetros (nm);
- ser parásitos genéticos intracelulares obligados;
- poseer (casi siempre) un solo tipo de ácido nucleico en la partícula viral completa o virión, una estructura elemental y un mecanismo complejo de replicación.

Los virus carecen de los sistemas enzimáticos productores de energía necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas, indispensables para el crecimiento y multiplicación como los que poseen las células procarióticas o eucarióticas. Por esta razón, deben necesariamente utilizar los sistemas de las células que parasitan y por ello se definen como **parásitos genéticos intracelulares obligados**.

2.1 TAMAÑO

La mayoría de los virus poseen un tamaño muy inferior al de las bacterias. El tamaño comparativo de algunas familias virales en relación a la bacteria estafilococo se muestra en la Figura 1.1. Las bacterias se miden en micrones ($1\mu\text{m} = 10^{-6}$ metros). Para los virus se utiliza una medida inferior al micrón, llamada nanómetro (nm) o milimicrón (m μ) que equivale a 10^{-9} metros. En la Tabla 1.1 se muestran las unidades de medida y límites de resolución de los diferentes microscopios empleados en Microbiología.

Micrón (μm)	10^{-6} metros
Milimicrón (m μ) o nanómetro (nm)	10^{-9} metros
Angstrom (Å)	10^{-10} metros
Límite de resolución de:	
Microscopio óptico	250 nm
Microscopio de fluorescencia	125 nm
Microscopio electrónico	0,5 a 0,05 nm
Tamaño promedio de los virus	20 a 300 nm
Tamaño promedio de las bacterias	0,7 a 10 μm
Linfocito	10 μm

Tabla 1.1. Unidades de medida y límites de resolución de los microscopios utilizados en Microbiología.

Los virus más pequeños, por ejemplo los de la familia *Picornaviridae*, que incluye el virus de la poliomielitis, miden alrededor de 27 nm y los más grandes, como los de la familia *Poxviridae*, donde se encuentra el virus de la viruela miden 250 nm (Figura 1.1).

2.2 ESTRUCTURA, FUNCIONES Y PROPIEDADES

Los virus poseen habitualmente un solo tipo de ácido nucleico ya sea DNA o RNA. Los ácidos nucleicos constituyen **el nucleoide** y, asociado a proteínas se designa como **core viral**. En el *core* se encuentra toda la información genética; siendo los ácidos nucleicos los responsables de la infectividad. El *core* está protegido por una cubierta proteica denominada **cápside**. En el virus hepatitis B el *core* y la cápside constituyen la misma estructura.

Además, algunas familias de virus poseen otra estructura, de composición lipoproteica, llamada **envoltura** (Figura 1.2). Los virus que presentan envoltura se denominan **envueltos**, en contraposición a los que carecen de envoltura que se denominan **desnudos**.

La partícula viral completa con su capacidad infectante intacta se denomina **virión**.

La **cápside** está formada por subunidades proteicas denominadas **capsómeros** o unidades morfológicas que se encuentran en la superficie de la partícula en los virus desnudos. Los capsómeros pueden ser de forma esférica hueca (adenovirus) o en forma de prisma con una zona hueca central (herpesvirus) (Figura 1.5).

Son funciones/propiedades de las proteínas de la cápside:

- Protección del ácido nucleico: del medio externo, de la desecación y de las enzimas tisulares.
- Presentar estructuras que permiten la unión del virus a los receptores de membrana de la célula hospedadora.
- Actuar como antígenos que estimularán la respuesta inmune del hospedador.
- Reprimir la expresión de genes virales tempranos.
- Proveer interacciones espaciales con las polimerasas virales en ciertos casos.

La **envoltura** es lipoproteica, de composición similar a la de la membrana de la célula infectada, ya que los virus la adquieren de ésta. La presencia o no de envoltura determina la resistencia de los virus al medio externo y esto es de fundamental importancia en la forma de transmisión de las enfermedades virales.

La mayoría de los virus desnudos son resistentes al medio externo, a la desecación y a solventes de lípidos (éter, cloroformo, sales biliares, detergentes, etc). Por ejemplo, los poliovirus y el virus hepatitis A se transmiten eficientemente por vía fecal-oral ya que conservan su infectividad en el agua y pueden resistir el pH ácido del estómago y la acción de las sales biliares (Figura 1.3).

Por el contrario, los virus con envoltura son muy lábiles a la desecación y a los solventes de lípidos; por ello, para su transmisión se requiere un contacto directo de persona a persona o a través de fomites

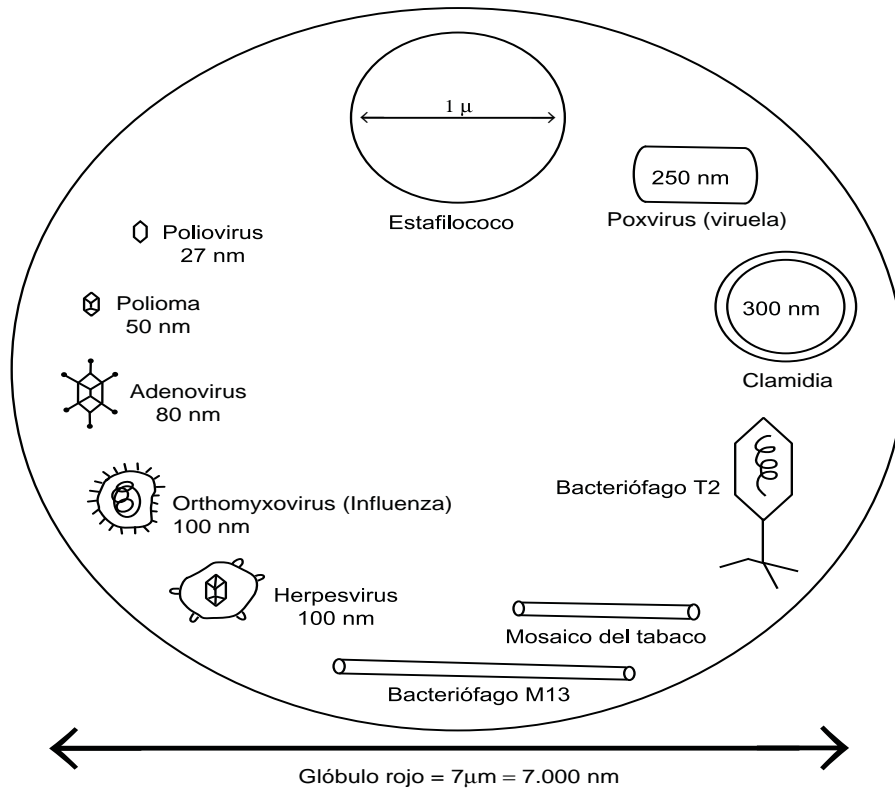


Figura 1.1. Tamaño comparativo de los virus con otros agentes infecciosos.

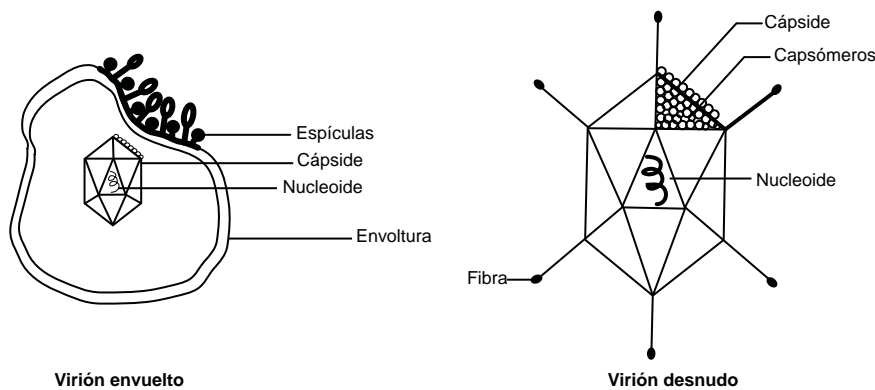


Figura 1.2. Anatomía de un virión.

(elementos inertes contaminados). La presencia de envoltura determina la sensibilidad a los solventes de lípidos, lo que constituye uno de los criterios de la clasificación de los virus.

Las funciones/propiedades de la envoltura son similares a las tres inicialmente mencionadas para la cápside. En la envoltura se encuentran las estructuras que permitirán la unión a receptores de la célula hospedadora. Se trata de glicoproteínas ancladas en la membrana a modo de espículas, por ejemplo las hemaglutininas de los virus influenza o la glicoproteína gp 120 del virus HIV. Estas glicoproteínas son potentes antígenos que estimularán la respuesta inmune del hospedador.

2.3 DIFERENCIAS CON EUBACTERIAS, CLAMIDIAS, MICOPLASMAS Y RICKETTSIAS (TABLA 1.3)

Los virus se diferencian de otros patógenos en su organización, composición química y mecanismos de replicación (Tabla 1.3). Los virus

poseen un solo tipo de ácido nucleico, ya sea DNA o RNA con las actuales excepciones conocidas de dos virus: el citomegalovirus humano y el virus herpes humano tipo 8. Ambos pertenecen a la familia *Herpesviridae* con genoma a DNA pero con transcriptos RNA en el virión.

Los virus no crecen ni se multiplican por fisión binaria y su replicación siempre produce más de una copia. Se replican por síntesis y ensamble de los componentes recientemente formados en el interior de la célula hospedadora. Por esta razón, son parásitos genéticos intracelulares obligados y no pueden replicar en medios axénicos como lo hacen las bacterias.

La replicación viral se detalla en el capítulo 2. Brevemente, la unión del virus a la célula que infectarán es el paso inicial y se produce por interacción de las estructuras presentes en la superficie del virión con receptores de la membrana de la célula hospedadora. Al ingresar, el virus toma el comando de la célula y controla los mecanismos energéticos celulares para su replicación y la síntesis de sus

ESTRUCTURA		FUNCIÓN / PROPIEDAD
NUCLEOCÁPSIDE	Nucleoide	- información genética - infectividad
	Cápside	- protección del nucleoide - unión a receptores celulares - expresión de determinantes antigénicos - represión de genes tempranos - interacción espacial con ciertas polimerasas
ENVOLTURA*	Lípidos y proteínas	- protección del nucleoide - unión a receptores celulares - expresión de determinantes antigénicos en glicoproteínas

Tabla 1.2. Estructura del virión. *Sólo algunos virus.

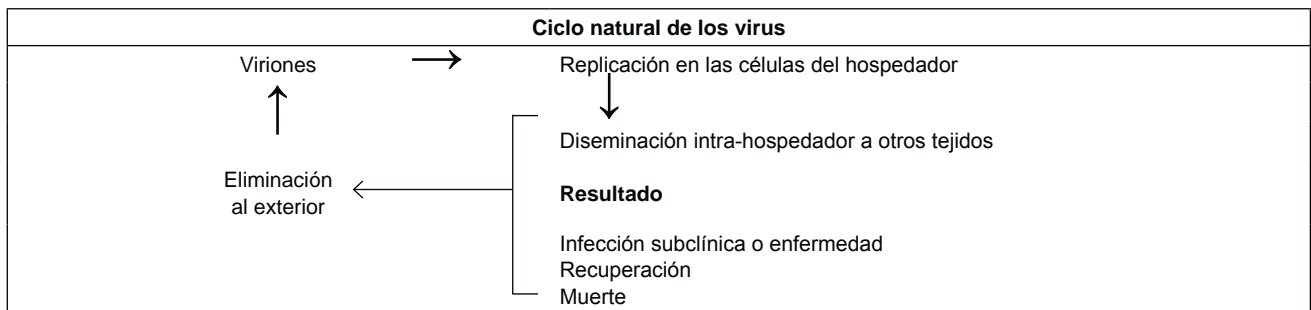


Figura 1.3. Diseminación de los virus.

propias proteínas. Este proceso puede o no destruir la célula mediante diferentes mecanismos que se analizarán en otros capítulos. Los viriones neo-formados saldrán de la célula hospedadora e iniciarán nuevos ciclos de infección en nuevas células (Figura 1.3).

2.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS VIRUS

2.4.1 Ácidos nucleicos

La información hereditaria de un virus está codificada en la secuencia de nucleótidos de su RNA o DNA. Los virus se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo al tipo de su ácido nucleico. Si éste es DNA se denominan **desoxirribovirus** y, si es RNA, **ribovirus**.

Los ribovirus constituyen junto con los viroides, los únicos organismos hasta ahora conocidos en la naturaleza donde el RNA es el portador de toda la información genética.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios, es decir, presentar una sola cadena de nucleótidos, o bicatenarios (doble cadena). En los ribovirus, el RNA es habitualmente monocatenario (togavirus, mixovirus, picornavirus) siendo la excepción los reovirus que poseen RNA bicatenario.

El ácido nucleico de todos los virus a DNA es bicatenario (adenovirus, poxvirus y herpesvirus), con las excepciones de los parvovirus y circovirus que poseen DNA monocatenario.

Los pesos moleculares del ácido nucleico y, por ende su longitud, dependen de la complejidad del virus y pueden variar desde 1,6 a 160 millones de daltons. Los ácidos nucleicos pueden ser moléculas continuas lineales o circulares, o bien segmentados. Un genoma segmentado exhibe mayores posibilidades de reasociación cuando dos virus infectan una misma célula. Ello tiene importancia protagónica, por ejemplo, en la emergencia de nuevas cepas de influenza o en la producción de nuevas vacunas para rotavirus.

Las moléculas circulares pueden a su vez ser planas o hiperenrolladas.

Como se verá en el Capítulo 2, un paso esencial de la replicación viral consiste en la producción de RNA mensajero (RNAm). Los virus se clasifican en virus de polaridad positiva o negativa, según tengan o no polaridad de mensajero. Algunos ribovirus monocatenarios presentan RNA de cadena positiva (polaridad de men-

sajero) otros poseen cadena negativa (polaridad de anti-mensajero). También existen virus a RNA con polaridad mixta o ambisenteo, también denominada *ambisense* (arenavirus). Los retrovirus poseen dos cadenas cuasi idénticas, lo que se denomina *dímero*.

Los desoxirribovirus monocatenarios tienen cadena positiva o negativa; los bicatenarios poseen una cadena positiva y otra negativa. La cantidad de información genética contenida en el genoma varía de acuerdo a su tamaño. Las células humanas poseen más de 60000 genes; la bacteria *Escherichia coli* posee 4000 genes, los virus más pequeños pueden tener de 3 a 4 genes y los mayores varios centenares. A mayor tamaño del genoma, mayor será la información para generar gran diversidad de proteínas específicas. En general, los virus a RNA tienen genomas de menor tamaño y codifican menos proteínas que los virus a DNA. Los genomas se miden por el número de bases (nucleótidos). Se expresan en kilobases (kb). Para los genomas de cadena simple se emplean kb, mientras que para los de doble cadena se utilizan pares de kilobases (kbp). Por ejemplo, el genoma de cadena simple del virus sarampión es de 16 000 bases (16 kb) y el genoma de cadena doble de los adenovirus es de 36 000 pares de bases (36 kbp).

Las composición de bases es variable. La proporción de guanina-citosina varía de acuerdo a la familia viral. En los virus de mayor tamaño (herpes), esta proporción difiere en mayor grado con respecto al de la célula hospedadora que en aquellos virus de menor tamaño, en los que es más parecida al DNA celular.

Los ácidos nucleicos constituyen la base de la infectividad del virus. Estas moléculas son, en general, frágiles y pierden su actividad rápidamente si no están protegidas por la cápside y/o la envoltura. Sin embargo, los poliovirus poseen un RNA con polaridad de mensajero, es decir, el RNA puro, separado de las cubiertas del virión e introducido artificialmente en cultivos celulares, es capaz de infectar y dar lugar a la formación de nuevos viriones. Esto se denomina **ácido nucleico infeccioso**. Utilizando secuencias previamente publicadas, ya se ha logrado la síntesis química *in vitro* del RNA (infeccioso) del poliovirus y, por ende, de dicho agente.

Por el contrario, en la mayoría de los virus, el ácido nucleico puro separado del virión no es capaz de dar origen a progenie ya

Característica	Virus	Rickettsias	Clamidias	Micoplasmas	Eubacterias
Tamaño	20-250 nm	1 µm	300 nm	250 nm	0,7 a 10 µm
Ácido nucleico	DNA o RNA	ambos	ambos	ambos	ambos
Fisión binaria	no	+	+	+	+
Enzimas del metabolismo energético	no	+	no	+	+
Ribosomas	no*	+	+	+	+
Replicación en medios axénicos	no	no	no	+	+

Tabla 1.3. Diferencias entre virus, eubacterias, micoplasmas, clamidias y rickettsias. / * Los arenavirus constituyen una excepción ya que poseen ribosomas de origen celular cuya función en el virión es prescindible para la infectividad viral.

que les resulta imprescindible la actividad de las polimerasas que están presentes en el virión, sin las cuales la replicación no puede iniciarse (véase el Capítulo 2).

2.4.2 Proteínas

Las proteínas constituyen la mayor parte del virión (50 a 90%). Según el tamaño y complejidad del virión éste puede contener desde 2 a 30 polipéptidos estructurales diferentes. **Las proteínas del virión pueden clasificarse en estructurales o no estructurales.**

Proteínas estructurales

Se define como **proteína estructural** aquella que está presente en el virión en proporción importante y mantiene la estructura del mismo. Pueden ser **de superficie** o **internas**. Las proteínas de superficie constituyen los capsómeros, y las proyecciones de la envoltura, denominadas peplómeros (del griego *peplos*= túnica; *meros*= parte). En los virus con simetría icosaédrica, los capsómeros están formados por polipéptidos (1 a 6 moléculas) de la misma clase (homopolímeros) o de clase diferente (heteropolímeros). La cápside constituye un recipiente protector formado por los capsómeros.

En los virus con simetría helicoidal, los capsómeros están constituidos por un único tipo de proteína y se denominan protómeros. Las cápsides así constituidas son muy resistentes a la digestión por enzimas proteolíticas y al medio externo.

Las proteínas de la envoltura (peplómeros) son glicoproteínas que tienen funciones biológicas muy importantes tales como actividad de hemaglutinina, o de neuraminidasa, por ejemplo en los virus influenza. Es fundamental su intervención en la adsorción a los receptores de la célula hospedadora, paso inicial en la replicación viral. Las hemaglutininas virales se unen a receptores mucoproteicos presentes en ciertas células del tracto respiratorio y otras, permitiendo así la adsorción.

La enzima neuraminidasa en el virus influenza puede clivar esa unión permitiendo la liberación del virus y la diseminación de los nuevos viriones (Capítulos de virus respiratorios).

Las funciones/propiedades de las proteínas de superficie son:

- a) Protección del genoma contra el medio externo, la desecación y la acción de proteasas tisulares.
- b) Afinidad por los receptores celulares para iniciar la adsorción y penetración a la célula hospedadora. Esta afinidad selectiva será uno de los factores más importantes para determinar el tropismo del virus por determinadas estirpes celulares.
- c) Capacidad antigénica ya que las proteínas externas son potentes inmunógenos, que inducirán en un hospedador inmunocompetente una respuesta inmune, mediada fundamentalmente por anticuerpos neutralizantes responsables de la protección del hospedero y por células citotóxicas que reconocerán a las células que expresen epítopes virales en éstas.

Las proteínas internas del virión pueden ser proteínas estructurales o no estructurales. Pueden ubicarse en la cara interna de la envoltura (proteína M de los paramixovirus), entre capas de cap-

sómeros debajo de la cápside (cápside interna), y en el centro del virión, asociadas al *core*; éstas últimas suelen ser histonas.

Proteínas no estructurales

Un ejemplo lo constituyen las enzimas requeridas para la replicación que se sintetizan en fases muy tempranas de ésta y pueden detectarse en las células infectadas, pero que luego no se incorporan al virión, por ejemplo, las polimerasas de los poliovirus. En otros casos, esas enzimas son proteínas que se asocian a la estructura viral, pero que no forman cualitativamente parte importante de ella. Por ejemplo, la polimerasa RNA dependiente del virus influenza que sí se incorpora al virión.

La enorme diversidad de proteínas que presentan los virus permite distinguir entre virus de diferentes grupos y, aun dentro de un mismo grupo, identificar diferentes serotipos (tipos antigénicos). Esto constituye una de las bases de la clasificación viral, como se verá más adelante.

2.4.3 Glúcidos y Lípidos

Los virus con envoltura contienen escasas cantidades de lípidos o glucolípidos que están asociados a las glicoproteínas presentes en la misma (mixovirus y paramixovirus). Estos lípidos son de origen celular, ya que esos virus adquieren su envoltura por brotación en las membranas de la célula hospedera.

2.5 CONCEPTO DE SIMETRÍA: HELICOIDAL, ICOSAÉDRICA, COMPLEJA Y BINARIA (TABLA 1.5)

La simetría es la forma que adopta un cuerpo en el espacio. La simetría de los virus está dada por la estructura de su nucleocápside y puede ser de cuatro tipos: a) helicoidal; b) cúbica o también llamada icosaédrica; c) compleja; y d) binaria.

Virus a RNA	Simetría	Desnudo / envuelto	Familia
cadena única	icosaédrica	desnudo	<i>Picornaviridae</i>
	helicoidal	envuelto	<i>Togaviridae</i>
cadena doble	helicoidal	envuelto	<i>Orthomyxoviridae</i>
	icosaédrica	desnudo	<i>Arenaviridae</i> <i>Reoviridae</i>
Virus a DNA	cadena doble	icosaédrica	<i>Adenoviridae</i> <i>Herpesviridae</i>
		compleja	<i>Poxviridae</i>
	cadena única	icosaédrica	desnudo

Tabla 1.5. Simetría de algunas familias de virus.



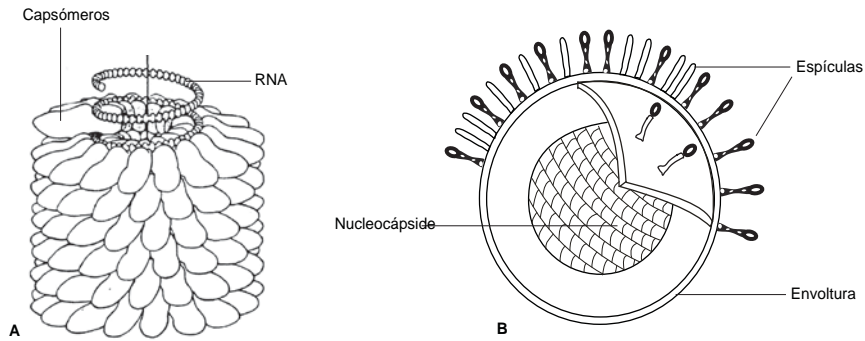


Figura 1.4. Simetría helicoidal: A, desnuda, virus del mosaico del tabaco; B, envuelta, ortomixovirus (influenza).

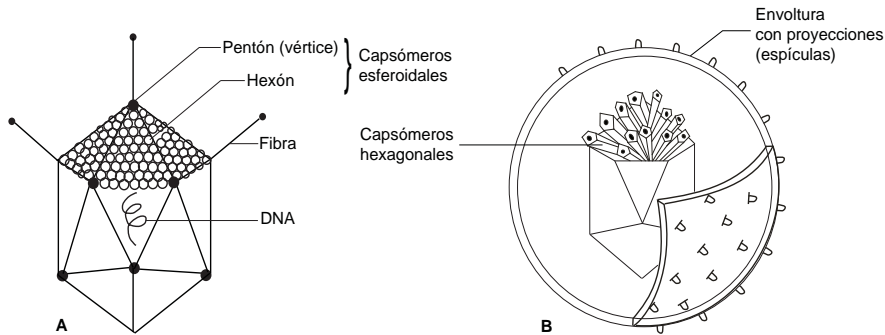


Figura 1.5. Simetría icosaédrica: A, desnuda, adenovirus; B, envuelta, herpesvirus.

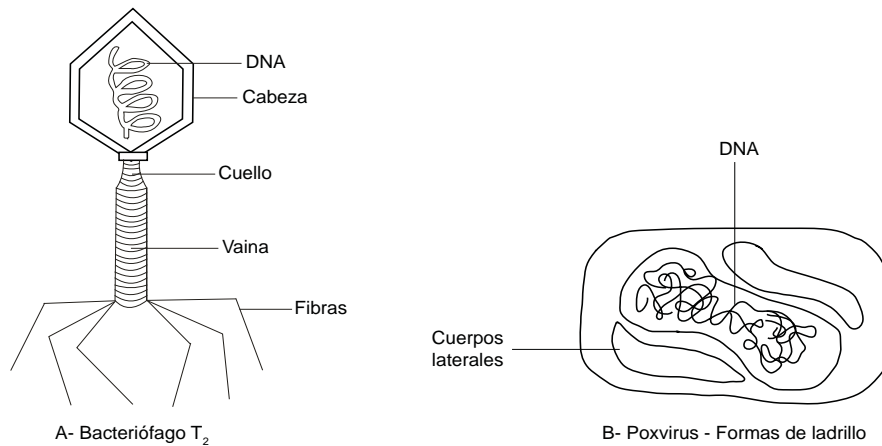


Figura 1.6. A, Simetría binaria; B, Simetría compleja.

La simetría helicoidal se asemeja a una escalera en caracol. Los virus con esta simetría pueden presentar una nucleocápside cilíndrica extendida (virus del mosaico del tabaco; bacteriófago M13, ambos son virus desnudos), o bien la nucleocápside está arrollada sobre sí misma y recubierta por una envoltura (virus influenza). (Figura 1.4).

Los virus con simetría cúbica o icosaédrica son poliedros regulares con 20 caras triangulares, 30 aristas y 12 vértices. Pueden ser desnudos (poliovirus o adenovirus), o estar recubiertos de envoltura (herpesvirus o togavirus) (Figura 1.5).

Se denominan virus de simetría compleja a aquellos que no son ni helicoidales ni icosaédricos. Como ejemplo podemos mencionar a los poxvirus (viruela) que poseen forma de ladrillo. Algunos autores denominan de simetría binaria o combinada a la observada en algunos bacteriófagos que poseen una cabeza con simetría icosaédrica y una cola con simetría helicoidal (Figura 1.6).

3. ¿CÓMO SE REPLICAN LOS VIRUS?

Al carecer de las enzimas biosintéticas necesarias para su replicación los virus no crecen, no aumentan de tamaño ni su división es por fisión binaria. No pueden replicarse en medios de cultivo axénicos sino que necesitan de células vivas. La replicación productiva sólo se puede realizar en el interior de células vivas y permisivas. En los comienzos de la Virología, se utilizaron como fuente de células vivas embriones de pollo o de pato y/o animales de experimentación (ratones, cobayos o conejos). Posteriormente, con el advenimiento de los antibióticos que permitieron el desarrollo de técnicas para mantener vivas células *in vitro* se desarrollaron infinidad de cultivos celulares, aptos para la replicación de la mayoría de los virus.

En la actualidad, el aislamiento de los virus humanos con fines diagnósticos, así como también la producción de vacunas se realiza casi exclusivamente en cultivos celulares (capítulos de Diagnóstico Viroológico y de Vacunas).

La replicación viral se describe en el Capítulo 2. En breve, el paso inicial de la replicación es la **unión a un receptor celular** en una célula susceptible. Luego, la replicación se lleva a cabo sólo en aquellas células permisivas, utilizando los mecanismos biosintéticos de la célula, dirigidos por la información contenida en el ácido nucleico viral para la síntesis de los ácidos nucleicos y proteínas virales. De esta forma, la célula parasitada por un virus obedece las órdenes codificadas en el genoma viral para sintetizar productos virales que, luego de su ensamble, darán lugar a la formación de **nuevos viriones, o viriones progenie**. Éstos saldrán de la célula donde replicaron para iniciar nuevos ciclos de replicación en otras células permisivas.

La replicación viral se divide en las siguientes etapas:

- 1) Adsorción: interacción de proteínas de superficie del virus con receptores celulares específicos.
- 2) Penetración: a través de la membrana plasmática de la célula por pasaje directo (adenovirus y picornavirus); por fusión de la membrana celular con la envoltura viral (paramixovirus, herpes); o por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor (viropexis), que es el más frecuente y es similar a la fagocitosis.
- 3) Decapsidación: liberación del nucleico viral de la nucleocápside.
- 4) Eclipse: etapa en la que no se observan viriones en el interior de la célula ni se recupera virus infeccioso.
- 5) Latencia: período que incluye al eclipse y que se extiende desde que se pierde la infectividad inicial hasta que se la recupera debido a la aparición de los nuevos viriones neoformados. Durante las fases de eclipse y latencia ocurre la biosíntesis de los ácidos nucleicos y de las proteínas virales.
- 6) Maduración: ensamble de los ácidos nucleicos neoformados con las proteínas de la cápside.
- 7) Liberación: los viriones progenie pueden salir de la célula por lisis (poliovirus) o por brotación a través de la membrana celular (paramixovirus, arnavirus), de la membrana nuclear (herpesvirus) o del retículo endoplásmico (togavirus, hepadnavirus).

3.1 INTERACCIÓN DE LOS VIRUS CON SUS HOSPEDADORES

Si bien todos los seres vivos pueden ser infectados por virus, la relación virus-hospedero es claramente específica. Cada virus afecta solamente a un grupo bien definido de especies biológicas (hombre, animales, vegetales, bacterias, etc.) y dentro de ellas, solamente a algunas células. Esto se debe a la especificidad de la unión del virus a receptores de la membrana celular, cuya presencia está determinada por factores genéticos y fisiológicos. Por ello, aún antes de que se conociera la estructura y replicación de los virus, se los clasificaba teniendo en cuenta los tejidos que infectaban en: **virus dermatropos, neumotropos, hepatotropos, neurotropos y pantropos**.

Actualmente, se reconoce que esta clasificación es artificial ya que muchos virus pueden afectar a diversos tejidos, aunque las manifestaciones de la infección sean más evidentes en un determinado tejido u órgano. Por ejemplo, el virus del sarampión produce manifestaciones en piel y mucosas, pero puede infectar también el pulmón o el cerebro.

Los virus que afectan animales y plantas no infectan en general al hombre, dado que éste carece genéticamente de los receptores necesarios. Constituyen una excepción aquellos virus que son productores de **antropozoonosis** (enfermedad común al hombre y animales). Estos virus pueden replicar tanto en el hombre como en animales reservorios y en artrópodos vectores. Como ejemplos de antropozoonosis podemos mencionar a la rabia, las enfermedades producidas por arbovirus (fiebre amarilla, encefalitis equinas, dengue), por arnavirus (fiebre hemorrágica argentina, fiebre de Lassa) o por hantavirus, y más recientemente, la influenza aviar (H5N1).

3.2 NOCIONES DE BACTERIÓFAGOS

Los virus que infectan a las bacterias se denominan bacteriófagos. No infectan directamente al ser humano pero poseen gran importan-

cia en patología humana ya que pueden poseer información genética que codifica para la producción de ciertas toxinas bacterianas. Por ejemplo, la toxina diftérica es una proteína codificada por un bacteriófago que parasita al *Corynebacterium diphtheriae*. En forma análoga, las toxinas bacterianas del *S. pyogenes* y de *V. cholerae* son codificadas por bacteriófagos lo que permite a dichas bacterias la producción de la escarlatina y el cólera, respectivamente.

Otros bacteriófagos pueden transmitir resistencia a antibióticos por diferentes mecanismos, lo que posee una enorme trascendencia médica. Además, dada la facilidad de su cultivo en bacterias se han utilizado los bacteriófagos en el estudio de los mecanismos moleculares de interacción virus-bacteria.

3.3 LOS VIRUS: ¿SON SERES VIVOS?

Si la vida se define como una serie compleja de procesos capaces de plasmar la información codificada en el genoma, los virus podrían considerarse seres vivos sólo cuando invaden una célula hospedadora y pueden replicarse. Ello implica que carecen de vida independiente. Desde este punto de vista, no serían seres vivos cuando cristalizan o cuando se los conserva en congeladoras a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ o en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. En estas circunstancias, es decir fuera de una célula, son metabólicamente inertes, si bien conservan su potencialidad de infección. En 1953, cuando Stanley pudo cristalizar por primera vez un virus, el del mosaico del tabaco, se suscitaron discusiones filosóficas sobre si los virus eran o no seres vivos. Al respecto, podría aplicarse la frase del Evangelio: "Los conoceréis por sus obras". Es decir, por sus efectos sobre los hospedadores que infectan.

4. INTRODUCCIÓN A LA PATOGENESIS VIRAL

4.1 INTERACCIÓN DE LOS VIRUS CON LA CÉLULA HOSPEDERA

Las consecuencias de la infección viral sobre las células dependen tanto de las características del virus como de la sensibilidad de las células. Al igual que sucede con los bacteriófagos, los virus animales se clasifican en **citocídicos** o **no citocídicos**.

Se denominan **virus citocídicos** a aquellos que producen la lisis de la célula en que replican, lo cual se puede observar histológicamente. Por ejemplo, el virus de la poliomielitis, si afecta la médula espinal, lesionará en forma irreversible las motoneuronas del asta anterior ocasionando así una parálisis permanente de los músculos inervados por dichas neuronas.

En los cultivos celulares, las alteraciones producidas por virus pueden observarse al microscopio óptico y se denominan **acción citopática (ACP)** o **efecto citopatogénico (ECP)** (Capítulo 3).

Por el contrario, otros virus se denominan **no citocídicos** porque pueden replicar sin destruir a la célula hospedadora (arnavirus). Dentro de los virus *no citocídicos* se encuentran también aquellos capaces de integrarse al genoma celular (retrovirus) pudiendo permanecer en ese estado por tiempo indefinido con o sin producción viral.

Se denomina **infección productiva** a aquella que da origen a nuevos viriones como consecuencia de la replicación. Las infecciones productivas son las que se producen habitualmente cuando un virus infecta células permisivas. Por el contrario, cuando un virus infecta células no totalmente permisivas o bien cuando el virus presenta defectos en su replicación, se producen **infecciones abortivas**, es decir, sin producción de nuevos viriones. Las infecciones abortivas pueden detectarse mediante la búsqueda de antígenos o genomas virales en las células infectadas.

Durante la replicación pueden producirse otro tipo de partículas que se denominan **partículas defectivas** porque son defectuosas en cuanto a su potencial de replicación. Por ello, no pueden dar lugar a nuevos viriones pero sí pueden interferir con la replicación normal, esto se denomina fenómeno de **autointerferencia**.

Otro término a definir es **provirus**. Se denomina provirus al genoma viral integrado al genoma celular. El ejemplo típico se encuentra en la familia *Retroviridae* (*HIV*, *HTLV*). El provirus puede

Genoma (tamaño)	Segmentos	Cápside (simetría)	Envoltura	Virión (tamaño en nm)	Familia
DNA de cadena doble					
130-370 kpb	1	compleja	sí	250	<i>Poxviridae</i>
120-220 kpb	1	icosaédrica	sí	100	<i>Herpesviridae</i>
28-48 kpb	1	icosaédrica	no	80	<i>Adenoviridae</i>
5 kpb	1	icosaédrica	no	50	<i>Poliomaviridae</i>
7-8 kpb	1	icosaédrica	no	50	<i>Papillomaviridae</i>
DNA de cadena única					
4-6 kb	1	icosaédrica	no	20 40	<i>Parvoviridae</i> <i>Circoviridae</i> (en estudio)
RNA de cadena doble					
20-30 kpb	10-12	icosaédrica	no	70	<i>Reoviridae</i>
RNA de cadena única (+)					
28-33 kb	1	helicoidal	sí	100	<i>Coronaviridae</i>
10-13 kb	1	icosaédrica	sí	60	<i>Togaviridae</i>
10-12 kb	1	icosaédrica	sí	50	<i>Flaviviridae</i>
7-8 kb	1	icosaédrica	no	27	<i>Picornaviridae</i>
7-8 kb	1	icosaédrica	no	30	<i>Astroviridae</i>
8 kb	1	icosaédrica	no	37	<i>Caliciviridae</i>
7 kb	1	icosaédrica	no	40	<i>Hepeviridae</i>
RNA de cadena única (-)					
15-16 kb	1	helicoidal	sí	200	<i>Paramyxoviridae</i>
19 kb	1	helicoidal	sí	80-900	<i>Filoviridae</i>
10-16 kb	1	helicoidal	sí	70-200	<i>Rhabdoviridae</i>
6 kb	1	helicoidal	sí	80-100	<i>Bornaviridae</i>
10-15 kb	8	helicoidal	sí	100	<i>Orthomyxoviridae</i>
12-23 kb	3	helicoidal	sí	90	<i>Bunyaviridae</i>
11 kb	2	helicoidal	sí	50-200	<i>Arenaviridae</i>
RNA de cadena única - Transcriptasa inversa					
7-10 kb	dímero	icosaédrica	sí	90	<i>Retroviridae</i>
DNA de cadena doble - Transcriptasa inversa					
3 kpb	1	icosaédrica	sí	42	<i>Hepadnaviridae</i>

Tabla 1.5. Clasificación de los virus de importancia médica.

permanecer en estado latente durante años en el núcleo celular, o bien transcribirse luego de la inducción espontánea o como consecuencia de diversos estímulos a nivel celular, que no se conocen con exactitud (Capítulo 5, *Patogenia de las infecciones virales* y Capítulo 22, *Retrovirus*).

4.2 INTERACCIÓN DE LOS VIRUS CON EL ORGANISMO INMUNOCOMPETENTE

A diferencia de lo que sucede en la interacción de un virus y células en cultivo, en el hospedador entero inmunocompetente, los virus deben enfrentarse a todos los mecanismos de la inmunidad innata y a los complejos mecanismos humorales y celulares específicos que se desencadenarán luego de la infección. La acción directa del virus y/o los mecanismos inmunológicos que producen enfermedad son denominados **mecanismos patogénicos**. En esta batalla, los virus pueden perder y ser eliminados del organismo, lo que ocurre en la mayoría de los casos o, por el contrario, algunos virus pueden persistir, como por ejemplo en las infecciones latentes, para poder reactivarse con posterioridad (Capítulo 5, *Patogenia de las infecciones virales* y Capítulo 7, *Mecanismos de defensa del hospedador frente a las infecciones virales*).

5. FUNDAMENTOS DE LA CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LOS VIRUS

Todos los seres vivos pueden ser parasitados por virus. **Los virus pueden clasificarse de acuerdo a sus hospedadores, formas de transmisión, estructura, presencia o no de envoltura, simetría, propiedades fisicoquímicas, tipo y características de sus genomas, y lugar de replicación.** También se considera el tropismo por determinados tejidos, ya que la acción patógena viral dependerá de su tropismo y según ella se orientará la confirmación etiológica dentro de un espectro limitado de virus causantes de una patología determinada.

De acuerdo a sus hospedadores, los virus pueden ser clasificados como virus de vertebrados, de insectos, de plantas, de bacterias, etc. Inicialmente, los virus se clasificaron por la especificidad del hospedador, las enfermedades producidas o bien a su tropismo tisular. Muchos nombres de virus derivan de su tropismo. Por ejemplo, los arbovirus replican en un artrópodo vector, los poliovirus producen poliomyelitis, los adenovirus se aislaron de adenoides, etc. Otros nombres de familias están basados con acrónimos tales como picornavirus (*pico* = pequeño,

RNA = ácido ribonucleico). En otros casos, el nombre proviene de alguna característica estructural del virión, por ejemplo, los coronavirus presentan una corona de espículas, o bien el nombre proviene del lugar de su primer aislamiento (Coxsackie, Marburg, West Nile, Junín, Andes, etc.).

Los virus pueden transmitirse por vía respiratoria, digestiva, cutáneo-mucosa o ingresar directamente a la sangre a través de picaduras de artrópodos o bien por transfusiones de sangre o materiales contaminados con sangre (agujas contaminadas con los virus hepatitis B, hepatitis C, HIV, etc.).

Los virus entéricos son aquellos que penetran y replican primariamente en el tracto gastrointestinal. Este grupo incluye numerosos virus desnudos y por ello resistentes al ácido estomacal y a las sales biliares, como los enterovirus (poliovirus, Coxsackie, virus hepatitis A), y otros como rotavirus, calicivirus, adenovirus entéricos, etc.

Los virus respiratorios penetran a través de la mucosa respiratoria, por inhalación, auto-inoculación o por contacto con fomites contaminados y producen patología localizada exclusivamente en el aparato respiratorio (*ortomixovirus*, muchos *paramixovirus*, coronavirus, *rinovirus*, y adenovirus). Otros virus, si bien penetran por vía respiratoria se diseminan a otros órganos a través de viremia (presencia de virus en sangre) como los virus que producen el sarampión, paperas, rubéola y viruela (actualmente erradicada).

El término **arbovirus** se aplica a aquellos virus que se transmiten por medio de artrópodos hematófagos cuando éstos ingieren sangre de un vertebrado virémico. Este proceso no consiste en la simple transmisión mecánica sino en la replicación viral activa en los tejidos de los artrópodos (mosquitos, garrapatas, culicídeos). El nombre proviene del inglés *arthropod-borne viruses*. Los arbovirus se incluyen en las familias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* y *Reoviridae*.

Existe un Comité Internacional de Taxonomía que clasifica a los virus e incluye a los nuevos que se descubren, en la familia que les corresponde. Los virus se agrupan en familias, subfamilias y géneros. Los criterios para definir una familia son: 1) tipo de ácido nucleico, estructura del genoma, mecanismos y lugar de replicación; 2) tamaño del virión y simetría de la cápside; 3) número de capsómeros en los virus desnudos o diámetro de la hélice en los virus helicoidales; 4) presencia o no de envoltura; 5) lugar de ensamblaje de las partículas virales (núcleo o citoplasma); 6) forma de salida de la célula hospedadora.

La nomenclatura de los órdenes, familias, subfamilias y géneros virales se escribe con mayúsculas (*Picornaviridae*, *Adenoviridae*). En aquellas familias que se dividen en subfamilias se emplea el sufijo *virinae* (*Lentivirinae*).

En el año 2011, según comunicación del Comité Internacional de Taxonomía Viral, se conocían 6.000 virus, 6 órdenes, 87 familias, 19 subfamilias, 349 géneros y 2.284 especies de virus y viroides que afectan a todos los seres vivos. Los virus que causan patología humana se resumen en la Tabla 1.5 y la Figura 1.7.

La subdivisión de las familias en géneros depende de criterios diferentes según las familias. Cada género puede tener cientos de especies distintas, las que se identifican por diferencias antigénicas.

Existen virus que tienen un único **serotipo** (sarampión, rubéola); otros presentan 3 serotipos (poliovirus) mientras que otros poseen más de 100 serotipos diferentes (rinovirus). Esto tiene gran importancia para seleccionar las cepas que deberán incluirse en las vacunas.

A su vez, dentro de un mismo serotipo pueden albergarse uno o múltiples **tipos genómicos o genotipos**. Por ejemplo, en el virus hepatitis B un único serotipo incluye al menos ocho genotipos diferentes.

Las divergencias genómicas que permiten la expresión de diferentes serotipos son mayores que las que acaecen entre los diversos genotipos. El porcentaje de homología nucleotídica (similitud nucleotídica) que define un genotipo como diferente de otro es variable según el virus en cuestión, por lo cual un mismo porcentaje de homología puede definir para un virus un genotipo y, para otro, un subtipo.

Se denominan **cuasiespecies virales** a genomas viables sometidos a un proceso de evolución y selección cuyas secuencias nucleotídicas están íntimamente relacionadas entre sí (diferenciadas por pocas mutaciones), las que varían alrededor de una secuencia *master*.

Recientemente, se ha agrupado a los virus en órdenes o taxones. Por ejemplo, los virus incluidos en el orden *Mononegavirales* presentan todos un genoma de cadena única, son no segmentados y de polaridad negativa. Este orden incluye tres familias: *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Flaviviridae*.

6. LOS VIRUS NO SON LOS AGENTES PATÓGENOS MÁS PEQUEÑOS:

¿QUÉ SON LOS VIRIONES, LOS VIROIDES Y LOS PRIONES?

Recordemos que se denomina **virión a la partícula viral completa e infectante**. Es decir, a la partícula que posee tanto sus características estructurales como su infectividad intactas.

Existen otros agentes de menor tamaño y complejidad que los virus, denominados **viroides**. Los viroides fueron descubiertos por Diener en 1971 y producen enfermedades en plantas (pepino, crisantemo, cítricos, etc.), lo que ocasiona pérdidas económicas en las plantaciones de vegetales. Se caracterizan por presentar un único tipo de ácido nucleico (RNA). Se diferencian de los virus verdaderos en que carecen de cápside y de envoltura; no poseen información para la síntesis proteica; son muy resistentes al calor y su ácido nucleico es siempre infeccioso en condiciones naturales.

Finalmente, existen otros patógenos denominados **agentes virales no convencionales** que comparten algunas propiedades de los virus pero se diferencian en su estructura y en su extraordinaria resistencia a los agentes inactivantes de virus. Estos agentes no convencionales presentan características asombrosas:

a) carecen de cápside o envoltura y por ello no poseen capacidad antigénica, por lo que son incapaces de desencadenar respuesta inmune alguna en el hospedador; b) no se conoce su ácido nucleico, por lo que son los primeros agentes infecciosos sin ácido nucleico detectables hasta el momento en la naturaleza en este planeta; y c) son resistentes a los agentes inactivantes de virus incluyendo calor, luz ultravioleta, formol, glutaraldehído, etc.

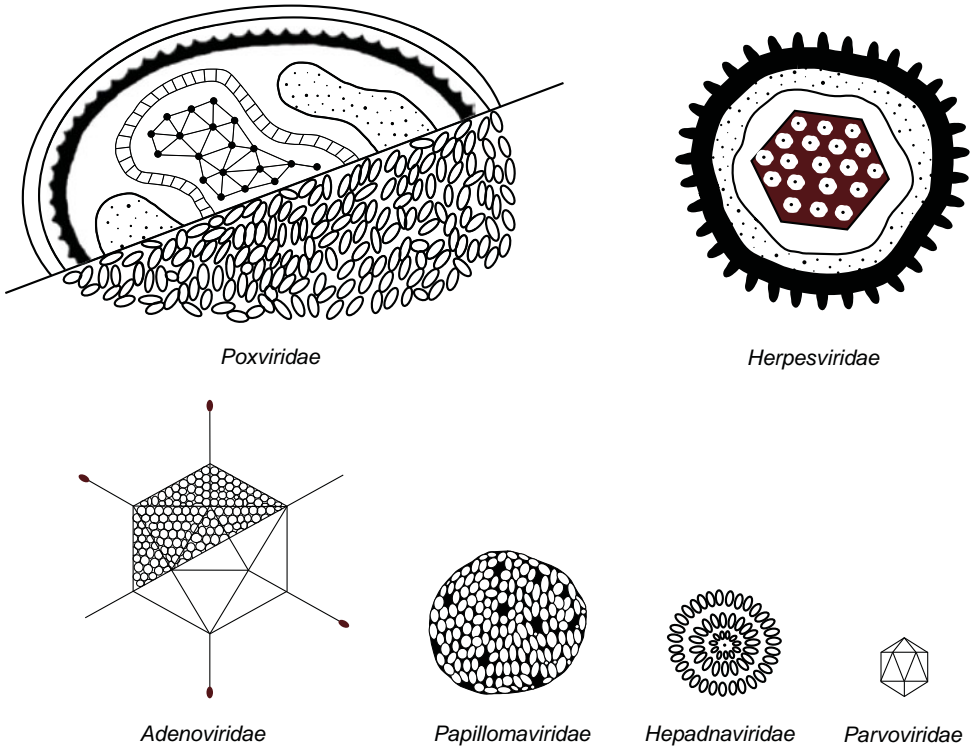
Producen enfermedades lentas del sistema nervioso central que afectan al hombre (*kuru* o ataxia degenerativa endémica; enfermedad de Creutzfeldt-Jacob o demencia presenil) o al ganado ovino (*scrapie*) y bovino (encefalopatía espongiiforme bovina o *enfermedad de la vaca loca*). A partir de la sustancia amiloide de los enfermos se pudieron aislar unas glucoproteínas capaces de transmitir la enfermedad a ratones. Su descubridor, S. Prusiner, las denominó **priones** (*proteinaceous infective particle*) y por este descubrimiento recibió el premio Nobel.

Al microscopio electrónico, los priones se observan como fibrillas de 20-200 nm. No se conoce su mecanismo de replicación pero se postula que, dado que no poseen la información genética necesaria para su síntesis, ésta estaría codificada en el genoma de la célula hospedadora. Normalmente, esa información estaría reprimida y la infección con priones produciría su des-represión y permitiría la replicación del prión y el posterior desarrollo lento de la enfermedad, muchos años después de ocurrida la infección (Capítulo 31, Encefalopatías espongiiformes transmisibles).

7. ¿CÓMO PUEDEN INACTIVARSE LOS VIRUS? EFECTO DE LOS AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS

Diversos agentes físico-químicos (temperatura, luz ultravioleta, pH, medio iónico y solventes lipídicos) pueden actuar sobre los constituyentes del virión produciendo su inactivación. El conocimiento de la sensibilidad o resistencia de los virus a estos agentes es importante para: 1) determinar sus formas de transmisión; 2) emplear métodos de inactivación viral adecuada para materiales contaminados que necesitan desinfección; 3) efectuar el tratamiento correcto del agua potable, etc.; 4) conocer la viabilidad de muestras

VIRUS CON DNA



VIRUS CON RNA

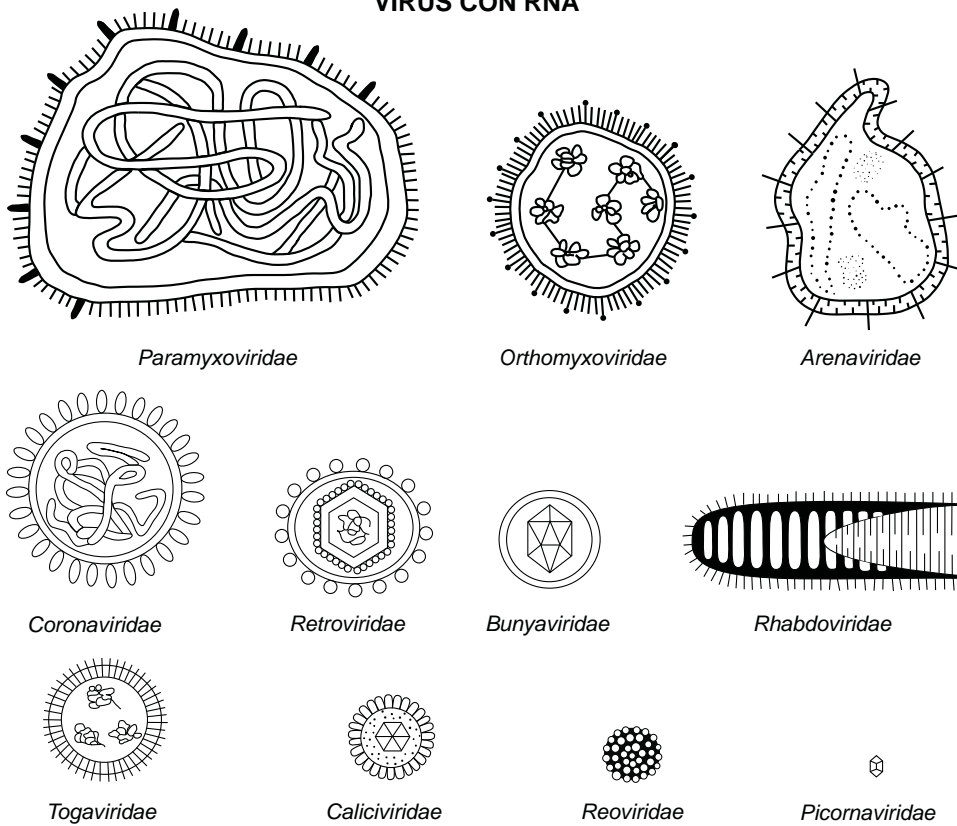


Figura 1.7. Principales familias de virus patógenos para el hombre.

clínicas para diagnóstico virológico; 5) conservar adecuadamente las vacunas virales, en especial aquellas a virus vivo y atenuado.

7.1.1 Temperatura

La mayoría de los virus son lábiles al calor. Es suficiente una hora a 55-60° C para inactivar la mayoría de los virus por desnaturalización de las proteínas de la cápside. Constituyen excepciones a esta regla el virus hepatitis B, los adenoasociados y viroides, que resisten esa temperatura.

Como regla general, la vida media de la mayoría de los virus libres puede ser medida en segundos a 60° C, en minutos a 37° C, en horas a 4° C, en días a -20° C, en meses a -70° C y en años a -196° C.

La esterilización por calor seco en estufa (1½ hora a 180 °C) o por calor húmedo en autoclave (20 a 30 minutos a 120° C y a 1½ atmósferas de presión por encima de la presión atmosférica) destruye todos los virus, incluyendo a los más resistentes como el de hepatitis B. Por esta razón, la estufa o el autoclave son instrumentos usados para esterilización de diversos materiales de uso médico.

La temperatura ambiente inactiva muchos virus, aunque el tiempo requerido depende de las características de la familia. El virus hepatitis B y los poxvirus (viruela) pueden conservar su infectividad a temperatura ambiente durante meses, lo que facilita la transmisión por medio de fomites, aun en ausencia de contacto directo con el enfermo. Por el contrario, los ortomixovirus (influenza), los paramixovirus (sarampión, sincicial respiratorio, etc.) o los herpesvirus se inactivan rápidamente en pocas horas a temperatura ambiente. En estos casos, se requiere un contacto directo con el enfermo o fomites contaminados para lograr su efectiva transmisión a un nuevo hospedador.

En relación al diagnóstico virológico, la conservación adecuada de las muestras provenientes de pacientes para el aislamiento viral es fundamental. Estas muestras deben ser conservadas a 4° C y enviadas rápidamente al laboratorio en hielo granizado o con enfriadores de uso doméstico. Es importante evitar la congelación ya que muchos virus, en especial aquellos con envoltura como el virus sincicial respiratorio, o citomegalovirus son muy sensibles a la congelación y descongelación.

En el laboratorio, habitualmente se preparan y conservan cepas virales denominadas semillas, *stocks* o lotes, los que se emplean en algunos métodos diagnósticos y en pruebas de control de calidad en el diagnóstico. Luego de la replicación del virus en células permisivas se logra un lote viral, el que se titula y fracciona en alícuotas con el agregado de medios protectores conteniendo suero o dimetilsulfóxido para preservar su infectividad. Los lotes virales se conservan en congeladoras a -70° C o en tanques de nitrógeno líquido a -196° C durante meses o años.

Otro procedimiento empleado para preservar la infectividad es la liofilización (deseccación en frío usando cámaras de vacío). Este método se utiliza en la conservación de vacunas ya que facilita su traslado a 4° C y, aun a temperatura ambiente. El hecho de que la vacuna antivariólica liofilizada pudiera ser conservada durante meses en esas condiciones fue un factor fundamental en la eficacia de las campañas de vacunación que permitieron lograr la erradicación de la viruela del planeta (Capítulo 48, Vacunas Virales).

7.1.2 pH y medio iónico

Los virus se conservan mejor en medios isotónicos y a pH fisiológico, aunque algunos pueden soportar un amplio rango de pH y fuerzas iónicas. Por ejemplo, los enterovirus resisten el pH ácido del estómago y por esa razón pueden penetrar por vía digestiva.

En aquellos casos en que es imprescindible preservar la infectividad, como por ejemplo en la preparación de vacunas a virus vivo y atenuado, se adicionan sales de MgCl₂ ya que aumentan la resistencia de los virus a la inactivación térmica.

7.1.3 Radiaciones

La radiación ultravioleta y las radiaciones ionizantes (rayos X o radiaciones gamma) producen alteraciones irreversibles en el genoma y por ello pueden inactivar a los virus, en especial a aquellos con

ácidos nucleicos monocatenarios. Se ha utilizado la luz ultravioleta para inactivar vacunas como la anti-rábica que fue usada en nuestro país (vacuna Fuenzalida-Palacios).

Asimismo, puede usarse luz ultravioleta para desinfectar áreas de trabajo en el laboratorio (flujos laminares, mesadas, etc). La fuente emisora es un tubo germicida y la radiación emitida actúa formando dímeros entre las cadenas adyacentes de pirimidinas. Dado que la luz ultravioleta posee escaso nivel de penetración, sólo puede emplearse en la desinfección de áreas que reciban directamente la luz emitida.

Las radiaciones ionizantes (Cobalto 60) se utilizan para esterilizar materiales plásticos de uso médico (sondas, catéteres, jeringas, etc.) o de laboratorio (botellas, tubos y policubetas para cultivos celulares). En la actualidad, la mayor parte del material descartable se esteriliza por este método.

7.1.3 Solventes de lípidos

La presencia o no de envoltura determina la sensibilidad de los virus a los solventes lipídicos. Los virus con envoltura se inactivan fácilmente con estos solventes (éter, cloroformo, sales biliares, o con detergentes aniónicos). Por el contrario, los virus desnudos son resistentes a estos agentes y por ello pueden ser infectivos por vía digestiva ya que resisten la acción de las sales biliares (*Picornavirus*: poliovirus, Cocksackie, etc.). La sensibilidad a los solventes de lípidos es empleada en la clasificación preliminar de los virus aislados de muestras clínicas.

7.1.4 Nociones de Vacunas a virus inactivados

Las vacunas a virus inactivados están constituidas por suspensiones de virus en las que se inactiva la infectividad pero se conserva la antigenicidad. El formaldehído es un inactivante clásico y fue usado por Jonas Salk para preparar la primera vacuna antipoliomielítica. El formaldehído reacciona con los grupos amino de las proteínas y con los ácidos nucleicos. Otros inactivantes utilizados para vacunas son la luz ultravioleta y la betapropiolactona (Capítulo 58, Vacunas Virales).

8. NOCIONES DE ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN

Este tema se tratará en el capítulo de Bioseguridad pero definiremos aquí algunas nociones esenciales ya que para prevenir las infecciones nosocomiales (intra-hospitalarias) es fundamental la utilización de procedimientos de esterilización y desinfección.

Se define a la **esterilización** como aquel procedimiento que logra la ausencia total de microorganismos viables, mientras que la **desinfección** es la destrucción de la infectividad potencial de un material determinado. Para lograr la esterilización pueden utilizarse métodos físicos como la temperatura (en estufa de esterilización o en autoclave), las radiaciones o bien los agentes mecánicos como la filtración a través de filtros con poros de 0,2 micrones que pueden retener las bacterias y hongos.

La esterilización adecuada se logra sólo cuando se obtiene la exposición requerida en cuanto a temperatura (y eventual presión) y tiempo. En una estufa de esterilización, las condiciones adecuadas son: 200° C durante 1 hora; ó 180° C durante 1½ hora ó 160° C durante 2 horas. En el autoclave, las condiciones de esterilización son: 120° C durante 20 a 30 minutos a 1½ atmósfera de presión por encima de la presión atmosférica. El método a elegir depende del material a esterilizar. Para ropas, material de goma y soluciones tamponadas sin proteínas debe utilizarse el autoclave, ya que esos elementos no resistirían el calor seco de la estufa. Para aquellos materiales que resisten el calor (vidrio, instrumental quirúrgico metálico) puede emplearse la estufa de esterilización. En materiales que no resisten el calor (plásticos, sondas, endoscopios, etc.) se utiliza el óxido de etileno o la radiación ionizante.

La filtración a través de membranas con poros de 0,2 micrones se emplea para esterilizar medios de cultivo de células, los que contienen soluciones tamponadas, sueros animales, vitaminas, enzimas,

etc. Estas sustancias no resisten el calentamiento que destruye sus constituyentes esenciales, por lo que se debe emplear la filtración.

Para desinfección de superficies en el medio hospitalario, en el laboratorio, así como también para material de laboratorio contaminado, se utiliza hipoclorito de sodio al 10% (agua lavandina de uso doméstico) ó 1-5% de cloro activo. Es importante recordar que las soluciones de hipoclorito de sodio deben prepararse diariamente a la concentración adecuada, ya que se evapora disminuyendo así la concentración de cloro activo y por lo tanto su efectividad como desinfectante. También puede emplearse glutaraldehído al 2% o ácido peracético para los elementos que no resisten la acción del hipoclorito.

Para la antisepsia de piel no es posible utilizar los productos recién mencionados por ser tóxicos. En este caso deberán utilizarse alcohol iodado al 2%, cloroheximida al 0,5-1%, o bien etanol al 70%.

9. NOMENCLATURA DE LOS VIRUS

Los virus se designan según normas establecidas por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (*International Committee for Taxonomy of viruses* -ICTV-). Al igual que acontece con otros agentes biológicos, los órdenes, familias, subfamilias y géneros se deben consignar en itálica y con la primera letra mayúscula.

En agosto de 2002, el ICTV propuso (Capítulo 3 sobre las Reglas de Clasificación y Nomenclatura de virus) reemplazar su previa denominación taxonómica (se los consignaba con letra minúscula) por su designación en letra itálica, y mayúscula en la letra inicial de la primera palabra. Otras palabras inherentes a la denominación de un virus, sólo se consignan con mayúscula si corresponden a un nombre propio o a partes de un nombre propio.

Los nombres de las enfermedades producidas por virus deben escribirse con minúscula. Asimismo, cuando se emplea el nombre de una familia en forma genérica (por ejemplo, los poliovirus o los herpesvirus) también debe utilizarse la letra minúscula.

Sin embargo, el ICTV indica textualmente que "no es necesaria" la escritura en itálica y letra inicial mayúscula cuando se refiere a una entidad donde el virus "adjetiva" otro componente (por ejemplo, "la polimerasa del virus del mosaico del tabaco"), o se refiere a entidades físicas que hacen referencia a viriones (por ejemplo, "1 µg de virus del mosaico del tabaco").

No obstante lo mencionado, el lector podrá comprobar que, aun las publicaciones científicas internacionales más relevantes en el ámbito de la Virología, estas reglas no siempre se aplican uniformemente.

Por lo expuesto, en esta obra podrá observarse que los virus son mencionados con mayúscula o minúscula.

Bibliografía

- Collier L, Oxford J. *Human Virology*, Second Edition. Oxford, Oxford University Press, 2000.
- Comité Internacional de Taxonomía de Virus o ICTV, <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>
- David M, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. *Fields Virology*. 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (LWW), 2007.
- ICTV. The International code of virus classification and nomenclature. August 2002. http://ictvonline.org/codeOfVirusClassification_2002.asp.
- Informe semana epidemiológica 49 (22, diciembre, 2009).
- Neuman G, Noda T, Kawaoka Y. "Emergence and pandemic potencial of swine-origin H1N1 Influenza Virus". *Nature* 2009; 459: 931-9.
- Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. Emergence of a novel swine origin Influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009; 360: 2605-15.
- Organización Panamericana de la Salud Actualización semanal pandemia H1N1, 2009.
- Storch GA. *Essentials of Diagnostic Virology*. New York, Churchill Livingstone Editor, 2000.
- Strauss JH, Strauss EG. *Viruses and Human Disease*. San Diego, California, Academic Press, Elsevier, 2002.
- Van Regenmortel Marc HV, Mahy Brian WJ. "Emerging Issues in Virus Taxonomy". *Emerg Infect Dis* 2004, 10: 8-13.
- Wagner EK, Martinez JH. *Basic Virology*. Massachusetts, USA, Blackwell Science, Inc., 2004.



Replicación viral

Viviana Castilla - Elsa B. Damonte

1. INTRODUCCIÓN

Una característica fundamental de los virus es su dependencia de la maquinaria biosintética y energética de la célula que infectan, siendo incapaces de replicar en el medio extracelular. Por lo tanto, en muchos aspectos, el estudio de la replicación viral comprende el análisis de las interacciones entre el virus y la célula hospedera. La replicación viral puede, en algunos casos, producir daño o muerte celular siendo estos procesos una de las causas de las enfermedades producidas por virus, por lo que el conocimiento de los mecanismos de patogénesis viral se basa en parte en el estudio de la replicación intracelular. Asimismo, el desarrollo de compuestos con actividad antiviral requiere del conocimiento de las características del ciclo de multiplicación de un virus a fin de determinar aquellos eventos de la replicación que involucren procesos o componentes específicamente virales.

Las infecciones virales pueden ser clasificadas en productivas y no productivas. Las infecciones productivas son aquellas que tienen como consecuencia la producción de nuevas partículas virales infecciosas (progenie viral). Dentro de este tipo de infecciones, algunas llevan a la muerte y lisis de la célula infectada mientras que en otros casos la célula sobrevive y continúa produciendo virus a veces a bajos niveles (infecciones crónicas), aunque en algunos casos los niveles pueden ser fluctuantes o persistentemente elevados (ejemplo, la hepatitis C crónica). En el caso de las infecciones no productivas, la replicación viral se encuentra bloqueada y la célula infectada puede o no sobrevivir.

2. CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL

El ciclo de replicación de un virus, conjunto de eventos que conducen a una infección viral productiva, comienza con la unión de las partículas virales con receptores específicos presentes en la superficie celular, proceso denominado *adsorción*. Esta interacción inicial es seguida por la etapa de penetración que permite la incorporación del material genético viral en la célula. A continuación, mediante estrategias que difieren de acuerdo a la naturaleza del material genético, se produce la expresión y replicación del genoma viral. Finalmente, los componentes virales sintetizados se ensamblan de manera de conformar partículas virales maduras (viriones) que son liberadas de la célula infectada. Consideraremos ahora los aspectos sobresalientes de cada una de las etapas del ciclo de replicación de un virus.

2.1 ADSORCIÓN

Para iniciar la replicación en una célula los virus deben adherirse a la membrana plasmática y dicha interacción implica la unión de una proteína de la cubierta viral (cápside o envoltura), denominada anti-receptor o proteína de unión, con una molécula presente en la superficie celular o *receptor*. La presencia de receptores específicos es lo que determina la susceptibilidad de un tipo celular a determinado virus, por lo tanto esta interacción inicial entre el virus y la célula es de suma importancia en la patogénesis viral. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la sola presencia de receptores adecuados no necesariamente conduce al desarrollo exitoso de una infección productiva ya que ésta requiere además de otros factores intracelulares cuya presencia determina la permisividad celular respecto a un virus dado. La capacidad de un virus de invadir y replicar en un tipo celular particular se denomina *tropismo celular* o tisular.

Diferentes moléculas presentes en la superficie de la célula, como proteínas, glicoproteínas o carbohidratos que normalmente cumplen un papel importante en la fisiología celular, pueden ser utilizadas como receptores virales. Las moléculas receptoras utilizadas por algunos virus son proteínas que se expresan únicamente en la superficie de células diferenciadas por lo que estos virus exhiben un tropismo tisular restringido, por ejemplo, el virus hepatitis B que replica en hepatocitos o el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) que multiplica en linfocitos T CD4⁺ y macrófagos. Los miembros de algunas familias de virus, como picornavirus y retrovirus, han evolucionado hacia la utilización de distintos receptores. A pesar de la existencia de esta heterogeneidad, también ocurre que virus no relacionados comparten un mismo receptor.

Si bien la interacción de virus como poliovirus, rinovirus o el virus influenza con un único receptor es suficiente para permitir la posterior penetración del virus a la célula, los virus HIV-1, adenovirus y alfa herpesvirus requieren de la interacción con un receptor primario, que facilita la unión a la superficie celular, y con un co-receptor necesario para la entrada del virus a la célula. En el caso de adenovirus, por ejemplo, el inicio de la infección implica una primera interacción de la partícula viral con un tipo de molécula receptora (molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase I o una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas denominada CAR) y una segunda interacción con proteínas de la familia de las integrinas, indispensable para la internalización del virus a la célula.

2.2 PENETRACIÓN

Luego de la unión al receptor, el virus debe atravesar la membrana plasmática para iniciar su replicación. En el caso de los virus envueltos, la *penetración* viral puede ocurrir por fusión a nivel de la membrana plasmática o por endocitosis mediada por receptor y ambos mecanismos involucran un proceso de fusión de membranas.

En el caso de los virus que entran por fusión a nivel de la membrana plasmática, la unión al receptor provoca cambios conformacionales en las espículas glicoproteicas virales que conducen a la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática. Dicha fusión es mediada por una glicoproteína denominada *proteína de fusión* que puede ser o bien la misma glicoproteína viral que actúa como anti-receptor o bien otra glicoproteína integral de la envoltura. Este proceso de fusión de membranas, utilizado por ejemplo por los paramyxovirus, los herpesvirus y algunos retrovirus como HIV, es independiente del pH y conduce a la liberación de la nucleocápside o de la cápside viral en el interior del citoplasma.

Otros virus envueltos, como rhabdovirus, influenzavirus y arenavirus, que presentan una actividad de fusión dependiente de pH ácido, luego de la unión al receptor son incorporados a la célula a través de un mecanismo de endocitosis (Figura 2.1). Diferentes virus pueden utilizar distintas vías endocíticas, ya sea endocitosis mediada por clatrina, por caveola o macropinocitosis. En la ruta endocítica que ha sido más estudiada hasta el momento, las partículas virales son internalizadas en vesículas recubiertas por la proteína clatrina y luego transportadas a los endosomas. El pH ácido en el interior de los endosomas induce cambios en la conformación de las espículas glicoproteicas de la envoltura viral, exponiéndose regiones hidrofóbicas de la proteína de fusión que será la responsable de mediar la fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal que lleva a la pérdida de la envoltura viral.

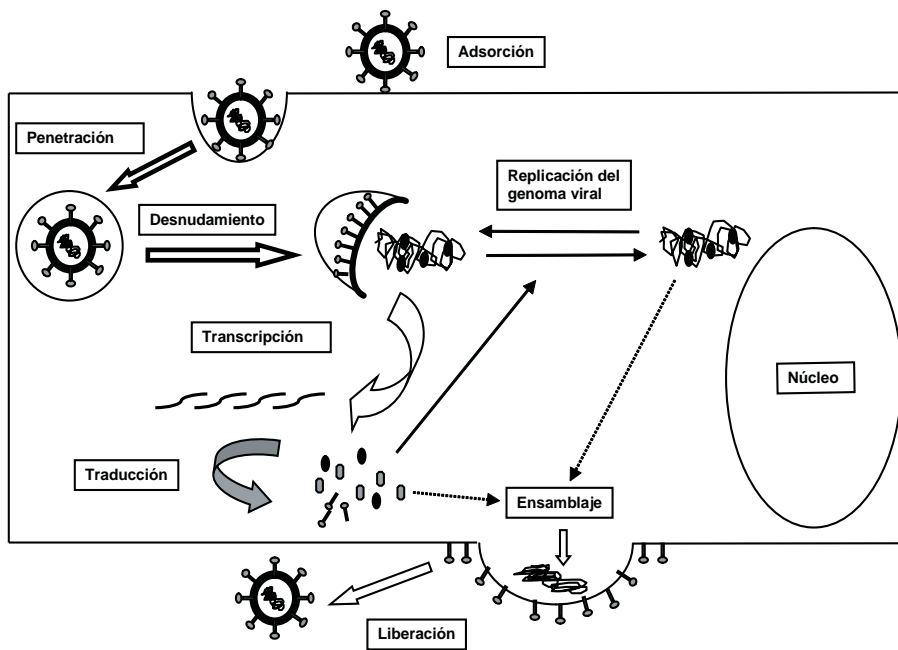


Figura 2.1. Aspectos generales del ciclo de replicación de un virus tomando como modelo un virus envuelto con genoma RNA cuya replicación transcurre en el citoplasma celular.

Con respecto a los virus desnudos, en la mayoría de los casos la incorporación de las partículas virales ocurriría mediante un mecanismo de endocitosis mediada por receptor. Sin embargo, para poliovirus existen evidencias que indican que la interacción de este virus con su receptor PVr, una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas, lleva a rearrreglos en la conformación de la partícula viral y a un aumento de su hidrofobicidad y afinidad por las membranas. Estas alteraciones conducirían finalmente a la formación de poros en la membrana plasmática permitiendo la incorporación del RNA viral al citoplasma de la célula.

2.3 DESNUDAMIENTO

La pérdida de la cubierta externa viral (envoltura o cápside) se conoce como proceso de *desnudamiento* y es imprescindible para la posterior expresión de los genes virales. A excepción de los virus con genoma RNA simple cadena de polaridad positiva, el desnudamiento no implica la liberación del ácido nucleico desnudo en el interior de la célula sino que el mismo permanece íntimamente asociado a algunas proteínas virales conformando complejos nucleoproteicos.

El desnudamiento puede ocurrir durante la penetración a nivel de la membrana plasmática (poliovirus o virus envueltos como paramyxovirus y HIV) o a nivel de vesículas endosomales, es decir subsecuentemente a la internalización de la partícula viral (Figura 2.1). Este último caso es el de virus envueltos, como rhabdovirus, influenzavirus o arenavirus, y virus desnudos que ante la exposición al pH ácido de estas vesículas intracelulares sufren alteraciones en la conformación de las proteínas de cápside que provocarían la lisis o permeabilización de la membrana endosomal, permitiendo la traslocación del material genético al citoplasma.

Una mención aparte merecen los virus cuyo desnudamiento ocurre a nivel de los poros de la membrana nuclear como herpesvirus y adenovirus. Luego de la pérdida de envoltura durante la penetración por fusión a nivel de la membrana plasmática, en el caso de herpesvirus, o de la liberación de partículas virales parcialmente desensambladas a partir de los endosomas, en el caso de adenovirus, la cápside viral liberada en el citoplasma es transportada hacia el complejo del poro nuclear a través del que se produciría el ingreso del genoma viral al núcleo de la célula.

2.4 EXPRESIÓN Y REPLICACIÓN DEL GENOMA

Los procesos de biosíntesis intracelular de macromoléculas virales comprenden:

- 1) la *expresión del genoma* a través de la síntesis de las proteínas virales, para lo que previamente deben generarse los correspondientes RNA mensajeros (RNAm);
- 2) la *replicación del genoma* viral a través de la síntesis de moléculas progenie del ácido nucleico viral.

En general, las variaciones que se observan en los mecanismos para desarrollar estos procesos biosintéticos dependen fundamentalmente de las características del genoma viral, y en base a ello, se pueden agrupar todos los virus en tres grandes categorías: 1) virus con genoma a DNA; 2) virus con genoma a RNA; 3) virus con transcripción inversa. En todos los casos, los mecanismos para llevar a cabo la biosíntesis han debido respetar las restricciones que la célula impone para la utilización de su maquinaria en dos aspectos básicos. Por un lado, los virus deben expresar RNAm que sean traducibles a proteínas por el sistema celular, es decir, RNAm monocistrónicos. Además, de acuerdo a la mayor o menor utilización de las diferentes enzimas celulares por parte de los virus, los procesos de transcripción y replicación del genoma viral tendrán lugar en el núcleo o el citoplasma.

2.4.1 Virus con genoma a DNA

Dado que el DNA es el material genético de la célula eucariótica, no es sorprendente que la mayoría de los virus con genoma a DNA usen en gran medida la maquinaria enzimática celular para expresar y replicar su genoma y que los mecanismos con que ocurren estos eventos sean en muchos casos réplicas de los que normalmente realiza la célula. Asimismo, hay una amplia mayoría de virus con DNA de cadena doble (DNA cd) y sólo unas pocas especies de virus con genoma DNA de cadena simple (DNA cs).

Para los virus que portan un genoma a DNA cd, como herpesvirus, adenovirus, papillomavirus y polyomavirus, siempre el primer paso es la transcripción, es decir la síntesis de RNAm subgenómicos, a partir de cada uno de los cuales se va a sintetizar una proteína viral (Figura 2.2, Grupo I). En la mayoría de los casos, la transcripción no es simultánea para todos los genes sino que ocurre secuencialmente; primero se trans-

criben los genes llamados tempranos, que codifican para proteínas no estructurales, generalmente enzimas requeridas luego para la replicación del DNA y otras proteínas que pueden inducir diferentes fenómenos en la célula hospedera. La transcripción tardía abarca a los genes que corresponden a las proteínas estructurales, es decir, las que conforman la cápside y envoltura viral. Entre ambas rondas de transcripción, suele ocurrir la replicación del DNA viral. En general, la síntesis de RNAm virales es catalizada por la RNA polimerasa II celular, mientras que la replicación del DNA viral está a cargo de una DNA polimerasa propia del virus. Dada la localización nuclear de la RNA polimerasa II, ambos procesos transcurren en el núcleo, hacia donde debe migrar el genoma viral luego que es liberado en el citoplasma. Una excepción la constituyen los poxvirus, que realizan todo su proceso de biosíntesis en el citoplasma, por lo que deben aportar no sólo su propia DNA polimerasa sino también una RNA polimerasa para sintetizar los RNAm.

Los virus con genoma a DNA cs, que incluyen parvovirus y circovirus, primero pasan a DNA cd sintetizando la cadena complementaria y luego, a partir de este DNA cd, sintetizan sus RNAm, para expresar las proteínas correspondientes, como así también las cadenas de DNA genómico (Figura 2.2, Grupo II). Estos virus tienen un genoma muy pequeño, donde sólo se expresan 4-5 genes, no presentan regulación temporal de la transcripción, y, al igual que los virus a DNA cd de menor tamaño genómico, son altamente dependientes de la célula hospedera pues en general sólo multiplican en células en proceso de división activa. Por el contrario, los virus a DNA grandes, que poseen alrededor de 50-250 genes, pueden replicar en células que no están en división pues aportan una amplia variedad de enzimas para generar los precursores de sus ácidos nucleicos.

2.4.2 Virus con genoma a RNA

Dentro del grupo de los virus con genoma a RNA se da la situación inversa a la descrita para los virus con DNA: los virus con RNA de cadena simple (RNA cs) son mayoritarios frente a los de RNA cadena doble (RNA cd). Tanto la transcripción como la replicación de estos genomas implican la síntesis de una hebra de RNA sobre un templado de RNA, la enzima para catalizar este proceso es una RNA polimerasa RNA dependiente que no existe en la célula eucariótica, por lo que siempre debe ser obligatoriamente codificada por el virus.

Los virus con genoma RNA cs han sido clasificados de acuerdo a la relación que existe entre la cadena de RNA genómico y la cadena de RNAm, propuesta efectuada por Baltimore hace casi cuatro décadas y que aún se mantiene vigente. Hay dos posibilidades: que el RNA genómico tenga la secuencia del RNAm o que, por el contrario, que el RNA genómico tenga la secuencia complementaria al RNAm. Tomando la convención de asignar polaridad positiva al RNAm, aquellos virus cuyo genoma es directamente el RNAm se denominan virus RNA de polaridad positiva (RNA+) y los que poseen la secuencia complementaria al RNAm son virus RNA de polaridad negativa (RNA-).

Los virus RNA+ (ejemplos: picornavirus, flavivirus, togavirus y coronavirus) directamente sintetizan total o parcialmente sus proteínas como primera etapa de biosíntesis intracelular (Figura 2.2, Grupo III). Entre estas proteínas se halla la RNA polimerasa que va a catalizar la replicación del genoma, pasando primero a la hebra complementaria, negativa, y luego a partir de ésta se copia la cadena de RNA genómico. Esta síntesis de RNA siempre ocurre en una estructura que se denomina intermediario replicativo (IR), en la que sobre una cadena de RNA se van copiando simultáneamente varias cadenas de RNA complementarias.

Los virus RNA- (Figura 2.2, Grupo IV; ejemplos: rhabdovirus, myxovirus y paramyxovirus) deben primero sintetizar RNAm para poder expresarse, por lo tanto la RNA polimerasa es siempre una proteína constitutiva del virión, que está asociada al genoma, y cataliza la síntesis de los RNAm que son luego traducidos. A continuación ocurre a partir del RNA infectante la replicación del genoma, por síntesis sucesiva de las dos cadenas complementarias, primero la positiva y luego la negativa, en IR, al igual que en los virus RNA+. Cabe acotar que hay dos familias de virus RNA cs denominadas

ambisentido, los arenavirus y los bunyavirus, que tienen un genoma con una región de polaridad positiva y una región de polaridad negativa. Sin embargo, estos virus son considerados dentro del grupo de virus RNA de polaridad negativa, porque su estrategia es similar a los RNA-, ya que el primer evento de biosíntesis es la transcripción de RNAm.

Los virus con genoma RNA cd también tienen asociada al genoma la RNA polimerasa RNA dependiente, que transcribe RNAm a partir de una de las hebras del genoma (Figura 2.2, Grupo V; ejemplo: reovirus). Este RNAm, luego de ser traducido, es también utilizado como templado para originar las moléculas de RNA cd genómicas.

Dado que los virus con genoma de RNA no utilizan las enzimas celulares para transcripción y/o replicación de sus genomas, realizan su ciclo de multiplicación íntegramente en el citoplasma celular. Los virus de influenza son la excepción a esta situación, ya que los RNA virales son transportados al núcleo porque requieren de la maquinaria de transcripción y procesamiento de la célula para sintetizar sus RNAm.

2.4.3 Virus con transcripción inversa

Dentro de los virus con capacidad de infectar células animales hay dos familias en las que hay una etapa de *transcripción inversa* es decir la síntesis de una cadena de DNA a partir de un templado de RNA catalizada por la enzima transcriptasa inversa viral. Estas familias son *Retroviridae* y *Hepadnaviridae* y a pesar de tener un genoma de RNA y DNA, respectivamente, se las clasifica en forma separada de los grupos anteriores (Figura 2.2, Grupos VI y VII).

El genoma de los retrovirus es diploide, formado por dos hebras idénticas de RNA de polaridad positiva, pero este RNA no se expresa directamente como RNAm. El virión porta la transcriptasa inversa que sintetiza una cadena de DNA complementaria al RNA genómico, proceso inverso justamente al de la transcripción celular. El RNA genómico del híbrido RNA-DNA es luego degradado por una ribonucleasa viral, y se sintetiza la hebra complementaria de DNA. Así se genera una molécula de DNA doble cadena que se dirige al núcleo celular y mediante una integrasa aportada por el virus se integra al cromosoma celular, donde se mantiene en una forma estable denominada provirus. El provirus es expresado como un gen celular, por la RNA polimerasa II de la célula y así se originan nuevas moléculas de RNA viral, que sirven como RNAm para expresar las proteínas virales y como genomas para formar los nuevos viriones.

Por el contrario, los hepadnavirus, entre los que se destaca el virus hepatitis B, tienen un genoma formado por dos cadenas de DNA de distinta longitud, una mayor (la L, del inglés *large*) y otra de menor tamaño (S del inglés *small*), las que al aparearse en las regiones complementarias originan una estructura cadena doble parcial (DNA cdp). El ciclo de replicación intracelular comienza con la reparación de las dos cadenas incompletas de manera tal que se origina una cadena doble de DNA completa (DNA cdc, Figura 2.2, Grupo VII). Este DNA cdc migra al núcleo, donde a diferencia de los retrovirus no se integra al cromosoma celular, sino que en forma de episoma libre es transcrito por la RNA polimerasa II celular a RNAm, y a partir del RNAm de mayor tamaño la transcriptasa inversa del virus sintetiza moléculas de DNA cdp, réplicas del genoma viral.

2.5 ENSAMBLAJE Y LIBERACIÓN

Una vez que se ha sintetizado dentro de la célula suficiente cantidad de proteínas y genomas virales, se pasa a las etapas finales del ciclo de multiplicación, que consisten en el *ensamblaje* de los distintos componentes para formar nuevas partículas virales y su posterior *liberación* o salida a partir de la célula infectada.

La forma en que transcurren estos procesos va a depender de las características de la cápside y de la presencia o no de envoltura. Las cápsides icosaédricas se ensamblan por interacción entre las distintas subunidades con total independencia de la síntesis del ge-

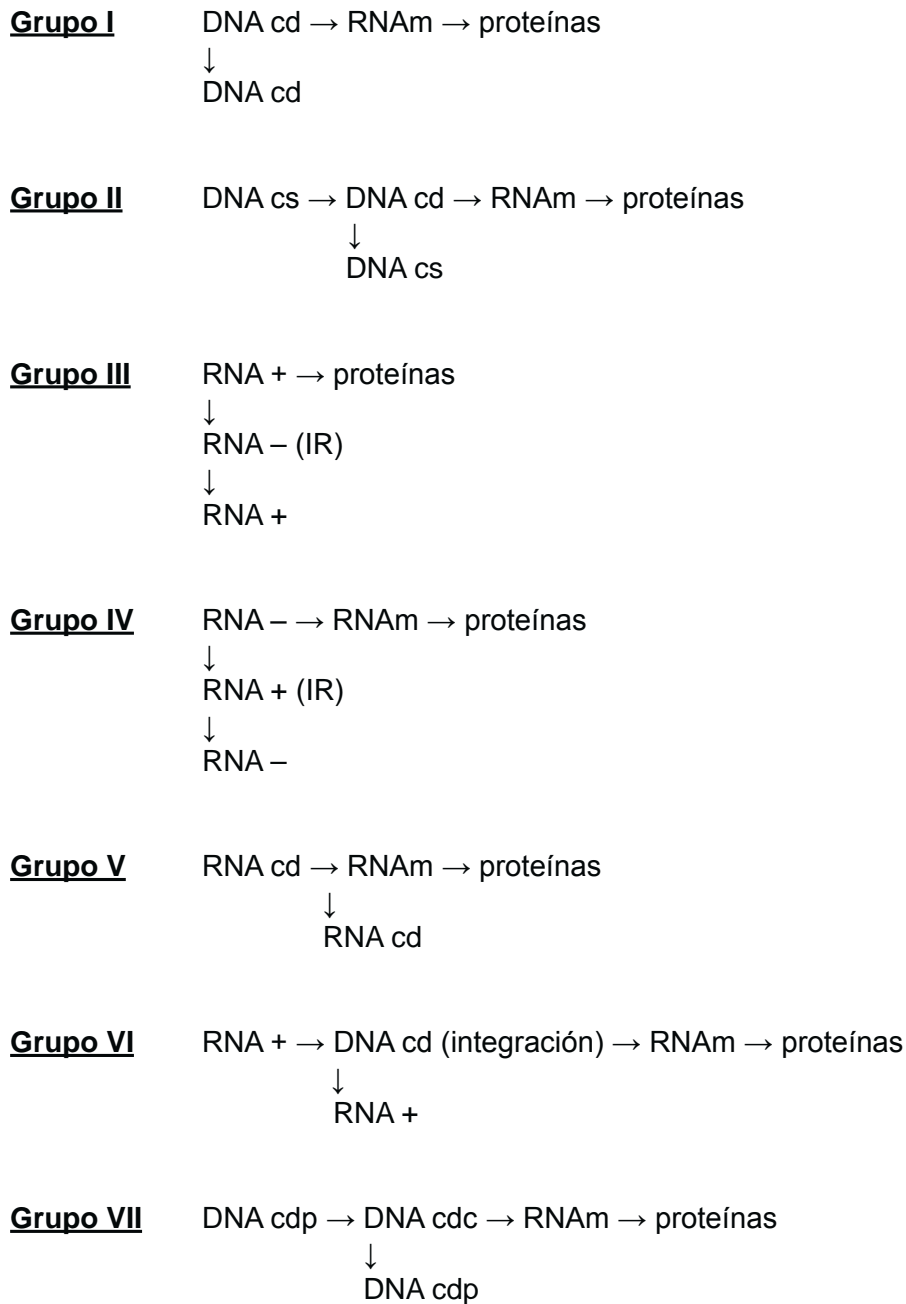


Figura 2.2. Esquemas de los procesos de expresión y replicación genómica para los distintos grupos de virus. RNAm: RNA mensajero; RNA +: RNA de polaridad positiva; RNA -: RNA de polaridad negativa; cd: cadena doble; cs: cadena simple; IR: intermediario replicativo; cdp: cadena doble parcial; cdc: cadena doble completa.

noma, y es así que pueden detectarse en la célula infectada cápsides vacías que carecen de ácido nucleico en su interior. El genoma se introduce en la cápside prearmada a través del reconocimiento entre secuencias específicas del genoma, denominadas secuencias de empaquetamiento, y algún dominio particular de una proteína de la cápside. Por el contrario, en los virus con cápside helicoidal la cápside se va estructurando por agregado de subunidades proteicas alrededor del ácido nucleico viral a medida que éste se va sinteti-

zando. Por último, los virus envueltos adquieren su envoltura a través de un proceso de *brotación* a partir de la membrana celular. La bicapa lipídica de la envoltura deriva totalmente de la membrana celular, en la que se han insertado las glicoproteínas codificadas por el virus formando las espículas que se proyectan hacia el exterior. La

membrana celular se regenera luego de la gemación de la partícula viral, y de este modo la liberación de nuevos viriones se produce sin causar daño a la célula. En general, los virus envueltos son los que pueden originar infecciones persistentes justamente porque tienen esta capacidad de salir de la célula sin dañarla. Por el contrario, los virus desnudos sólo pueden liberarse de la célula produciendo la lisis de la misma.

2.6 CURVA DE CRECIMIENTO DE UN SOLO CICLO

La mayoría de los estudios de replicación de virus animales se han realizado utilizando líneas celulares crecidas en monocapa o en suspensión. Para conocer las características de las distintas etapas de la multiplicación de un virus se debería estudiar el desarrollo de la

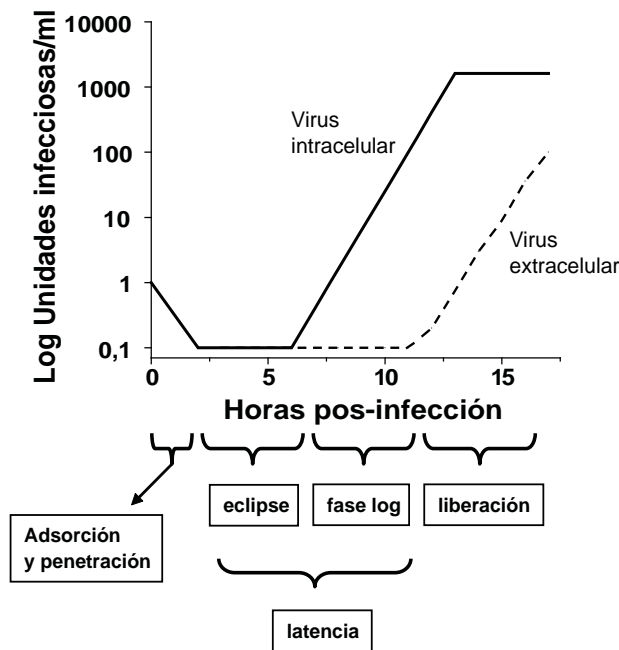


Figura 2.3. Curva de un sólo ciclo de un virus desnudo.

infección producida por la infección de una única partícula viral en una sola célula hospedera. Dado que el estudio de células infectadas aisladas es prácticamente imposible se recurre al análisis de las curvas de crecimiento llamadas *curvas de un solo ciclo*. Estas curvas se obtienen infectando al cultivo celular con una alta relación entre el número de partículas virales infecciosas y el número de células del cultivo, con el objeto de lograr una infección sincrónica, es decir, que todas las células del cultivo sean infectadas de forma

simultánea y así evitar las infecciones secundarias, es decir infecciones de células con la progenie viral resultante del primer ciclo de replicación. A distintos tiempos pos-infección se cuantifica la infectividad (número de unidades infecciosas/ml) asociada a las células del cultivo (virus asociado a células o intracelular) y la infectividad presente en el medio de cultivo (virus extracelular).

El tipo de curva que generalmente se obtiene en el caso de un virus desnudo se muestra en la Figura 2.3 y resulta de graficar el título infeccioso en escala logarítmica (log unidades infecciosas/ml) en función del tiempo (horas pos-infección). Inmediatamente después de la infección, la infectividad inicialmente inoculada va disminuyendo a medida que se suceden la penetración y el desdramiento de las partículas virales. Llega un momento en que no es posible detectar partículas virales infecciosas ni siquiera intracelularmente. Este período en que no es posible detectar virus infeccioso se denomina *eclipse* y tiene su fin cuando empieza a evidenciarse un incremento de la infectividad intracelular o asociada a células. Los virus no envueltos maduran en el interior de la célula donde la progenie viral se acumula, obteniéndose un incremento exponencial de la infectividad intracelular (período de crecimiento exponencial o fase log). A medida que empieza a producirse la lisis de las células infectadas la progenie viral comienza a liberarse al medio extracelular. Se denomina período de *latencia* al tiempo que tarda en detectarse infectividad extracelular. En estos tipos de virus, que se forman rápidamente pero permanecen durante largo tiempo en el interior de la célula, el período de eclipse es mucho menor que el de latencia.

Los virus que se liberan de la célula por brotación, a partir de la membrana plasmática, son infecciosos sólo después de haber adquirido la envoltura y por lo general permanecen poco tiempo asociados a las células como partículas infecciosas. Por lo tanto, la recuperación de la infectividad es mayor en el sobrenadante y los períodos de eclipse y de latencia son similares. Otros virus envueltos que maduran en el interior de la célula, adquiriendo su envoltura a partir de membranas intracelulares, presentan períodos de eclipse menores a los de latencia, y en algunos casos suelen permanecer retenidos en el interior de la célula, por lo que éstas deben ser rotas para lograr la liberación completa de las partículas virales.

Bibliografía

- Cann AJ. *Principles of Molecular Virology*. London: Academic Press, 2001.
- Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. *Principles of Virology*. Washington: ASM Press, 2000.
- Knipe DM, Howley PM. *Fundamental Virology*. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- Wagner EK. *Basic Virology*. Willinston: Blackwell Publishing, 2004.

¿Cómo se estudian los virus?

Susana Mersich - Nélica Candurra

Los virus pueden estudiarse por procedimientos fisicoquímicos o por aquellos que demuestren su interacción con las células vivas, es decir, su capacidad infecciosa.

Los **procedimientos fisicoquímicos** pueden detectar a los virus: a) como partículas virales, por microscopía electrónica; b) como unidades hemaglutinantes, por hemaglutinación; c) como antígeno, mediante técnicas inmunohistoquímicas; y, d) como ácidos nucleicos mediante técnicas moleculares (hibridación, amplificación genómica o secuenciación; Tabla 3.1). Muchas de estas técnicas se emplean habitualmente para el diagnóstico virológico.

Las características de las proteínas virales (peso molecular, punto isoelectrico, composición, contenido glucosídico, etc.) y de los ácidos nucleicos virales (peso molecular, longitud, polaridad, contenido en guanina-citosina y secuencia nucleotídica) se estudian en los laboratorios de Virología básica.

Los **estudios de infectividad** son fundamentales tanto en Virología básica como clínica. En el primer caso, la cuantificación de partículas infectivas en un inóculo es útil para controlar un proceso de purificación y absolutamente necesaria cuando se estudia la replicación viral o las propiedades de un agente virucida. En el segundo caso se utilizan los estudios de infectividad para determinar la presencia del virus viable en las muestras clínicas.

Procedimientos fisicoquímicos

Detección de:

- partículas virales
- antígenos virales
- ácidos nucleicos

Procedimientos para detección de infectividad:

Replicación en:

- cultivos celulares
- animales de experimentación
- huevos embrionados

Tabla 3.1. Procedimientos para el estudio de los virus.

1. PROCEDIMIENTOS FISCOQUÍMICOS

1.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA: VISUALIZACIÓN Y ENUMERACIÓN DE PARTICULAS VIRALES

El microscopio electrónico permite observar la morfología de las partículas virales y se utiliza ampliamente en investigación, siendo restringida su aplicación al diagnóstico. Existen dos técnicas básicas: la microscopía de transmisión y la tinción negativa.

Para el estudio de partículas virales en tejidos y células infectadas se emplea la microscopía electrónica de transmisión. Su poder de resolución permite observar estructuras moleculares como proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, los haces de electrones que forman las imágenes de la muestra tienen escaso poder de penetración y no permiten la visualización directa de células aisladas ya que resulta demasiado gruesa. Por ese motivo, se deben fijar los tejidos en estudio mediante su inmersión en resinas *epoxi* y luego, efectuar cortes ultrafinos con microtomo. Después, las preparaciones se tiñen con sustancias que poseen átomos pesados, capaces de desviar los electrones y aumentar el contraste (ácido ósmico, sales de uranio, lantano o plomo).

Esta técnica permite el estudio de las etapas de la replicación viral en las diferentes estructuras celulares y, asimismo, permite

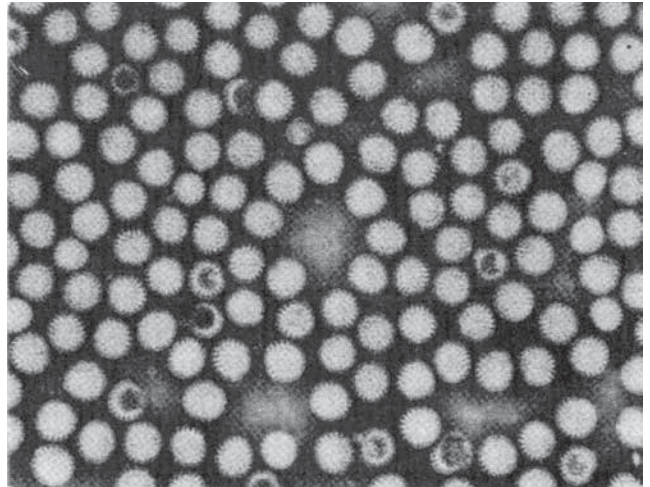


Figura 3.1. Microscopía electrónica. Tinción negativa de rotavirus en materia fecal (80 000 X).

observar las partículas virales que no demuestran una estructura bien definida por la técnica de tinción negativa.

1.1.1 Tinción negativa

En algunos casos, para estudiar la estructura externa de los virus no es necesario preparar las muestras como se indicó en el párrafo anterior, pudiéndose observar a las partículas virales de modo directo y rápido, combinando la microscopía electrónica de transmisión con la técnica denominada *tinción negativa*. La misma consiste en mezclar la suspensión viral con un colorante de alta densidad electrónica (ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo). Las partículas virales no dispersan el haz de electrones, por lo que se verán claras sobre un fondo oscuro que delinea su estructura (Figura 3.1). El procedimiento es rápido, pero necesita de un observador experimentado y una cantidad de partículas virales mayor a 10^6 por ml. Esta técnica permite visualizar fácilmente a los virus envueltos que pueden tener envoltura lisa o con espículas y a los virus icosaédricos que presentan estructuras características (por ejemplo, rotavirus: forma de rueda; adenovirus: icosaédrico desnudo). En cambio, los virus de tamaño medio (papilomavirus) y los pequeños (calicivirus) se visualizan pero no se identifican claramente. Aquellos de tamaño muy pequeño (picornavirus y parvovirus) se observan como partículas borrosas.

Las aplicaciones de la tinción negativa para el diagnóstico rápido son: a) diferenciar en muestras clínicas a los herpesvirus (herpes simplex, varicela) de los poxvirus (viruela, vaccinia) debido a las características morfológicas diferenciales de ambas familias; y, b) estudiar las diarreas virales ya que en muestras de materia fecal pueden identificarse fácilmente los rotavirus, adenovirus, calicivirus, etc.

1.1.2 Inmunomicroscopía electrónica

El empleo de un inmunosuero con anticuerpos específicos contra antígenos superficiales de un virus, por ejemplo, el antígeno de superficie del virus hepatitis B (HBsAg), permite aglutinar las partículas virales. Esta técnica, que combina una reacción inmune con

la microscopía electrónica se denomina *inmunomicroscopía electrónica*. Para realizarla, se incuba la suspensión viral con el inmunosuero, se realiza la tinción negativa y se observan al microscopio electrónico las partículas virales agregadas.

En otros casos, se concentra previamente la muestra sobre la grilla utilizando anticuerpos de captura o proteína A; luego se incubaba con un inmunosuero específico y, por último, se realiza la tinción negativa.

1.1.3 Recuento de partículas

Las partículas virales pueden identificarse con el microscopio electrónico, aunque no es posible distinguir entre partículas infecciosas y no infecciosas. Para cuantificar el número de partículas la técnica más empleada es mezclar la suspensión viral con una concentración conocida de partículas de látex. Luego, se cuentan con el microscopio electrónico las partículas virales y las de látex y se determina, mediante un simple cálculo, el título de virus en unidades de partículas virales por mililitro.

Otra técnica consiste en ultra-centrifugar sobre una grilla un volumen conocido de la suspensión viral y luego contar todas las partículas sedimentadas sobre la grilla.

1.2 DETECCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES POR HEMAGLUTINACIÓN

Algunas familias de virus poseen la capacidad de aglutinar glóbulos rojos de diversas especies animales. Esta propiedad, descubierta en 1941 por Hirst, McClelland y Harc para el virus influenza (*Orthomyxoviridae*) es utilizada para cuantificar virus.

Muchos virus de las familias *Orthomyxoviridae* y *Paramyxoviridae* poseen glicoproteínas en las espículas de su envoltura (*hemaglutininas*) que pueden aglutinar eritrocitos; los virus de la familia *Adenoviridae* aglutinan eritrocitos mediante los constituyentes de su cápside.

Aunque las condiciones en que se produce la hemaglutinación varían para los distintos virus, el fenómeno básico es la unión de las moléculas de hemaglutinina viral a receptores mucoproteicos presentes en los glóbulos rojos (Figura 3.2). Si la concentración de virus es suficiente, se formarán múltiples puentes entre ellos y los eritrocitos, y los agregados de glóbulos se depositarán en forma de retículo, que puede visualizarse en el fondo del tubo. El borde de este depósito tiene una forma de sierra característica. En cambio, los eritrocitos que no fueron aglutinados se depositarán en forma de botón (Figura 3.3). Habitualmente, se realizan diluciones al medio de la suspensión viral, la que se mezcla con cantidad conocida de eritrocitos. El título hemaglutinante es la inversa de la última dilución que presenta hemaglutinación completa.

Los receptores presentes en los glóbulos rojos y aquellos que se encuentran en las células del tracto respiratorio, permitiendo la adsorción de los mixovirus y paramixovirus, son mucoproteínas que contienen ácido N-acetil-neuramínico (NANA). Estos receptores son inactivados en forma específica por la enzima *neuraminidasa* que cliva el NANA y, por lo tanto, separa los viriones del eritrocito. Este fenómeno se denomina *elución* y ocurre a 37 °C. Por el contrario, a 4 °C la enzima no actúa y la unión del virión a los glóbulos rojos es estable. Los virus eluidos pueden volver a aglutinar otros eritrocitos pero los eritrocitos eluidos no pueden volver a ser aglutinados ya que su receptor ha sido destruido por la neuraminidasa. Por esta razón, esta enzima se llama *enzima destructora de receptores*.

En muchos líquidos biológicos (suero, orina, saliva) están presentes mucoproteínas con residuos terminales de NANA que pueden unirse a las hemaglutininas virales inhibiendo competitivamente la hemaglutinación. Por ello, es importante el tratamiento de las muestras de suero antes de la realización de esta técnica para destruir a los inhibidores inespecíficos de la unión virus-eritrocito. El tratamiento se realiza incubando con neuraminidasa o bien con peryodato de sodio, que oxida los grupos glicoles del azúcar.

1.2.1 Reacción de inhibición de la hemaglutinación

Si se hace reaccionar un virus con capacidad hemaglutinante con su anticuerpo específico, éste anulará su capacidad de he-

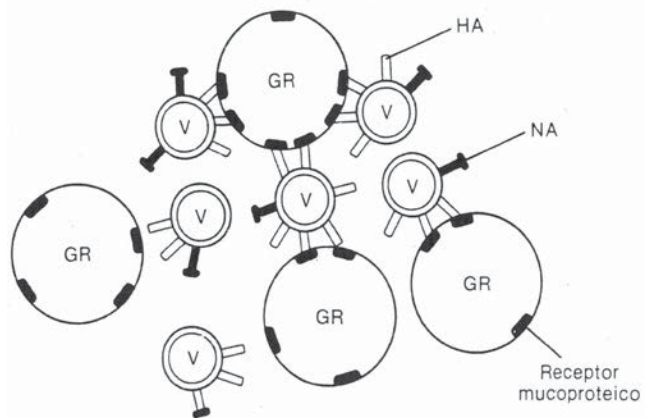


Figura 3.2. Esquema de hemaglutinación viral. GR: glóbulo rojo; V: virión de orthomyxovirus; HA: hemaglutinina viral; NA: neuraminidasa.

maglutinación por bloqueo de las hemaglutininas presentes en la envoltura del virión. Este fenómeno se denomina *inhibición de la hemaglutinación* y es utilizado tanto para identificar y tipificar virus como para determinar la presencia de anticuerpos específicos inhibidores de la hemaglutinación en los sueros de los pacientes.

1.3 PROTEÍNAS VIRALES

Las proteínas presentes en los viriones purificados se denominan estructurales, mientras que aquellas que son codificadas por el virus y están presentes sólo durante el ciclo de replicación, se denominan proteínas no estructurales. Además, los virus envueltos contienen en su envoltura proteínas provenientes de la célula donde replicaron. Es importante la caracterización de ambos tipos de proteínas, estructurales y no estructurales, cuando se quieren preparar reactivos inmunológicos tales como anticuerpos monoclonales, estudiar algunas enzimas como posibles blancos antivirales, modificar o adaptar una proteína para ser usada en biotecnología, etc.

La caracterización de las proteínas virales requiere una previa concentración del virus por alguna técnica, como la de precipitación. Asimismo, cuando se quiere aislar y caracterizar una proteína estructural, es importante disponer de partículas virales separadas de los componentes celulares, lo que se consigue a través del uso de gradientes de densidad en sacarosa y ultracentrifugación. Los viriones pueden romperse con detergente, de manera que sus componentes se solubilizan en el medio acuoso. El agregado de nucleasas, que digieren el ácido nucleico, permite estudiar las proteínas, que se analizan mediante electroforesis. La caracterización fisicoquímica de las proteínas incluye la determinación de su peso molecular (por electroforesis, filtración por gel o ultracentrifugación), así como su carga y tamaño.

La difracción de rayos X de cristales de proteínas da detalle de su conformación tridimensional y de la interacción tanto de péptidos como de hidratos de carbono, si estos últimos estuvieran presentes.

Por ejemplo, para analizar las proteínas de la cápside del virus polio los viriones purificados se solubilizan en una solución tamponada y se separan con dodecilsulfato de sodio. Cada proteína migrará en un gel de poliacrilamida de acuerdo a su tamaño, pudiéndose determinar la masa de cada banda con respecto al total de las mismas. Así, se observa que las cuatro proteínas VP1, VP2, VP3, y VP4 están en cantidades equimoleculares.

La técnica de *Western Blot* se usa para estudiar antígenos virales presentes en suspensiones virales o en células infectadas, así como también para detectar anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente.

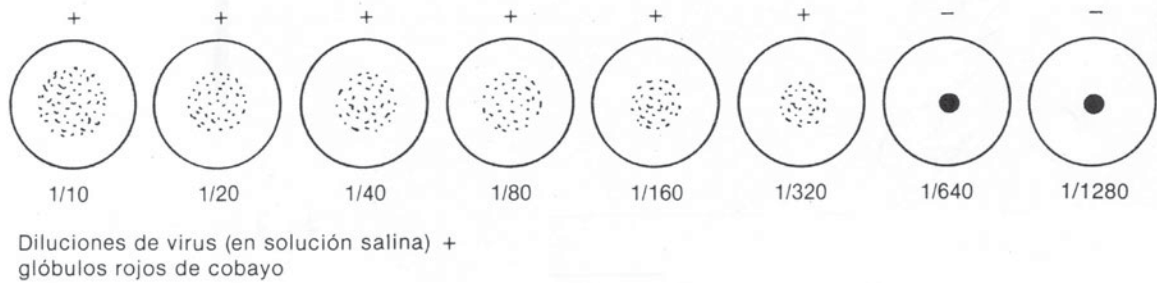


Figura 3.3. Lectura de una reacción de hemaglutinación. La lectura es visual y la inversa de la última dilución que presenta hemaglutinación completa corresponde al título hemaglutinante.

La técnica se inicia con el fraccionamiento electroforético de las suspensiones de proteínas virales en geles de poliacrilamida; las bandas formadas en los geles se transfieren a filtros de nitrocelulosa o nylon mediante la aplicación de una adecuada intensidad de corriente eléctrica o por capilaridad. Dichas bandas conservan en el filtro la misma posición que tenían en los geles y se pueden observar coloreadas después de incubar el filtro con anticuerpos específicos dirigidos contra las proteínas virales y luego, con un suero anti-inmunoglobulinas de la especie del suero anterior conjugadas con peroxidasa. El *Western Blot* se usa para tipificar proteínas de numerosos virus. Sus elevadas especificidad y sensibilidad han promovido su uso como técnica confirmatoria de la presencia de anticuerpos para HIV en el suero de pacientes con serología positiva determinada por técnicas de tamizaje (véase el capítulo 9 *Diagnóstico virológico*).

El procedimiento se denomina *immunoblot* cuando se emplean proteínas virales recombinantes o péptidos sintéticos (producidos en laboratorios de biotecnología), las que se siembran directamente sobre filtros sin necesidad de fraccionamiento electroforético previo. Estas proteínas se pueden utilizar como sustrato para detectar anticuerpos específicos en el suero de los pacientes. Para ello, se incubaba el suero con las proteínas ubicadas en los filtros y, luego de un lavado, se realiza una segunda incubación con anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas conjugadas con peroxidasa o fosfatasa alcalina. Esta técnica se denomina RIBA (*recombinant immunoblotting assay*), y LIA (*Line immunoassay*), según se empleen proteínas recombinantes o péptidos sintéticos, respectivamente.

Estas técnicas se usan habitualmente como pruebas suplementarias para el diagnóstico de hepatitis C.

1.4 LOS ÁCIDOS NUCLEICOS: TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN, PCR Y SECUENCIAMIENTO NUCLEOTÍDICO

La detección de ácidos nucleicos en muestras clínicas puede realizarse mediante diversas técnicas, que pueden ser cualitativas, semicuantitativas o cuantitativas. A su vez, las mismas pueden realizarse previa extracción de los ácidos nucleicos a partir de un fluido o tejido, o bien *in situ*. Esta última alternativa permite identificar las células que exhiben el ácido nucleico en cuestión, lo que es de especial relevancia en estudios de patogénesis molecular.

Así, las técnicas de Biología Molecular aplicadas a los ácidos nucleicos involucran básicamente dos tipos: a) técnicas de hibridación sin amplificación; y b) técnicas de amplificación.

Entre las primeras deben mencionarse las que se emplean para la detección de DNA previo fraccionamiento electroforético, seguido de transferencia a un soporte sólido de nitrocelulosa o nylon, e hibridación con una sonda marcada (con material radiactivo o no, tales como la biotina, la digoxigenina, las sulfonas o la fluoresceína). Esta técnica recibe el nombre de manchas de Southern o *Southern blot* en homenaje a su inventor el Profesor Sir Ewin Southern.

Cuando el procedimiento se aplica a la detección de RNA en un soporte sólido, luego del fraccionamiento electroforético y la transferencia respectiva, se denomina –por extensión– *Northern blot*.

La eventual detección de DNA o RNA puede también hacerse sin fraccionamiento electroforético, denominándose según el tipo de imagen obtenida (reflejo de la siembra respectiva de ácidos nucleicos según el tipo de aparato utilizado) luego de la hibridación, un *Dot blot* (mancha con aspecto de un punto) o *Slot blot* (mancha con aspecto de una ranura rectangular).

Las técnicas mencionadas son de detección cualitativa o –como por ejemplo en el caso del *Slot blot*– pueden también ser semicuantitativas. En este último caso, se puede expresar la presencia de ácidos nucleicos en ng o pg de DNA o RNA por ml de muestra o µg de tejido.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos comprenden las denominadas técnicas de amplificación de la secuencia blanco como la PCR (en inglés *Polymerase Chain Reaction*; reacción en cadena de la polimerasa), el NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*; amplificación basada en secuencias de ácido nucleico) u otras menos utilizadas.

La PCR acoplada previamente a una reacción de transcripción inversa se utiliza para detectar RNA. La reacción de PCR (o la de RT-PCR) no sólo es altamente específica, sino que exhibe una extraordinaria sensibilidad. Por este descubrimiento de 1983, Kary Mullis recibió el premio Nobel de Química 10 años más tarde. Más recientemente, se han incorporado múltiples variantes a dicha reacción que pueden ser aplicadas para incrementar la sensibilidad (doble PCR con cebadores internos, como la PCR anidada o *Nested PCR*). También es factible la cuantificación genómica mediante la utilización de una PCR (o RT-PCR) competitiva con utilización de secuencias de DNA templado usadas como controles internos previamente cuantificados.

En los últimos años, se ha añadido una nueva tecnología conocida con la denominación de PCR en tiempo real, la que es utilizada tanto para la cuantificación del material genético como para la eventual detección de polimorfismos en posiciones genómicas previamente determinadas para su investigación mediante sondas complementarias a determinadas secuencias nucleotídicas. Esta técnica de PCR se denomina en tiempo real, ya que el producto sintetizado en cada ciclo es monitoreado mediante registros que son capturados con programas informáticos adecuados.

Los ácidos nucleicos, a su vez, pueden ser caracterizados mediante técnicas especialmente diseñadas a tal efecto. Entre ellas merece mencionarse una técnica también descubierta por Southern, la RFLP (en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*, o polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) capaz de detectar mediante enzimas de restricción de tipo II secuencias genómicas de DNA blanco, lo que se refleja en fragmentos de DNA de diferente tamaño que migran diferencialmente en una corrida electroforética. Otra técnica es la SSCP (en inglés *Single Strand Conformational Polymorphism*; polimorfismo conformacional de cadena única) para detectar eventuales mutaciones reconocidas por la migración diferencial en geles de poliacrilamida no desnaturizantes, luego de la previa desnaturalización del DNA.

Las técnicas de secuenciamiento nucleotídico tales como la de Sanger o la de Maxam y Gilbert, significaron avances extraordina-

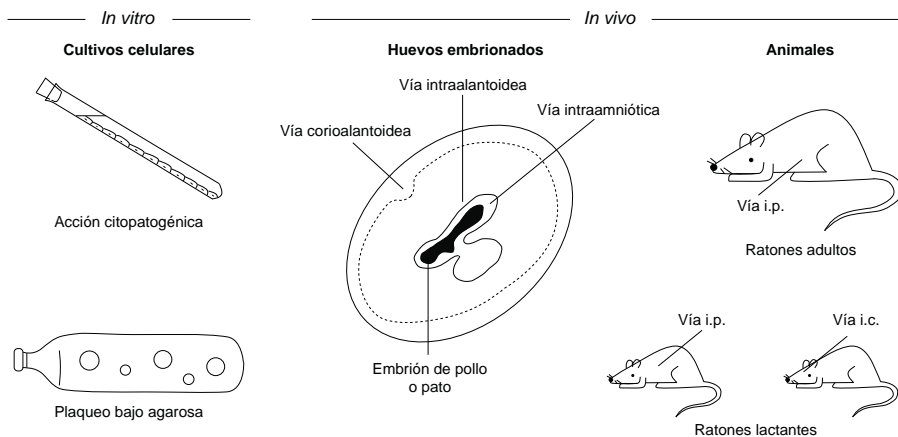


Figura 3.4. Procedimientos para aislamiento de virus *in vivo* e *in vitro*.

rios para el conocimiento detallado de los ácidos nucleicos. Ambas técnicas contribuyeron en tal grado al avance de todas las ciencias biológicas que ameritaron también el otorgamiento del Premio Nobel de Química de 1980 a Frederick Sanger y a Walter Gilbert (junto a Paul Berg por la construcción de genomas quiméricos). En el caso de Sanger, constituyó el segundo reconocimiento otorgado por el Comité Nobel a su persona, habiendo recibido anteriormente su primer Nobel por la invención de un procedimiento para secuenciar proteínas.

Las aplicaciones del análisis de secuencias de DNA permite la identificación de los virus, sus cepas y fenotipos, en diversos ensayos como, por ejemplo, la susceptibilidad a drogas antivirales, la caracterización de aislamientos virales con el fin de determinar sus relaciones, la identificación de cepas virales que han modificado su virulencia y la epidemiología molecular de los virus.

En este sucinto historial, se han mencionado algunas de las técnicas que serán abordadas con mayor detalle en el capítulo de diagnóstico virológico.

2. PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE INFECTIVIDAD: AISLAMIENTO VIRAL

El aislamiento de un virus es un requisito esencial para su estudio. La replicación y propagación de virus requiere células vivas ya sean provenientes de animales de experimentación, huevos embrionados o bien de células cultivadas *in vitro*. Luego del aislamiento debe realizarse la identificación. Posteriormente, pueden realizarse la cuantificación y la determinación de sus propiedades biológicas, bioquímicas y serológicas (Figura 3.4).

2.1 REQUERIMIENTOS PARA UN LABORATORIO DE CULTIVOS

El laboratorio que realiza aislamiento de virus debe implementar adecuadas barreras de bioseguridad para disminuir el riesgo de infección en los operadores y en el medio ambiente, así como para evitar la contaminación del agente en estudio. Para ello, es importante tener en cuenta que los virus se clasifican en niveles de riesgo relacionados con su patogenicidad para el ser humano y su diseminación en la comunidad.

Las barreras de protección incluyen la del operador con guantes, barbijos, anteojos y ropas especiales si se trabaja con agentes de alto riesgo, así como la inmunización con las vacunas virales disponibles.

Las medidas para no contaminar al agente viral incluyen el trabajo con buenas prácticas microbiológicas y el uso de cabinas de seguridad biológica denominadas *flujos laminares*. Dichas cabinas poseen filtros con tamaños de poro adecuados que impiden el pasaje de microorganismos y además, generan un flujo de aire estéril que protege al operador, al medio ambiente y evitan también la contaminación del material en estudio.

En cuanto a la protección del medio ambiente o la comunidad, el diseño del laboratorio de Virología debe contar con un adecuado flujo de aire y el acceso restringido del área, con entrada permitida sólo al personal entrenado para evaluar el riesgo del material con el que se trabaja (véase el capítulo 57 *Bioseguridad en la práctica biomédica y en el laboratorio*).

2.2 AISLAMIENTO DE VIRUS

Las muestras para aislamiento de virus deben tratarse previamente con antibióticos, antimicóticos y centrifugación para eliminar la flora bacteriana que puede estar presente en muestras tales como secreciones respiratorias, orina, muestras mucocutáneas, etc. Este proceso se denomina descontaminación.

2.2.1 Animales de experimentación

La inoculación de animales es el procedimiento más antiguo para aislar y conservar los virus y puede producir desde una enfermedad con lesiones típicas hasta la muerte.

Los animales utilizados en el laboratorio son ratones lactantes o adultos, cobayos, conejos y, en algunos casos primates. Numerosos virus pueden aislarse en animales. Por ejemplo, los mixovirus por instilación nasal en hurones; los togavirus y los arenavirus por inoculación intracerebral en ratones lactantes, etc. En la actualidad, los animales de experimentación se utilizan cada vez menos en los estudios de infectividad debido al alto costo de su mantenimiento, a la complejidad de las instalaciones necesarias (biotorios), al riesgo de la manipulación de animales infectados, y a la presencia de virus latentes en los mismos. Sólo se siguen empleando ratones en el aislamiento de virus rábico, flavivirus, arenavirus y algunos virus Cocksackie. Sin embargo, los animales resultan indispensables tanto en estudios de investigación referidos a patogenicidad, oncogenicidad e inmunidad a virus, así como en los ensayos de eficacia e inocuidad de las vacunas en desarrollo y en la preparación de antiseros para fines diagnósticos.

2.2.2 Huevos embrionados

Los virus pueden inocularse en diferentes estructuras de huevos de pollo o de pato conteniendo embriones de 7-14 días. Los mixovirus se inoculan en cavidad amniótica, los paramixovirus y mixovirus en cavidad alantoidea y los herpesvirus y poxvirus en membrana corioalantoidea (Figura 3.4). Para la inoculación, se practica un pequeño orificio en la cáscara, previa antisepsia, y se inyecta el inóculo viral. Luego se tapa el orificio con tela adhesiva y se incuban los embriones a 37 °C. La replicación viral puede producir la muerte del embrión (herpes, parotiditis, algunos Orthomyxovirus) o no inducir lesiones aparentes aunque pueden detectarse antígenos virales (hemaglutininas). Los poxvirus y herpesvirus producen, en la membrana corioalantoidea, lesiones focalizadas que se denominan pústulas (*pocks*).

Los huevos embrionados presentan la ventaja de ser bacteriológicamente estériles, de poseer escasos virus latentes, de carecer de respuesta inmune y de ser de fácil manipulación. Actualmente, su uso está restringido a la producción de vacunas para influenza y para el aislamiento de orthomyxovirus o poxvirus.

2.2.3 Cultivos de células

Durante la primera mitad del siglo XX comenzó el desarrollo de los cultivos de células *in vitro* pero su uso se simplificó a mediados de ese siglo con el descubrimiento de los antibióticos, la tripsina y el avance debido a Eagle de los medios definidos de cultivo. En 1949, Enders logró cultivar el virus polio en células no nerviosas y, a partir de ese momento, los cultivos celulares constituyeron el sustrato de elección para la replicación de la mayoría de los virus.

En los cultivos celulares las células se mantienen viables en botellas o tubos de vidrio o plástico en condiciones de esterilidad, con medios nutritivos enriquecidos con sueros, vitaminas y antibióticos, generalmente a 37 °C en estufas de cultivo. Los medios de cultivo, que aportan nutrientes a dichas células, deben renovarse 1 ó 2 veces por semana.

Existen dos tipos básicos de cultivos celulares: los cultivos primarios y las líneas celulares. **Cultivo primario** es el primer cultivo *in vitro* de células obtenidas directamente de un organismo, mientras que la **línea celular** se obtiene a partir de muchos subcultivos del cultivo primario. (Figura 3.5 - Tabla 3.2).

Cultivos primarios

Los **cultivos primarios** se obtienen por tratamiento con tripsina de pequeños trozos de tejidos del hombre o animales. Las células disgregadas se lavan, se cuentan en cámaras cuentaglobulos (tipo Neubauer) y se siembran en tubos, botellas o policubetas de vidrio o de plástico, en estrictas condiciones de esterilidad. Se añade un medio nutritivo con antibióticos y antimicóticos y las células se incuban en estufa a 37 °C. Luego de pocas horas, las células se adhieren a la superficie del recipiente y posteriormente, en la mayoría de los casos, se dividen. Con el paso del tiempo se cubre toda la superficie del envase formándose una monocapa, con aspecto de células epiteliales o fibroblásticas. En ese momento se inhibe el crecimiento, fenómeno que se denomina inhibición por contacto. Los cultivos primarios poseen un número normal de cromosomas.

El mayor inconveniente de los cultivos primarios es que al cabo de algunos pocos pasajes (cultivos secundarios) las células mueren y es necesario obtener un nuevo cultivo primario a partir del tejido original, lo que implica un alto costo.

Los cultivos primarios más utilizados son: fibroblastos de riñón de primates, células embrionarias de distinto origen y fibroblastos de prepucio humano. Estos cultivos poseen un amplio espectro de sensibilidad a los virus por lo que son sumamente útiles en el diagnóstico virológico.

Líneas celulares continuas

Los cultivos primarios proliferan en forma exponencial por un número bajo de subcultivos, luego entran en una condición estacionaria y finalmente mueren. En algunos casos, luego de varios pasajes puede ocurrir una transformación y pueden aparecer variantes celulares que dan origen a las llamadas **líneas celulares continuas**. Estas líneas son de crecimiento ilimitado *in vitro*, es decir, pueden replicarse en el laboratorio un número ilimitado de veces, por ello se las denomina líneas inmortales. Su número de cromosomas es variable (aneuploidía), esto significa que pueden tener un número mayor o menor de cromosomas que el número normal de la especie que los originó. Por lo tanto, se considera que las líneas celulares continuas son sistemas celulares nuevos.

Existen numerosas líneas celulares continuas tanto de origen normal como neoplásico. Dentro de las primeras están las células Vero, provenientes de riñón de mono verde africano, las MDCK de riñón de perro, las BHK de riñón de hámster o las RK-13 de riñón de conejo. Dentro de las de origen neoplásico las más conocidas

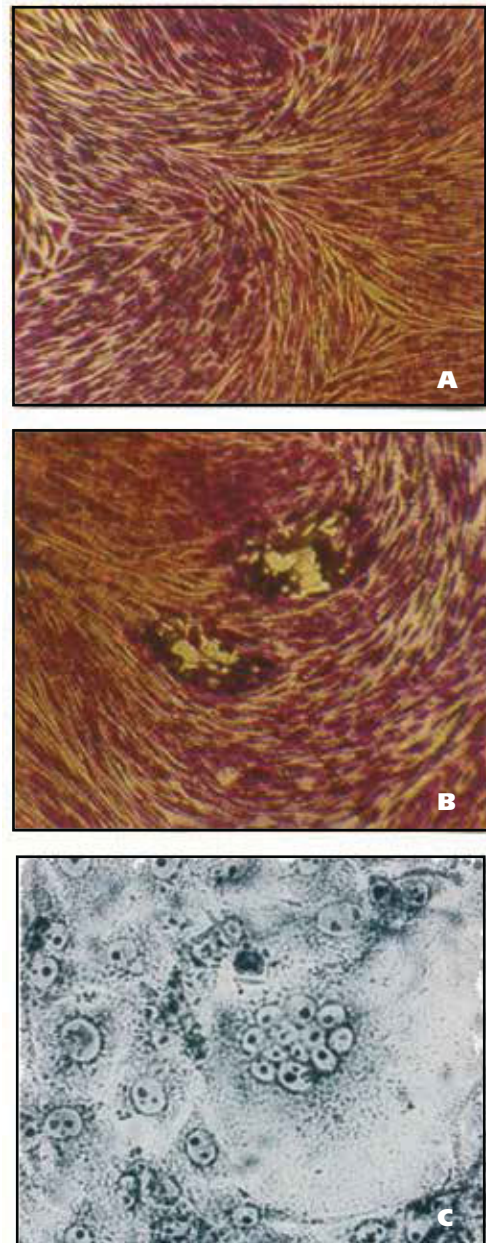


Figura 3.5. Cultivos celulares normales e infectados. A: fibroblastos de prepucio humanos sin infectar; B: *idem*, infectados con citomegalovirus. Se observa ACP focal. C: células de riñón de mono infectadas con paramyxovirus. Se observa un sincicio con 12 núcleos (100 x).

son las células HeLa, derivadas de un carcinoma de cérvix, o las HEp-2 de carcinoma de laringe. Si bien la sensibilidad de las líneas celulares continuas a los diferentes virus es limitada, son de bajo costo y se utilizan habitualmente para aislamiento de virus sincicial respiratorio, herpesvirus, rubéola, poliovirus, Coxsackie, adenovirus, etc. (Tabla 3.2).

Líneas celulares diploides

A partir de los cultivos primarios es posible obtener subcultivos al tratar las células presentes en la monocapa con una enzima proteolítica (tripsina) y sembrar en recipientes nuevos con medio fresco. Así, es posible seleccionar a partir de los cultivos primarios, células que conserven una morfología intacta, un número normal de cromosomas (diploide) y su capacidad de crecimiento durante un número limitado de subcultivos. Habitualmente, las líneas celulares pueden duplicarse un número limitado de veces (50-80) sin perder sus caracteres normales.

Tipo de cultivo	Susceptibilidad a
Primario Riñón de mono	Influenza, parainfluenza, enterovirus
Riñón de conejo Riñón de embrión humano	Herpes simplex Adenovirus, enterovirus
Diploide Fibroblastos	Citomegalovirus, herpes simplex, varicela-zóster, rinovirus, adenovirus, virus sincicial respiratorio, algunos enterovirus
Continuo HEp-2	virus sincicial respiratorio, adenovirus, herpes simplex, algunos parainfluenza y enterovirus, adenovirus, virus sincicial respiratorio
A549	adenovirus
MDCK	enterovirus
LLC-MK2	influenza
Rhabdomiosarcoma (RB)	parainfluenza echovirus

Tabla 3.2. Cultivos celulares utilizados para aislamiento de virus.

Estas **líneas diploides** tienen una elevada sensibilidad a muchos virus y son aptas para la producción de vacunas de uso humano. Las líneas diploides más usadas son las MRC-5 (de riñón de mono rhesus) o las WI-38 (*Wistar Institute*) de origen humano. Ambas líneas se utilizan para el aislamiento de adenovirus, citomegalovirus, varicela-zóster, rinovirus, etc., así como también como sustrato para la replicación de muchas cepas vacunales.

Cultivo de órganos

Para el aislamiento de ciertos virus (coronavirus o rotavirus) se pueden utilizar cultivos de órganos. Estos consisten en cortes de tejidos embrionarios que mantienen su estructura y función durante un cierto tiempo, mantenidos con medios especiales adecuados.

2.2.4 Detección de los virus en cultivos celulares

El desarrollo de la replicación viral, es decir, la amplificación del virus inoculado en el cultivo puede identificarse por diferentes procedimientos que tienden a detectar las modificaciones producidas en el cultivo por efecto de la replicación viral.

Acción citopatogénica

Muchos virus replican con producción de **acción citopatogénica (ACP)**, también denominada **efecto citopático**. Esto consiste en alteraciones de las monocapas celulares que pueden observarse directamente al microscopio óptico invertido, sin necesidad de coloración alguna. Existen diversos tipos de ACP que son características. Por ejemplo, los poliovirus y los herpes producen una ACP que se manifiesta a los pocos días y consiste en redondeamiento de las células, desprendimiento de la monocapa de la superficie en que crece y liberación de las células alteradas al medio de cultivo. Esta acción suele observarse en forma generalizada a toda la monocapa celular.

Por el contrario, otros virus, como el citomegalovirus, tienen una ACP lenta, que se manifiesta luego de días o semanas post-inoculación, y comienza en forma de focos bien delimitados de células redondeadas (Figura 3.5 B). Otros virus producen **inclusiones** características localizadas en el núcleo o en el citoplasma de las células, las que pueden ser visualizadas mediante tinciones histológicas o por técnicas inmunohistoquímicas.

Aquellos virus que tienen en su envoltura proteínas de fusión son capaces de inducir la fusión de células vecinas formando **sincicios** (células gigantes multinucleadas), características del virus sincicial respiratorio (Figura 3.5 C), sarampión y algunas cepas de herpesvirus.

Algunos virus, si bien son capaces de replicar en cultivos, no producen acción citopatogénica visible directamente al microscopio óptico; sin embargo, como producto de la replicación viral se liberan al medio de cultivo o están presentes en las células infectadas, proteínas de origen viral que pueden ser demostradas por diversos procedimientos. Por ejemplo, las hemaglutininas pueden detectarse por reacciones de hemaglutinación y otros antígenos pueden ponerse en evidencia por reacciones de fijación de complemento, inmunomarcaciones, etc.

Los virus que poseen hemaglutininas expresan estos antígenos en la membrana celular de las células que infectan. Esto puede demostrarse por reacciones de **hemadsorción**, es decir, fijación de glóbulos rojos en las células infectadas. Esta reacción se utiliza para identificación de virus respiratorios.

En algunos virus, la replicación ocurre sin producción de ACP pero –sin embargo– esta replicación es capaz de inhibir la replicación de un segundo virus que se inocule en el mismo cultivo. Este mecanismo se denomina **interferencia viral**, y se debe a la inhibición de algún paso temprano en el ciclo de replicación del segundo virus debido a la replicación del primero en las mismas células. Este fenómeno se evalúa principalmente con fines de investigación básica y fue empleado para diagnóstico del virus rubéola.

Finalmente, también suelen emplearse técnicas que detectan antígenos virales y en los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten detectar los genomas virales en las células infectadas.

Detección de antígenos virales

La detección de antígenos virales se realiza mediante una reacción antígeno-anticuerpo, que puede ser puesta en evidencia mediante marcadores tales como fluorocromos, enzimas o radioisótopos. Estas técnicas son de aplicación amplia y fundamental en Virología para la identificación, clasificación y cuantificación de los agentes virales, con fines de investigación, diagnóstico y estudios epidemiológicos.



Inmunofluorescencia (IF) (Figura 3.6). Esta técnica utiliza anticuerpos específicos marcados con fluorocromos como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, rojo Texas u otros. La reacción antígeno-anticuerpo se visualiza usando un microscopio con luz UV. Es altamente específica y rápida.

En la técnica directa, las células o tejidos son tratados con una inmunoglobulina específica, de alto título, conjugada con el fluorocromo. La técnica indirecta, en cambio, utiliza anticuerpos específicos no marcados y luego de lavados éstos, se incuban las muestras con anticuerpos conjugados con fluorocromos y dirigidos contra la especie animal en la que se preparó el antisuero viral. La técnica indirecta es generalmente más sensible que la directa pues los anticuerpos específicos adheridos a los antígenos virales pueden incrementar el número de uniones a los anticuerpos marcados. Asimismo, requiere sólo anticuerpos marcados contra la especie animal y no para cada muestra de virus individual. Sin embargo, se necesitan más controles y pasos en esta reacción.

Los resultados positivos por IF son aquellos que demuestran una tinción específica de la célula infectada, documentando la presencia de antígenos en distintas localizaciones celulares (núcleo, citoplasma o membrana). La IF es ampliamente utilizada en el diagnóstico virológico tanto para la detección rápida de antígenos virales en muestras clínicas como para diagnóstico serológico. (Véase el capítulo 9 *Diagnóstico virológico*).

Inmunoensayos enzimáticos. Las técnicas para detectar antígenos virales por inmunoensayos enzimáticos, también denominados **ELISA** (del inglés *enzyme linked immuno sorbent assay*) son similares a las tinciones de inmunofluorescencia. La diferencia es que, en este caso, la marcación de los anticuerpos se realiza con enzimas en lugar de fluorocromos. Las enzimas marcadoras más utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. Los anticuerpos marcados unidos al antígeno (técnica directa) o a los complejos antígeno-

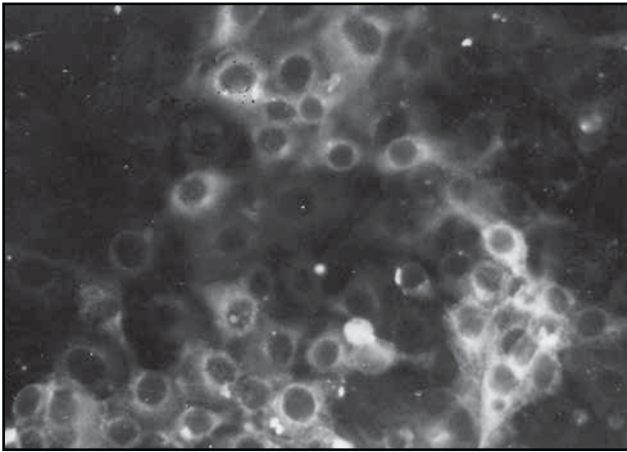


Figura 3.6. Inmunofluorescencia directa para detección de antígenos virales en cultivo. Células de riñón de mono infectadas con virus Junín, a las 72 horas posinfección, teñidas con un anticuerpo monoclonal marcado con isotiocianato de fluoresceína (400 x).

anticuerpo (técnica indirecta) son detectados por el agregado de un sustrato. Este sustrato reacciona con la enzima para producir un producto insoluble, detectable por examen microscópico, o soluble coloreado, fluorescente o luminiscente. Los ELISAs podrían ser más sensibles que la IF ya que la marca enzimática puede tener una acción continua sobre el sustrato y así producir una cantidad creciente del producto de reacción, amplificando la reacción inicial.

La **técnica de inmunoperoxidasa (IP)** utiliza la enzima peroxidasa como marcador, un sustrato que contiene peróxido de hidrógeno y un reactivo, que al ser oxidado, produce un precipitado coloreado insoluble en el lugar de la actividad enzimática que se corresponde con la localización del antígeno viral. La IP puede realizarse en forma directa o indirecta, al igual que la IF. Las ventajas de la IP frente a la IF son que utiliza un microscopio de luz común y los preparados permanecen inalterados por varios años. Sus desventajas son el mayor número de pasos, el potencial cancerígeno de algunos sustratos y la necesidad de inactivar previamente la peroxidasa endógena presente en ciertas muestras.

Neutralización

Esta prueba se basa en la capacidad que tienen los anticuerpos de disminuir o anular la infectividad viral. Es la técnica clásica más específica para la identificación de virus y es la elegida como *gold standard* para evaluar a otras técnicas. En esta reacción intervienen sólo los antígenos de superficie del virión que son los que han sufrido las mayores presiones de selección durante la evolución y que son específicos para cada virus dentro de un género o familia. La técnica se realiza incubando el virus, a la temperatura y tiempo adecuados, con un suero de referencia que contiene anticuerpos específicos. Luego, se mide la infectividad residual en un cultivo celular sensible. Su disminución indica la presencia de homología entre el par virus-anticuerpo enfrentados.

Existen dos formas de realizar la reacción:

- **Virus constante-suero variable.** Se utiliza una cantidad fija de virus haciéndola reaccionar con diluciones en base 2 del suero inmune. El título del suero es la inversa de la dilución que produce una reducción del 50-80% de la infectividad empleada en el ensayo.
- **Virus variable-suero constante.** Se realizan dos series de diluciones en base 10 de la preparación viral, una de ellas se hace reaccionar con una concentración fija de inmunosuero y la otra con suero normal. Se puede así calcular el índice de neutralización como el logaritmo del cociente entre el título de la serie incubada con suero normal y el de la enfrentada al inmunosuero.

Esta técnica tiene varias aplicaciones: a) cuando se usa un antisuero específico, se pueden identificar virus desconocidos; b) se

pueden detectar anticuerpos específicos en un suero problema al enfrentarlo con virus conocidos; y c) los ensayos de neutralización cruzada entre dos virus y sus antisueros pueden usarse para comparar antigénicamente dichos virus ya que este ensayo es más específico que otras técnicas serológicas.

Inhibición de la hemaglutinación

Si se hace reaccionar un virus con capacidad de hemaglutinación con su anticuerpo específico, éste anulará su capacidad de hemaglutinación por bloqueo de las hemaglutininas presentes en la envoltura del virión. Este fenómeno se llama inhibición de la hemaglutinación y es utilizado con frecuencia para identificar virus y en estudios serológicos para determinar la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación. (Véase el capítulo 14 *Orthomyxovirus*)

Fijación de complemento

Esta técnica se basa en la captura de complemento (C) realizada por los complejos inmunes. Si se trabaja con el sistema en estudio de antígeno y suero de referencia y luego se agrega un segundo sistema formado por eritrocitos de carnero y anticuerpos dirigidos hacia esos eritrocitos (sistema revelador), se establecerá una competencia por el C. Si la cantidad de C utilizada por el primer sistema es pequeña o nula, quedará C libre que será tomado por el sistema revelador, produciéndose la hemólisis de los eritrocitos. Si por el contrario, el primer sistema consume el C y no deja C libre para ser capturado por el sistema revelador, no habrá hemólisis y la reacción será positiva. Una reacción negativa (hemólisis) significa que no hay afinidad entre el antígeno y el suero ensayado.

Esta técnica detecta antígenos virales solubles, obteniéndose generalmente reacciones cruzadas dentro de las familias, géneros o serotipos que comparten antígenos. Fue una de las primeras técnicas disponibles para la detección de anticuerpos antivirales, aunque en la actualidad ha sido reemplazada por otras (véase el capítulo 9 *Diagnóstico virológico*). Los sueros deben tratarse previamente con calor (30 minutos a 56 °C) para eliminar el C endógeno.

2.2.5 Medición de la actividad biológica: titulación

La infectividad se mide determinando la cantidad de inóculo necesario para obtener una respuesta específica en un determinado hospedador. La determinación cuantitativa de la infectividad de una preparación viral se denomina **titulación**. Por lo tanto, un **título** es el número de unidades infecciosas presentes en el inóculo por unidad de volumen.

Se denomina **unidad infecciosa** a la mínima cantidad de material que es necesario inocular a un hospedador para obtener una respuesta determinada. Esta respuesta puede ser localizada o generalizada. Según el tipo de respuesta, los procedimientos para cuantificar un virus se clasifican en 3 grupos: a) titulación de punto final; b) enumerativos; y c) de gradación, siendo los dos primeros los que usualmente se utilizan.

Cuantificación viral por la técnica de cuantificación de unidades formadoras de placas (UFP)

La técnica de recuento de placas permite cuantificar la cantidad de viriones presentes en un inóculo. Es un procedimiento enumerativo que se utiliza en investigación. Se basa en el recuento de lesiones localizadas, por ejemplo, placas de lisis en monocapas de células, focos en membrana corioalantoidea de embrión de pollo, focos de proliferación en cultivos celulares (en el caso de virus tumorales).

Es un procedimiento de fundamental importancia si se dispone del sustrato celular adecuado, y es de fácil realización, reproducible y exacto.

Un virus que se inocula en un cultivo de células susceptibles se disemina habitualmente a todas las células a través del medio de cultivo. Por lo tanto, no es fácil cuantificar la cantidad de virus presente en el inóculo, a menos que se efectúen diluciones del mismo y que se utilice un medio semisólido.

Para realizar el plaqueo, los cultivos celulares (en botellas o policubetas) se infectan con diluciones de virus. Luego de una hora de adsorción a 37 °C, se cubre la monocapa celular con un medio de cultivo semisólido que contiene agar, agarosa o metilcelulosa y se procede a la incubación de las células a 37 °C durante varios días. La cobertura de la monocapa con un medio semisólido impide la diseminación del virus a través del medio de cultivo y hace que los nuevos viriones formados deban infectar las células vecinas. Es decir, se produce una diseminación de célula a célula. Cada virión se replica y produce un foco o **clon** de células infectadas. Luego de varios días de incubación, se tiñe la monocapa infectada con un colorante vital como el rojo neutro. Solamente se teñirán las células vivas, mientras que las infectadas quedarán sin teñir y formarán una **placa** visible a la observación directa (Figura 3.7).

La infectividad se puede expresar en **unidades formadoras de placas (UFP) por ml**. El título se calcula directamente a partir de la dilución de la muestra (d), el número de placas contado (n) y el volumen de inóculo (v).

$$\text{Título (UFP/ml)} = n / v \times d$$

Esta técnica se emplea en investigación para determinar la cantidad de virus presente en las muestras analizadas con alta precisión. Otra aplicación importante es la selección de mutantes de virus (**clones de virus**), así como la búsqueda y producción de cepas atenuadas para uso en vacunación.

Cuantificación mediante la técnica de punto final

Algunos virus no producen placas en medio semisólido como el descrito más arriba y por ello, la titulación por UFP no puede utilizarse para cuantificar su presencia. En estos casos, deben emplearse las técnicas de **punto final**.

Para esta prueba, se realizan diluciones seriadas del virus (en general en base 10), las que se inoculan en números iguales de **unidades de pruebas** (tubos con células susceptibles o animales de experimentación). Luego de la incubación, se registra cuidadosamente a lo largo de varios días o semanas, la aparición de ACP en los cultivos o de enfermedad y/o muerte en los animales. Las unidades de prueba desarrollarán signos de infección en las diluciones más bajas del virus y no en las más altas. En las diluciones intermedias, solamente una parte de ellas mostrará signos de infección. Por razones matemáticas, es necesario emplear los datos obtenidos en las distintas diluciones para poder calcular la dilución límite en que el 50% de las unidades de prueba están infectadas. Para este cálculo existen diversas fórmulas, siendo la

más utilizada la de Reed y Muench (1938). Este método se basa en la propuesta de que si una unidad de prueba dio un resultado positivo en una dosis alta de virus, también dará positivo en dosis mayores, es decir, en diluciones más bajas del inóculo. Coincidentemente, la unidad de prueba que dio resultado negativo con cierta dosis, dará negativo con dosis más bajas. La estimación de las **dosis infectivas de cultivo 50 (DICT₅₀)** se basa en las frecuencias acumulativas de las respuestas positivas y negativas.

El método de Reed y Muench toma en cuenta los resultados obtenidos en varias diluciones del inóculo. La dilución que infecta el 50% de las unidades de prueba se denomina **Dosis infectante de cultivo₅₀ (DICT₅₀)** si se trata de cultivos, o bien **Dosis Letal 50 (DL₅₀)** si se trata de animales.

Analicemos el siguiente ejemplo donde se infectaron tubos conteniendo monocapas de células en cultivo con 0.1 ml de cada dilución decimal de virus (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶). Luego de varios días de incubación a 37° C, se observó y registró la aparición de ACP (Tabla 3.3).

En este ejemplo, la distancia entre 2 diluciones donde se encuentra la DICT₅₀ (diluciones 10⁻⁴ y 10⁻⁵) se calcula mediante la siguiente fórmula:

Logaritmo de la DICT₅₀ = logaritmo dilución más concentrada - distancia relativa del logaritmo de la dilución al punto 50% x logaritmo del factor de dilución

La distancia relativa del logaritmo de la dilución al punto 50% se calcula por la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Infectividad mayor de 50\%} - 50\%}{\text{Infectividad mayor de 50\%} - \text{infectividad debajo de 50\%}} = \frac{83 - 50}{83 - 40} = 0,7$$

Por lo tanto: el logaritmo de la DICT₅₀ = - 4 - 0,7 = - 4,7

En consecuencia, una suspensión viral diluida 10^{4.7} contenida en 0,1 ml (volumen del inóculo), representa 1 DICT₅₀. Esto significa que en esa dilución la mitad de los cultivos se infectaron con el virus.

En este método el título corresponde al número de DICT₅₀ en el volumen del inóculo.

En consecuencia:

$$\text{Título} = 10^{4.7} / 0,1 \text{ DICT}_{50} = 2,5 \times 10^5 \text{ DICT}_{50}/\text{ml}$$

Esta técnica es más laboriosa que el recuento de placas bajo agar y requiere de un operador adiestrado para observar la ACP, pero es sumamente útil cuando se trabaja con muchas muestras.

Comparación entre las diferentes pruebas: las pruebas de infectividad son en general más sensibles que los procedimientos fisicoquímicos de estudio de los virus. La precisión de las pruebas depende del número de unidades de prueba empleados. Si se comparan recuento de placas y técnica de dilución límite para obtener la misma precisión sería necesario emplear, en caso de contar 50 placas por cavidad, 50 unidades de prueba. Esto último es complejo y costoso; por ello, la sensibilidad de la técnica de dilución límite es menor, ya que se usan habitualmente 4 ó 5 unidades de prueba por cada dilución.

En general, el título obtenido por técnicas de infectividad es inferior al número de partículas virales, detectadas por plaqueo. Por ejemplo, una suspensión titulada por la técnica de unidades formadoras de placas tiene 10⁹ UFP y la titulación por dilución límite en cultivo indica sólo 10⁸ DICT₅₀.

Se denomina **eficiencia de infección** a la relación entre el título de infectividad sobre el número total de partículas. Esta

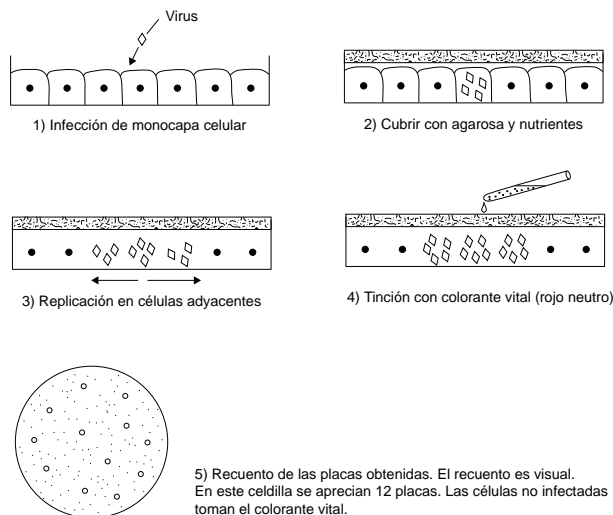


Figura 3.7. Esquema de los pasos para la producción de placas bajo un medio semisólido (agarosa).

Dilución de virus	Nº de cultivos con ACP/Nº de cultivos inoculados	Nº acumulativo de cultivos infectados	Nº acumulativo de cultivos no infectados	Infectividad cociente	%
10-3	4/4	9	0	9/9	100
10-4	3/4	5	1	5/6	83
10-5	2/4	2	3	2/5	40
10-6	0/4	0	7	0/7	0

Tabla 3.3. Método de Reed y Muench para la titulación viral.

relación varía ampliamente dependiendo del virus y del hospedero. Habitualmente, es menor de 1 y esto se debe a la presencia de partículas no infectivas con defectos en sus proteínas o ácidos nucleicos incorrectos, generados durante la replicación en un determinado hospedero, o bien por inactivación producida por agentes físicos o químicos.

La titulación de los virus es una técnica de rutina en un laboratorio de investigación. La cuantificación de un virus es la base en

la determinación de las curvas de un solo ciclo, en el estudio de la neutralización de la infectividad viral, en el ensayo de la actividad de agentes antivirales, en el monitoreo de los pasos de una purificación viral y en los estudios de patogenicidad.

Por el contrario, en los laboratorios de diagnóstico, sólo es necesario conocer el título de material infectivo presente en una muestra en algunas oportunidades, como es el caso de realizar alguna técnica serológica especial o para estudio de resistencia a antivirales.

Bibliografía

- Wagner EK, Hewlett MJ. *Basic Virology*. Massachusetts, USA. Blackwell Science Inc., 1999.
- Mahy BWJ, Kangro HO. *Virology Methods Manual*. London, Great Britain. Academic Press, 1996.

Genética viral

Víctor Romanowski

La genética es la ciencia de la transmisión de los caracteres hereditarios y su variación. No debe dejar de tenerse en cuenta que fueron los sistemas virus-célula los que permitieron, en la segunda mitad del siglo pasado, extraordinarios avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares básicos comprometidos en la transmisión y expresión de la información genética.

El propósito de este capítulo es introducir los conceptos generales involucrados en la genética de los virus, es decir, en la replicación y transmisión de la información genética a la progenie y su variación. Los mecanismos de replicación de los distintos tipos de genomas se describen en el Capítulo 2. Por lo tanto, aquí se enfocarán aspectos relacionados con la variación de los genomas virales y sus consecuencias.

1. INTRODUCCIÓN A LA TERMINOLOGÍA

Para comenzar, necesitaremos familiarizarnos con algunos términos utilizados en forma arbitraria en la descripción de diferencias entre virus.

Si bien no existen dudas sobre el significado de **genotipo** (información genética definida por las secuencias de ácido nucleico, que comprende tanto las regiones que se expresan en forma de RNA y proteínas, como las regiones regulatorias) y **fenotipo** (características observables producto de la expresión del genotipo), el uso habitual de algunos otros términos no es tan claro y requiere algunas consideraciones.

Así, los términos **cepa**, **tipo**, **variante** y **mutante** se usan extensa e indiscriminadamente para denominar a virus que difieren de alguna manera heredable de un virus parental o *wild type* (silvestre). Los genetistas moleculares le asignan el nombre de *wild type* (*wt*) a un virus, generalmente cultivado en el laboratorio, del que se obtuvieron mutantes que se comparan al *wt* como referencia. En este contexto, debe diferenciarse entre los virus *wt* de laboratorio y los virus recientemente aislados de su hospedero natural, que se denominan *aislamientos de campo* (*field isolates*).

En función de su uso habitual, se pueden asociar significados particulares a los otros términos mencionados más arriba. Así, **cepa** es utilizado para designar distintos *wt* y mutantes caracterizados del mismo virus; **tipo** se convirtió en sinónimo de **serotipo** definido por neutralización cruzada de la infectividad (un mismo serotipo incluye varias cepas) y **variante** se utiliza para indicar que un virus es genotípicamente diferente del *wt*.

Estas diferencias terminológicas no resultan esenciales cuando se conoce la secuencia nucleotídica del genoma en cuestión (aun cuando en muchos casos no resulte claro qué cambios nucleotídicos tienen un determinado efecto a nivel del fenotipo). Generalmente, el porcentaje de diferencias entre las secuencias nucleotídicas de dos virus determina si pertenecen a un mismo género (diferencias de hasta 35%), a una misma especie (diferencias no mayores al 20%, por ejemplo), a un mismo tipo o serotipo (diferencias no mayores a 10%, por ejemplo). Las diferencias consideradas suficientes para ubicar a dos virus en dos especies diferentes o para definir que se trata de dos cepas distintas dentro de la misma especie dependen de la familia de virus de que se trate (ver la página web del Comité Internacional de Taxonomía de Virus o ICTV: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv>).

2. BASES MOLECULARES DE LOS CAMBIOS EN LOS GENOMAS

Los virus se reproducen con ayuda de las células a las que infectan para generar nuevas copias de sí mismos (progenie). En este proceso es esencial que la progenie de partículas virales reciba una copia fiel del ácido nucleico paterno (¿o materno?; en realidad, como los virus no tienen sexo no nos vamos a detener a discutir la conveniencia de estos términos).

Los procesos de replicación de los ácidos nucleicos son bastante elaborados y la copia de la secuencia nucleotídica es extraordinariamente fiel (como una secretaria meticulosa que copia un documento muy importante), aunque, de vez en cuando, se pueda deslizarse algún error (la copia mecanografiada no es tan fiel como una fotocopia). En la replicación de la información en forma de DNA existen mecanismos de corrección de errores (*proofreading*; imaginar a una secretaria que mira la pantalla de su procesador de texto mientras escribe y, al detectar un error, vuelve inmediatamente atrás —presiona la tecla *backspace*— y sustituye la letra mal tipeada por la correcta). Si esto fuera estrictamente lo único que ocurre no habría variación genética ni evolución.

En términos generales, las variaciones de los genomas ocurren por dos mecanismos que cambian la secuencia de los ácidos nucleicos, de manera que, al menos, algunos miembros de la progenie no resultan idénticos a su(s) progenitor(es): mutación y recombinación. En el caso de virus en los que el genoma se encuentra repartido en varias moléculas de DNA o RNA (genomas segmentados) la variación también puede ocurrir por reordenamiento de los juegos de moléculas (reasociación o *reassortment*).

2.1 MUTACIONES

Las mutaciones son cambios en la secuencia nucleotídica. Comprenden cambios de un nucleótido por otro (transiciones: una purina por otra purina o una pirimidina por otra; transversiones: una pirimidina por una purina y viceversa), inserciones de uno o más nucleótidos y deleciones (eliminación de uno o más nucleótidos de la secuencia original).

2.1.1. Mutaciones espontáneas

En este capítulo no nos referiremos a los distintos agentes mutagénicos de tipo químico o físico que aumentan la frecuencia de mutación de acuerdo a la concentración o dosis en que se administran; algunos actúan sobre el material genético (por ejemplo, agentes metilantes) en forma directa y otros requieren que se esté replicando para producir su efecto (por ejemplo, análogos de bases).

Algunos virus generan una gran proporción de mutantes por pasaje en ausencia de mutágenos. Las mutaciones espontáneas se acumulan en los genomas de los virus produciendo alteraciones en el fenotipo, que está sujeto a la presión de selección durante la evolución de ese virus.

Las mutaciones espontáneas se deben a errores producidos durante la replicación. La frecuencia de mutación en virus con genoma a DNA es muy baja, de 10^{-8} a 10^{-11} por nucleótido incorporado (o sea, un nucleótido de cada 100 a 100 000 millones de nucleótidos polimerizados en una secuencia ordenada de acuerdo al molde paterno de DNA). Esto quiere decir que podríamos encontrar, en

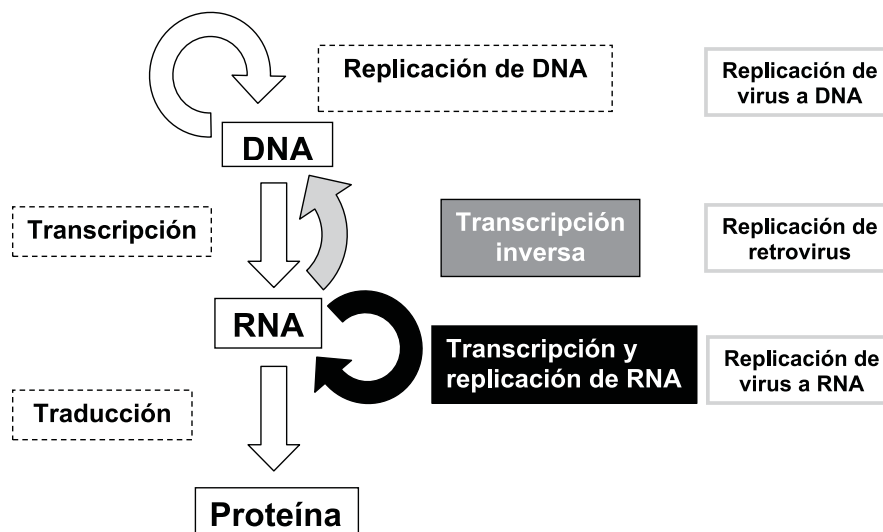


Figura 4.1. Dogma central de la biología molecular. Se esquematiza la replicación y expresión del genoma de las células y de los diferentes tipos de genomas de virus (indicados en los recuadros de la derecha). Los indicados por las flechas curvas en color gris y negro son procesos no incluidos en el *dogma central* original y se observan en sistemas virales con genomas a RNA y en los eventos de transposición de retroelementos del genoma celular (retrotransposones, retroposones, LINEs, SINEs, etc.).

promedio, a lo sumo, un nucleótido cambiado por mutación espontánea en el genoma de una sola de cada 10 000 partículas virales provenientes de una placa generada por la replicación de un virus con un genoma a DNA de 10 000 pares de bases.

Esto se debe a que las DNA polimerasas poseen una actividad enzimática que les permite corregir errores durante la replicación (Tabla 4.1). Las DNA polimerasas incorporan residuos de nucleósido monofosfato (dNMP) a partir de nucleósidos trifosfato complementarios (dNTPs) a las bases de la hebra molde de DNA. De tal manera, la hebra que es sintetizada crece en el sentido 5'-3'. Si, por error, el nucleótido incorporado en el extremo 3' de la cadena creciente no es perfectamente complementario al que se encuentra en la cadena molde, la polimerasa tarda en seguir elongando esta cadena y le da tiempo a su actividad de exonucleasa 3'-5' para eliminar al nucleótido mal incorporado (por hidrólisis del último enlace fosfodiéster).

Mientras que los genomas a DNA son bastante estables, los virus con RNA exhiben frecuencias de mutación en el orden de 10^{-3}

a 10^{-5} por nucleótido incorporado. De esta manera, en promedio, sería probable encontrar un nucleótido cambiado en cada uno de los viriones que se recuperan de una placa de virus y que provienen de la replicación de una única partícula viral cuyo genoma tiene un tamaño de 10 000 nucleótidos.

A los virus con genoma de RNA se deben agregar los retrovirus, que expanden aún más el esquema básico central de la biología molecular (es decir, el flujo de información DNA→RNA→Proteína; Figura 4.1).

En la Tabla 4.1 se resumen las actividades de las enzimas involucradas en la copia de la información genética de virus.

Los virus exhiben una variedad de estrategias para la expresión y replicación de sus genomas y, para hacerlo, usan enzimas que han evolucionado dando lugar a mecanismos de copia de mayor o menor fidelidad. De esta manera, conociendo el tipo de genoma y la estrategia de replicación puede inferirse en una primera aproximación si se trata de un virus muy variable o muy estable desde el punto de vista genético.



Molde/ producto	Enzima ^(a)	Actividad	Corrección de errores (frecuencia de error)
DNA / DNA	DNA pol. DNA-dep. (DNA pol)	Replicación de genomas a DNA DNA→DNA Exonucleasa 3'-5'	Sí (1:10 ⁹)
DNA / RNA	RNA pol. DNA-dep. (RNAPol)	Transcripción DNA→RNA	No (1:10 ⁴)
RNA / RNA	RNA pol. RNA-dep. (RdRp) RNA pol.- replicasa / transcriptasa	Transcripción, replicación de genomas a RNA RNA→RNA	No (1:10 ³ - 10 ⁵)
RNA / DNA	DNA pol. RNA-dep. (RT) Transcriptasa reversa o inversa	Transcripción inversa RNA→DNA (cDNA) DNA→DNA ^(b) RNasaH ^(c) Integrasa	No (1:10 ⁴)

Tabla 4.1. Propiedades de las polimerasas de ácidos nucleicos

(a) Las abreviaturas pol. y dep. significan polimerasa y dependiente, respectivamente. Entre paréntesis se mencionan las abreviaturas habituales de las enzimas tal como aparecen en la literatura científica internacional.

(b) RNasaH (degrada RNA en híbridos RNA-DNA): es un dominio de la transcriptasa inversa en algunos retrovirus y es un polipéptido separado en otros.

(c) Integrasa (integración de la copia de DNA en el genoma de la célula hospedera): es un dominio de la transcriptasa inversa en algunos retrovirus y es un polipéptido separado en otros.

En algunos casos, la frecuencia de mutación espontánea hace que sea imposible contar con un *stock* de virus genéticamente homogéneo, ya que en cada generación aparecen nuevos cambios en la secuencia de genomas individuales. Si la velocidad de replicación del virus *wt* original es más alta que la de los eventuales mutantes, en la población predominará el *wt*. En caso contrario, habrá una colección más o menos variada de genomas con más o menos cambios con respecto a la secuencia nucleotídica del *wt*. Esto es especialmente cierto en virus a RNA. Así, en virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) se encontraron mutantes con morfología de placa distinta a la del *wt* con una frecuencia de 3 a 7%, y en el virus de la estomatitis vesicular (VSV) se aislaron mutantes sensibles a la temperatura (*ts*) con frecuencias de 1 a 5%. Por el contrario, en la mayoría de los casos de virus a DNA, la frecuencia de mutación espontánea es muy baja para ser tenida en cuenta.

Las técnicas de la biología molecular han permitido recientemente un análisis más directo de las frecuencias de mutación espontánea. De estos estudios surge que las frecuencias de error en la replicación de los genomas a RNA son, en efecto, altas, aunque varían en varios órdenes de magnitud (10^{-3} a 10^{-6}) dependiendo del virus. La acumulación progresiva de cambios en la secuencia nucleotídica del genoma viral conduce a un cambio en la composición genética de una población de virus, donde las proporciones de las distintas variaciones del genoma original cambian con el tiempo. Si pudiéramos obtener una instantánea en distintos momentos de la población viral en los individuos HIV positivos que fueron contagiados por recibir sangre contaminada de un único donante, el resultado no sería el mismo para los distintos tiempos y los distintos pacientes (ver sección sobre evolución, efecto *cuello de botella*, Figura 4.7). En genética de poblaciones los cambios observados se conocen como deriva genética (*genetic drift*).

La estabilidad genética en las vacunas a virus vivos atenuados es un motivo de preocupación y cuidadosa evaluación y control. En el caso de los virus a RNA, se ha propuesto mantener una copia del genoma en forma de cDNA clonado (copia del RNA viral utilizando una transcriptasa inversa, obtención de DNA de doble hebra e inserción en un plásmido) para poder usarlo como *stock* más estable, debido a que la replicación del DNA se realiza por enzimas que corrigen eventuales errores en la incorporación de nucleótidos. Esto es técnicamente factible en aquellos virus en los que se ha logrado recuperar virus a partir de cDNA infectivo.

2.1.2. Tipos de mutantes

Mutantes letales. El cambio en la secuencia nucleotídica conduce a la anulación de alguna de las funciones esenciales del virus. Este tipo de mutantes no puede ser aislado, a menos que se utilicen líneas celulares que expresen el gen faltante (complementación genética).

Mutantes letales condicionales. Este tipo de mutantes puede propagarse en una condición que se denomina *permissiva*, aunque no lo hacen en otra situación (por ejemplo, mutantes *ts* y *cs*).

Mutantes sensibles a la temperatura (*ts*: temperature sensitive). La alteración en la secuencia nucleotídica es tal que el producto del gen alterado resulta inactivo a una cierta temperatura llamada no permisiva (alta), a la que no puede adoptar su conformación activa. Sin embargo, el producto de ese gen es capaz de mantener la conformación necesaria para su actividad biológica cuando el virus crece a una temperatura permisiva (baja).

Mutantes sensibles al frío (*cs*: cold sensitive). Responden al mismo principio que los *ts*, pero la condición permisiva es, en este caso, una temperatura alta.

Mutantes de rango de hospederos. Se trata de mutantes que son capaces de crecer en un tipo de células y no en otro. Algunos mutantes que se usan como vacunas a virus vivos poseen un neutrotropismo (capacidad de infectar células del sistema nervioso) muy disminuido cuando se los compara con el virus *wt* del que fueron derivados.

Mutantes resistentes a drogas. Las interacciones entre la droga y la molécula viral blanco se ven afectadas por la mutación. Por

ejemplo, la transcriptasa inversa de un retrovirus es capaz de utilizar como sustrato algunos análogos de nucleósidos (por ejemplo, AZT) que, una vez incorporados a la cadena creciente de DNA, impiden la incorporación del próximo nucleótido. En forma espontánea, pueden aparecer mutantes con una alteración en el sitio activo de la transcriptasa inversa, de manera tal que estos análogos de nucleótidos ya no son reconocidos como sustrato y la enzima se torna refractaria a la terapia antiviral.

Mutantes de delección. Este tipo de mutantes puede ser el resultado de la eliminación de regiones esenciales o no esenciales de la secuencia nucleotídica del genoma viral. En este último caso, los virus son viables, mientras que en el primero no lo son y sólo son capaces de replicarse en presencia de un virus *helper*, que les suministre la función que ellos no poseen (o si la célula contiene los genes virales necesarios integrados en su genoma).

Mutantes de escape a la neutralización (resistentes a anticuerpos monoclonales, *mar*). Algunos cambios en las secuencias de genes que codifican proteínas externas del virión pueden resultar en alteraciones de epítopes que son reconocidos en el *wt* por cierto anticuerpo monoclonal. De esta manera, el mutante es capaz de eludir la neutralización por ese anticuerpo e infectar a la célula hospedera. La identificación de los cambios producidos en la secuencia nucleotídica en tales mutantes permite definir las regiones funcionales en las proteínas virales externas.

Algunas mutaciones pueden resultar en varias alteraciones fenotípicas. Así, por ejemplo, una mutación *ts* en un gen puede producir un virus atenuado y con un tropismo tisular alterado. El efecto múltiple de una única mutación se denomina **pleiotropismo** o **efecto pleiotrópico**.

3. INTERACCIONES GENÉTICAS ENTRE VIRUS

3.1. RECOMBINACIÓN

Los virus con genomas que consisten en una sola molécula de DNA o RNA pueden intercambiar información genética en una célula infectada simultáneamente con dos virus distintos por interacción física directa de sus genomas.

Los virus grandes a DNA (adeno, herpes, pox) pueden intercambiar información genética por recombinación homóloga. Generalmente, la recombinación entre dos mutantes que coinfectan una célula produce proporciones equivalentes de los tipos de recombinantes recíprocos, además de viriones con los genomas parentales (Figura 4.2). La recombinación puede ocurrir también entre virus de distintos tipos dentro del mismo grupo (por ejemplo, adeno tipo 2 y 5), pero sólo en regiones de alta homología de secuencia nucleotídica.

Los eventos moleculares que conducen a la recombinación ocurren en forma simultánea con la replicación del genoma. En el caso de los virus a DNA la recombinación ocurre según el modelo de corte y reunión (o mecanismo de recombinación intramolecular). Mientras tanto, en los virus a RNA, las evidencias experimentales apoyan el mecanismo de selección de copia (*copy choice*) en el que la RNA polimerasa salta de un molde a otro generando una molécula del genoma en la que una parte resulta de copiar el RNA molde de uno de los virus parentales y otra parte, del otro (Figura 4.3).

También se han descrito mecanismos de transesterificación parecidos químicamente a los que utilizan las células eucarióticas para procesar sus mRNAs (*splicing* o corte y empalme).

La recombinación en el hospedero infectado con dos variantes de un virus puede producir virus con una patogenicidad alterada. En este sentido, se han descrito infecciones *in vivo* con dos variantes no virulentas del virus herpes simplex (HSV) que generaron recombinantes letales.

3.2. REASOCIACIÓN DE SEGMENTOS GENÓMICOS (REASSORTMENT)

En los genomas no segmentados, la frecuencia de recombinación depende de la distancia de los marcadores genéticos (por ejemplo,

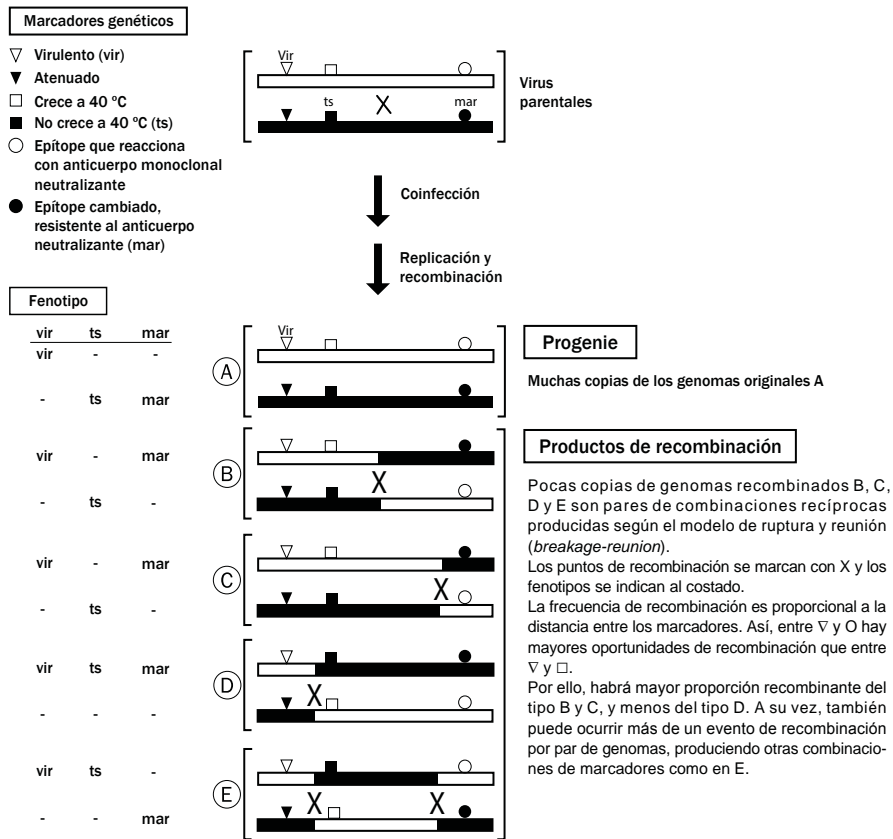


Figura 4.2. Recombinación homóloga de genomas lineales de DNA.

mutaciones *ts* en dos genes distintos, A y B) sobre el *cromosoma*, llegando a un máximo teórico de 50% sólo en el caso de que los marcadores estén alejados a una distancia infinita.

Los virus con genoma segmentado, en cambio, exhiben un comportamiento muy distinto: dado un par de marcadores, la frecuencia de recombinación es muy alta (hasta 50%), cuando éstos pertenecen a segmentos distintos, o es muy baja cuando los marcadores se encuentran sobre el mismo segmento.

A diferencia de los genomas de molécula única, en una infección mixta de dos virus con genomas segmentados la progenie puede contener las combinaciones (*assortments*) alternativas de segmentos por simple empaquetamiento o *reasociación* (*re-assortment*) de segmentos de uno u otro virus (Figura 4.4). Este fenómeno ocurre en virus de las familias a RNA de simple (*Orthomyxo*, *Bunya*, *Arena*, varias familias de virus de plantas) y doble (*Reo*) cadena y conduce a variaciones bastante bruscas en los complementos genéticos de la progenie (*genetic shift*) cuando se la compara con los virus parentales y las variaciones generadas por incorporación de mutaciones durante la replicación. En la naturaleza se han encontrado virus de la gripe con distintas combinaciones de segmentos (el virus tiene un genoma compuesto por ocho segmentos de RNA de cadena simple) responsables de una dramática diversidad antigénica de los distintos subtipos (variantes) virales (el segmento 4 contiene el gen del precursor de la hemaglutinina y el 6, de la neuraminidasa, ambas proteínas de la envoltura viral).

3.3. COMPLEMENTACIÓN

En una infección mixta, dos mutantes letales condicionales pueden dar progenie *wt* por recombinación (o reasociación en el caso de genomas segmentados). Este *wt* será el único miembro de la progenie capaz de replicarse en la condición no permisiva.

Por otra parte, en la infección mixta, en condiciones no permisivas, también se puede producir un aumento en el rendimiento de la progenie de los mutantes sin que cambien sus genomas. En este fenómeno, que se conoce como complementación, uno de los mutantes proporciona el producto génico que es defectuoso en el otro y viceversa, permitiendo que se produzca la replicación.

Esto significa que si ambos mutantes son defectuosos en el mismo gen, no se producirá complementación, ya que ninguno de los virus parentales podrá proveer el producto o la función faltante. Este razonamiento se utiliza para agrupar mutantes de manera que aquellos que son incapaces de complementar se encuentran en el mismo grupo de complementación y se considera que poseen defectos en el mismo gen o producto génico. En teoría, puede haber tantos grupos de complementación como genes en el genoma. Sin embargo, debido al carácter absolutamente letal de algunas mutaciones y al carácter no esencial de algunas funciones o productos génicos virales, a menudo, el número de grupos de complementación resulta menor que el número real de genes.

La complementación se observa en una serie de situaciones naturales. Cuando algunos virus animales se propagan repetidamente por cultivos celulares a altas multiplicidades de infección, aparecen mutantes de delección en forma espontánea. Estos mutantes de genoma más corto interfieren con el crecimiento de otros virus y mutantes. Ellos mismos son incapaces de crecer de manera independiente y son mantenidos en la población viral por complementación con los pocos virus que poseen genoma completo, que se encuentran en la misma población (ver interferencia más adelante).

Otro caso se presenta en los virus tumorales a RNA (retrovirus), la mayoría de los cuales es defectiva en la replicación debido a extensas delecciones en los genes que codifican funciones involucradas en la replicación. Los *stocks* de estos virus contienen, además de los virus transformantes deficientes en replicación, un virus relacionado deficiente en transformación pero que provee las funciones necesarias

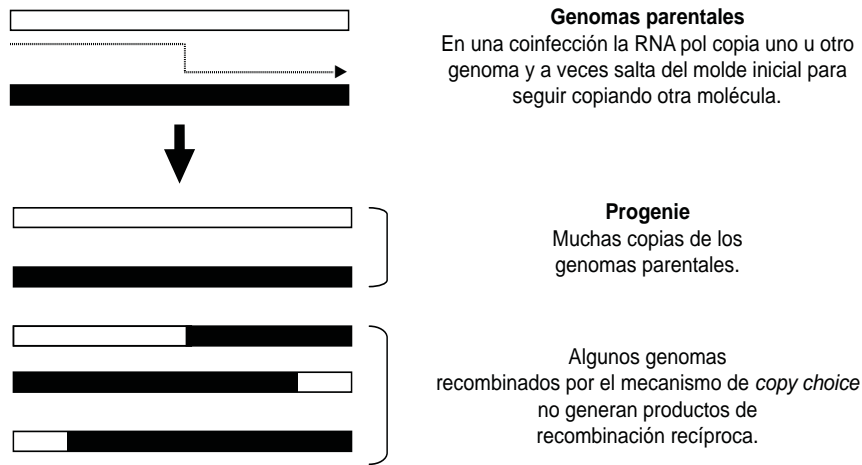


Figura 4.3. Recombinación de RNA: modelo de *copy choice*.

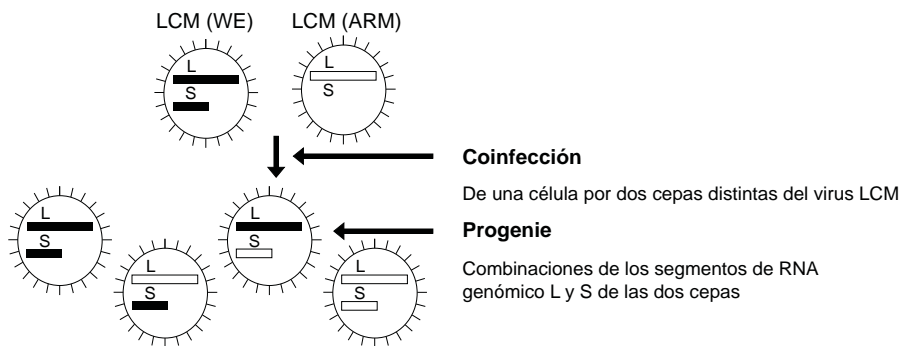


Figura 4.4. Reasociación genética (*genetic reassortment*). Los arnavirus son el ejemplo más simple de virus con genoma de RNA segmentado, ya que solamente consta de dos moléculas, denominadas L y S, que se asocian con la proteína N para formar las nucleocápsides. Si dos cepas (WE y ARM) distintas del arnavirus LCM infectan una misma célula al completarse la morfogénesis de las partículas virales por brotación de la membrana de la célula infectada, en el interior podrán quedar encerradas diferentes combinaciones de RNAs genómicos L y S. Las combinaciones pueden ser aún mayores, ya que se ha demostrado que los viriones pueden empaquetar más de una copia del RNA S.

para la replicación (*replication-competent*). Este segundo virus rescata al virus defectivo en replicación, manteniéndolo en la población viral.

Otro ejemplo de complementación se encuentra en la aplicación de los retrovirus (y otros) como vectores para introducir genes foráneos (transducción) en organismos multicelulares o en células en cultivo. Resulta conveniente que los vectores virales no contengan la información genética del virus (que lo hace patógeno para el organismo blanco). Pero, entonces, ¿cómo se pueden producir virus con los genes que se desean transducir? Para ello se utilizan líneas celulares, llamadas *empaquetadoras* (*packaging cells*), que contienen integrados a sus genomas los genes virales (en el caso de retrovirus, *gag*, *pol* y *env*) necesarios para construir las partículas virales alrededor del *genoma sin genes virales* provisto por el vector. Los viriones que salen de estas células son capaces de infectar por una sola vez sus células blanco, pero estas células no podrán producir progenie (*vectores virales suicidas*).

4. INTERACCIONES NO GENÉTICAS ENTRE VIRUS

Una serie de interacciones no genéticas que ocurre entre los virus puede afectar los resultados de los estudios genéticos al enmascarar el verdadero genotipo.

4.1. HETEROCIGOSIS

Dado que, en general, los virus no poseen un número diploide de *cromosomas*, no puede hablarse de homo y heterocigotas.

Sin embargo, los genomas de los retrovirus son diploides y consisten en dos moléculas del RNA genómico; de manera que en este caso los virus pueden ser heterocigotas para cualquiera de sus genes. Otro caso particular es el de varios virus a DNA, que contienen regiones repetidas donde es factible la heterocigosis (herpes simplex).

En virus envueltos, con genomas haploides, es posible encontrar partículas multiploides como resultado de un empaquetamiento *poco prolijo*. En este caso, cuando de una coinfección con dos variantes (por ejemplo, dos mutantes *ts*) resulta la producción de un aparente recombinante (con fenotipo *wt* a partir de mutantes *ts*), éste segrega las dos variantes originales luego de su aislamiento y cultivo (Figura 4.5).

Esto es así porque en los heterodiploides o multiploides producidos en coinfecciones con dos virus defectivos en dos genes distintos el fenotipo es silvestre (*wt*), ya que la complementación está asegurada por la presencia de ambos genomas.

No se han descrito casos de heterocigosis ni partículas multiploides en virus no envueltos debido a que existen mayores restricciones en el empaquetamiento y es improbable que dos moléculas de un genoma puedan acomodarse en una cápside viral.

4.2. INTERFERENCIA

La interferencia en el crecimiento entre dos virus homólogos o muy relacionados se observa cuando alguno de los dos posee una ventaja sobre el otro. Puede ocurrir en distintas etapas de la infección:

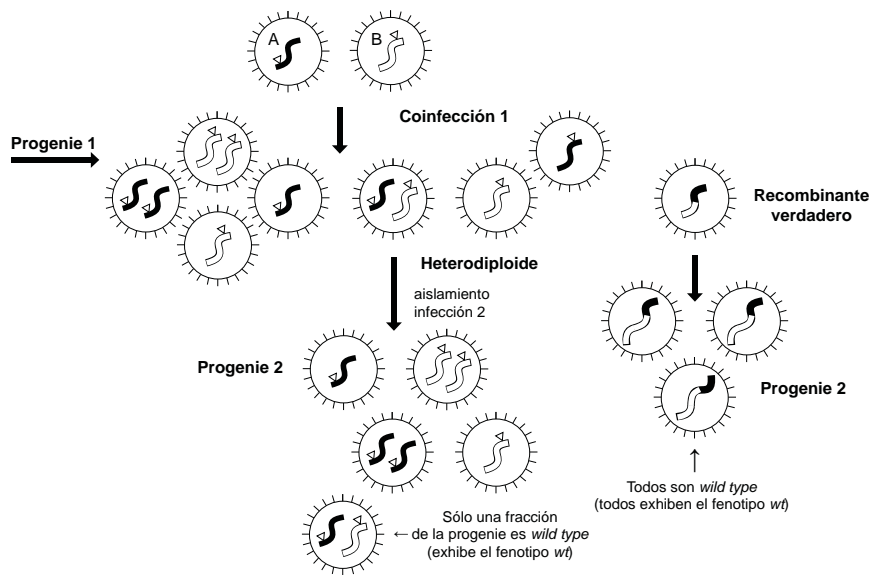


Figura 4.5. Heterocigosis. En el ejemplo esquematizado en la figura, la coinfeción con dos mutantes *ts* en los genes A y B, respectivamente, produce una progenie compuesta por distintos tipos de partículas virales. Además de viriones idénticos a los parentales (*ts*), se pueden aislar viriones capaces de replicarse a temperatura no permisiva. Estos últimos pueden ser recombinantes verdaderos (con las versiones *wt* de los genes A y B) o heterodiploides que contienen dos copias de los genomas con las mutaciones *ts* en los genes A y B. Ambos virus son capaces de infectar y dar una nueva progenie en condiciones no permisivas. Mientras la infección con los recombinantes *wt* produce un tipo de viriones, los heterodiploides generan una colección de partículas virales, en la que solamente una parte sigue siendo heterodiploide (fenotipo *wt*) y se observa la segregación de los genotipos parentales (*tsA* y *tsB*).

adsorción (por ejemplo, el paramixovirus NDV), penetración (retrovirus) o replicación (muchos virus).

La interferencia homóloga a nivel de replicación se debe por lo general a partículas **DI** (defectivas interferentes), que se acumulan por pasajes sucesivos de infecciones con alta multiplicidad. Se ha descrito en varias familias de virus a RNA (*Rhabdo*, *Toga*, *Orthomyxo*, *Paramyxo*) y en algunos a DNA (*Herpes*). Normalmente, las partículas DI contienen las mismas proteínas que las partículas estándar, pero sus genomas son más cortos debido a las deleciones. En algunos casos, el tamaño de las partículas DI es más pequeño (por ejemplo, VSV).

Las partículas DI son defectivas en replicación y requieren que un virus normal coinfecte las mismas células (actuando como auxiliar o *helper*) para poder replicarse. Después de varios pasajes seriados el título de las partículas DI aumenta con rapidez; luego, la proporción de virus estándar en la progenie disminuye y, finalmente, baja en forma progresiva la producción de virus total (autointerferencia). En algunos casos, esta secuencia conduce a una infección persistente, manteniendo un balance entre las partículas estándar y las DI.

Los virus DI contienen, generalmente, deleciones internas pero retienen las secuencias nucleotídicas de los extremos, que son importantes para la replicación de los virus a RNA. En los virus DI a DNA se conserva el origen de replicación y, a veces, se encuentra repetido. En todos los casos, para causar interferencia los genomas DI deben replicarse. Para hacerlo utilizan la replicasa del virus normal, compitiendo eficientemente con los genomas normales por esta enzima. De esta manera, los genomas normales encuentran menos enzima disponible para su propia replicación.

Además de la interferencia homóloga, se conoce la interferencia heteróloga, cuyo mecanismo es variable y ocurre entre virus no relacionados.

Por ejemplo, el RNA del NDV (*Paramyxo*) no replica en células previamente infectadas con algunos otros virus como Sindbis (*Toga*), probablemente, porque forma algún complejo inactivo con la RNA replicasa del virus interferente (los mutantes de Sindbis deficientes en RNA replicasa no interfieren). El virus polio (*Picorna*) interfiere con la multiplicación de otros virus a RNA debido a la alteración que produce en la maquinaria de biosíntesis de pro-

teínas de la célula hospedera (que en las infecciones productivas con picornavirus debe reconocer mRNAs sin *cap*).

4.3. MEZCLA FENOTÍPICA

En una célula infectada por un par de virus relacionados pueden producirse viriones compuestos por proteínas estructurales de ambos y el genoma de uno u otro (Figura 4.6). Este proceso se conoce como **mezcla fenotípica** y ocurre porque las proteínas homólogas (con la misma función y estructuras muy similares) de uno y otro virus pueden sustituirse unas a otras en la formación de cápsides y en el ensamblaje con el material genético (por ejemplo, poliovirus tipos 1 y 2). Las características antigénicas de tales partículas están dadas por las proteínas externas y no reflejan la identidad del genoma.

En el caso de los virus envueltos, las nucleocápsides de un virus pueden encerrarse en la membrana lipídica con glicoproteínas codificadas por otro virus, que coinfecta la célula. Este fenómeno de mezcla fenotípica se conoce como formación de **pseudotipos**. Por ejemplo, en coinfecciones de VSV con algunos retrovirus se forman pseudotipos que pueden ser neutralizados con anticuerpos anti-VSV.

5. INTERACCIONES GENÉTICAS ENTRE LOS VIRUS Y LA CÉLULA HOSPEDERA

5.1. TRANSFORMACIÓN

La transformación de un cultivo celular se mide por una variedad de modificaciones de parámetros morfológicos, bioquímicos y de crecimiento y, con frecuencia, por la capacidad de formar tumores por inoculación en animales seleccionados. Varios virus con genoma a DNA (especies de las filias *Polyoma* y *Papilloma*, y algunos adeno y herpesvirus) son capaces de transformar líneas celulares en las que no pueden llevar a cabo el ciclo de replicación completo. La transformación requiere la expresión de un gen viral (por ejemplo, el antígeno T del polyomavirus SV40), y depende también de la expresión de algunos genes celulares (por ejemplo, la proteína celular p53).

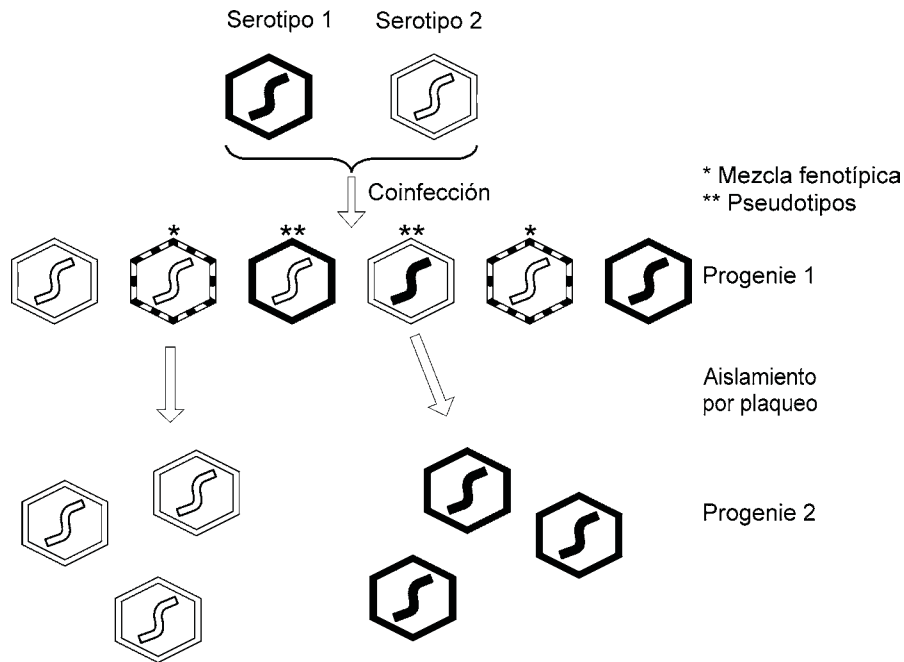


Figura 4.6. Mezcla fenotípica. La coinfección de una misma célula con dos virus emparentados 1 y 2 (dos serotipos, en este ejemplo) produce una progenie compuesta por distintos tipos de partículas virales (además de las parentales), en las que el ácido nucleico del genotipo 1 resulta empaquetado por una mezcla proteínas estructurales de tipo 1 y 2 (mezcla fenotípica), el ácido nucleico del genotipo 1 encerrado en la estructura de proteínas del tipo 2 (pseudotipo), o viceversa, etc. Cuando se trata de dos virus no emparentados, se favorece la formación de pseudotipos (por ejemplo, genomas de retrovirus y envoltura de rhabdovirus).

En los retrovirus la replicación y la transformación no son mutuamente excluyentes, aunque no es necesario que ocurra la replicación. La transformación ha sido estudiada *in extenso* en los retrovirus de tipo C que causan leucemias y sarcomas. En los diferentes grupos de retrovirus los mecanismos de transformación parecen transcurrir por mecanismos diferentes.

El genoma de los virus de sarcoma de Rous (RSV) contiene un oncogén, indispensable para la transformación. Se han descrito más de treinta oncogenes, que representan versiones alteradas (con algunos cambios en las secuencias nucleotídicas) de los genes homólogos celulares (que participan en transducción de señales, control del ciclo celular, etc.) y que fueron adquiridos por distintos retrovirus.

Los virus de leucemia, en cambio, no contienen oncogenes en sus genomas y transforman luego de un período de latencia muy prolongado. Generalmente, los virus producidos por las células transformadas no han adquirido oncogenes de origen celular. El modelo propuesto para explicar el efecto transformante se basa en la inserción del provirus en el DNA celular de manera tal que un proto-oncogén celular queda bajo el control transcripcional de un promotor viral.

5.2. INTEGRACIÓN

Los genomas de los virus transformantes a DNA se encuentran por lo general integrados en el genoma de la célula hospedera transformada. El número de copias del genoma viral insertado en el DNA celular varía entre 1 y 10, y también es variable el sitio de integración. Los datos experimentales favorecen el modelo de integración por recombinación ilegítima entre secuencias no homólogas del DNA viral y celular.

La integración de los genomas de retrovirus en el estado de provirus tampoco ocurre en un sitio fijo del DNA celular, pero en el genoma viral existe un sitio definido para la integración, que ocurre de manera similar a la de los transposones (retrotransposones y retrotransposones). Resulta muy interesante que una proporción significativa del DNA humano (45%) consista en secuencias re-

petidas, en gran parte relacionadas a retrovirus, que tuvieron una importante incidencia en la evolución del genoma (inserción, delección, duplicación de segmentos de DNA, generación de familias de genes).

5.3. INFECCIÓN PERSISTENTE

Cuando un virus lítico establece una infección persistente en un huésped susceptible, se ejercen presiones de selección tanto sobre el virus como sobre la célula hospedera. El virus debe cambiar para no dañar a la célula en la que se mantiene o, alternativamente, la célula debe cambiar para soportar la replicación viral sin ser lisada. Ambas situaciones han sido documentadas experimentalmente.

6. EVOLUCIÓN VIRAL

La evolución viral es observable, sobre todo a nivel fenotípico, a través de la variación antigénica y la resistencia a agentes quimioterápicos. En esta sección nos concentraremos en la variación antigénica (reactividad frente a anticuerpos), aunque los conceptos son extensivos a otros caracteres fenotípicos. Estas variaciones surgen como resultado de las sustituciones de aminoácidos en los dominios de las proteínas que interactúan con los componentes del sistema inmune. Las mutaciones puntuales, delecciones e inserciones, como también el reemplazo de genes enteros o segmentos genómicos por recombinación o reasociación (*reassortment*) pueden producir viriones con propiedades antigénicas alteradas.

En poblaciones virales se encuentran variantes resistentes a un anticuerpo monoclonal neutralizante con frecuencias de 10^{-3} a 10^{-6} . Pero, ¿cómo estas variantes, presentes en proporciones tan bajas, se convierten en predominantes en las poblaciones virales durante el desarrollo de la enfermedad o durante algún brote epidémico? Nos referiremos aquí a la diversificación antigénica en los virus a RNA, por ser en estos casos donde los cambios se aprecian en una escala más dramática.

La variación genética observada en los virus a RNA es el resultado de, al menos, dos procesos diferentes: la generación de mutantes y su eficiencia competitiva frente a los demás virus de la población. La generación de genomas mutantes durante la replicación viral es una consecuencia inevitable de la naturaleza de las enzimas que cometen errores (RNA polimerasas o RNA replicasas de los virus a RNA y transcriptasas inversas de retrovirus, ver más arriba). Algún tipo particular de mutación puede estar favorecido o impedido por condiciones tales como la naturaleza de la enzima viral, el contexto de la secuencia nucleotídica (por ejemplo, una secuencia NAAAAANN), la concentración de los distintos nucleótidos en las *pool* celulares (la incorporación de una G en el lugar que corresponde a otro nucleótido estaría favorecida por una concentración relativamente alta de GTP frente a los otros NTPs), etc. Las frecuencias de mutación tan grandes como las indicadas más arriba aseguran que en cada célula infectada (y, por supuesto, en un organismo entero) se generen muchos mutantes (tal como se ha probado utilizando la técnica de RT-PCR que evita la necesidad de nuevos pasajes en cultivos celulares). Es muy difícil de imaginar que en la replicación de virus a RNA no aparezca al menos un nucleótido cambiado por genoma y, por lo tanto, las poblaciones de virus son en realidad una mezcla de genotipos. Estos existen en la forma de una distribución dinámica que se ha dado en llamar **cuasispecie** (*quasispecies*).

La frecuencia de mutación se refiere a la incorporación de variaciones en la secuencia nucleotídica durante la replicación del genoma, y debe distinguirse de la frecuencia o proporción en que encontramos un mutante determinado en la población. Esta última es el resultado de la frecuencia de mutación pero, además, de la competencia entre ese mutante y todas las otras variantes generadas (*fitness*). La competitividad del mutante puede resultar de la eficiencia relativa de cualquiera de los procesos bioquímicos en el ciclo de vida del virus: replicación del genoma, síntesis y procesamiento de proteínas, ensamble de partículas, liberación a partir de las células infectadas, estabilidad de los viriones fuera de la célula, etc.

En el término de varias generaciones, la evolución de los genomas virales se verá influenciada, además, por la selección positiva y el muestreo al azar, tal como ocurre cuando unas pocas partículas virales son transmitidas de un individuo infectado a otro hospedero susceptible (efecto de cuello de botella, *genetic bottleneck*; Figura 4.7).

Por mucho tiempo se ha supuesto que la variación antigénica era el resultado de la selección directa de variantes causada por las respuestas humorales y/o celulares del sistema inmune del hospedero (selección negativa de las variantes antigénicas originales; predominio de las nuevas variantes que escapan a la reacción con los anticuerpos presentes). Sin embargo, en estudios realizados en ausencia de anticuerpos antivirales (por ejemplo,

en cultivos celulares, en individuos inmunodeprimidos) también aparecen variantes antigénicas predominantes (herpes simplex y especies de *Picorna*, *Lenti*, *Paramyxo*, *Orthomyxo*). Existen evidencias experimentales considerables sobre este fenómeno en infecciones de organismos enteros, en los que la respuesta de anticuerpos neutralizantes no es determinante directa de la prevalencia de una determinada variante antigénica. Así, por ejemplo, el grado de variación antigénica en las proteínas externas de paramixovirus es similar al observado en su polimerasa (que no es blanco de los anticuerpos neutralizantes).

Como ejemplo se puede citar una variante antigénica predominante del virus de influenza porcina (generado en ausencia de presión selectiva por un anticuerpo neutralizante), que contenía un cambio en la secuencia de un epítipo (reactividad serológica distinta). Por otra parte, este cambio resultaba en una mayor eficiencia en la interacción del virus con su receptor celular, lo que favorecía la replicación de esta variante frente a otras con una menor afinidad por los receptores (selección positiva del mutante).

De manera que la diversificación antigénica depende de la generación estocástica de mutantes, de la selección positiva de aquellos que estén mejor adaptados al ambiente que sus progenitores, o los elegidos al azar, de acuerdo al efecto de cuello de botella y la probabilidad de incorporar otras mutaciones adicionales con efecto más neutro (toleradas por la selección negativa).

7. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA EL ANÁLISIS DE GENOMAS

La biología molecular moderna provee al virólogo una serie de metodologías y herramientas que permiten el análisis detallado de los genomas virales. En particular, la determinación de secuencias nucleotídicas de genomas y la comparación de los mismos contribuye a establecer una taxonomía más racional y al establecimiento de las relaciones evolutivas de los distintos grupos taxonómicos. El conocimiento de la secuencia nucleotídica también permite establecer relaciones de parentesco entre distintos aislamientos de virus, elucidar los orígenes de un brote epidémico, deducir cómo aparecieron nuevas variantes virales, establecer puntos de recombinación, deleción o inserción en un genoma y hacer inferencias sobre los virus parentales, etc. El advenimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su combinación con la síntesis de cDNA utilizando transcriptasa inversa (RT-PCR) han posibilitado la obtención de datos de secuencias nucleotídicas a partir de cantidades escasas de material infectado y son técnicas poderosas que no dependen de la posibilidad de propagar el virus en condiciones de laboratorio.

La automatización de la determinación de secuencias nucleotídicas la ha convertido en el procedimiento rutinario de elec-

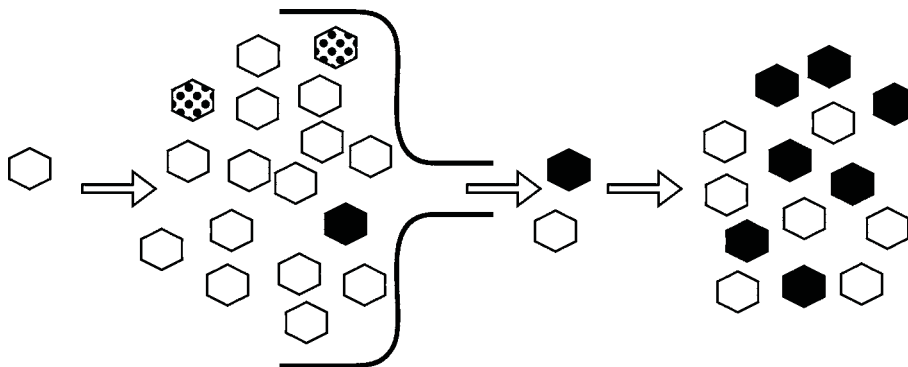


Figura 4.7. Efecto del cuello de botella. Durante la replicación de un virus en un individuo (o en una célula) aparecen mutantes espontáneos que constituyen una población A. Cuando sólo un número limitado de viriones de esta población A alcanza a infectar a otro individuo se genera una progenie (población B) en la que las proporciones de las variantes genómicas resulta diferente de la que se encontraba en la población original.

ción a la hora de caracterizar un nuevo aislamiento de virus. Sin embargo, en distintos momentos de la historia reciente de la genética molecular se desarrollaron variadas metodologías para la caracterización de genomas, que brindan distinta información y son accesibles en la mayoría de los laboratorios de escasa complejidad (patrones de restricción, PCR-RFLP, hibridación, *fingerprints*, RAPDs, SSCP, etc.) para establecer si dos virus son iguales o diferentes.

El repertorio de armas bioquímicas con que cuenta la genética, en general, y la genética molecular de virus, en particular, crece con rapidez y, afortunadamente, es incorporado tanto a estudios básicos como clínicos y aplicaciones diagnósticas de rutina.

8. VIRUS COMO VECTORES DE EXPRESIÓN DE GENES

El reemplazo de genes virales no esenciales por recombinación *in vitro* e *in vivo* permite obtener vectores que son capaces de *inocular* eficientemente nueva información genética en células en cultivo y organismos enteros. Así se aprovechan los exquisitos y sofisticados mecanismos que han adquirido los virus a través de su evolución para penetrar en la célula hospedera con alta eficiencia e introducir su material genético. Probablemente haya pocos virus que no podrían ser usados como transportadores de genes clonados, aunque se seleccionan aquellos que más se adecuan al objetivo deseado.

Los genomas de los virus pequeños a DNA (SV40, BPV) se pueden manipular fácilmente *in vitro* (en un tubo de ensayo) para insertar nuevos genes y quitar, recortar o modificar secuencias nucleotídicas utilizando las herramientas habituales de la ingeniería genética.

En los retrovirus se aprovecha la propiedad de integración en el genoma de la célula hospedera. Esto requiere que del genoma

viral original sólo se conserven las secuencias terminales LTR (*long terminal repeats*) y se *rellena el medio* (distancia entre dichas secuencias terminales) con el gen de elección.

Los virus grandes a DNA (vaccinia, baculo) con genomas de 150 000 a 200 000 pares de bases no pueden cortarse y rearmarse *in vitro* con facilidad utilizando enzimas de restricción y DNA ligasa. Por ello, los genes a insertar habitualmente se introducen primero en plásmidos apropiados. En estas construcciones el gen clonado se encuentra flanqueado por secuencias cortas correspondientes, en general, a un gen no esencial del virus que se utilizar como vector. Este plásmido se introduce en las células susceptibles por transfección junto con el DNA genómico viral (por transfección o por infección con el virus entero). En la célula, la presencia conjunta de ambos DNAs ofrece la oportunidad para que ocurra la recombinación homóloga que reemplaza al gen viral por el gen clonado flanqueado por secuencias virales, obteniéndose de esta forma un virus recombinante. Más recientemente, se desarrollaron metodologías muy ingeniosas que permiten replicar estos genomas virales en bacterias y que incrementan la eficiencia en la obtención de virus recombinantes.

Los vectores virales permiten expresar genes en sistemas eucarióticos aprovechando la maquinaria de las células hospederas, lo que incluye las modificaciones durante y después de la traducción. Las aplicaciones de estos vectores son múltiples, entre ellas, la fabricación de vacunas más seguras y económicas y la terapia génica. Por otra parte, la potencial utilidad de algunos virus ha estimulado el estudio de su biología a nivel molecular detallado, contribuyendo al crecimiento de la Virología como ciencia.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Agustín E. Ure por la producción de las figuras.

Bibliografía

- Bannert N, Kurth R. "Retroelements and the human genome: New perspectives on an old relation". *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:14572-14579.
- Cann, A. *Principles of Molecular Virology*. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, 2005.
- Enquist LW, Skalka AM, Racaniello VR, Flint SJ. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*. 2nd Ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 2003.
- Morse, SS. *Evolutionary biology of viruses*. Raven Press, New York, 1993.
- Sallie, R. "Replicative homeostasis II: Influence of polymerase fidelity on RNA virus quasispecies biology: Implications for immune recognition, viral autoimmunity and other virus receptor diseases". *Virology J*. 2005;2:70. Versión electrónica gratuita en: <http://www.virologyj.com/content/2/1/70>.

Patogenia de las infecciones virales

Verónica Lidia Mathet - José Raúl Oubiña

1. INTRODUCCIÓN

En una infección viral existen ciertos estadios obligatorios que permiten a los virus la diseminación de un hospedero a otro y por ende, su mantenimiento en la naturaleza. Estos estadios son los siguientes:

1. *Infección inicial del hospedero.* En esta etapa el virus se adsorbe a células susceptibles y luego penetra en el tejido del hospedero.
2. *Diseminación de la infección.* El virus puede multiplicarse y diseminarse localmente o a través del cuerpo.
3. *Egreso del virus al exterior.*

Estas 3 etapas pueden ocurrir a veces sin causar enfermedad aparente en el hospedero: es el caso de las infecciones denominadas subclínicas o inaparentes. Por el contrario, en otras ocasiones se producen signos y síntomas que podrán ser o no característicos de la infección generada por un virus determinado. El tiempo que transcurre entre la infección inicial del hospedero y la producción de enfermedad corresponde al período de incubación de la misma.

En este capítulo se describirán algunos eventos de la relación virus-hospedero: la entrada y diseminación de virus en el organismo, los mecanismos de lesión celular inducidos por acción viral directa y aquellos que son el resultado de la respuesta del hospedero frente al virus o a algunos de sus componentes. La relación virus-célula que posibilita la propagación viral se describe en el capítulo 2. La capacidad oncogénica de algunos virus se analiza en el capítulo 6. En el capítulo 7 se detallan los eventos relacionados con la constelación de factores vinculados a los mecanismos de defensa del hospedero frente a la infección viral, mientras que en el subsiguiente capítulo 8, se abordan los diversos **mecanismos de evasión viral** a la respuesta inmune del hospedero y que también **forman parte de la patogénesis viral**.

1.1. UNA APROXIMACIÓN AL VOCABULARIO

Con el objetivo de lograr que el lector pueda acceder con mayor facilidad a la temática desarrollada en este capítulo, a continuación se menciona el significado de algunos términos utilizados. Si bien algunos autores de la literatura anglo-sajona, han adoptado como sinónimo los términos patogenicidad y virulencia, en esta obra, dichos vocablos se asignan a conceptos diferentes.

1.1.1. Patogenicidad

Este vocablo deriva del griego *Pathos* y *gene* que significan enfermedad y génesis, o "dar origen a". En otras palabras, implica la capacidad de un agente para producir enfermedad. Por ejemplo, el virus sarampión es un agente altamente patógeno, ya que sobre un número determinado de individuos infectados y no inmunizados previamente, la gran mayoría de ellos desarrollará el cuadro exantemático y sistémico característico.

Por el contrario, virus como polio o hepatitis A, cuando infectan lactantes menores de un año producen infecciones subclínicas o inaparentes, siendo –por ende– su patogenicidad prácticamente nula en ese grupo etario.

1.1.2. Virulencia

Indica la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo, los enfermos de poliomielitis exhiben severas restricciones motoras, estando el

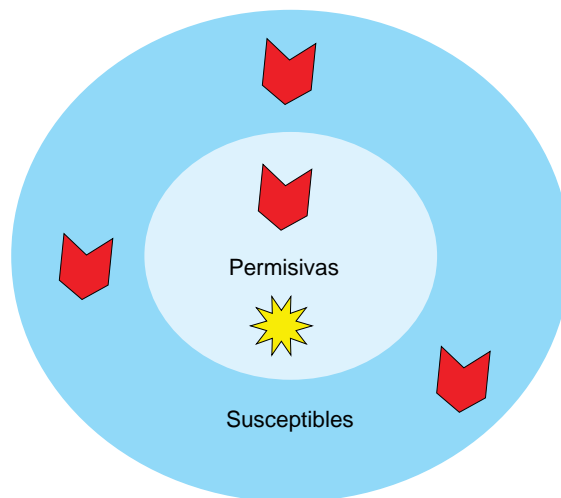


Figura 5.1. Células susceptibles y permisivas. Son susceptibles a la infección por un determinado virus aquellas que poseen el/los receptor(es) [y eventual(es) correceptor(es)] para el mismo. Sólo aquellas que además del receptor (❤) poseen los factores de transcripción (★) que permiten la expresión de los genes virales, son permisivas. Toda célula permisiva es susceptible, aunque no todas las susceptibles son permisivas.

agente etiológico consiguientemente asociado a una alta virulencia. En modo análogo, los pacientes que padecen rabia habitualmente evolucionan al óbito, siendo –por ende– máxima la virulencia del virus homónimo. Por el contrario, uno de los agentes causales de resfriado común, denominado rinovirus, exhibe habitualmente una virulencia muy baja.

1.1.3. Células susceptibles y permisivas

Los virus pueden interactuar con la superficie de células que expresan receptores y correceptores para los mismos (véase el capítulo 2) y que pueden permitir su ingreso a aquellas. Dichas células reciben la denominación de **susceptibles**. Sin embargo, el mero ingreso del virus a la célula no implica que en ella este agente podrá propagarse. Se requiere la presencia de diversos factores celulares tales como factores de transcripción que –por ejemplo– pueden interactuar con los promotores y potenciadores (*enhancers*) del genoma viral permitiendo la producción de progenie viral. A las células que disponen de los factores necesarios para la replicación viral se las denomina **permisivas**. En síntesis, toda célula permisiva es susceptible, mas no toda célula susceptible será permisiva (Figura 5.1). Como ejemplo, existen en el ser humano receptores para el virus polio en órganos tan diversos como –entre otros– corazón, riñón, pulmón, además del SNC. Sin embargo, el virus a pesar de dichos receptores, no puede producir progenie en corazón, pulmón o riñón dado que las células de estos órganos son susceptibles pero no permisivas al virus, en contraposición con lo observado en el SNC.

1.1.4. Determinantes del tropismo viral

Si bien hasta la década de 1980 se aceptaba que el tropismo viral dependía únicamente de la interacción entre los receptores y correcep-

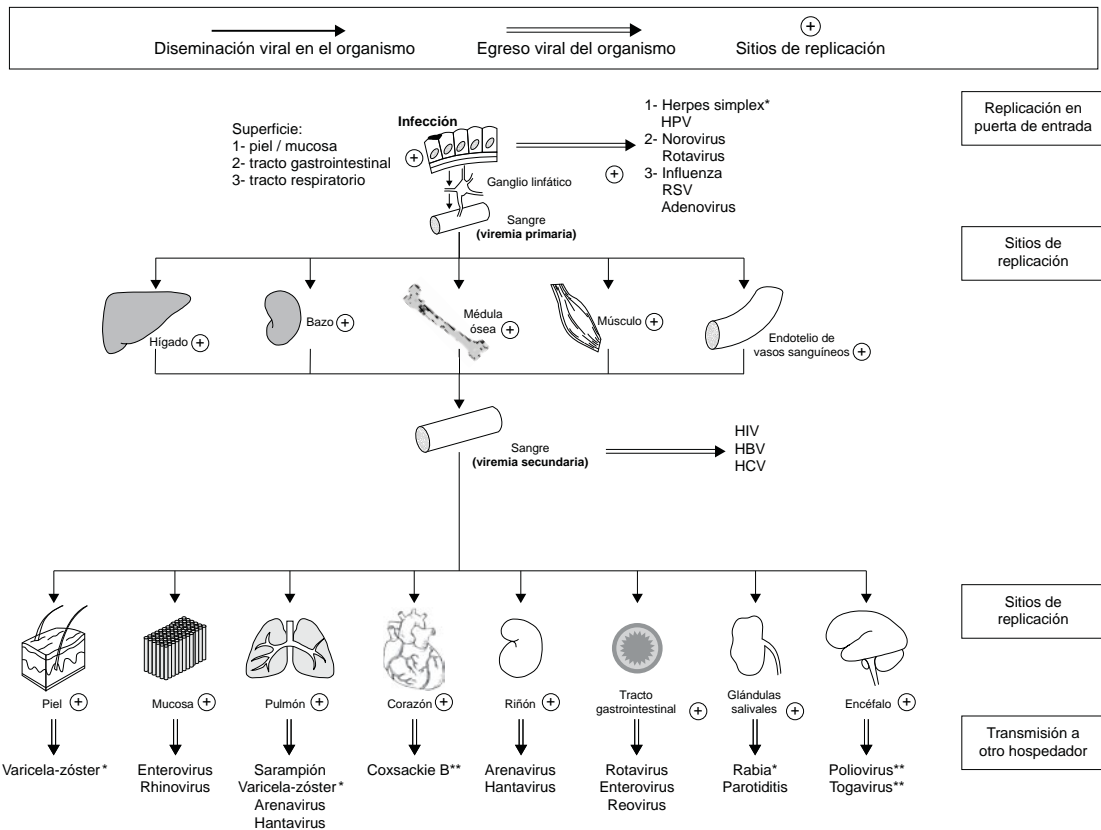


Figura 5.2. Entrada, diseminación y egreso viral del organismo. Los virus pueden ingresar al organismo luego de infectar una determinada superficie (piel, mucosa o tracto específico). La infección puede quedar circunscrita a dicho sitio (localizada) o diseminarse (sistémica). Desde la superficie epitelial los virus pueden ser transportados hacia los ganglios regionales. Desde allí los virus son vertidos a la sangre durante un breve período de tiempo y en baja cuantía (viremia primaria), lo que permite la diseminación a órganos como hígado, bazo, médula ósea, músculo y endotelio vascular. Luego de replicar allí, se produce una viremia secundaria de mayor duración y cuantía, a través de la cual los virus alcanzan células blanco permisivas. Se mencionan sólo algunos ejemplos ilustrativos. En este diagrama no se indica la vía de diseminación neural de algunos virus (*), como ocurre con la recurrencia del virus varicela-zóster asociado al zóster, o con la recurrencia del herpes simplex, o la diseminación neural del virus rabia. Múltiples virus alcanzan el órgano blanco, y a partir de su replicación allí pueden transmitirse a otro organismo; sin embargo, algunos virus encuentran una "vía muerta" en dicho órgano, sin diseminarse al exterior a partir de éste. De todas formas, a pesar de dicho "impedimento" anatómico, pueden igualmente transmitirse al exterior (**), ya que egresan del organismo por otras vías.

tores de la superficie celular con el ligando específico viral (presente en la superficie de las partículas envueltas o desnudas), diversos experimentos demostraron que los receptores son necesarios pero insuficientes para determinar dicho tropismo. Actualmente, se acepta que son también relevantes las interacciones entre los factores transcripcionales celulares con las polimerasas virales y/o con los promotores y *enhancers* del genoma viral. En ciertas circunstancias, un único cambio aminoacídico en la polimerasa viral, ha permitido cambiar el tropismo de un virus, tal como se observó en la infección murina experimental con el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM).

En los ítems subsiguientes se mencionarán ejemplos ilustrativos de virus que a partir de diferentes puertas de entrada (Figura 5.2) promueven infecciones con una espacialidad localizada o sistémica. Asimismo, las diversas infecciones virales pueden clasificarse según su temporalidad (agudas o persistentes) y afectar a individuos inmunocompetentes o inmunosuprimidos (Figura 5.3).

2. PUERTAS DE ENTRADA

El evento inicial en el ciclo de replicación viral es la adherencia a receptores específicos celulares (véase el capítulo 2 y el ítem 6 de este capítulo). La presencia o ausencia de dichos receptores puede repercutir sobre el espectro de hospederos susceptibles a la infección viral, así como en el tropismo tisular de los virus, el que a su

vez está influenciado por la puerta de entrada y la vía de diseminación del agente.

Desde el punto de vista de la puerta de entrada al organismo, los virus pueden ingresar por diversas vías. Más aún, algunos virus poseen más de una puerta alternativa. Algunos ejemplos se indican en la Tabla 5.1.

2.1 PIEL

Dado que éste es el "órgano" más grande del cuerpo humano y teniendo en cuenta que está constituido por células muertas en sus capas más externas (recuérdese que los virus replican sólo en células vivas) es comprensible que constituya una importante barrera para el ingreso de estos agentes infecciosos. Sin embargo, los virus pueden penetrar dicha barrera en los sitios en los que la misma está dañada. Tal es el caso de la entrada del virus rábico en el lugar de la mordedura producida por ejemplo por perros, zorros o murciélagos. Asimismo, los arbovirus penetran la piel al ser introducidos mediante la picadura de artrópodos, tal como se observa con el virus de la fiebre amarilla vehiculizado en la saliva de *Aedes aegypti*. Las células dendríticas (CD) de la piel (células de Langerhans [langerina positivas] y/u otras células dendríticas inmaduras de la dermis y el intersticio [que expresan la molécula DC-SIGN: (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* o CD209)] fueron postuladas sucesivamente

1) VIRUS QUE PENETRAN A TRAVÉS DE PIEL O MUCOSAS

A través de microtraumas

<i>Hepadnaviridae</i>	Hepatitis B
<i>Papilomaviridae</i>	Papilomavirus: todos los tipos
<i>Herpesviridae</i>	Herpes simplex 1 y 2
<i>Poxviridae</i>	Molusco contagioso
<i>Arenaviridae</i>	Junín
<i>Flaviviridae</i>	Hepatitis C

Transmitidos por artrópodos

<i>Poxviridae</i>	Tanapoxvirus
<i>Flaviviridae</i>	Dengue, fiebre amarilla, virus del Oeste del Nilo
<i>Togaviridae</i>	Encefalitis de San Luis
<i>Reoviridae</i>	Fiebre por garrapatas de Colorado
<i>Bunyaviridae</i>	Fiebre del Valle de Rift

Transmitidos por vertebrados

<i>Rhabdoviridae</i>	Rabia
----------------------	-------

Transmitidos mediante inyección

<i>Hepadnaviridae</i>	Hepatitis B
<i>Retroviridae</i>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<i>Herpesviridae</i>	Citomegalovirus humano, Epstein-Barr
<i>Filoviridae</i>	Ébola
<i>Flaviviridae</i>	Hepatitis C

Tracto genital

<i>Papilomaviridae</i>	Tipos genitales (ej. 6, 11, 16, 18)
<i>Herpesviridae</i>	Herpes simplex 2
<i>Retroviridae</i>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<i>Hepadnaviridae</i>	Hepatitis B
<i>Filoviridae</i>	Ébola

Mucosa conjuntival

<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus serotipos H 8, 3 y 7
<i>Picornaviridae</i>	Enterovirus 70 Echovirus 7, 11 Coxsackie A 24

2) VIRUS QUE PENETRAN POR VÍA RESPIRATORIA

Con manifestaciones clínicas locales

<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza
<i>Paramyxoviridae</i>	Parainfluenza, sincicial respiratorio, metapneumovirus humano
<i>Picornaviridae</i>	Rhinovirus, algunos enterovirus
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus
<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus
<i>Herpesviridae</i>	Epstein-Barr, citomegalovirus humano, herpes simplex

Con manifestaciones clínicas generalizadas

<i>Togaviridae</i>	Rubéola
<i>Herpesviridae</i>	Varicela-zóster
<i>Parvoviridae</i>	Erythrovirus (parvovirus) humano B19
<i>Paramyxoviridae</i>	Sarampión, parotiditis
<i>Picornaviridae</i>	Algunos enterovirus
<i>Polyomaviridae</i>	BK y JC

(continúa en la página siguiente)

<i>Bunyaviridae</i>	Hantaan
<i>Poxviridae</i>	Viruela (erradicado)

3) PUERTA DE ENTRADA DIGESTIVA**Orofacial**

<i>Herpesviridae</i>	Hepes simplex, Epstein-Barr Citomegalovirus humano
----------------------	---

Intestinal**Con manifestaciones clínicas locales**

<i>Reoviridae</i>	Rotavirus (puede asociarse también a infección extra-intestinal)
<i>Caliciviridae</i>	Norovirus
<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus 40, 41

Con manifestaciones clínicas generalizadas

<i>Picornaviridae</i>	Poliovirus Hepatitis A Algunos enterovirus
<i>Hepeviridae</i>	Hepatitis E

Sin producción de manifestaciones clínicas

<i>Picornaviridae</i>	Algunos enterovirus
<i>Adenoviridae</i>	Algunos adenovirus
<i>Reoviridae</i>	Reovirus

4) INFECCIÓN FETAL TRANSPLACENTARIA

<i>Togaviridae</i>	Rubéola
<i>Herpesviridae</i>	Citomegalovirus humano
<i>Poxviridae</i>	Viruela (erradicado)
<i>Parvoviridae</i>	Erythrovirus (parvovirus) humano B19
<i>Retroviridae</i>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<i>Hepadnaviridae</i>	Hepatitis B
<i>Flaviviridae</i>	Hepatitis C

Tabla 5.1. Puertas de entrada viral al organismo: algunos ejemplos.

te como permisivas a la infección, aunque los reportes más recientes indican que son las últimas las que desempeñan un rol principal. La infección de unas u otras células dendríticas favorece la infección cutánea y la subsiguiente diseminación viral a otros órganos. Otros virus pueden potencialmente penetrar la piel mediante inyección al efectuarse transfusiones controladas en forma inadecuada o cuando no son detectables los marcadores específicos: tal es el caso del virus hepatitis B (HBV), del virus hepatitis C (HCV), del virus Epstein-Barr (EBV), del citomegalovirus humano (HCMV) y de diversos retrovirus, tales como los virus de la leucemia T humana (*Human T Leukemia Virus* o HTLV-1/2) y HIV. La viremia persistente asociada con diversa frecuencia a la circulación plasmática de virus libre en las infecciones crónicas producidas por HBV, HCV o HIV, así como la integración del provirus de retrovirus como HTLV-1/2 o HIV en linfocitos T CD4⁺ de individuos infectados, y la asociación de HBV y HCV a linfocitos y monocitos multiplica las posibilidades de propagación de dichos agentes en drogadictos que comparten agujas. En otras infecciones de la piel propiamente dicha, como es el caso de la verruga producida por diversos papilomavirus humanos (HPV), el sitio inicial de la injuria puede pasar inadvertido.

2.2 OROFARINGE Y TRACTO RESPIRATORIO

Es éste un sitio muy importante de penetración de virus. Sin embargo, normalmente los mecanismos de eliminación viral que partici-

pan en el árbol respiratorio mantienen limpio el tracto removiendo las partículas inhaladas, logrando así que los pulmones sean prácticamente estériles. La estructura mucociliar que recubre la cavidad nasal y la mayor parte del árbol respiratorio bajo permite que las partículas extrañas que se depositan sobre el mucus puedan ser transportadas hacia las fauces posteriores y luego deglutidas. En las porciones terminales del árbol respiratorio bajo no existe dicha cubierta mucociliar: el alvéolo está formado por células epiteliales, células dendríticas y macrófagos con elevada actividad fagocítica.

El destino de una partícula extraña inhalada está determinado por su tamaño: si es mayor de 6-10 µm quedará atrapada en las fosas nasales, mientras que aquellas cuyo tamaño oscila entre 0,6-6 µm se depositarán a lo largo del tracto respiratorio alto y bajo. Partículas menores de 6 µm pueden entrar a los pulmones y algunas de ellas alcanzan los alvéolos. Al producirse un estornudo o un acceso de tos se producen aerosoles conteniendo partículas que oscilan entre 1 µm a más de 20 µm. Teniendo en cuenta que las partículas de 10 µm tardan aproximadamente 17 minutos en caer de una altura de 3 metros, se infiere que aquellas partículas menores a dicho tamaño poseen un tiempo de circulación considerable en ambientes cerrados. En el caso de los virus respiratorios, dicho tiempo de circulación favorece su transmisión aerógena.

Durante un acceso de tos se expelen cientos de microgotas de Flügge a una velocidad aproximada a los 900 km/hora, mientras que al estornudar se eliminan cientos de miles de mi-

PATOGÉNESIS DE LAS INFECCIONES VIRALES

- Según hospedador

Inmunocompetente
Inmunodeficiente

- Según espacialidad de la infección

Localizadas
Sistémicas

- Según temporalidad de la infección

Agudas
Persistentes
 Crónicas
 Latentes
 Lentas
 Transformantes

Figura 5.3. Clasificación de las infecciones virales.

crogotas, a una velocidad cercana a los 100 km/hora. Estos datos ilustran la facilidad de transmisión de las infecciones virales respiratorias en las que se eliminan viriones a través de dichas secreciones (Figura 5.4).

Un mismo virus puede afectar una o más localizaciones del árbol respiratorio; a su vez, múltiples virus pueden afectar una determinada localización (Figura 5.5).

Las infecciones virales que tienen por puerta de entrada el tracto respiratorio pueden asociarse a manifestaciones localizadas o sistémicas, dependiendo si la infección queda restringida a células especializadas de dicho tracto o si se infectan elementos móviles residentes en él (CD), o si se produce viremia que disemine al virus a un órgano secundario de ataque. La (eventual) diseminación viral a otras partes del organismo depende de la superficie celular a través de la cual egresan los virus en las células epiteliales polarizadas: aquellos que sólo lo hacen por el polo apical, promoverán infecciones localizadas (por ejemplo, la producida por los virus sincicial respiratorio [RSV], metapneumovirus humano [HMPV] o parainfluenza humano); los que egresan por el polo baso-lateral, producen infecciones sistémicas afectando diversos órganos de la economía. Hay virus que egresan preferencialmente por un polo, aunque también lo hacen en menor grado por otro: es el caso de los virus sarampión y rubéola. Sarampión lo hace principalmente por

el polo baso-lateral, mientras que rubéola lo hace preferencialmente por el polo apical.

La prevalencia de las infecciones virales respiratorias agudas es diferente según sea el hospedero un paciente inmunocompetente o inmunosuprimido. En este último caso, son frecuentes y de mayor gravedad las infecciones por adenovirus, RSV, HMPV, HCMV, herpes simplex o varicela-zóster.

Como ya se mencionó anteriormente, el virus influenza se une a las células a través de la interacción de sus hemaglutininas con glicoproteínas celulares que contienen ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico), aunque ello no es suficiente para promover la infección, habiéndose postulado la necesidad de un receptor más específico para que dicho evento ocurra *in vivo*. Sin embargo, la transmisibilidad de las diferentes cepas del virus influenza es variable. La presencia de la neuraminidasa viral se asocia a la liberación de viriones de la célula, y por ende, probablemente, a su transmisibilidad. A su vez, otra posible función de la neuraminidasa sea liberar viriones de inhibidores presentes en el mucus que contienen ácido neuramínico análogo al de los receptores celulares.

Otros factores que afectan la transmisión de los virus que penetran por vía respiratoria incluyen la intensidad de las secreciones por boca o nariz, la contaminación de manos y objetos, la resistencia a la desecación de cada virus en particular, y el número de partículas infecciosas liberadas.

Desde el punto de vista de las células infectadas, puede observarse infección de las células epiteliales (como ocurre con influenza o RSV), de las CD (como se observa con sarampión o RSV) o de los macrófagos alveolares. El virus influenza puede infectar dichos macrófagos septales pero produce en ellos un ciclo de replicación abortivo: se sintetizan antígenos virales sin liberación de virus infeccioso. La producción de TRAIL (*TNF- α Related Apoptosis-Induced Ligand*) por los macrófagos promueve la apoptosis de las células epiteliales, lo cual está asociado al exudado pulmonar observado en las neumonías causadas por influenza. En el caso del RSV, las células que son blanco para su ingreso al organismo corresponden a las del epitelio ciliado columnar. La oclusión aérea observada en casos fatales de bronquiolitis agudas –patología de la que RSV es la primera causa– se asocia a la acumulación de restos celulares conteniendo cuerpos apoptóticos y proteínas séricas, con afectación funcional de los macrófagos alveolares, lo que resalta el papel de la inmunidad innata en su génesis.

El desenlace de una infección respiratoria aguda puede variar ampliamente, dependiendo de la respuesta inmune del hospedero, la que definirá la cinética de la eliminación viral. En este contexto, desempeñan un rol muy importante tanto la respuesta innata como la adaptativa. Entre las células de la respuesta innata, diferentes subpoblaciones de CD mieloides (convencionales) y plasmocitoides son responsables de distintas tareas que incluyen desde la captación antigénica, hasta la presentación a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, como la producción de Interferón- α , respectivamente. Una actividad alterada de las CD (por ejemplo, como resultado de su infección) puede favorecer –junto a la diversidad antigénica– las reinfecciones por un mismo virus, como se observa con RSV, como consecuencia de una afectación de la sinapsis inmunológica (contacto intercelular) entre CD y linfocitos T, lo que impide una respuesta adaptativa protectora adecuada.

La infección de las CD puede promover su maduración, como lo hace influenza, lo que facilita su eliminación por los linfocitos T. Por el contrario, el virus sarampión impide su maduración al inhibir la expresión de CD40 ligando en los linfocitos T, lo cual contribuye a la inmunosupresión observada en la fase aguda de la enfermedad homónima. En otros casos, como ocurre en la infección por HCMV, las células dendríticas progenitoras portan el genoma viral en forma latente (véase más adelante ítem 5.2), sin expresión de genes de la fase lítica. Al madurar dichas células, se produce la reactivación viral con producción de virus infeccioso, lo cual es dependiente de la diferenciación celular que –a su vez– promueve una remodelación de la cromatina en la región del promotor inmediato temprano viral. La infección de las CD mieloides con HCMV



Figura 5.4. Formación de microgotas de Flügge. Las mismas se expelen durante el acto de toser o de estornudar, así como también al pronunciar la consonante "F".

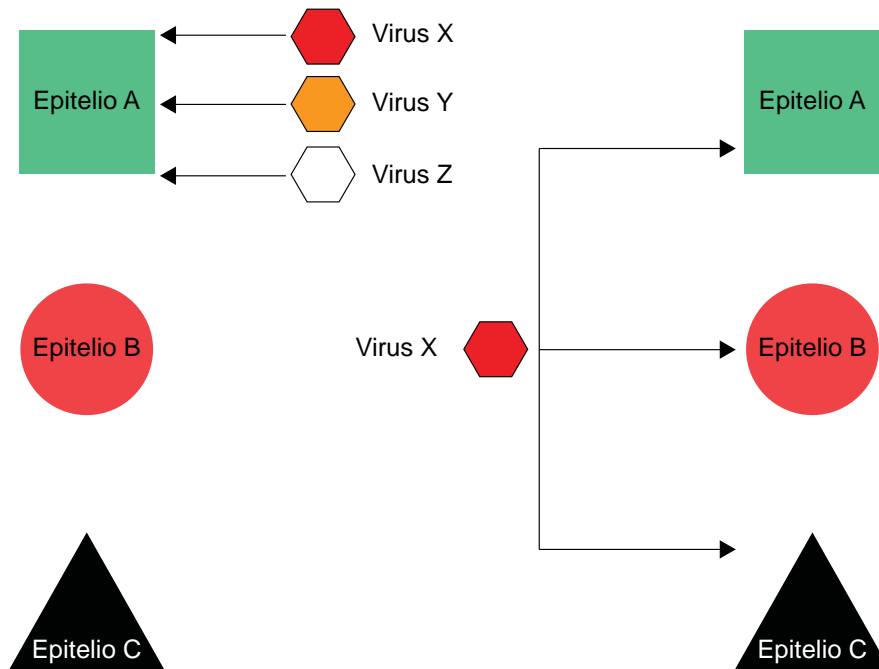


Figura 5.5. Virus respiratorios y localización de las infecciones. Un mismo virus puede localizarse en diversos sitios del árbol respiratorio; una misma localización anatómica puede ser el sitio de multiplicación de diversos virus.

es permisiva y lítica, afecta su maduración, bloquea la secreción de citoquinas, dificulta su migración en respuesta a quimioquinas e impide su habilidad aloestimuladora. Por el contrario, la infección con HCMV de las CD plasmocitoides afecta diferencialmente su capacidad de colaborar con la respuesta adaptativa: inhibe la colaboración con los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (contribuyendo a otro ejemplo de inmunosupresión temporaria), a la vez que promueve la hiperactividad de los linfocitos B (Figura 5.6).

También es relevante en la respuesta innata la actividad del eje NKT / macrófagos CD1d⁺ mediada por IL-13, ya que dependiendo del mismo es posible promover al cabo de una infección viral aguda que deje meramente vestigios virales (por ejemplo, genomas sólo detectables por PCR) una enfermedad crónica inflamatoria como la enfermedad obstructiva crónica pulmonar o el asma (Figura 5.7). Este nuevo mecanismo patogénico (que se opone al dogma que sostenía la asociación con una respuesta adaptativa alterada) podría explicar la asociación entre infecciones producidas por RSV o HMPV con el asma, aunque aún debe definirse si para ello se requiere la persistencia viral en CD, macrófagos u otras estirpes celulares.

En la Tabla 5.2 se muestran las principales asociaciones entre virus e infecciones agudas de la orofaringe y el tracto respiratorio alto y bajo en pacientes pediátricos.

Tenga en cuenta el lector que la replicación viral en la orofaringe puede ser una puerta de entrada para virus que replican subsiguientemente en el tracto respiratorio como entérico.

Algunos virus pueden infectar directamente las células del epitelio faucial o células subyacentes, produciéndose como consecuencia de ello, anginas generalmente eritematosas, contribuyendo en aproximadamente un 80% al total de casos.

En los pacientes pediátricos es muy frecuente la infección amigdalina con adenovirus (Tabla 5.2). Si se considerase en cambio la prevalencia global de los diversos virus asociados a faringitis, irrespectivamente de la edad del individuo, debería mencionarse en orden decreciente la contribución de rinovirus, coronavirus, herpes simplex (tipos 1 y 2), parainfluenza, influenza (tipos A y B), Coxsackie A (tipos 2, 4-6, 8 y 10), virus Epstein-Barr, citomegalovirus humano y HIV.

En el caso de la infección primaria por EBV se ha postulado que el mismo puede unirse a linfocitos B en reposo de la orofaringe para iniciar una infección latente, y mediante transferencia viral – desde dicha población y aún sin replicar inicialmente en ella –, puede infectar productivamente células epiteliales faríngeas en donde la infección se circunscribe (no se observa habitualmente replicación en el tracto digestivo de individuos inmunocompetentes).

2.3 OROFARINGE Y TRACTO ENTÉRICO

Esta puerta de entrada es la segunda en orden de frecuencia como medio de diseminación de infecciones virales, sólo aventajada por la vía respiratoria. Las glándulas salivales constituyen la principal fuente de IgA secretoria presente en el tracto respiratorio superior y en el tracto entérico, lo cual confiere protección frente a múltiples infecciones virales que ingresan por dichas vías.

La hipotética participación de las amígdalas en el ingreso del HIV al organismo está sustentada en un limitado número de estudios *in vitro* y de primates inoculados por vía oral con SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*). La expresión del receptor para complemento 2 (CR2), de FCγRIII, y del correceptor CXCR4, (así como de CCR5) por células epiteliales o por los linfocitos T CD4⁺ y CDs de las amígdalas, junto a una disminución de los mediadores de la respuesta innata (como una proteasa antiviral secretada por leucocitos), favorece la potencial interacción entre HIV y las amígdalas. Si bien todos estos elementos participan en la patogénesis de la infección por HIV, su contribución a la transmisión oral de este virus es aún debatida, teniendo en cuenta la baja eficacia de esta vía (1: 2 500) respecto a la homosexual (1: 200) o heterosexual (1:1 000).

La susceptibilidad a la infección por HIV en la cavidad oral está influida por diversos factores: a) las propiedades físicas de las células de la mucosa (no se ha definido si los queratinocitos –dado que expresan receptores para el virus– presentan al HIV a células profesionales presentadoras de antígenos, o si las células de Langerhans –CD inmaduras– muestrean y procesan al virus directamente); b) el tiempo de exposición al virus antes de la deglución; c) la accesibilidad a las células blanco; y d) la infectividad de la "forma de presentación" del HIV (libre de células, o en macrófagos u otras células en saliva, leche materna o semen). Si bien los

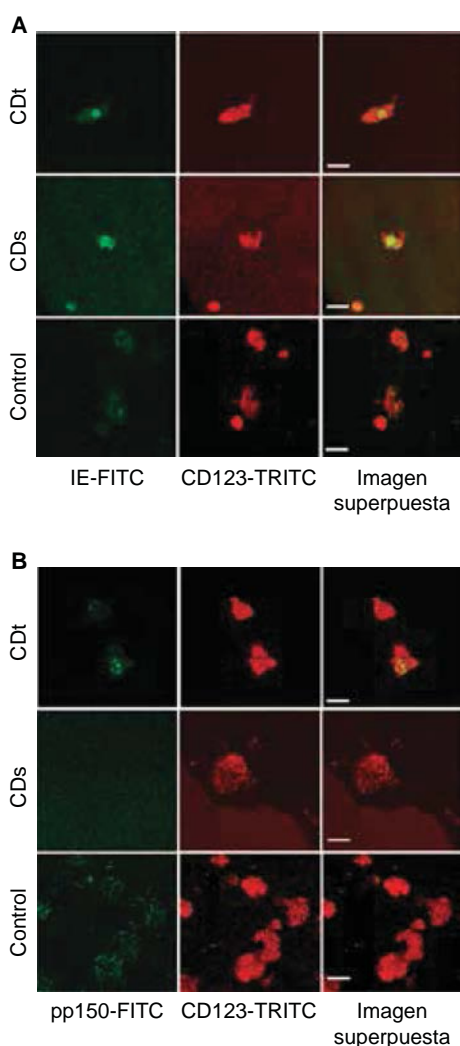


Figura 5.6. Expresión de proteínas del citomegalovirus humano (HCMV) en células dendríticas plasmocitoides periféricas sanguíneas (CDs) y tisulares (CDt). Análisis por inmunofluorescencia (con dos colores) utilizando microscopía confocal. La expresión de la proteína inmediato-temprana -IE- (A: a las 24 hs. post-infección [p.i.]) y de la proteína tardía pp150 del HCMV (B: al 5to. día p.i.) es revelada con anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) con un color verde manzana. La expresión de CD123 (marcador de las células plasmocitoides) en amígdalas y sangre, es revelada con anticuerpos conjugados con isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC) con color rojizo. La superposición de imágenes revela la infección de las células dendríticas plasmocitoides con HCMV (color amarillo). La barra representa 20 μ m. De: Schneider K *et al.* *Human Cytomegalovirus Impairs the Function of Plasmacytoid Dendritic Cells in Lymphoid Organs.* PLoS ONE 3(10): e3482, doi:10.1371/journal.pone.0003482, 2008. Reproducido con autorización.

linfocitos T infectados con HIV son infrecuentemente detectados en la mucosa oral, existen circunstancias en las que los factores de resistencia pueden ser superados, lo cual permite la penetración del HIV desde el exterior o el egreso viral hacia el mismo. Los títulos más altos de virus infeccioso se detectan antes de la aparición del síndrome retroviral agudo, lo que sugiere la existencia de viriones muy pronto luego de la exposición y antes de la seroconversión. Menos del 1% de los individuos que seroconvierten exhiben HIV-1 libre en saliva.

De todas formas, se ha establecido que la exposición oral al HIV promueve la infección y subsiguiente depleción de linfocitos

T de memoria (¡con marcadores fenotípicos de células en reposo!) ubicados en la mucosa del tracto intestinal. Esta vía de ingreso, es de especial significación en la transmisión de la infección neonatal por HIV mediante la lactancia materna y potencialmente en adultos ante el sexo oral. La deglución de virus HIV presente en la boca (diluido en la leche materna, concentrado en el semen), puede promover su captura y transmisión a través de receptores CCR5 en intestino, a pesar del desafío a su infectividad impuesto por la acidez del pH gástrico (4,3 en el lactante). Las células epiteliales del yeyuno expresan los receptores galactosil ceramida y CCR5 pero no CXCR4, lo que sugiere un potencial mecanismo para la transmisión preponderante de cepas "R5" (denominadas macrófago-tropicas) o con tropismo dual (macrófago- y linfotrópicas) del HIV-1 en la infección primaria a través del tracto gastrointestinal superior. Luego del pasaje del HIV a través del epitelio mediante endocitosis dependiente de microtúbulos, el virus es transportado por transcitosis a las CD mieloides. Éstas entran en contacto con el virus mediante el receptor DC-SIGN (una lectina tipo C), lo que permite el ingreso viral a vesículas endocíticas. Las CD (que no necesitan estar infectadas, aunque son permisivas) entran en contacto con linfocitos T CD4⁺ (sinapsis inmunológica) y "regurgitan" el virus hacia estos últimos. El contacto del HIV con macrófagos y linfocitos T CD4⁺ CCR5⁺ y/o CXCR4⁺ promueve la fusión, ingreso y replicación viral. A partir de esta instancia, HIV está en condiciones de iniciar la infección sistémica.

Recientemente se ha establecido que existe una asociación etiológica **entre ciertos tumores de cabeza y cuello (originados en las amígdalas) y la infección persistente por HPV**. El tipo 16 –habitualmente asociado al carcinoma de cuello uterino– está implicado en la génesis de aproximadamente un 25% de los carcinomas de células escamosas de amígdala.

Diversos factores influyen en la probabilidad de infección viral del intestino: el ya mencionado pasaje a través del pH ácido gástrico, la existencia de ácidos biliares, el tránsito intestinal, y la presencia de moco y enzimas proteolíticas. Si un virus determinado no es resistente al pH ácido y a la acción solubilizadora de las sales biliares sobre su envoltura lipídica, difícilmente podrá causar infección a través de esta puerta de entrada. De allí que los virus envueltos no penetran al organismo por esta vía habitualmente. Además de la mencionada infección del lactante con HIV, otra excepción la constituyen algunos miembros de la familia *Coronaviridae*, tales como los torovirus, causantes de gastroenteritis y enterocolitis necrotizantes en el neonato.

El movimiento intestinal opera como mecanismo de barrido. Una película de moco recubre la superficie de las células epiteliales y quita probabilidades a una firme adhesión de los virus con los receptores celulares específicos para iniciar la infección. Además, dicho moco contiene anticuerpos de clase IgA secretoria, los que al igual que en el tracto respiratorio, desempeñan un papel relevante en la neutralización ó agregación local de los virus. Ello implica una importante barrera en la cadena epidemiológica de transmisión viral. Este fenómeno es aprovechado en eventos de inmunización, tal como se observa en vacunados contra la poliomielitis con la vacuna atenuada Sabin.

A diferencia de los virus respiratorios, los virus entéricos raramente producen enfermedad como consecuencia de su multiplicación en las células del tracto digestivo. De allí que no es frecuente la asociación de infecciones virales de este tracto con diarrea o vómitos o dolor abdominal. Sin embargo, **entre aquellos virus productores de sintomatología local merece destacarse la gastroenteritis producida por rotavirus (principalmente en menores de dos años), o por los virus Norwalk o sapovirus (miembros respectivos de los géneros *Norovirus* y *Sapovirus* de la familia *Caliciviridae*), los adenovirus entéricos, y los astrovirus**. Las infecciones por reovirus, se asocian habitualmente a manifestaciones gastrointestinales leves.

Los rotavirus merecen una mención especial, dado que en años recientes se ha establecido que no sólo causan gastroenteritis a través de la síntesis y liberación extracelular de la enterotoxina NSP4,

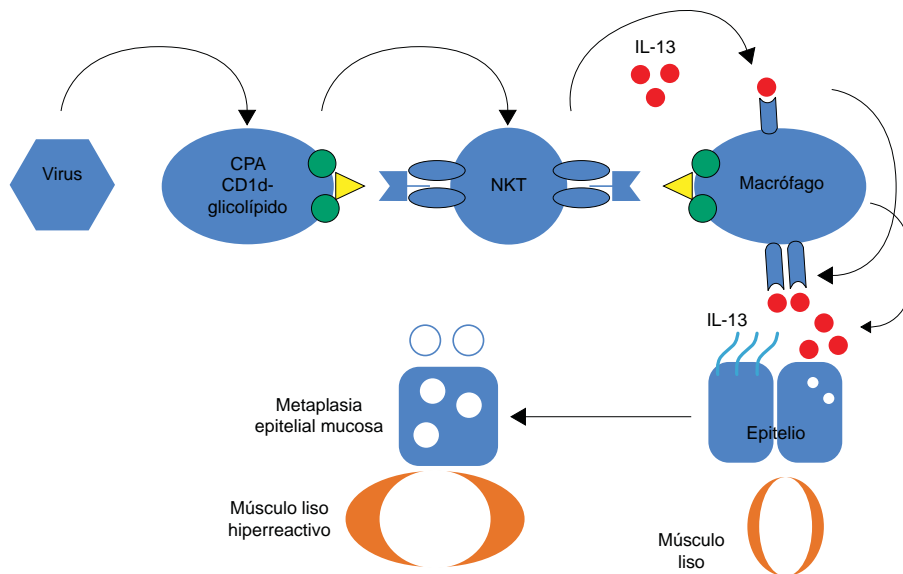


Figura 5.7. Circuito NKT - IL-13 - Macrófago en la génesis de la enfermedad obstructiva crónica y el asma. Véase el texto. Adaptada de Kim EY et al. Nat Med 14:633-40, 2008.

sino que están asociados en aproximadamente un 65% de los casos a viremia, y son capaces de infectar diversos órganos, tales como pulmones, hígado, SNC, estómago, páncreas, testículos, etc., por lo cual no deben ser considerados meramente agentes de infecciones localizadas en el tracto gastrointestinal (como se los consideró hasta muy recientemente), sino también sistémicas (Figura 5.2), aunque aún no se ha definido su patogenia. Estudios en animales infectados experimentalmente, demostraron que los rotavirus causan lesiones en pulmones e hígado, pudiendo replicar en macrófagos.

Como contrapartida, los órganos blanco habituales de la mayoría de los virus que penetran por vía enteral se encuentran a distancia: el S.N.C., el corazón o la piel para los enterovirus, el hígado para ciertos virus productores de hepatitis (A y E), etc.

Cabe destacar que mientras los rotavirus replican activamente en las células M del epitelio gastrointestinal -provocando la lisis de las mismas-, los reovirus ingresan a las capas basales del epitelio por transcitosis a través de estas mismas células, donde pueden infectar a partir de su polo basal otras células epiteliales intestinales o bien CDs y macrófagos. Por el mecanismo de transcitosis los virus endocitados transitan desde la superficie apical a la basolateral dentro de vesículas, para luego ser excitados sin que se produzca infección de la célula en cuestión.

La mucosa rectal puede ser también blanco de la infección por diversos virus en hombres que mantienen por vía anal relaciones homosexuales receptivas sin protección. Dado que el epitelio es cilíndrico (no estratificado como el vaginal), se favorece el contacto con las CDs DC-SIGN positivas lo cual explica (al menos parcialmente) por qué es más eficiente la transmisión por esta vía que a través de la vagina (Figura 5.8). Se estima que los microtraumatismos que ocurren en este tipo de relaciones, favorece el ingreso viral. Entre los agentes asociados a esta vía de transmisión, se encuentran HIV, HBV, HCMV, virus herpes humano-8 (HHV-8) –agente etiológico del sarcoma de Kaposi–, y HCV en pacientes homosexuales coinfectados con HIV.

2.4 APARATO GÉNITO-URINARIO

La infección viral del árbol urinario no es frecuente. Si bien muchos virus pueden replicar *in vitro* en cultivos celulares de riñón humano, son pocos los que se asocian a infecciones del árbol urinario *in vivo*, donde el flujo de orina sirve como mecanismo de barrido.

Hasta el presente sólo se han asociado los adenovirus con serotipo 11 y 21 a cistitis hemorrágica en niños y en pacientes inmunocomprometidos. En la infección por HBV los complejos inmunes constituidos por antígenos HBs y HBe y sus respectivos anticuerpos desempeñan un papel patogénico en las nefritis observadas en algunos pacientes. Sin embargo, el depósito de inmunocomplejos es de corta duración y la glomerulonefritis no es frecuente. También se observan glomerulonefritis membranosas asociadas a la infección por HCV.

La superficie del tracto genital está más expuesta a las infecciones. El contacto de mucosas durante las relaciones sexuales y el pasaje del producto de la concepción a través del canal de parto constituyen la fuente de infección para los miembros de una pareja o para el recién nacido, respectivamente. Como se observa en la figura 5.9, en la vagina existe un epitelio estratificado en el que se localizan las células de Langerhans, y debajo del cual subyacen tejidos estromales densamente poblados con otras células dendríticas (DC-SIGN positivas), monocitos/macrófagos y linfocitos T que expresan CD4 y los correceptores para HIV CXCR4 y/o CCR5. La susceptibilidad a las infecciones diversas no sólo está influida por la respuesta adaptativa (presencia de IgA secretoria con actividad neutralizante y linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ citotóxicos), sino también por componentes de la respuesta innata, en la que sobresalen mediadores polipeptídicos anfipáticos catiónicos, como las moléculas SLP-1, lisozima, lactoferrina y α y β defensinas. **SLP-1**, una molécula con propiedades anti-inflamatorias cuya concentración en vagina alcanza 1-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y que está incrementada 100 veces en el tapón mucoso del cuello uterino, posee una actividad protectora anti-HIV, como lo demuestra la menor tasa de transmisión vertical en aquellas madres que exhiben concentraciones elevadas. Aunque la concentración de **lisozima** (muropeptidasa) es baja en la vagina (~13 $\mu\text{g}/\text{ml}$), está significativamente aumentada en el tapón mucoso; cuando la misma está disminuida en el trabajo de pretérmino, ocurren eventos de corioamnionitis, que facilitan la infección del producto de la concepción. Dominios específicos de la lisozima, tienen actividad anti-HIV, la que a nivel del tapón mucoso sería efectiva *in vivo*. Otro polipéptido con actividad antiviral (directa o indirectamente demostrada contra herpes simplex, HCMV y HIV) es la **lactoferrina**, la que inhibe la fusión y subsiguiente ingreso del HIV a las células, al unirse al V3 loop de la glicoproteína de envoltura gp120. La lactoferrina está presente a una baja concentración en la vagina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), pero está signifi-

	Adenovirus	Coronavirus 229E y C43	Enterovirus	Influenza	Metapneumovirus humano	Para-influenza	RSV	Rhinovirus
Resfrío común	+	++	++	++	+/-	+	+	+++
Amigdalitis	+++	-	++	+	+/-	+	+	-
Laringitis	+	-	+	++	+/-	+++	+	+
Bronquitis	+	+	+	+++	+++	++	+++	+
Bronquiolitis	+	+	+	++	+++	++	+++	++
Neumonía	+	+	+	+++	+++	++	+++	++

Tabla 5.2. Virus asociados a infecciones respiratorias agudas altas y bajas en pacientes pediátricos. Recientemente se han descubierto dos nuevos coronavirus humanos denominados NL63 y HKU1, que infectan el aparato respiratorio. Su patogenicidad –al igual que la de los bocavirus y la de los poliomavirus Wu o KI– debe ser aún establecida.

tivamente concentrada en el tapón vaginal (100 µg/g). Las **α defensas** tienen efectos inhibitorios sobre herpes simplex y HIV; frente a este último, inhiben la fusión viral a la membrana citoplasmática (exhibe similitud con la estructura de la glicoproteína de envoltura viral gp41) y a nivel intracelular mediante inhibición de la PKC. Si bien las β defensas de la mucosa oral (HBD2 y HBD3) inhiben al HIV, se desconoce si las mismas son inducidas en la vagina como resultado de la infección por dicho virus.

Aunque los mecanismos que llevan a viajar a través de la mucosa vaginal a los diversos virus no están totalmente definidos, parecería involucrar a las células del epitelio. En el caso del HIV, las células epiteliales y las de Langerhans (éstas mediante endocitosis a través de múltiples receptores) son las primeras en encontrarse con el virus. Una vez que éste alcanza la lámina propia, puede directamente infectar macrófagos o linfocitos T (mediante la fusión con el receptor específico) o adherirse a otras **CDs (DC-SIGN positivas)**, que luego migran hacia los ganglios regionales, donde transferirán las partículas virales a los linfocitos T CD4⁺ en los que el virus replica vigorosamente (Figura 5.10). **La infección de éstos puede ocurrir mediante trans-infección o cis-infección de las CDs (Figura 5.11). La trans-infección de éstas puede acaecer por 2 vías:** a) el transporte viral a través de la **vía endocítica y posterior "regurgitación" en exosomas**; o b) la **sinapsis infecciosa**, por contacto entre la CD (con participación de DC-SIGN) y el linfocito T CD4⁺. La infección "genuina" de las CDs puede ocurrir subsiguientemente, luego de la interacción con los LT CD4⁺, así como también es posible la misma luego de ocurrir la interacción entre una significativa cuantía de partículas del HIV con DC-SIGN, para ser luego sean transferidas a los verdaderos receptores del HIV en las CDs e iniciar su infección productiva (**cis-infección de las CDs**). Existen evidencias que indican que esta última es relevante para la infección a largo plazo de los **linfocitos T CD4⁺**, habiéndose documentado que este mecanismo sería aún más crítico que la trans-infección en el contexto general de la infección.

La infección de las células de Langerhans tiene efectos opuestos según estén o no activadas: en el primer caso contribuyen a la diseminación viral, ya que permiten la replicación y transfieren la progenie a los linfocitos T en el ganglio. En contraposición, las células de Langerhans inmaduras eliminan la infección a través de la langerina, otro receptor lectina tipo C, que permite la internalización viral y promueve su degradación intracelular. Es posible que una fracción de HIV escape a esta barrera antiviral, y pueda continuar el ciclo mediante la *trans* infección de los linfocitos T CD4⁺ de memoria (con la subpoblación viral R5) o en etapas más avanzadas de la infección los CD4⁺ *naïve* (con la subpoblación X4). **La coinfección con otros agentes de transmisión sexual, impide la protección conferida por las células de Langerhans contra el HIV, al activarlas.**

La presencia de moléculas de heparán sulfatos en la superficie epitelial permite la adsorción de múltiples virus, tales como herpes simplex, HPV, HCMV, y ciertas cepas del HIV. Dichas moléculas sirven como receptores iniciales de baja afinidad, que permiten la

subsiguiente interacción con otros receptores de mayor afinidad, algunos de los cuales han sido definidos para virus individuales. De hecho, entre los virus transmitidos por vía genital se encuentran los herpes simplex tipo 2 –y con menor frecuencia el 1–, los papilomavirus humanos (especialmente los genotipos 6 y 11 [de bajo riesgo, asociados a verrugas ano-genitales benignas] y 16, 18, 31 y 33 [entre los aproximadamente 15 de alto riesgo, asociados al carcinoma genital]), HCMV, y los virus causantes del SIDA (HIV-1 y 2). Aproximadamente, ocurren 300 000 000 nuevas infecciones de transmisión sexual al año. Dichas infecciones (ulcerativas y no ulcerativas) incrementan entre 3 y 5 veces el riesgo de infección por HIV, siendo este último 8 veces superior en pacientes sífilíticos o en quienes padecen la infección genital herpética.

La infección por **HPV afecta a más del 50% de la población femenina sexualmente activa**, lo que la ubica como la infección de transmisión sexual más prevalente del mundo; aunque la mayoría de las mujeres elimina la infección al cabo de dos a cinco años, aproximadamente un 10% desarrolla una infección persistente que puede asociarse a diversos desenlaces dependiendo del genotipo, la carga y las variantes virales, y de cofactores del hospedero (susceptibilidad y respuesta inmune) y sus hábitos conductuales (tabaquismo, anticonceptivos hormonales, etc.). El HPV interacciona inicialmente con proteoglicanos de heparán sulfato (lo que promueve un cambio conformacional de la cápside) y quizás transitoriamente con la laminina 5 u otra(s) molécula(s) presente(s) en la matriz extracelular, para subsiguientemente ingresar a las células. La replicación del HPV es un paradigma de evasión a la respuesta inmune innata, dado que aquélla no se asocia a inflamación.

Se ha documentado la presencia de diversos virus en semen y fluidos vaginales. Merecen destacarse entre los primeros HIV, HBV, HCMV, EBV, virus herpes humano-6 (HHV-6), virus herpes simplex, HTLV-1, y un agente aparentemente apatógeno para el humano –pero que parecería influir favorablemente sobre el curso de la infección con HIV– denominado GBV-C (inicialmente también designado virus hepatitis G); asimismo, se han aislado HIV, HBV, HCMV, herpes simplex-1 y virus rubéola de las secreciones cervicales. La infectividad viral en estos fluidos está influenciada por componentes de estos últimos: así por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de fibrillas de amiloide en el semen (SEVI: *Semen derived Enhancement of Viral Infection*) derivadas de la fosfatasa ácida prostática incrementa 4 a 5 órdenes de magnitud la adhesión/infectividad del HIV al funcionar como un puente policatiónico que neutraliza la repulsión de cargas negativas entre la membrana viral y la citoplasmática del epitelio y CDs, favoreciendo la adherencia viral. Dado que en promedio hay presentes unas 11 000 copias de RNA del HIV/ml de semen en individuos infectados, una eyaculación de 4 ml implica el depósito en la mucosa vaginal de una cuantía inferior a la del umbral necesario para producir la infección (lo cual contribuye a la inferior tasa de transmisión antes mencionada del HIV por vía sexual, respecto a otros virus como HBV). De allí que la participación de SEVI, sea crítica para incrementar la infectividad del inóculo. En contraposición, también se ha postulado la existencia

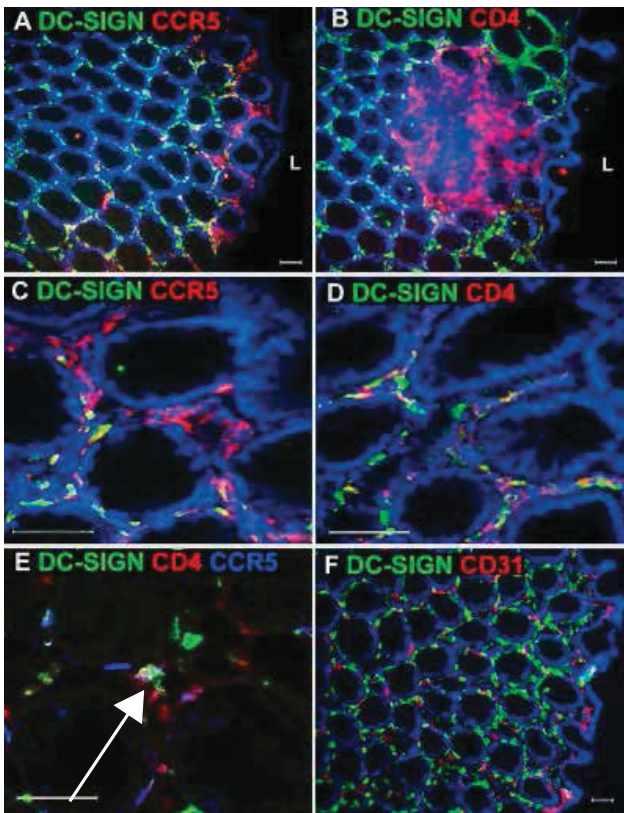


Figura 5.8. Microscopía confocal de la mucosa rectal humana conteniendo células que expresan DC-SIGN, CCR5 y CD4. DC-SIGN se observa en color verde (paneles A-F), CCR5 en rojo (A y C) o azul (E). CD4 en rojo (B, D y E) y el marcador de células endoteliales CD31 en rojo (F). Los núcleos se visualizan en color azul. La flecha indica una célula (en blanco) que exhibe triple marcación para DC-SIGN, CCR5 y CD4. La letra "L" muestra la luz. De: Jameson B. *et al. J Virol.* 76: 1866–78, 2002. Reproducido con autorización.

de una molécula inhibitoria de dicho virus en el plasma seminal, que contendría carbohidratos (posiblemente una cadena larga de residuos de N-manosa) e impediría la unión del HIV a DC-SIGN.

La presencia del HIV y del HBV en el canal de parto constituye una fuente importante de contagio en recién nacidos en países con alta prevalencia de individuos crónicamente infectados.

2.5 VÍA CONJUNTIVAL

La secreción lacrimal y el constante parpadeo mantienen la conjuntiva húmeda y limpia. Nuevamente aquí, para evitar ser arrastrados por el mecanismo mencionado, los virus deben adherirse firmemente a sus receptores. Si bien ésta no es una vía habitual de penetración viral, puede ocurrir en caso de lesión de la conjuntiva.

A modo de ejemplo, un oftalmólogo puede ser el involuntario transmisor de un ojo al otro de adenovirus tipo 8, al intentar una extracción de un cuerpo extraño a través del simple contacto con las manos contaminadas. Otros virus pueden producir una conjuntivitis luego de haber replicado en otro órgano de la economía: tal es el caso de la conjuntivitis sarampionosa o la observada con ciertos adenovirus. En contraste con ellos, el enterovirus 70 produce una conjuntivitis hemorrágica luego de un período de incubación de sólo 24 horas, ya que la conjuntiva en sí misma es el sitio inicial de la infección. También variantes de Coxsackie A24 han sido asociadas a brotes de conjuntivitis hemorrágicas acaecidos en África y Brasil.

El espectro de compromiso ocular asociado a virus herpes simplex 1 y 2 incluye las conjuntivitis, las queratitis, cataratas e iri-

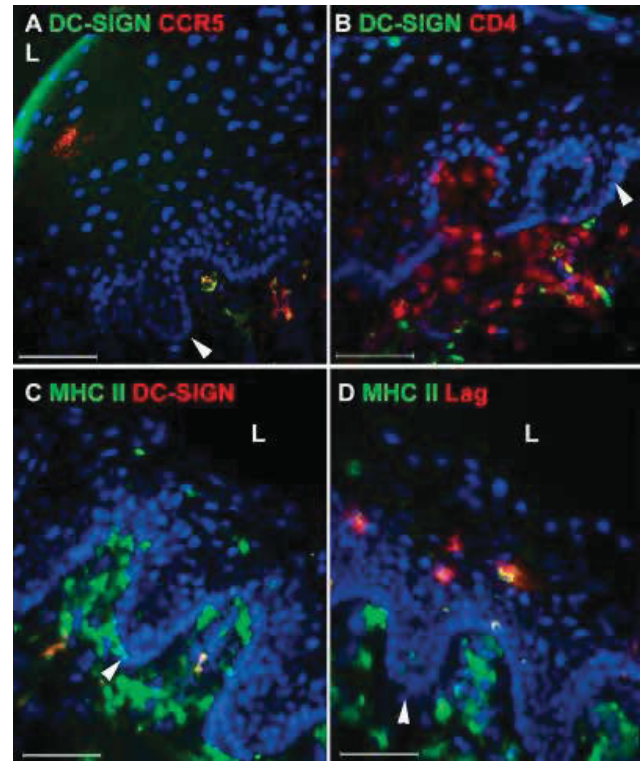


Figura 5.9. Microscopía confocal de la mucosa vaginal humana para detectar células que expresen DC-SIGN, CCR5 y CD4. Las células de Langerhans no expresan DC-SIGN. Cortes de tejidos congelados de vagina fueron teñidos con anticuerpos para DC-SIGN marcados ya sea en color verde (paneles A-B) o rojo (C-D), en combinación con anticuerpos para CCR5 en rojo (A), CD4 en rojo (B) o CMH-II en verde (C-D) y para los gránulos de Birbeck de células de Langerhans en rojo (D). Los núcleos se visualizan en color azul. La cabeza de flecha blanca indica la base del epitelio vaginal. La letra "L" muestra la luz. 40x. De: Jameson B. *et al. J Virol.* 76: 1866–78, 2002. Reproducido con autorización.



dociclitis. La infección por estos virus promueve un desequilibrio entre eventos angiogénicos y anti-angiogénicos, lo que gatilla la vascularización corneal. Las **trombospondinas** 1 y 2 y proteínas de la matriz celular (potentes agentes anti-angiogénicos) están directamente **implicadas en la génesis de las queratitis** (véase el ítem 6.4: Mecanismos indirectos de lesión).

3. VÍAS DE DISEMINACIÓN EN EL ORGANISMO

Las vías de diseminación pueden corresponder a uno de los siguientes cinco grupos: 1) diseminación local sobre las superficies epiteliales; 2) invasión subepitelial y diseminación linfática; 3) diseminación sanguínea (viremia) e invasión tisular; 4) diseminación a través del líquido cefalorraquídeo y nervios; 5) diseminación pleural y a través de la cavidad peritoneal.

3.1 DISEMINACIÓN SOBRE SUPERFICIES EPITELIALES

La diseminación viral en las superficies epiteliales es claramente diferente si están cubiertas por una capa de líquido, tal como ocurre en el tracto respiratorio o digestivo o si esa cubierta no existe, tal como se observa en la piel.

En el primer caso, la diseminación viral desde el foco inicial de infección hacia células distantes se ve facilitada, mientras que en el segundo, la diseminación se efectúa por contigüidad. Ello se traduce, por ejemplo, en el diferente período de incubación de ambos: a) pocos días en el caso de las infecciones respiratorias causadas por influenza, parainfluenza, adenovirus, rinovirus, RSV, HMPV, etc.,

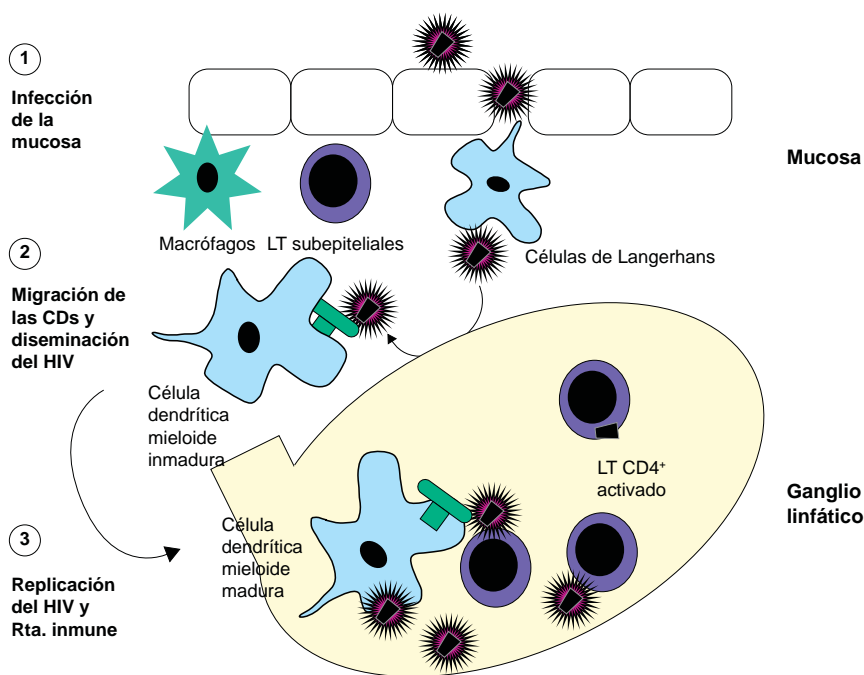


Figura 5.10. Rol de las CDs en la infección por HIV y su posterior diseminación. Las CDs (que incluyen a las células de Langerhans en los epitelios y en las mucosas, y a las mieloides inmaduras en la submucosa) constituyen una de las primeras células en enfrentar al virus. Las CDs mieloides inmaduras migran hacia los ganglios linfáticos donde pueden madurar como resultado de la infección viral o de citoquinas secretadas. Las CDs presentan los antígenos virales a los LT CD4⁺ e inician su participación en la respuesta inmune adaptativa. Las partículas virales asociadas a las CDs pueden quedar protegidas de la degradación intracelular durante la migración hacia el ganglio linfático y durante su estadía aquí. Algunas subpoblaciones de CDs pueden infectarse. La infección de los LT CD4⁺ acontece mediante eventos de trans-infección o cis-infección de las CDs (véase la figura 5.11).



o las intestinales producidas –por ejemplo– por rotavirus; o por el contrario, b) un período de incubación mucho más prolongado para producir las lesiones verrucosas por HPV. Las bases patogénicas que intervienen en la localización viral exclusivamente circunscrita a un epitelio determinado no se conocen totalmente. Entre los factores que intervienen, deben señalarse la termosensibilidad de algunos virus a 37° C (como ocurre con los rinovirus, aunque recientemente se demostró que pueden infectar el árbol respiratorio bajo -Figura 5.12-), la liberación unidireccional de viriones hacia la superficie externa de las células epiteliales polarizadas y la maduración viral producida recién cuando las células de la capa basal se aproximan a la superficie, lo cual limita la diseminación a tejidos subyacentes, tal como se observa con los papilomavirus.

3.2 INVASIÓN SUBEPITELIAL Y DISEMINACIÓN LINFÁTICA

Al atravesar un epitelio y su membrana basal, un determinado virus queda expuesto a células fagocíticas (histiocitos) y al sistema linfático. La entrada de un virus a un histiocito puede dar lugar a su destrucción por disminución del pH y por las enzimas liberadas al fagosoma al producirse la fusión lisosomal. Sin embargo, ciertos virus pueden replicar en macrófagos, como se describirá más adelante.

La red de capilares linfáticos que bañan las superficies epiteliales, transporta las partículas virales hacia los ganglios regionales donde son procesadas por los macrófagos / CDs residentes en los senos marginales. El desenlace de dicha interacción es variable: 1) puede inactivarse el virus, en cuyo caso los antígenos son presentados a los linfocitos colindantes y, respuesta inmune mediante, la infección no progresa; o 2) el virus no es inactivado y entonces se produce la infección de macrófagos y linfocitos. Este último patrón de infección se observa entre los adenovirus, el virus del sarampión, y algunos miembros del grupo de herpesvirus. En estos casos, el ganglio linfático no se comporta como una barrera de contención

de la infección, sino como un trampolín de privilegio para la diseminación de la misma.

Teniendo en cuenta la circulación de los monocitos y linfocitos a través del organismo, es fácilmente comprensible que si dichas células son infectadas sin ser dañadas, pueden transportar viriones a sitios distantes del cuerpo, a la manera de un inocente caballo de Troya. En el caso particular del HIV, el virus puede unirse a las moléculas DC-SIGN que se encuentran en la superficie de las CDs presentes en las mucosas y ser transportados en compartimientos no lisosomales –sin que medie infección celular– desde la puerta de entrada a los ganglios linfáticos, donde puede infectar linfocitos T CD4⁺ CCR5⁺, un proceso que –como se mencionó en párrafos anteriores– es denominado **trans-potenciación de la infección o trans-infección** (Figura 5.11). El virus sarampión utiliza también DC-SIGN (aunque no el receptor SLAM) para la trans-infección desde las CDs a los linfocitos T. En modo análogo, los virus Ébola y dengue pueden utilizar mecanismos similares, para infectar las células diana. También el HCV interactúa con DC-SIGN y con L-SIGN (CD209 L).

La evolución de una infección viral desde una superficie corporal (a partir de cualquier epitelio) se ve íntimamente vinculada a la presencia o no de una respuesta inflamatoria local. La misma puede inducir daño tisular o bien circunscribir la infección.

3.3 DISEMINACIÓN SANGUÍNEA E INVASIÓN TISULAR

La entrada de un virus al torrente sanguíneo se conoce como **viremia**. Puede producirse luego de la multiplicación viral en el sitio de infección inicial (tal es el caso de sarampión o polio) o como consecuencia de su introducción directa al ser inoculado por picaduras de artrópodos (como se observa con los arbovirus) o por transmisión iatrogénica (como puede ocurrir por ejemplo con HBV o HCV), o accidentalmente por el uso de agujas contaminadas (por ejemplo, con HIV, HBV o HCV).

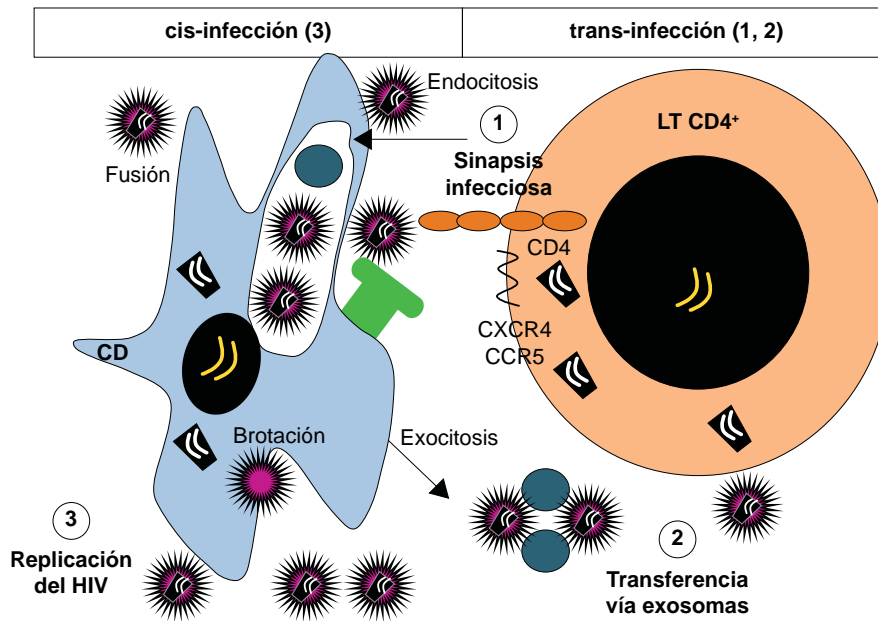


Figura 5.11. Trans-infección y cis-infección de las células dendríticas. La trans-infección puede ocurrir mediante dos vías: 1) la sinapsis infecciosa; y 2) la transferencia de partículas asociadas a exosomas. En la sinapsis infecciosa la CD regurgita las partículas a los LT CD4⁺, interviniendo en el proceso la molécula DC-SIGN. En la exocitosis, las partículas del HIV endocitadas se incorporan a los cuerpos endosómicos multivesiculares, siendo eliminadas en asociación con exosomas. Un cuerpo multivesicular es una organela endocítica que contiene vesículas como resultado de la brotación de membranas endosómicas hacia la luz del compartimento. Las partículas virales exocitadas pueden ingresar a los LT CD4⁺ probablemente mediante la unión y fusión de membranas. Una tercera vía (3) muestra la cis-infección de las CDs. En ella se produce la infección de las mismas (con síntesis *de novo* de partículas), lo cual es crítico para la transmisión del HIV por períodos prolongados.

La primera entrada de un virus a la sangre se conoce como **viremia primaria** (Figura 5.2). Ello acontece luego de la replicación viral en órganos tales como el hígado, el bazo, la médula ósea, el músculo y/o el endotelio vascular. El título de virus circulante en la viremia primaria es habitualmente bajo. En general, éste es un evento que no se traduce clínicamente. La diseminación viral hacia órganos a distancia a través del flujo sanguíneo ocurre en uno o dos minutos. Una vez que el virus alcanza el órgano blanco de replicación se producen nuevos ciclos de multiplicación viral que permiten la reinvasión del torrente sanguíneo: es la **viremia secundaria**. La misma es fácilmente detectable por su mayor cuantía.

Una vez en la sangre, los virus pueden circular libres en el plasma o bien asociados a diferentes células (Tabla 5.3). En este último caso, los virus encuentran cierta protección frente a los mecanismos de defensa del hospedero.

La magnitud y duración de la viremia son el resultado del balance final entre aquellos factores que tienden a la mantención de la multiplicación viral o a su limitación. La posterior localización viral en los órganos blanco depende de la actividad fagocítica del sistema reticuloendotelial y de la capacidad para adherirse y multiplicarse en las células del endotelio vascular.

Entre las fuentes de producción de virus para la mantención de la viremia pueden mencionarse: 1) el endotelio vascular; 2) las células reticulo-endoteliales; 3) las células adyacentes al sistema reticulo-endotelial; 4) las células sanguíneas; y 5) los tejidos desde los cuales los virus son eliminados hacia la circulación por vía linfática.

La eliminación viral de la circulación sanguínea es también dependiente de un número considerable de factores: 1) el tamaño de las partículas virales; 2) factores séricos como anticuerpos y complemento; 3) la carga neta de las partículas; 4) en algunos virus, la inactivación térmica gradual; y 5) la naturaleza de las proteínas de superficie de los virus.

Se ha demostrado que los virus de mayor tamaño se eliminan más rápidamente de la circulación teniendo especial relevancia en

dicho papel las células retículo-endoteliales de Küpffer. La presencia de anticuerpos y complemento contribuye –mediante su opsonización– a la eliminación viral por células del sistema retículo-endotelial, teniendo en cuenta que los macrófagos poseen receptores para Fc y la fracción C3 del complemento. A su vez, los anticuerpos neutralizantes pueden participar en la modificación estructural de los viriones, en su agregación, en el bloqueo de su unión a los receptores, en la liberación de su genoma, etc.

La invasión viral tisular se produce por mecanismos que no se conocen en su totalidad, aunque la patogenia de aquella en el SNC y el hígado es la que mejor ha sido establecida.

3.3.1 Invasión viral al SNC

Puede ocurrir cuando la viremia es de adecuada magnitud y duración. Sin embargo, éstos son requisitos necesarios aunque no siempre suficientes para producirla.

En el SNC las células del endotelio capilar se encuentran firmemente unidas entre sí, con excepción de las ubicadas en el plexo coroideo, donde el epitelio es fenestrado. La infección de ese epitelio o el pasaje pasivo a través de dichas fenestraciones, permite el ingreso viral al líquido cefalorraquídeo. Vehiculado en éste, ciertos virus pueden infectar las células ependimarias, y a partir de allí invadir las células nerviosas subyacentes (tal es el caso de los arbovirus o el virus parotiditis). La localización viral en células capilares meníngeas, también permite la invasión de células neurales a través del pasaje al líquido cefalorraquídeo. Finalmente, algunos virus pueden ingresar al SNC directamente después de localizarse en vasos sanguíneos cerebrales o de la médula espinal o bien desde terminaciones nerviosas periféricas (véase diseminación neural).

Como consecuencia de la invasión al SNC pueden observarse meningitis (por ejemplo, producidas por virus ECHO o Coxsackie), meningoencefalitis (como se observa con parotiditis y virus polio), o encefalitis (producida por invasión directa e independiente del cerebro a través de capilares cerebrales, como se demostró en infecciones por retrovirus o en algunos casos de polio).

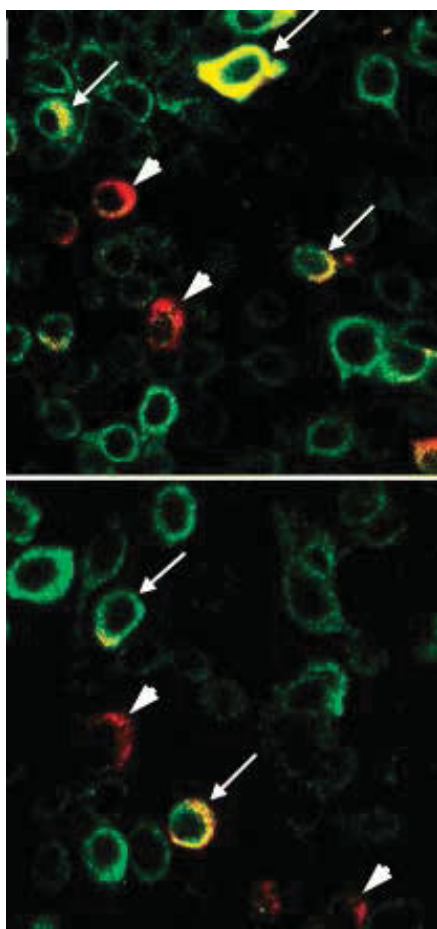


Figura 5.12. Infección de células epiteliales tráqueo-bronquiales humanas por rinovirus. Co-localización de citocqueratina 14 (teñido mediante IFI con isotiocianato de fluoresceína en color verde) y antígeno VP2 de la cápside de rinovirus (teñido con Alexafluor-568 en rojo) en células basales. La expresión de antígenos virales se observa tanto en células que expresan citocqueratina 14 (indicadas con flechas), como en aquellas que carecen de dicho marcador (señaladas con puntas de flechas). El color amarillo resulta de la co-localización de la citocqueratina 14 y el antígeno VP2. De: Jakiela B, *et al. Am J Respir Cell Mol Biol.* 38: 517-23, 2008. Reproducido con autorización.

Las células endoteliales participan en la patogenia de la infección del SNC ya sea a través del pasaje pasivo trans-endotelial de leucocitos y monocitos que transportan virus (como se observa en las infecciones producidas por sarampión, parotiditis, togavirus y lentivirus) o bien como sitio activo de la replicación viral (según se demostró en infecciones por enterovirus, togavirus y bunyavirus).

3.3.2 Invasión viral hepática

La patogenia de la invasión hepática está íntimamente vinculada a la interacción entre el virus infectante y las células macrofágicas sinusoidales (células de Kúpffer). Así, pueden observarse cuatro situaciones disímiles: 1) las células de Kúpffer no captan los virus; 2) los macrófagos captan los virus y producen su inactivación; 3) los macrófagos captan los virus y los transfieren a hepatocitos; y 4) los virus replican en células macrofágicas y / o endoteliales. La falta de captación viral por parte de los macrófagos hepáticos favorece la viremia persistente. Sin embargo, la mayoría de los virus que producen viremia son inactivados por dichas células. En algunos casos, se produce la transferencia viral pasiva hacia los hepatocitos. Si éstos no son permisivos para un virus dado, éste no replicará aunque podrá ser eliminado por el conducto biliar (tal como se

observa en la infección experimental intravenosa de primates con virus polio). La presencia de receptores celulares para virus en los hepatocitos permite también la entrada de virus que se multiplican en ellos, induciendo el desarrollo de hepatitis (hepatitis A, B, C y E, fiebre amarilla, HCMV, EBV, etc.). Algunos virus serán entonces liberados al conducto biliar (por ej. hepatitis A y hepatitis E) o bien transportados nuevamente al torrente sanguíneo (hepatitis B y hepatitis C). Finalmente, algunos virus pueden replicar en macrófagos hepáticos y a partir de allí invadir el torrente sanguíneo o bien infectar hepatocitos (fiebre amarilla). Véase el capítulo 24.1 para analizar la modulación inmunológica de las infecciones por virus hepatotrópicos primarios.

3.3.3 Diseminación virémica a otros órganos o tejidos

La diseminación virémica a órganos y tejidos (Figura 5.2) puede ocurrir además a sitios tan disímiles como las glándulas salivales, mamarias, la pituitaria o la tiroides, timo, páncreas, testículos, riñones, suprarrenales, tracto respiratorio, músculos, articulaciones o piel. A su vez, algunos virus pueden atravesar la barrera placentaria y causar infecciones en el producto de la concepción. La patogenia de las infecciones virales en dichos compartimentos se describirá individualmente en capítulos posteriores. A continuación, sólo se mencionarán algunos comentarios de ejemplos ilustrativos.

La presencia de virus en las glándulas salivales puede o no ir acompañada de cambios inflamatorios, como se observa en la infección por virus parotiditis o HCMV, respectivamente. La replicación de este último también en tejido glandular mamario explica su excreción a través de la leche materna.

Entre los virus que se han visto asociados a pancreatitis se pueden mencionar: Coxsackie B, rubéola y parotiditis. La infección de las células beta conduce ocasionalmente a hiperglucemias en el hombre. Sin embargo, su frecuencia real se desconoce. El páncreas puede también participar en la infección persistente por HBV.

La invasión renal habitualmente involucra infección de las células epiteliales tubulares. Los virus que replican en esas células pueden ser a su vez excretados por orina. Este hecho puede ser aprovechado para su diagnóstico mediante técnicas para detección de antígenos o ácidos nucleicos. Entre los virus que se excretan por orina debe mencionarse los virus BK, HCMV, sarampión y Junín. Sin embargo, el compromiso renal en las infecciones virales no está habitualmente asociado a la infección directa de células, sino al depósito de complejos inmunes en los glomérulos. Dicha situación se ha descrito en la hepatitis B, la hepatitis C y la rubéola, entre otras.

La participación del árbol respiratorio como resultado de la diseminación virémica se observa frecuentemente en el curso de algunas infecciones generalizadas como las producidas por viruela (ya erradicada), sarampión, HCMV, varicela-zóster en inmunocomprometidos, rubéola, etc.

Los cuadros anatomopatológicos pueden corresponder a neumonitis intersticiales, neumonías o bronquitis.

Las orquitis virales se asocian frecuentemente al virus parotiditis, aunque también se ha observado en relación a infecciones por Coxsackie B.

Las miositis virales en el hombre son generalmente causadas por togavirus, Coxsackie B y virus influenza. A su vez, se ha demostrado la participación de Coxsackie B, influenza y erythrovirus (parvovirus) humano B19 en pacientes con daño miocárdico.

El compromiso articular en las infecciones virales puede deberse a la presencia de virus infeccioso (como se observa en el curso de la infección rubeólica) o al depósito de inmunocomplejos (como por ejemplo el que se produce en el curso de la infección con HBV). El erythrovirus B19 es el agente causal de brotes de eritema infeccioso (5ta. enfermedad) acompañados de artritis y crisis anémicas aplásicas. En la rubéola, así como en la infección por el parvovirus B19, o por ciertos alfavirus, la artritis es una manifestación característica. La artritis no es inusual luego de las infecciones por HIV, HCV, HCMV y EBV.

En ciertas infecciones virales, la aparición de exantemas en la piel puede atribuirse al depósito de inmunocomplejos, aunque tam-

Libres en plasma	Asociados a células			
	Eritrocitos	Linfocitos	Monocitos	Plaquetas*
Enterovirus	Virus de la fiebre por garrapatas de Colorado	HCMV	Viruela	LCM
Togavirus		Epstein-Barr	HIV	Dengue
HBV		HHV-6	HCV	
HCV		HHV-7		
HIV		HHV-8		
		Rubéola		
		Parotiditis		
		HBV		
		HCV		
		HIV		
	HTLV			
	LCM			
	GBV-C			

Tabla 5.3. Transporte de virus en sangre: algunos ejemplos. HBV: virus hepatitis B; HCV: virus hepatitis C; HHV: virus herpes humano (tipos 6, 7 ú 8); HTLV: virus de la Leucemia T humana; LCM: virus de la coriomeningitis linfocitaria; GBV-C: virus GB (iniciales de un cirujano cuyo suero estaba infectado por este virus) tipo C. *HIV, HCV y la cepa patógena XJ de virus Junín infectan megacariocitos, lo cual se puede asociar a eventos de trombocitopenia por diversos mecanismos.

bién puede detectarse virus infeccioso en algunos casos. En otras virosis, la participación de la inmunidad celular en el desarrollo del exantema no ha sido definitivamente establecida.

Entre los virus que probablemente producen exantema por depósito de inmunocomplejos se pueden mencionar al virus dengue y al HBV, este último en el estadio prodrómico de la enfermedad. Se ha demostrado la presencia de virus en las lesiones exantemáticas causadas por rubéola, virus ECHO 4, 6, 9 y 16 y por Coxsackie A9, A16, A23 y B5, aunque no se produce liberación de dichos agentes al exterior. Obviamente, ello implica que la obtención de muestras con fines diagnósticos no debe efectuarse a partir del exantema. La patogenia del exantema sarampiñoso parecería estar principalmente mediado por una respuesta de inmunidad celular, ya que la lesión máculo-papular de la piel no se observa en pacientes con significativo déficit de la respuesta linfocito T-dependiente. Los focos de replicación del virus sarampión en la epidermis quedan restringidos a zonas próximas a los vasos sanguíneos y no se libera virus al exterior.

Por el contrario, la presencia de virus en piel en lesiones vesiculosas (herpes simplex, varicela-zóster) facilita su diseminación al exterior. En estos casos es posible aislar el virus en las lesiones. Recuérdese que la localización cutánea del virus del herpes simplex en las lesiones recurrentes o del virus varicela-zóster en los episodios de zóster, no se deben a la diseminación virémica sino al transporte de virus por vía nerviosa (véase el epígrafe de la Figura 5.2 y el ítem 3.4).

El empleo de animales de experimentación ha permitido dilucidar fehacientemente la participación de algunos órganos en la patogénesis de ciertas virosis. A continuación se mencionan dos ejemplos ilustrativos.

El efecto de una infección viral en la hipófisis y el timo fue estudiado en ratones inoculados experimentalmente con arenavirus. Se ha observado que ratones persistentemente infectados con el virus LCM tienen afectada la producción de hormona de crecimiento

sin que medie daño histológico aparente. A su vez, la infección con virus Junín de células tímicas en ratones recién nacidos se asocia a persistencia viral en el SNC. En estos animales, la imposibilidad de sus linfocitos T de inducir una respuesta efectora en el SNC contrasta con la meningoencefalomielitis T-dependiente que se observa habitualmente en ratones lactantes de 2 a 5 días de edad.

3.3.4 Diseminación viral transplacentaria

La transmisión viral transplacentaria (vertical) es un evento circunscrito a pocos virus en el ser humano (Tabla 5.1). Se desconoce el mecanismo patogénico de la invasión fetal, aunque la localización viral previa en los vasos placentarios parecería ser un paso necesario. Habitualmente se pueden detectar focos localizados de infección placentaria en la rubéola o en la enfermedad citomegálica. Similares hallazgos fueron descritos anteriormente en la infección por viruela. El espectro de manifestaciones clínicas en el feto es variable. En los primeros meses de gestación, el feto es incapaz de montar una respuesta inmune. En contraposición, hacia la mitad del embarazo, pueden detectarse IgM, IgG, IgA, linfocitos T, células NK e interferón en tejidos infectados, cuyo grado de participación en la limitación o eventual agravamiento de las infecciones virales aún se desconoce. Sin embargo, el feto muestra una significativa capacidad para reparar y compensar el daño histórico. Es por ello que si el virus no es muy citocídico, el feto sobrevivirá. Caso contrario, el resultado de la infección es la muerte fetal y el aborto. Las consecuencias de la infección intrauterina son dependientes del momento de la infección, del agente etiológico y de la respuesta del hospedero.

Como resultado de la infección rubeólica puede producirse un efecto teratogénico en el producto de la concepción o inducirse el aborto. Existe aproximadamente un 80 % de riesgo de ocurrencia de malformaciones congénitas cuando la infección se produce en los tres primeros meses del embarazo. Dado que la organogénesis ocurre hasta las 20 semanas, dichas malformaciones son improbables más

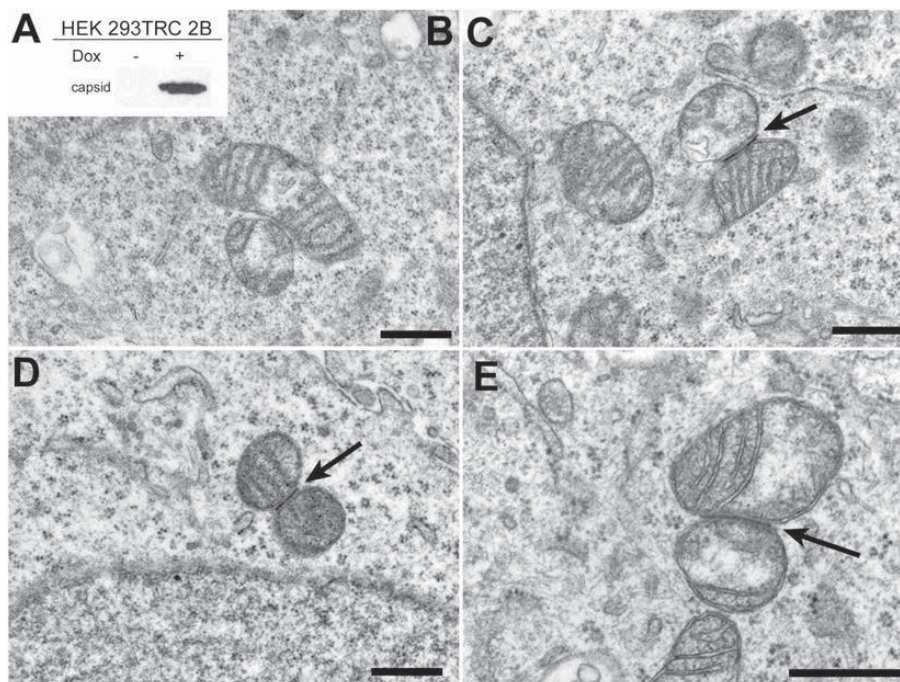


Figura 5.13. La expresión de la cápside del virus rubéola induce la formación de zonas electrón-densas entre mitocondrias. Células HEK293TRC 2B transfectadas con el gen de la cápside de rubéola en forma estable e inducible fueron propagadas en presencia o ausencia del inductor doxiciclina (dox) durante 24 horas. (A): *Western blot* de lisados celulares utilizados para detectar la expresión de la cápside viral mediante de anticuerpos específicos. (B-E): Células propagadas en ausencia (B) o presencia (C-E) del inductor durante 48 hs. antes de la fijación para M.E. Las células no inducidas (no expresan la cápside de rubéola) exhiben morfología normal de las mitocondrias. En las células inducidas se observa la formación de placas electrón-densas entre mitocondrias adyacentes. La barra indica 500 nm. De: Beatch MD, *et al. J Virol* 79: 10807-20, 2005. Reproducido con autorización.

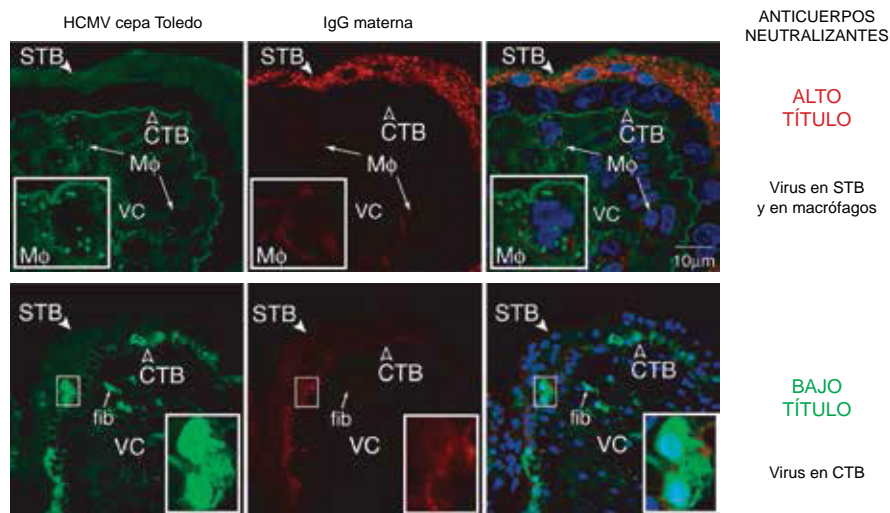


Figura 5.14. Infección transplacentaria por citomegalovirus humano (HCMV). Replicación del HCMV en explantos de placenta dependiente del título de anticuerpos neutralizantes maternos. STB: Sincitiotrofoblasto; CTB: Citotrofoblasto; Mφ: Macrófago; VC: Villus core (centro de la vellosidad); fib: Fibroblastos del estroma. De: Maidji, *et al. Am J Pathol.* 168(4):1210-26, 2006. Reproducido con autorización.

allá de este momento, aunque se produzca entonces la infección del feto. En la infección rubeólica congénita hay una interferencia en el proceso de formación de órganos vitales (corazón, cerebro, ojos, oídos, etc.) con la consiguiente afectación funcional de los mismos. Paradójicamente, aunque puede detectarse al virus rubéola en múltiples órganos, las células infectadas son escasas y están agrupadas en focos. Aunque el mecanismo íntimo de lesión de los órganos fetales no ha sido establecido, se han observado en estudios *in vitro* con células de embrión humano, rupturas cromosómicas e inhibición de

la mitosis normal. Se ha postulado la participación de la replicasa viral P90 en la inducción de eventos apoptóticos, mediados por su unión a la proteína reguladora de la citoquinesis (Citron-K quinasa), lo cual deviene en la detención del ciclo celular luego de la fase S, generando un estado de tetraploidía que podría promover la muerte celular programada mediada por caspasas. También se han documentado alteraciones morfológicas en las mitocondrias (formación de estructuras electrón-densas que se enfrentan –entre otras localizaciones– entre la membrana externa mitocondrial y la del retículo

endoplásmico; figura 5.13), agrupamiento mitocondrial alrededor de los complejos de replicación viral, y despolimerización de los filamentos de actina. Estas alteraciones muy probablemente desempeñan un rol en la teratogénesis.

El HCMV es el agente etiológico de la primera causa mundial de infecciones congénitas. Aproximadamente un 0,2-2,3% de todos los nacidos vivos exhiben infección congénita por HCMV y un porcentaje variable de ellos (10-15%) padece síntomas al nacer, aunque las secuelas neurosensoriales y psicomotoras pueden también observarse ulteriormente en un 10% de los neonatos asintomáticos. La infección congénita por HCMV es la causa más importante que puede conducir a un daño del desarrollo del SNC, que incluye retardo mental, pérdida de la audición y de la visión. El recién nacido sintomático exhibe frecuentemente la tríada ictericia, hepato-esplenomegalia y petequias, aunque puede observarse también microcefalia, ventriculomegalia y calcificaciones intracraneales. La infección congénita puede ocurrir en el transcurso de la primoinfección materna o –con mucho menor frecuencia– como consecuencia de una reactivación viral asociada a inmunosupresión (por ejemplo, en pacientes con trasplante de médula ósea o riñón). Los anticuerpos anti-HCMV maternos modulan la transmisión vertical, según su título, actividad neutralizante y avidéz. Bajos títulos de anticuerpos –frecuentemente dirigidos contra epítopes de proteínas que no generan anticuerpos neutralizantes– la facilitan, al promover el pasaje viral al citotrofoblasto mediante transcitososis de las vesículas endocíticas a través del sinciotrofoblasto utilizando el receptor neonatal para Fc. Los viriones asociados son luego capturados por macrófagos, desde donde se propagan hacia el estroma (Figura 5.14). En contraposición, elevados títulos de IgG1 neutralizantes de alta avidéz, se unen a la glicoproteína gB de envoltura viral, formando complejos que son transportados en cavéolas, luego captadas por macrófagos en el citotrofoblasto sin infectarlos productivamente (véase ítem 5.1), asociándose ello a protección. El HCMV promueve la degradación de receptores para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*) α y β en fibroblastos y células de músculo liso. Dicho factor induce la diferenciación de estas últimas, promoviendo el cambio de su fenotipo contráctil a uno secretor del propio PDGF. La degradación de sus receptores conduce a defectos en el desarrollo del SNC, aparato cardiovascular y órganos epiteliales del feto mediante falla en la diferenciación, migración y/o proliferación celular y alteraciones en el depósito de matriz extracelular de un gran espectro de células mesenquimatosas, gliales y migratorias. También se ha postulado que el daño hístico del SNC podría atribuirse parcialmente a otros factores, tales como la infección endotelial que se asocia a las vasculitis que condicionan el flujo sanguíneo, la alteración de la maduración de células neuronales y gliales, y a la propia respuesta inflamatoria.

La infección congénita por erythrovirus (parvovirus) humano B19 ha sido fehacientemente documentada: la incidencia de la infección primaria durante el embarazo se estima en el 1-5% de los embarazos, y la subsiguiente transmisión transplacentaria del 24-33%. Teniendo en cuenta la intensa viremia materna (~10¹¹ copias genómicas / ml de suero) y el requerimiento viral por las células en división, se ha postulado que el resultado de dicha infección congénita se asociaría todavía más frecuentemente con abortos espontáneos o muerte fetal que con anomalías físicas. El receptor celular para el virus es el globósido P, el que está presente en trofoblasto, células progenitoras de la serie eritroide, miocardiocitos, células endoteliales y megacariocitos. La infección de células susceptibles pero no permisivas del trofoblasto promueve eventos apoptóticos mediados por caspasas, que se asocian a la muerte fetal. La grave anemia fetal debido a la infección de células eritroides progenitoras –especialmente en la fase hepática de la eritropoyesis fetal que acontece entre las 11 y 23 semanas de gestación– se asocia a falla cardíaca y al consiguiente *hidrops fetalis* no inmune. Asimismo, la infección de células miocárdicas desencadena una miocarditis que agrava la falla del órgano. También pueden ocurrir anomalías neurológicas. El riesgo de un desenlace desfavorable

para el producto de la concepción es máximo si la infección primaria materna ocurre en los dos primeros trimestres de la gestación, aunque puede acaecer también en el último trimestre.

La transmisión del HIV de la madre (no tratada con antirretrovirales) al hijo (independientemente de la vía) ocurre en el 12-45% de los casos, dependiendo de factores demográficos, geográficos y epidemiológicos de las cohortes estudiadas. Para ello se reconocen tres posibles vías de contagio: la intrauterina (transplacentaria), la que ocurre durante el momento del parto (connatal) y la que tiene lugar posparto a través de la alimentación láctea. Aunque la mayoría de las infecciones madre-hijo por HIV acontecen al momento de atravesar el canal de parto (~80%), un 1,5-2% ocurre por vía transplacentaria. Se postula que en la transmisión viral al feto intervienen factores virales (tropismo viral, cambios en el gen *env*), maternos (estado inmune, abuso de drogas, nivel de anticuerpos) y vinculados al embarazo (integridad de la placenta, viriones en el fluido amniótico, transferencia de células maternas o anticuerpos, etc.). La transmisión transplacentaria puede ocurrir a través de células endoteliales CD4⁺ o de células de Hofbauer CD4⁺ (células de estirpe macrofágica que además de DC-SIGN, también expresan los correceptores para HIV CCR5 y CXCR4) presentes en el centro de las vellosidades coriónicas. La presencia de la molécula DC-SIGN en células de placenta permite la infección en *trans* (**trans-infección**) de células que expresan CD4 o receptores para quimioquinas. Las **células trofoblásticas pueden ser blanco de la infección viral y/o pueden ser utilizadas por el virus para transportarse mediante transcitososis a través de la barrera placentaria**. La transmisión vertical del HIV por ambos mecanismos puede ser promovida o inhibida por factores vinculados al fenotipo viral y al microambiente celular, influido por citoquinas y quimioquinas. La transmisión del HIV está asociada a la selección de variantes genotípicas (pudiendo ser aun minoritarias en la madre) que evaden la presión de selección de la respuesta inmune materna. Estudios *in vitro* documentaron que el pasaje transplacentario está modulado por la activación celular producida por el contacto intercelular, lo que regula los niveles de RANTES y MIP-1 β , así como por TNF- α e IL-8, los que disminuyen o aumentan, respectivamente, la producción viral en el trofoblasto.

3.4 DISEMINACIÓN NEURAL

Ya se ha mencionado que la diseminación viral al SNC no sólo se produce a través de los vasos, sino también a través del pasaje por la barrera hematoencefálica en las meninges y en el plexo coroides. La diseminación viral puede ocurrir también a través de los nervios periféricos. En este caso, los virus pueden ser transportados por una de las siguientes cuatro vías: 1) a través de los axones; 2) a través de las células de Schwann; 3) desplazándose por los espacios interaxónicos; y/o 4) a través de los linfáticos perineurales.

En el hombre, los virus herpes simplex y rabia se desplazan a través de axones. La diseminación por esta vía es un proceso lento: se ha determinado experimentalmente en ratones que la velocidad de transporte de partículas de herpes simplex es de 2 a 10 mm por hora. El lento transporte de partículas virales (sólo por vía axónica) para alcanzar el encéfalo, la riqueza de la inervación tisular y la distancia axonal a recorrer determinan el periodo de incubación de la rabia (habitualmente alrededor de un mes, aunque puede variar entre una semana y un año).

El transporte retrógrado a través de los axones se produce por acción de las moléculas de dineína asociadas a los microtúbulos; éstas transportan las partículas virales desde las terminales sensoriales hacia el núcleo neuronal (vía axonal retrógrada). De manera inversa, en la reactivación los componentes de la estructura viral (cápside, glicoproteínas de envoltura, etc.) son transportados por vía axonal anterógrada a través de los microtúbulos asociados a proteínas de la familia de las quinesinas, mediante la unión directa con estas proteínas del citoesqueleto o viajando dentro de endosomas (Figura 5.15).

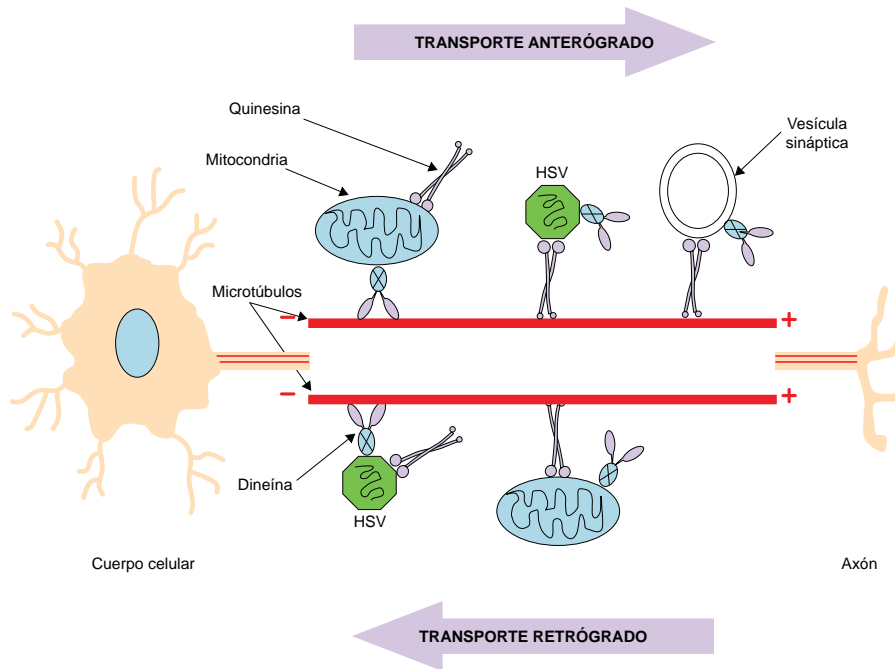


Figura 5.15. Transporte axonal del virus herpes simplex en neuronas. Luego de la infección de las neuronas sensoriales, las cápsidas virales son transportadas en sentido retrógrado hacia el núcleo celular a través de los microtúbulos, probablemente mediante las moléculas de dineína. Luego de la reactivación viral, las cápsidas conteniendo el DNA genómico viral y las glicoproteínas de la envoltura viral son transportadas en forma independiente en sentido anterógrado a través de los microtúbulos, probablemente por las moléculas de quinesina.

4. TRANSMISIÓN DE VIRUS AL EXTERIOR DEL ORGANISMO

La secuencia de eventos para la mantención de un virus determinado en la naturaleza comprende la liberación viral de la célula, la salida del hospedero, el transporte a través del medio ambiente en una forma viable y la apropiada entrada en un nuevo hospedero susceptible.

Algunos virus son liberados de las células al final del ciclo replicativo, otros no completan este ciclo, y un tercer grupo no egresan eficientemente.

La transmisión a un nuevo hospedero es dependiente de varios factores: 1) cantidad de virus diseminado o vehiculizado; 2) estabilidad viral en el medio ambiente; 3) presencia de vectores transmisores (imprescindibles en el caso de arbovirus); 4) disponibilidad de hospederos susceptibles; y 5) constitución genética del virus y el hospedero. A continuación se comentan brevemente sólo los dos primeros factores.

Las probabilidades de transmisión son mayores si el número de viriones es elevado. Por ejemplo, es sabido que cada mililitro de sangre puede contener hasta aproximadamente 10^7 partículas de Dane (infectantes) del HBV. Teniendo en cuenta que son necesarias sólo 100 (10^2) viriones para infectar a un chimpancé susceptible (no inmune) de 40-50 kg de peso, ello implica que sólo con 0,01 μ L de sangre podría lograrse tal efecto. Por ello, cantidades aún invisibles de dicho fluido pueden contaminar agujas y ser suficientes para transmitir el virus en poblaciones humanas vulnerables (por ejemplo, usuarios de drogas ilícitas por vía endovenosa).

De manera análoga, la presencia de 10^9 - 10^{11} partículas de rotavirus por gramo de materia fecal excretada (virucopria) constituyen una fuente importante de virus para asegurar la transmisión fecal-oral a susceptibles. En la transmisión del virus rabia, se ha demostrado que las mordeduras de zorros son más infecciosas que las producidas por perros, ya que contienen 10 veces más virus que los últimos en sus glándulas salivales ($10^{6,9}$ vs $10^{5,6}$ DL₅₀ ratón / g de glándula salival respectiva).

La transmisión del HCMV a través de leche materna se ve favorecida por el volumen del fluido que es ingerido por el lactante

a pesar de observarse un título bajo de virus por mililitro de leche.

Diferentes virus poseen distinta susceptibilidad al medio externo: temperatura, desecación, pH, etc. A modo de ejemplo, baste recordar que los rinovirus mantienen su infectividad casi intacta al cabo de 3 horas luego de depositarse a través de aerosoles o por medio de manos contaminadas en objetos diversos. Ello implica que su transmisibilidad no está circunscripta a la diseminación aerógena sino que también acaece a través de utensilios contaminados. Un estudio efectuado mediante aislamiento viral a partir de costras demostró que el virus de la viruela (enfermedad ya erradicada de la Tierra) es capaz de persistir viable en condiciones naturales durante al menos 13 años. Esta viabilidad viral es muy superior a la observada, por ejemplo, en cadáveres de individuos infectados con HIV mantenidos a 4° C (días-un par de semanas) o en aguas contaminadas con el virus hepatitis A a temperatura ambiente (3 a 10 meses).

Los virus pueden transmitirse a otro hospedero a partir de las siguientes fuentes: secreciones respiratorias, saliva, heces, orina, secreciones genitales, leche, sangre o piel.

En determinados casos, la replicación del virus ocurre en órganos que no le son útiles, a los efectos de mantener el ciclo en la naturaleza: por ejemplo, es el caso de la multiplicación viral en el SNC observada en infecciones por virus polio o por arbovirus, o en la orquitis por virus parotiditis o por Coxsackie B, o en la miocarditis por éste último agente (Figura 5.2). Un ejemplo extremo y fascinante a la vez fue descubierto por Daniel Carleton Gajdusek en la tribu Fore de la isla de Guam, Nueva Guinea. Este investigador pudo establecer la relación entre una enfermedad neurológica siempre letal –conocida como kuru y sólo observada en dicha población– y sus rituales canibalísticos. El agente posteriormente aislado sólo se transmitía –luego de un período de incubación prolongado de hasta 30 años– por ingesta de encéfalos de familiares (ejemplo de infección lenta del SNC). La presencia de un agente infeccioso fue demostrada mediante inoculación de homogeneizados de encéfalos humanos a primates no-humanos, también luego de un prolongado período de incubación. Estos hallazgos permitieron evitar nuevos casos de kuru en nacidos a partir de 1957 (al mo-

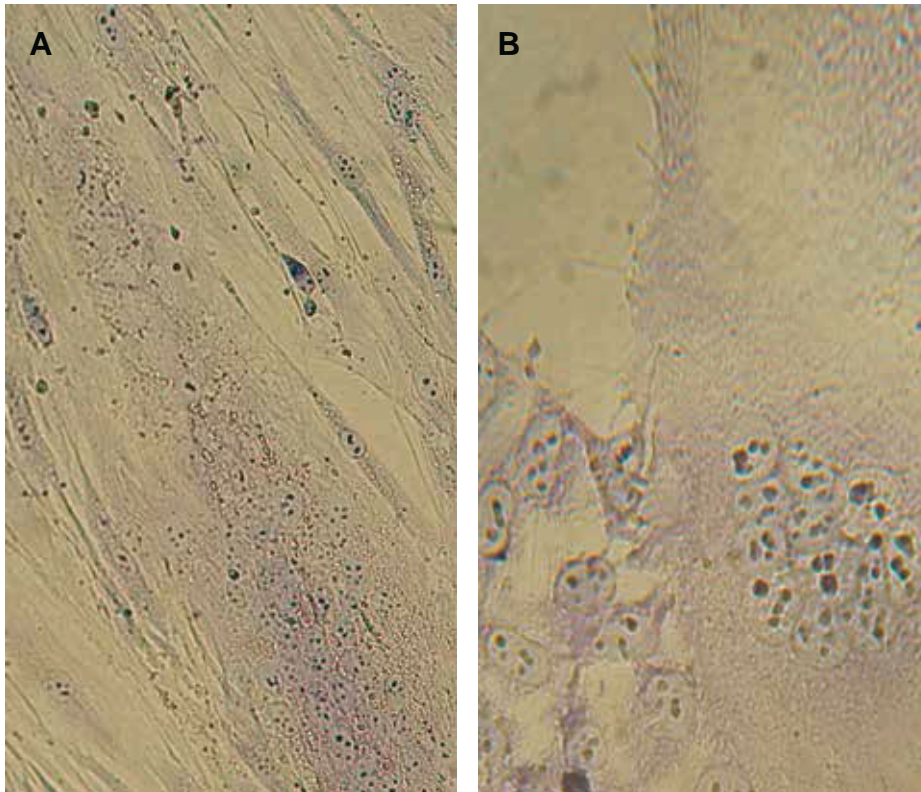


Figura 5.16. Formación de sincicios *in vitro*. **A.** Infección de células PH con virus sincicial respiratorio. **B.** Infección de células GHOST con HIV-1. Gentileza de la Dra. Gabriela Turk. Depto. Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina, UBA.

dificarse los ritos canibalísticos de la tribu), le valieron a Gajdusek el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1976 y abrieron las puertas a los asombrosos descubrimientos del neurólogo Stanley B. Prusiner (premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1997), quien propuso el término **prión** para definir a proteínas infecciosas que se propagan en ausencia de ácido nucleico asociado a ellas, como agente etiológico de infecciones lentas degenerativas del SNC.

5. EFECTOS DE LA INFECCIÓN VIRAL SOBRE LAS CÉLULAS

La naturaleza intrínseca de los virus los convierte en parásitos intracelulares obligatorios para su replicación ya que necesitan de la maquinaria celular de biomoléculas y procesos metabólicos.

El resultado de la interacción específica entre un virus y una célula determinada puede ser evaluado en función de los procesos de replicación viral y del efecto producido en la célula hospedera. En contraste con la relativa sencillez para reconocer y cuantificar biomoléculas virales, el estudio de los efectos biomoleculares producidos en la célula es dificultoso y en muchos casos no han sido dilucidados aún. Sin embargo, en algunos casos es posible observar a la luz del microscopio óptico y electrónico las alteraciones morfológicas que inducen algunos virus en ciertas células.

El resultado de la infección viral puede detectarse en muchos casos mediante la observación al microscopio óptico del **efecto citopático** del virus. Es una forma de detectar la replicación viral. La **acción citopática (ACP)** viral puede demostrarse en cultivos celulares *in vitro* (véase el capítulo 1: por ejemplo, formación de placas) o en tejidos *in vivo*. Como resultado de la ACP pueden observarse redondeamiento celular, formación de sincicios o de cuerpos de inclusión y muerte celular por necrosis y/o apoptosis.

Las manifestaciones tempranas de la ACP en cultivos celulares se producen por el edema celular asociado con alteración de la permeabilidad de la membrana. Ello se asocia a cambios en el retículo endoplásmico, polirribosomas y mitocondrias que constituyen las bases del redondeamiento celular. En las etapas finales se produce la marginación

cromatínica hacia el borde del núcleo y su condensación (picnosis). Habitualmente, las células mueren por necrosis, una respuesta patológica que implica aumento dramático del tamaño celular que conduce a la lisis. El proceso necrótico es iniciado por un daño celular que produce el desequilibrio osmótico, fundamentalmente asociado al ingreso de Ca^{++} , con la consiguiente inhibición de ciertos procesos (síntesis de ATP) y estimulación de otros (proteólisis).

La lisis celular es el resultado de 3 procesos: 1) interferencia de la biosíntesis de macromoléculas celulares; 2) alteración de la función de la membrana plasmática; y 3) liberación de enzimas hidrolíticas degradativas desde las membranas lisosomales.

Algunos virus (por ejemplo, virus sincicial respiratorio, parainfluenza, HCMV, HIV, herpes simplex, sarampión, entre otros) **pueden producir** la fusión de membranas celulares como resultado de lo cual se forma una masa citoplasmática que puede contener múltiples núcleos: son los **sincicios gigantes**. La formación de sincicios *in vitro* (Figura 5.16.A y B), no implica necesariamente su ocurrencia en todos los sustratos celulares, ni tampoco *in vivo*, aunque también se observan en algunos casos (véase el ítem 6.3. Mecanismos directos de lesión).

En otras infecciones virales se forman áreas celulares cuya tinción está alterada: son producidas por los cuerpos de inclusión. Ellos pueden corresponder a acúmulos cristalinos de partículas virales como se observa en las inclusiones intranucleares de poliomavirus y herpesvirus o pueden representar fábricas de síntesis y ensamblaje de componentes subvirales como se observa en los cuerpos acidófilos intracitoplasmáticos de neuronas infectadas por el virus rabia (cuerpos de Negri; véase la figura 14 del capítulo 9). En otras ocasiones corresponden simplemente a depósitos de antígenos virales sintetizados en exceso, como se visualiza con algunos de los cuerpos de inclusión formados en células infectadas.

Algunos virus pueden inducir la apoptosis de las células que infectan (aun aquellas de la respuesta inmune), o **inhibir dicho proceso**. Un mismo virus puede poseer proteínas (u otras moléculas) pro- y anti-apoptóticas, las que se pueden tornar operativas en diferentes

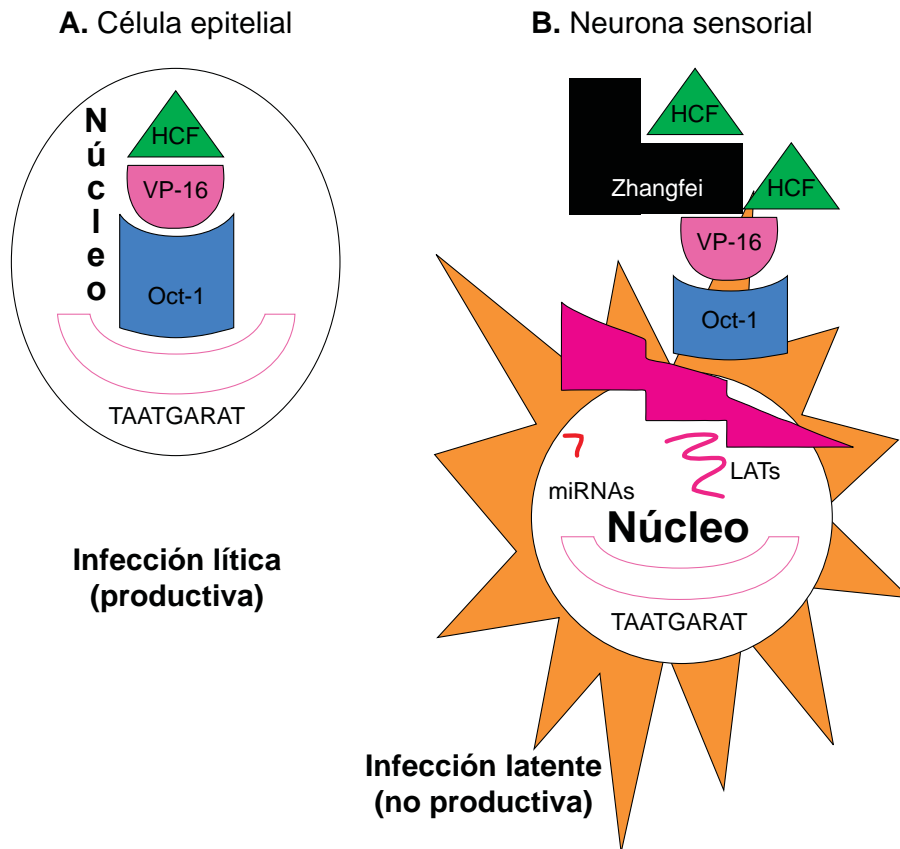


Figura 5.17. Infección lítica en células epiteliales y latente en neuronas sensoriales por herpes simplex. **A.** En la infección lítica, la proteína VP16 (α -TIF) forma un complejo con la proteína celular HCF (*Host Cellular Factor*) y con el factor transcripcional celular Oct-1 que reconoce secuencias octaméricas TAATGARAT presentes en los promotores de genes inmediato-tempranos del DNA viral –ubicado como episoma en el núcleo–, promoviendo su transcripción. **B.** En las neuronas, la proteína celular de respuesta al estrés denominada Zhangfei inhibe a VP16 (probablemente mediante la participación de otras proteínas) en un modo HCF-dependiente, impidiendo la formación del complejo ternario HCF-VP16-Oct-1. El activador celular Oct-2 presente en el núcleo neuronal no se une a VP-16.

momentos de la infección de una célula o expresarse diferencialmente en diversas estirpes celulares. Este tema se desarrolla en detalle en el capítulo 8; a continuación sólo se mencionan un par de ejemplos. Algunas cepas del virus influenza tipo A expresan una proteína denominada PB1-F2 que induce la apoptosis mitocondria-dependiente de células de estirpe monocítica, lo que contribuye a la virulencia viral. Dicha proteína estuvo presente en todos los eventos de pandemia por influenza observados en el siglo XX, y lo está en casi todas las cepas de origen aviar. A su vez, influenza expresa otra proteína no estructural denominada NS1 que inhibe la actividad proapoptótica antiviral inducida por el sistema Interferón. Asombrosamente, los transcriptos LATs (RNA de polaridad anti-mensajero) de herpes simplex inhiben la apoptosis de aquellas neuronas en las que el virus permanece latente durante la vida del individuo persistentemente infectado (véase más adelante el ítem 5.2.1).

Como resultado de la interacción virus-célula pueden presentarse 3 situaciones: 1) infección viral productiva asociada o no a lisis celular; 2) infección viral no productiva con replicación viral bloqueada; y 3) infección celular con baja y continua producción de virus.

5.1. INFECCIÓN PRODUCTIVA

En muchas infecciones virales se produce la multiplicación del agente hasta alcanzar elevados títulos en células permisivas, con eventual inhibición de la maquinaria biosintética celular que resulta en la lisis de aquéllas. Se observa tal efecto, por ejemplo, en la infección de motoneuronas por poliovirus. Sin embargo, la in-

fección productiva de células permisivas con ciertos virus –aun en elevados títulos– no se acompaña necesariamente de lisis celular.

La permisividad celular implica no sólo la existencia del receptor específico para el virus, sino también de un medio intracelular propicio que permita la prosecución de los procesos de replicación genómica, transcripción y expresión de sus genes.

Así, por ejemplo, se ha demostrado en tejidos humanos una elevada concentración de RNAm para el receptor del virus polio en hígado, pulmón y corazón, mientras que sorprendentemente este mensajero se halla en baja concentración en el cerebro. Dado que el hígado, el pulmón y el corazón no son considerados sitios de replicación habituales del virus polio, estas observaciones sugieren que la permisividad hacia el virus no está meramente vinculada con la expresión del receptor viral (véase el ítem 1.1.3).

La falta de permisividad celular para un virus puede ser modificada por la coinfección con otro agente (por ejemplo, como se observa entre los agentes adeno-asociados en presencia de adeno-virus).

En las infecciones productivas, los cambios necróticos observados en las células infectadas comienzan a ocurrir frecuentemente alrededor del momento de máxima síntesis de las proteínas estructurales del virus. Sin embargo, además de los efectos promovidos por la acumulación de virus en el interior celular, pueden observarse también cambios citopáticos tempranos atribuidos a un efecto tóxico directo de determinadas proteínas virales. Así, por ejemplo, la proteína de la fibra/pentón de los adenovirus o una proteína del túbulo de la superficie del virus vaccinia pueden promover por sí mismas dichos efectos.

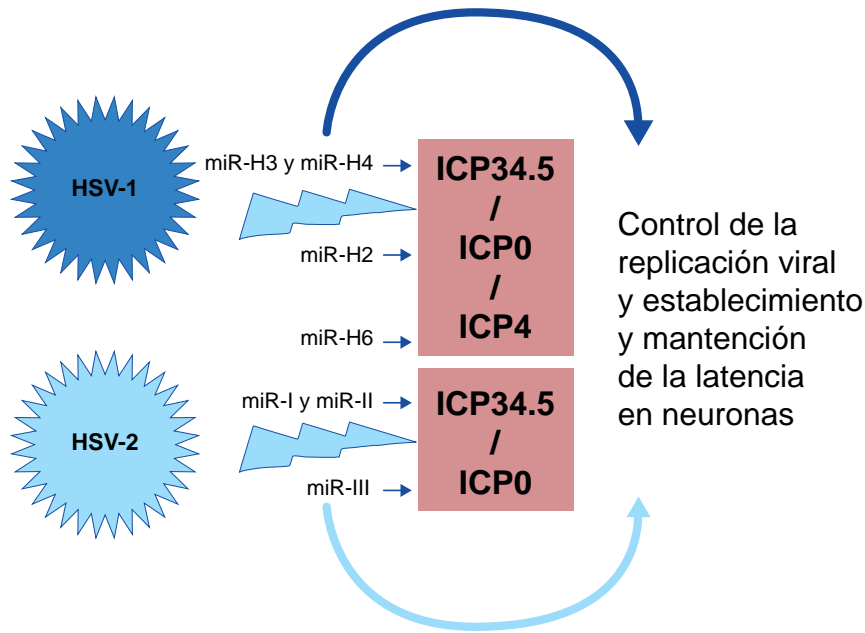


Figura 5.18. Actividad de microRNAs (miRNAs) virales que regulan la expresión de genes de los virus herpes simplex 1 (HSV-1) y herpes simplex 2 (HSV-2) durante la latencia. Las proteínas virales ICP0 (un activador transcripcional inmediato-temprano) e ICP4 (otro factor transcripcional viral necesario para la expresión de la mayoría de los genes del ciclo lítico) no se expresan en las neuronas sensoriales, lo que impide el ciclo productivo en ellas, como consecuencia de la inhibición por miRNAs específicos. La inhibición de la proteína ICP34.5 (una proteína clave en la replicación viral y neurovirulencia del HSV-1 y HSV-2) por miR-I y miR-II del HSV-2 (o por miR-H3 y miR-H4 del HSV-1) permite la sobrevida de las neuronas, una vez que se produjo la infección aguda de las mismas.

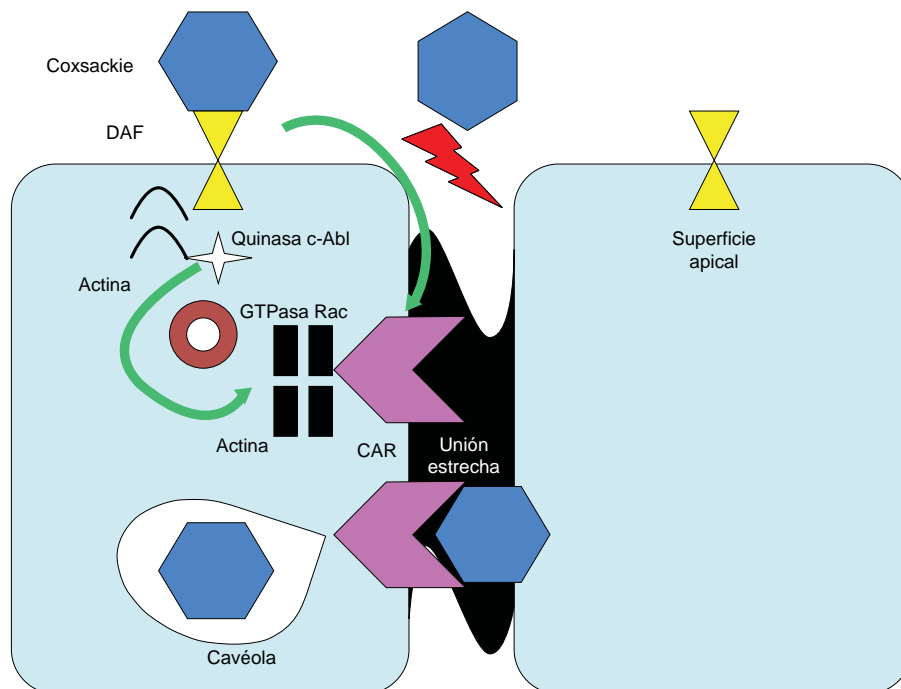


Figura 5.19. Ingreso del virus Coxsackie a la célula. El virus utiliza inicialmente el receptor DAF; luego de una señalización intracelular mediada por su entrecruzamiento citoplasmático, promueve un reordenamiento del citoesqueleto de actina, lo que transporta a la partícula viral unida a DAF hasta las uniones estrechas, donde podrá interactuar con el receptor CAR allí presente. Luego de la endocitosis mediada por receptor, Coxsackie es internalizado en cavéolas. El virus no puede acceder *per se* a las uniones estrechas intercelulares para alcanzar los receptores CAR.



Figura 5.20. Vista espacial de la molécula CD155 (receptor celular) anclada en las proteínas de cápside del virus polio. VP1, VP2 y VP3 están coloreados en azul, verde y rojo, respectivamente. De: Zhang P; *et al. Proc Natl Acad Sci USA.* 105:18284-9, 2008. Reproducido con autorización.

En contraposición a lo observado en las infecciones productivas, algunos virus pueden infectar células no totalmente permisivas o aun no permisivas (pero susceptibles). En estos casos, el ciclo de multiplicación viral queda detenido en alguna de sus etapas: ello da lugar a **infecciones abortivas**.

5.2. INFECCIÓN NO PRODUCTIVA

El **bloqueo de la replicación viral** en las infecciones no productivas puede asociarse a muerte o sobrevida celular. El genoma viral puede perderse, o bien puede integrarse como DNA al genoma celular o permanecer como episoma. La integración del genoma viral al celular puede alterar las propiedades de crecimiento de la célula y producirse la transformación de las mismas. Esto ocurre por ejemplo en la transformación de linfocitos T humanos al ser infectados por los virus HTLV-1, agente etiológico de leucemias / linfomas T del adulto. En dichas células infectadas se detectan 1 a 3 copias en forma de genoma integrado proviral de modo monoclonal u oligoclonal. No existen sitios preferenciales de integración de los aproximadamente 9 000 pares de bases del provirus del HTLV-1 en células malignas provenientes de diferentes pacientes con leucemia T, lo que sugiere que la tumorigénesis por dicho agente está más relacionada con la expresión de la proteína transactivadora Tax que con eventos de mutagénesis insercional. Los patrones de la integración del genoma proviral de los diversos retrovirus están relacionados con la estructura de las respectivas integrasas virales.

En otros casos de infección no productiva, se evidencia una escasa expresión del genoma viral: es lo que ocurre en las infecciones latentes.

5.2.1. Infección latente

Una infección latente está caracterizada por 4 eventos generales: a) ocurre en una célula que no replica, o bien el genoma viral se replica conjuntamente con el DNA celular, sin perturbar el ciclo celular; b) la expresión de genes virales del ciclo lítico está ausente o es ineficiente; c) la expresión de antígenos virales en la célula infectada está eliminada o restringida; y d) el genoma viral persiste intacto, de modo de mantener la total capacidad para promover un ciclo de infección productiva, que asegure el inicio de la diseminación viral a un nuevo hospedero. En otros términos, **en las infecciones laten-**

tes se documenta una ausencia de progenie viral (como si ocurre con las células productivamente infectadas), **aunque el genoma viral mantiene la capacidad para ser reactivado y generar una infección productiva** como resultado de ciertos estímulos.

Las infecciones latentes mejor conocidas son las producidas por herpesvirus. Se ha demostrado que el genoma del virus herpes simplex-1 se mantiene latente como plásmido extracromosómico en neuronas de ganglios sensoriales, existiendo 20 copias de DNA viral por neurona en ausencia de proteínas virales (detectables). Los procesos reguladores virales y celulares no han sido diluidados totalmente. Se ha observado que el DNA del genoma viral está hipermetilado, lo cual reduce la expresión genética. Se ha postulado que el herpes simplex sintetiza productos proteicos capaces de regular la formación de eucromatina o heterocromatina, lo que a su vez participa en la regulación de la relación infección lítica/latente.

La transcripción del genoma viral del HSV-1 durante la infección viral latente en las neuronas de los ganglios sensoriales del hombre, está circunscripta a la región correspondiente al gen inmediato temprano ICP0 (*Infected Cell Protein 0*), donde sólo es activo el promotor de unos transcritos de RNA no codificantes, asociados a latencia denominados LATs (*Latency Associated Transcripts*), no habiéndose detectado (hasta el momento) la síntesis de proteína alguna viral. Existen al menos, tres moléculas **LAT que están asociadas al establecimiento y mantención de la latencia, mediante la inhibición de la apoptosis neuronal**. Derivan de un transcrito primario de 8,5 kb mediante *splicing* (corte y empalme) diferencial. La polaridad de las moléculas LAT es opuesta a la del RNAm de ICP0. Las moléculas LAT son predominantemente no poliadeniladas y se detectan en el núcleo de la célula latentemente infectada. En la infección latente de las neuronas sensoriales (habitualmente ganglio trigémino para HSV-1 y ganglios sacros para HSV-2), la expresión de los genes inmediato-tempranos está inhibida, ya que el transactivador viral VP16 (también denominado α -TIF (*Trans-Inducing Factor*)) no es funcionalmente activo. Estudios experimentales que permitieron la construcción de virus quiméricos del HSV-2 conteniendo LATs del HSV-1, promovieron eventos de reactivación *in vivo* correspondiente al fenotipo HSV-1 (sitio-específico) en las neuronas trigeminales, demostrando el rol crucial de estos transcritos también en la reactivación. Habitualmente, en las células

epiteliales, VP16 y la proteína HCF (*Host Cellular Factor*) derivada del hospedero, forman un complejo que unido al factor de transcripción Oct-1 (que fisiológicamente reconoce secuencias octaméricas en el genoma celular), se unen a los genes alfa inmediato-tempranos del virus -que también contienen dichas secuencias nucleotídicas- para comenzar la transcripción de RNAm del ciclo lítico. En las neuronas sensoriales, dicho complejo VP-16 / HCF / Oct-1 no es activo, merced a la presencia de la proteína Zhangfei, que impide su llegada al núcleo (interactuando con VP16 en un modo HCF-parcialmente dependiente), y por ende la transcripción de los genes inmediato-tempranos del virus (Figura 5.17). Zhangfei inhibe la unión del factor transcripcional Luman a HCF, que promueve la localización nuclear de éste último.

Los transcriptos LAT del HSV-1 y HSV-2 funcionan como precursores de microRNAs virales (miRNAs), unas moléculas de 21-24 nucleótidos que inhiben la expresión de RNAm "blanco" mediante la similitud de su secuencia (véase el capítulo "Mecanismos de defensa"). Dichos miRNAs cumplen un rol esencial en la infección aguda y en la latencia. Los miRNA designados **miR-I y miR-II del HSV-2 (y miR- H3 y miR-H4 del HSV-1)**, funcionan como una "llave de encendido / apagado" del **factor de neurovirulencia ICP34.5** (proteína viral que inhibe la autofagia neuronal promovida por la proteína celular Beclina-1, así como también limita la respuesta inmune innata mediada por la actividad de la PKR). Asimismo, **miR-III (HSV-2) y miR-H2 (HSV-1)**, respectivamente, silencian el RNAm o inhiben la síntesis del transactivador ICP0. Otro miRNA no derivado de los transcriptos LAT del HSV-1 (miR-H6) inhibe la expresión del RNAm de otro activador crítico para el ciclo lítico viral: ICP4; figura 5.18). Esta proteína es -a su vez- blanco de la inmunovigilancia por parte de los linfocitos T CD8⁺ en los intentos de reactivación viral, a través de gránulos citotóxicos como la granzima B (y probablemente también la A) sin activación de las caspasas. De lo expuesto se infiere **que la latencia del HSV-1 es dependiente de 3 factores: 1) el programa de latencia del virus; 2) la fisiología neuronal; y 3) la inmunovigilancia de los linfocitos CD8⁺ mediante citoquinas (TNF- α e IFN- γ) y gránulos que ejercen un efecto no citolítico.**

Otros virus que producen infecciones latentes forman parte también de la familia *Herpesviridae*, tales como: citomegalovirus humano, virus Epstein-Barr, virus varicela-zóster, HHV6, HHV-7 y HHV-8. Todos ellos exhiben programas particulares de latencia en células específicas y pueden ser reactivados ante diversos estímulos (por ejemplo, la inmunosupresión para producir el zóster por virus varicela-zóster, o el sarcoma de Kaposi asociado al HHV-8).

Puede darse el caso de que exista en un hospedero una infección productiva en una determinada estirpe celular, y simultáneamente una infección latente en otra, lo que ocurre durante la infección productiva por **HIV** en macrófagos, linfocitos T CD4⁺ activados, células foliculares dendríticas, etc. *versus* lo observado en **algunos linfocitos T CD4⁺ de memoria, infectados**. Estos últimos constituyen un reservorio estable de infección, resistente aun a la administración de la terapia antirretroviral combinada (en inglés, *Highly Active Antiretroviral Therapy* o HAART). Sin embargo, **dada la activa replicación del HIV en las células inicialmente mencionadas, no debe considerarse que el paciente desarrolla una infección latente a nivel del organismo, considerado como un todo.**

5.3. INFECCIÓN VIRAL CON ESCASA Y CONTINUA PRODUCCIÓN VIRAL

En esta categoría se ubica, por ejemplo, la infección persistente producida por el virus LCM en el ratón. Se ha demostrado que este virus promueve fascinantes mecanismos de evasión viral a la respuesta inmune, modulando tanto los procesos de transcripción y replicación viral, como la vigilancia inmunológica mediada por la interacción entre células dendríticas y linfocitos T (véanse los capítulos 7 y 25.1).

6. ALGUNOS ASPECTOS DE LA RELACIÓN VIRUS-CÉLULA

6.1. CONCEPTOS INTRODUCTORIOS

La adherencia del virión a los receptores celulares es mediada por estructuras especializadas: "las proteínas de adherencia", presentes en múltiples copias en el virión. En algunos virus, se produce una modificación conformacional de dichas proteínas como consecuencia de su interacción con el microambiente celular local, lo cual permitirá su adsorción y posterior penetración (véase el capítulo 2). Una vez en el interior celular, los virus pueden propagarse en ella sin promover cambios visibles al microscopio óptico (ausencia de efecto citopático) o bien promover lesiones celulares asociadas a su presencia (mecanismo directo) o a la respuesta inmune o no inmune del hospedero frente a la infección (mecanismo indirecto).

6.2. ¿CÓMO INGRESA UN VIRUS A UNA CÉLULA? ¿QUÉ HACE EN ELLA?

El encuentro ocurre inicialmente como resultado del azar. Siguiendo una fórmula matemática, la probabilidad de que se produzca una infección por una partícula dada resulta de la ecuación $[V][R] / [VR]$, siendo V la cantidad de virus libres, R, la de receptores libres y VR la de receptores unidos a virus.

Los virus -verdaderos maestros del camuflaje y el engaño- deben ingresar a la célula causándole el menor daño posible, dejando el mínimo rastro de su ingreso a la misma para no ser detectados por el sistema inmune. La tarea esencial es propagarse desde una célula infectada hacia otra no infectada. Para ello debe procederse al empaquetado del RNA o DNA viral y de las proteínas accesorias, lograr una adecuada protección para persistir en el medio extracelular e introducir la información genética viral a una nueva célula. Como un caballo de Troya, el "intruso" encuentra la "cómplice asistencia" de la víctima, para lo cual el virus utiliza la información adquirida durante años de co-evolución con su hospedero. La mayoría de los virus a DNA (a excepción de los poxvirus) tienen por objetivo la replicación de dicho genoma en el núcleo; por el contrario los virus a RNA (a excepción de los orthomyxovirus y los iridovirus) lo hacen en el citosol. Para su propagación, los virus deben cumplir con un programa de "etapas múltiples", donde cada una debe ser realizada en un tiempo y lugar específicos. Las etapas iniciales de unión de la superficie viral a moléculas de superficie celular tienen lugar con diferente afinidad. Algunas moléculas celulares de adherencia sólo permiten la unión inicial de las partículas (concentrándolas sobre la célula), sin promover la prosecución del ciclo de multiplicación. Otras moléculas (**los receptores**), en cambio, funcionan como **disparadores de dicho ciclo, activando cambios en la estructura metaestable que constituye al virus, activando vías de señalización intracelular, lo que favorece la fusión y penetración**. En esta instancia, una etapa crucial en el ingreso a la célula es el desnudamiento viral, seguido frecuentemente por la endocitosis y el transporte del genoma al interior celular. El progreso en esta etapa de unión a la célula y desnudamiento, está regulado por las "señales subrepticias" o pistas que deja la célula para el ingreso: la exposición a los receptores, la exposición a un pH ácido y la reimmersion a un medio ambiente reductor. Para poder responder a dichas señales, algunos de los componentes virales (por ejemplo las glicoproteínas de envoltura) existen en una forma metaestable, fácilmente modificable sin gasto de energía.

Los virus pueden utilizar más de un receptor. Más aún, algunos virus a RNA pueden modificar con cierta facilidad los ligandos de su superficie para la utilización de diferentes receptores, ante la ausencia del receptor principal (una genuina adaptación viral), aunque ello no siempre ocurre en forma inmediata. Así, por ejemplo, la hemaglutinina (H1, H2 ó H3) presente en una de las dos clases de espículas glicoproteicas que posee el virus influenza tipo A adaptado a la especie humana -y por ende presente en los virus actualmente causantes de epidemias (subtipos H1N1 y H3N2)- se adsorbe preferentemente a receptores celulares del tracto respi-

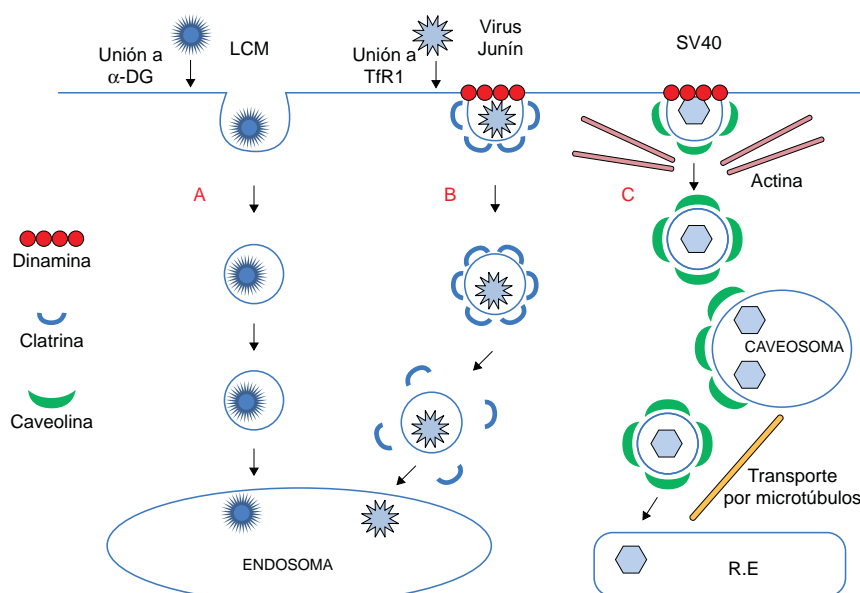


Figura 5.21. Vías endocíticas utilizadas por virus. **A.** Dependiente de colesterol e independiente de dinamina y caveolina; **B.** Dependiente de clatrina y dinamina. **C.** Dependiente de colesterol, actina, caveolina y dinamina. LCM: Virus de la coriomeningitis linfocitaria. α -DG: α -distroglicano. TfR1: *Transferrin receptor* 1. R.E.: Reticulo endoplásmico. Adaptado de: Rojek JM & Kunz S. *Cell Microb* 10: 828-835, 2008. Reproducido con autorización.

ratorio superior que contienen ácido siálico unido a residuos de α -2,6 galactosa. En cambio, el virus influenza tipo A subtipo H5N1 adaptado a las aves, se une preferentemente a receptores que contienen ácido siálico unido a residuos de α -2,3 galactosa, presente tanto en el intestino de las mismas como en el tracto respiratorio inferior de la especie humana. La especificidad del sitio de unión de la hemaglutinina a uno o a otro receptor está representada por sólo dos aminoácidos en las posiciones 190 y 225 de aquella (Asp en ambas para influenza adaptado al hombre, o Glu190 y Gly225 para influenza adaptado a las aves). Si bien no se ha observado una transmisión interhumana eficiente de influenza aviar (por el subtipo H5N1) hasta 2012, existe aún el riesgo potencial de diseminación pandémica de dicho virus como eventual resultado de mutaciones en posiciones aminoácidas críticas de la hemaglutinina viral.

Los receptores pueden variar según su composición (proteínas, glicolípidos, azúcares), ubicuidad (promiscuos o restringidos a ciertas estirpes celulares) y densidad celular. Los mismos constituyen uno de los principales determinantes del tropismo celular y de hospedero. Los virus pueden utilizar múltiples receptores simultáneamente o –en otros casos– sucesivamente para ingresar a la célula (como ocurre con HIV, herpes simplex, Coxsackie o hepatitis C [véase el capítulo 24.5]). En el caso del HIV es conocido que la interacción inicial con moléculas de adhesión tales como las de unión a manosa pertenecientes a la familia de receptores lectínicos tipo C, DC-SIGN (*Dendritic Cell –Specific Intercellular adhesion molecule [ICAM-3] Grabbing Nonintegrin*) o L-SIGN (*Liver and Lymph node Specific Intercellular adhesion molecule [ICAM-3] Grabbing Nonintegrin*), permite la unión a la célula, pero no promueve cambio alguno en la estructura viral. La interacción subsiguiente de la glicoproteína gp120 de la envoltura viral con el receptor CD4 permite un cambio conformacional de aquella, que a su vez posibilita la interacción con los correceptores CCR5 o CXCR4. Esta interacción promueve un cambio espacial de la glicoproteína viral de transmembrana gp41 que entonces adquiere la conformación adecuada para la fusión con la membrana celular. En modo semejante, la interacción inicial de la glicoproteína de envoltura gC del herpes simplex con proteoglicanos heparán sulfatos permite la subsiguiente interacción entre otras glicoproteínas virales de superficie y receptores celulares como HVE (*Herpes Virus Entry*), nectinas o integrinas. Los virus Coxsackie B constituyen una muestra

de la estrategia magistral de algunos virus para alcanzar el receptor adecuado en una célula a pesar de obstáculos aparentemente insalvables para lograrlo (Figura 5.19). Para entrar a la célula, Coxsackie B debe interactuar con el receptor CAR (*Coxsackie-Adenovirus Receptor*), el que está presente en las uniones estrechas intercelulares (polo basolateral), por lo que la interacción con aquellos virus que llegan a la célula por el polo apical está impedida. Coxsackie B interactúa inicialmente en la superficie apical de la célula con receptores DAF (*Decay Accelerating Factor*, una glicoproteína tipo I de membrana), lo cual –tras su entrecruzamiento– dispara una señalización intracelular mediada por la tirosina quinasa c-Abl, que mediante la activación de la GTPasa Rac promueve un reordenamiento del citoesqueleto de actina, y permite la transferencia de las partículas unidas en el polo apical con DAF hasta las uniones estrechas intercelulares en el polo basolateral. Ello posibilita la interacción de Coxsackie con CAR, receptor que promueve los cambios conformacionales al virus que permiten su introducción al citoplasma a través de una endocitosis mediada por cavéola (véase más adelante). Un desplazamiento lateral semejante –imagine el lector un verdadero evento surfístico– ocurre con HIV. En este caso –como en el del virus papiloma humano (HPV)– tiene un rol crucial el movimiento de difusión lateral (desplazamiento) sobre la superficie celular.

El receptor para el virus polio (CD155) consiste en tres dominios extracelulares, uno de transmembrana y otro intracelular. Su estructura proteica espacial permite su inclusión entre los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Sólo las formas alfa y delta del receptor (que tienen el dominio de transmembrana) son funcionales. Sorprendentemente, el RNAm de estos receptores se expresa en alto grado en el hígado, pulmón y corazón, pero no en el cerebro. Dado que esos tres órganos no son considerados sitios habituales de replicación del virus polio, se infiere –como se mencionó al comienzo de este capítulo– que el tropismo viral no es sólo determinado por la mera distribución celular de su receptor. Los aminoácidos ubicados en las posiciones 73 (Gly), 74 (Ser), 82 (Gln), 99 (Leu), 102 (Glu), 130 (Gln) y 132 (Ser) del receptor determinan la especificidad de hospedero para este virus (sólo en humanos, y chimpancés experimentalmente inoculados). El virus polio interactúa a través de una región estrecha y hundida de la superficie de su cápside (denominada cañón) con este receptor, promoviendo un

cambio en aquélla que permite la eliminación de la proteína interna VP4 y expone la porción hidrofóbica de VP1 en la superficie viral, lo que aumenta la afinidad por la membrana celular (Figura 5.20). Ello gatilla la formación de un poro constituido por moléculas de VP1 ancladas en la bicapa lipídica (se ignora si es de la membrana celular o de los endosomas) asociadas al receptor. Este evento es responsable del pasaje del RNA viral al citosol (metafóricamente, imagine el lector el movimiento de extrusión de una crema a través de una manga pastelera).

Si bien la interacción inicial entre los ligandos y los receptores celulares es débil (constante de afinidad en el orden milimolar), la multiplicación de dichas interacciones torna al proceso de unión un evento de alta avidéz y prácticamente irreversible. En el caso de los orthomyxovirus y los paramyxovirus, sus glicoproteínas de envoltura interactúan con residuos de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) en la célula. La presencia de una enzima con actividad de neuraminidasa en la superficie de estos virus, promueve la prosecución del ingreso a la célula, mediante la destrucción de dicho receptor, facilitando la liberación de las partículas.

Las interacciones entre las superficies virales y celulares pueden tener como sustrato a proteínas presentes en ambas superficies, o a proteínas y carbohidratos. Los virus envueltos lo hacen mediante glicoproteínas (la antes mencionada hemaglutinina de influenza con ácido siálico, glicoproteínas de envoltura como gp120 del HIV con CD4, la glicoproteína D del herpes simplex con HVE-A, gp42 del EBV con HLA-DR, etc.) mientras que los virus desnudos lo hacen a través de proteínas de la cápside (por ejemplo, las del hexón de los adenovirus con el receptor CAR, o la hendidura de la cápside [el antedicho "cañón"] de los rinovirus y enterovirus –incluyendo el virus polio– con el receptor específico, etc.). El papel de los carbohidratos en el ingreso a la célula es destacado, ya que ciertos virus pueden unirse a residuos de ácido siálico, mientras otros lo hacen a glicosaminoglicanos o a glicolípidos. El proteoglicano de heparán sulfato es la molécula reconocida por múltiples agentes (además del anteriormente mencionado herpes simplex) como HPV, dengue, paramyxovirus tipo 3, virus adeno-asociados, etc. Las interacciones con los carbohidratos celulares habitualmente sirven para la unión de virus, pero no promueven cambios en la estructura viral. En algunos casos, las interacciones virus-célula ocurren entre carbohidratos de la superficie viral (ligandos) con lectinas de la superficie celular, como se observa entre los residuos de manosa de las glicoproteínas del HIV, HCV, dengue, Ébola, y HCMV, con DC-SIGN y L-SIGN. El virus SV40 y los poliovirus interactúan con gangliósidos. Un bolsillo superficial de la proteína principal VP1 de la cápside de los poliovirus reconoce el disacárido ácido siálico α -2,3 galactosa unido a dichos gangliósidos.

Si bien existen similitudes entre la organización genómica, estructura y manifestaciones clínicas causadas por los arenavirus del Nuevo y Viejo Mundo, estos patógenos utilizan no sólo diferentes moléculas receptoras sino también distintas vías de internalización celular (véase más adelante). Así, los arenavirus del Viejo Mundo utilizan a la molécula de α -distroglicano (α -DG) –un receptor celular para proteínas de la matriz extracelular– mientras que los del Nuevo Mundo emplean al receptor 1 de transferrina (TfR1). Este último desempeña un rol preponderante en el metabolismo celular del hierro, expresándose en células del endotelio vascular y células del sistema inmune (Figura 5.21).

Sorprendentemente, el EBV adapta su composición de glicoproteínas de envoltura para "acomodarse" a los receptores presentes en linfocitos B y en células epiteliales. Dado que los LB exhiben moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (DR) en su superficie, EBV interactúa con ellas exhibiendo el trímero gH, gL y gp42, siendo esta última la molécula que se une a la CMH-II. Debido a que las células epiteliales no expresan CMH-II, las variantes de EBV con tropismo por dichas células, no exhiben en su superficie gp42. Este cambio molecular, permite que las variantes surgidas luego de la reactivación de la latencia en los linfocitos B, tengan tropismo por las células epiteliales de un

nuevo hospedero. De manera análoga, en el nuevo hospedero, las variantes que se producen en las células epiteliales y que contienen las 3 glicoproteínas de envoltura, pueden infectar LB, y así iniciar la latencia viral en dichas células.

Finalmente, el receptor celular para el erythrovirus (parvovirus) B19 es el antígeno P, un glucoesfingolípido que se encuentra en la membrana de células eritroides y actúa como antígeno de grupo sanguíneo. El receptor P está también presente en plaquetas, hígado, miocardio fetal, pulmón, riñón, endotelio, sinovia y en células de las vellosidades trofoblásticas del tejido placentario. En este último tipo celular la expresión del receptor exhibe niveles máximos en el primer trimestre del embarazo en las células de las vellosidades trofoblásticas, declinando subsiguientemente para ser indetectable hacia el final de la gestación. Esto último tiene importantes implicancias en la transmisión vertical de la infección por erythrovirus B19. Cabe destacar que este virus también puede ingresar a células de linaje no eritroide a través de la interacción con anticuerpos y receptores Fc por un proceso conocido como potenciación viral.

Curiosamente, aquellas interacciones moleculares que tornan estables a la partícula viral frente al estrés del ambiente extracelular, deben ser deshechas para posibilitar la propagación viral: la envoltura debe ser eliminada, la cápside abierta y el genoma descondensado.

Una vez que se produce la interacción entre receptores y ligandos, el resultado promovido es la internalización de la partícula viral a la célula ya sea por fusión de membranas o mediante endocitosis. Este último mecanismo regala a los virus un "viaje gratuito" al citoplasma. Ello tiene varias ventajas: a) no quedan rastros de glicoproteínas en la membrana celular que puedan ser detectadas por el sistema inmune; b) se atraviesa estructuras altamente organizadas presentes en el citoplasma y las barreras del citoesqueleto; y c) el ambiente ácido favorece el desnudamiento viral. Las partículas son habitualmente depositadas en estructuras endosómicas, o en lisosomas, RE, u ocasionalmente en el aparato de Golgi. Sin embargo, el riesgo de conducir a un virus a un callejón sin salida como es la vía muerta de los lisosomas donde se podría producir la degradación viral, ha hecho que los virus hayan desarrollado un sistema de fina regulación de su decapsidación en función del estado de la acidez ambiental (6-6,5 en endosomas tempranos o 5-6 en endosomas tardíos). El advenimiento de la video-microscopía permitió monitorear el destino de las partículas virales en el interior celular al utilizar compuestos fluorescentes "conjugados" a la partícula viral al producirse su acidificación y fusión a las membranas celulares.

¿Cómo y por qué ingresan a la célula los virus? Éstos deben "hacer saber" a la célula acerca de su presencia en la superficie de las mismas. Para ello, es necesario promover alguna señal. Esto se logra a veces mediante el entrecruzamiento de receptores, otras, mediante el agrupamiento de ciertas moléculas en la superficie. De ello surgen señales intracelulares en las que participan quinasas (tirosina- y serin-treonina-quinasas, PIP3 quinasas, etc.), fosfatasa, y GTPasas que activan diversas vías de señalización. Por dicha razón, muchos virus utilizan moléculas como las integrinas como receptores para disparar vías de señalización. En el caso de los adenovirus, la proteína del pentón (junto a la del hexón constituyentes de la cápside) interactúa con el receptor CAR y con integrinas, lo que media la fosforilación de la PIP3 quinasas, que mediante la activación de la GTPasa RAC y Cdc4 promueve la polimerización de actina y la endocitosis viral mediada por clatrina. En el caso de SV40, la señalización intracelular es mediada por 5 quinasas, las que sólo si son funcionales permiten el ingreso del mismo. Otros virus utilizan glicoproteínas de membrana tipo I y gangliósidos (unidos a la superficie externa de la membrana celular) como receptores, debido a que su agrupamiento se asocia a la formación de "balsas lipídicas" (del inglés *lipid rafts*: microdominios de membrana enriquecidos en colesterol) que activan tirosina quinasas del lado citosólico de la membrana. En modo análogo,

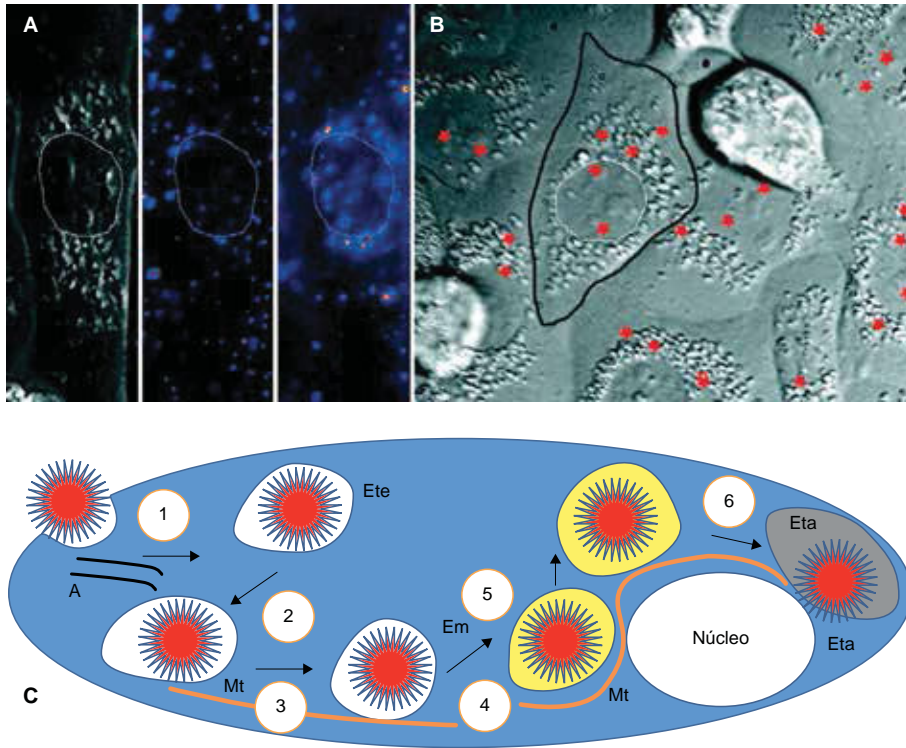


Figura 5.22. Imágenes fluorescentes y sitios de fusión de partículas individuales del virus influenza en células CHO. **A.** Imagen obtenida mediante microscopía de luz reflejada y contraste de interferencia diferencial (DIC) de una célula CHO (izquierda) e imágenes fluorescentes de virus teñidos con un colorante lipófilico (DID: 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina) al cabo de 2 min. (centro) y 15 min. (derecha) luego de iniciada la infección. La línea blanca demarca los límites del núcleo. **B.** Los sitios de fusión de partículas virales individuales se indican con estrellas rojas. Los bordes del núcleo están indicados con una línea gruesa gris y otra fina blanca, respectivamente. Los núcleos ovoides se visualizan cerca del centro de las células rodeados de estructuras vesiculares que exhiben alto contraste. Las estrellas que aparentan estar dentro del núcleo, probablemente indiquen eventos de fusión por encima o por debajo del mismo. **C.** Modelo de vía endocítica de transporte viral hacia los endosomas tardíos. El virus es internalizado y transportado a un endosoma temprano (Ete), en un modo actina (A)-dependiente (Etapa I del desplazamiento). El compartimiento endocítico que contiene el virus deja el Ete, aún con pH extracelular. Esto puede ocurrir ya sea mediante un transportador vesicular de partículas virales que brota del Ete o a través de la región tubular enriquecida en membrana endosómica que deja la zona de reciclado de endosomas, para conformar una estructura endocítica "más vesicular" conteniendo virus. Una u otra son transportadas a la región perinuclear mediante el transporte en microtúbulos (Mt) asociados a dineína (etapa II del desplazamiento). Dichas formaciones maduran a endosomas maduros (Em) cambiando el motor unido a la membrana (transición de la etapa II a la III). 5. Dicho Em madura aún más cambiando su pH a 6. La mayor acidificación, promueve el cambio a endosomas tardíos (Eta), donde el pH es igual a 5 (segunda acidificación) y gatilla la fusión entre éste y la envoltura viral. A y B. Imágenes obtenidas de la publicación de: Lakadamyali M, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 100:9280-5. 2003. La imagen C es una adaptación de la misma publicación. Reproducido con autorización.

algunos miembros de la familia de las Src quinasas (aunque no dicha quinasa) están asociadas a balsas lipídicas del lado citosólico de la membrana plasmática, y se activan ante su doble acetilación.

La penetración viral (ingreso de su genoma y de las proteínas accesorias a través de una membrana celular) ocurre de modo diverso según se trate de virus envueltos o desnudos: los primeros lo hacen mediante fusión, mientras los segundos lo pueden hacer luego de la endocitosis mediada por receptor, o directamente a través de la formación de poros en la misma.

La penetración de los virus envueltos y desnudos ocurre merced a cambios cooperativos generalmente irreversibles en sus respectivas superficies (envoltura ó cápside) que son gatillados por la unión a receptores celulares o por el bajo pH. En el caso de los virus envueltos, la fusión está asociada a la presencia de glicoproteínas de tipo I o tipo II en la superficie viral. Las primeras (como las hemaglutininas de influenza) se forman como homotrímeros unidos por sus respectivas colas, las que luego de unirse al receptor, exponen una región hidrofóbica que promueve la fusión. Ello ocurre debido a que si bien en el R.E. se sintetiza un precursor oligomérico estable, al atravesar el sistema de secreción celular, son clivadas mediante proteólisis, lo que le confiere una conformación

metaestable y con capacidad de fusión. Este estado metaestable permite una conversión cooperativa a una conformación de menor energía. Dicha nueva conformación espacial de la espícula de envoltura -al unirse al receptor- expone la región hidrofóbica que se ancla en la membrana celular. La energía libre liberada es utilizada para promover la aproximación focalizada entre la envoltura viral y la membrana celular e inducir la fusión. Las glicoproteínas tipo II, (como las que exhiben los flavivirus) poseen capacidad fusionante. Forman heterodímeros con otras proteínas de membrana. Luego de la unión al receptor, y promovida la endocitosis mediada por éste, ante un descenso del pH en los compartimientos endosomales, se disocian dichos heterodímeros y se reasocian las glicoproteínas con capacidad de fusión como homotrímeros activos con capacidad de fusión de membranas.

Ciertos virus envueltos como los herpesvirus y diversos retrovirus incluyendo HIV, pueden fusionar sus glicoproteínas de envoltura a la membrana citoplasmática sin dependencia del pH, lo cual habitualmente genera una infección productiva de la célula. Por el contrario, otros virus envueltos requieren de un pH ácido para la fusión de sus membranas; dependiendo del rango específico de cada uno, la fusión puede tener lugar en los endosomas

tempranos o tardíos. Ciertos virus requieren además del pH apropiado para fusionar sus membranas, la actividad de proteasas endosomales (catepsinas) para promover la penetración (coronavirus asociado al SARS, Ébola). La endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina si bien es habitualmente utilizada por la mayoría de los virus, no constituye una vía excluyente para el ingreso de un virus determinado. Estudios *in vitro* realizados con influenza, demostraron que un 60% de las partículas lo hacen por esta vía y un 40% mediante cavéolas (del latín: pequeña cueva; indentaciones de la membrana ricas en colesterol, esfingolípidos, caveolina y factores de señalización, en cuyo interior el pH es neutro). Sorprendentemente, la endocitosis dependiente de clatrina se observó sólo en grado mínimo (5%) asociada a fósitas preformadas rodeadas por clatrina. Parecería que existe una vía de señalización de transmembrana desde el receptor unido al virus hacia el interior celular que promueve la acumulación de clatrina subyacentemente al sitio donde se encuentran dichos receptores unidos al ligando viral. Desde las vesículas endocíticas los virus son transportados a poblaciones seleccionadas de endosomas. En el caso de influenza, lo hace mediante endosomas de transporte rápido a través del sistema de microtúbulos hacia la zona perinuclear (Figura 5.22), donde se promueve la fusión de membranas y la liberación del contenido. Este proceso es complejo, ya que se ha demostrado la participación de adaptadores, cofactores y proteínas de anclaje, necesarias para la formación de las vesículas y su transporte. Entre las quinasas, cumplen un rol primordial aquellas relacionadas con el ciclo y el crecimiento celular, el tráfico intracelular a través de membranas, y el citoesqueleto. Un porcentaje minoritario de las partículas de influenza, así como el virus LCM (un arnavirus) pueden ingresar a la vía mediada por endosomas mediante mecanismos clatrina-independientes (Figura 5.21 A).

Los **virus desnudos penetran habitualmente mediante endocitosis independientemente del pH** (como los adenovirus y los poliomavirus), aunque **en algunos casos pueden penetrar directamente a través de la membrana** citoplasmática (como lo hace polio). En el caso de los picornavirus (entre los que se encuentra polio), la interacción entre el "cañón" de la cápside y el receptor celular promueve la pérdida de la proteína precursora VP4, con anclaje de VP1 (que expone residuos de ácido mirístico) en la bicapa lipídica, la que forma un canal de transmembrana, a través de la cual ingresa el genoma viral. Los adenovirus del serotipo 2, ingresan a la célula luego de interactuar con el receptor CAR y el correceptor αV integrina, mediante un proceso dependiente de actina denominado **macropinocitosis**, aunque el proceso de endocitosis ocurre a través de las fósitas recubiertas de clatrina (Figura 5.21.B). La macropinocitosis es otra de las vías endocíticas conocidas. Es utilizada en un modo receptor-independiente para la captación celular de fluidos y macromoléculas. Los virus que ingresan inespecíficamente por dicha vía (como por ejemplo HIV [entre otras vías] en macrófagos (Figura 5.23) y células dendríticas, vaccinia, adenovirus, miembros de la familia *Picornaviridae* y otras familias) activan vías de señalización que gatillan cambios dependientes de actina en la membrana citoplasmática, que promueven una invaginación central, rodeada por dos protrusiones ondulantes laterales. Como resultado, se forma una gran vacuola de 0,2 a 3 μm (**macropinosoma**) que rodea a las partículas. Subsiguientemente, se produce a su través la descarga de virus o de nucleocápsides al citosol.

Existe otro mecanismo de ingreso a la célula clatrina-independiente: es el mediado por cavéolas, del cual existen tres variantes (dependientes de caveolina, de colesterol o de dinamina-2). Las cavéolas participan en el transporte de lípidos como colesterol, las glicoproteínas de anclaje tipo I y de componentes de las balsas lipídicas. Asimismo, las cavéolas median el transporte de factores séricos en células endoteliales mediante transcitosis. El SV40, luego de una fase inicial de desplazamiento lateral, ingresa a través de cavéolas, las que mediante la acción coordinada de aproximadamente 80 quinasas de la vía de señalización de integrinas y de regulación de actina, permiten la liberación de las partículas desde

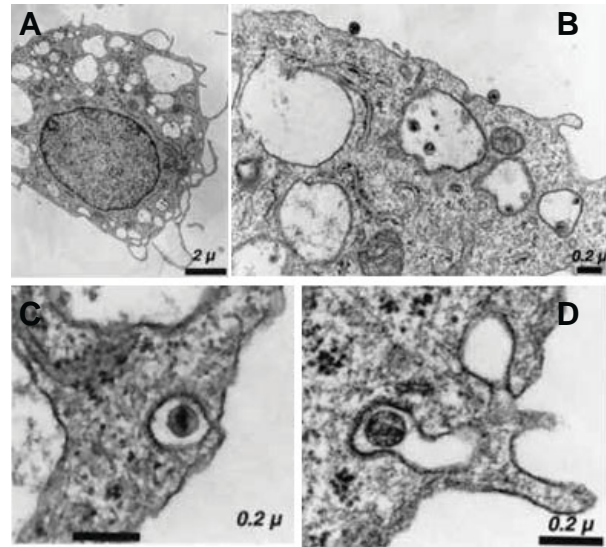


Figura 5.23. Ingreso del HIV a macrófagos mediante macropinocitosis. Macrófagos expuestos durante 30-45 minutos a la cepa HIV_{NLAD8} con tropismo para el correceptor CCR5 y luego procesados para el estudio por ME. **A.** Macrófago infectado. **B.** Mayor aumento de la imagen del cuadro A: se observan partículas virales unidas a la membrana celular y dentro de grandes vesículas intracelulares. **C y D.** Partículas del HIV-1 en fósitas recubiertas de clatrina. De: Maréchal V, *et al. J Virol* 75:11166-77, 2001. Reproducido con autorización.

el caveosoma al RE, utilizando la vía de translocación reversa de sustratos hacia dicha organela, que se usa habitualmente para la degradación de proteínas en el RE (Figura 5.21.C). En modo semejante, —aunque sin participación del RE— ECHO 1 es también transportado al interior celular.

Existen evidencias que las dos organelas que participan en la entrada de virus a la célula (endosomas y cavéolas) están interconectadas fisiológicamente, según lo sugiere el compartir algunas de sus quinasas en la señalización, y el transporte de sustratos entre ambas. Dado que se ha comprobado la activación compensatoria de una de dichas vías ante la inhibición de la otra, es comprensible que ciertos virus como influenza o SV40 puedan utilizar diversas vías, lo que les permite acceder a un amplio espectro de células ante diferentes condiciones.

Un viaje a lo desconocido: el virus tiene un pase libre para viajar en la célula. Una vez en el interior celular, los virus deben "encontrar su destino" ¿Cómo lo encuentran los virus en el interior celular? Al interactuar el virus con un receptor celular, se produce un **diálogo bidireccional entre la célula hospedera y la "visita" viral**. Como resultado, ocurren cambios conformacionales en la estructura de éste y señales intracelulares, mediadas por los diversos receptores (de factor de crecimiento epidérmico, de quimioquinas, integrinas, gangliósidos, etc.) que preparan a la célula para recibir al "visitante", facilitando su ingreso y promoviendo a veces el bloqueo de mecanismos de defensa. Algunos virus encuentran su destino en el medio discretamente ácido de los endosomas tempranos o tardíos, otros en el RE, otros en el Golgi, y unos pocos en el compartimiento post-secretorio. La información genética debe ser expresada para permitir su propagación en el hospedero y asegurar la cadena de perpetuación en la naturaleza. Las cápsides que arriban al citosol (es excepcional el caso en que el genoma lo hace desnudo, como se mencionó anteriormente con virus polio), no pueden atravesarlo por mera difusión, teniendo en cuenta su frecuente considerable tamaño, las "vastas" distancias a recorrer y la "congestión del tráfico" citosólico. Por ello, es habitual que las cápsides aprovechen la existencia de proteínas del citoesqueleto y del transporte celular. Las cápsides se transportan por dos siste-

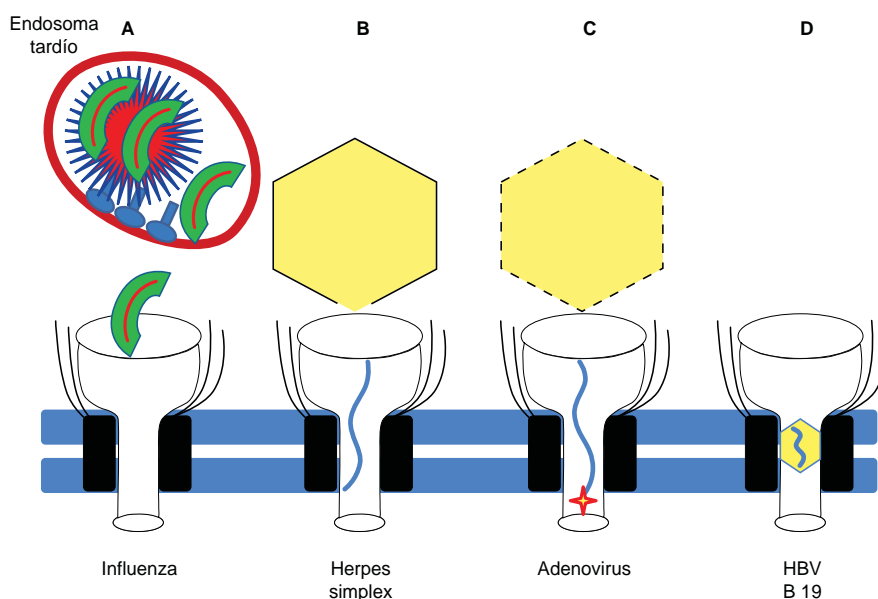


Figura 5.24. Transporte de partículas virales y cápsides al núcleo. Con fines didácticos, la imagen no está en escala. Se observan 4 posibles vías de entrada. **A.** El virus influenza (un RNA virus) es transportado por endosomas tardíos a la zona perinuclear, donde la acidificación del interior de aquéllos y luego, de la propia partícula (por activación del canal iónico proteico viral M2), permite la fusión de la hemaglutinina de envoltura a la membrana endosomal con liberación de las ribonucleoproteínas (RNPs) al citosol, subsiguiente interacción con la importina α e ingreso al núcleo a través del poro nuclear (el diámetro de las RNPs es menor que el de dicho poro). **B.** Las cápsides del virus herpes simplex-1 (un DNA virus envuelto) llegan hasta el poro nuclear, donde un vértice capsídico es abierto para permitir el paso del DNA viral al núcleo, dejando la cápside vacía anclada. **C.** El adenovirus (un DNA virus desnudo) llega al poro nuclear, donde la cápside interactúa con la proteína CAN/Nup214, y con la colaboración de la histona H1, es desensamblada, liberando el DNA viral al que está unido covalentemente una proteína (indicada con la estrella roja) atravesando ambas moléculas el poro. **D.** Los virus más pequeños como el erythrovirus (parvovirus) B19 o la cápside del virus hepatitis B, exhiben un diámetro inferior al del poro nuclear, por lo que pueden pasar a su través. El desnudamiento ocurre en el núcleo.

mas en este medio: a) por vesículas endocíticas que pasivamente las portan; y b) por verdaderas balsas, como son las **moléculas de dineína y su adaptador la dinamina**, dependientes del sistema de microtúbulos. Asociadas a ellas, pueden ir a su destino frecuente, el núcleo, como ocurre con casi todos los virus a DNA. También un virus a RNA como influenza alcanza dicha organela mediante la asociación entre las ribonucleoproteínas virales (que "protegen" a cada uno de los fragmentos del RNA viral) y la importina β (Figura 5.22). La **actina** puede tener dos roles diferentes y contrapuestos: a) ser un obstáculo más en el citosol, a modo de barrera, por lo que virus como SV40, promueven su propia disociación de los filamentos actínicos, mediante la activación de señales dependientes de tirosina-quinasas; y b) propulsar vesículas endocíticas conteniendo las cápsides en el citosol y también favorecer la brotación focalizada del virus en la membrana celular. Para que el genoma llegue al núcleo mediante la **unión de las cápsides o virus al complejo del poro nuclear**, se pueden promover al menos 4 estrategias (Figura 5.24): a) que la cápside o virus sea tan pequeña/o (menor a 39 nm) que atravesase dicho poro (HBV o erythrovirus B19, respectivamente, desensamblándose el primero en el lado nuclear de la canasta del poro nuclear); b) que las cápsides se ubiquen en el lado citosólico del poro nuclear y luego de abrirse un vértice, permitan el pasaje del DNA al núcleo, dejando liberadas cápsides vacías en el citosol (herpes simplex); c) que el virus desnudo se ubique en el lado citosólico del poro nuclear, anclado a la proteína Nup214/CAN, desensamblando su propia cápside por la interacción con la histona H1 y las importinas β y 7, facilitando el pasaje del DNA al núcleo, unido covalentemente a una proteína viral (adenovirus); y d) que luego de la fusión de la membrana de envoltura viral con las del compartimiento endosómico, las ribonucleoproteínas liberadas al citosol (a las que se asocian cada uno de los fragmentos del RNA viral), interactúen –como se mencionó anteriormente– con la importina β (influenza). Con la excepción de los lentivirus como HIV,

los retrovirus no utilizan el complejo del poro nuclear para ingresar al núcleo. Sólo pueden ingresar su complejo de pre-integración cuando las células carecen de membrana nuclear, como ocurre durante la mitosis, lo que limita su infectividad a células en división. En contraposición, HIV logra el pasaje a través del poro nuclear, merced a la presencia de 3 proteínas (la de matriz, la integrasa y vpr), y a una corta región de triple hélice del DNA proviral.

Parafraseando a Ari Helenius, el hecho que se produzca el ensamblaje de las partículas virales teniendo en cuenta la limitada información viral y la habitual múltiple compartimentación celular de dicho evento, implican un "testamento" singular de los designios estructurales del virus y una medida de la generosa asistencia de la célula.

Los virus envueltos habitualmente egresan mediante brotación y secreción. Los virus desnudos habitualmente lo hacen mediante lisis, aunque también pueden encontrarse ejemplos donde son eliminados de la célula mediante brotación al interior de organelas, con eliminación de la envoltura externa (como ocurre con los rotavirus), o bien al evitar los procesos de autofagia, ganando acceso a organelas excitadas, como ocurre con polio.

La existencia de virus que contienen glicoproteínas de fusión, permite que al estar ancladas en la membrana se produzca la fusión con células vecinas, dando origen a sincicios. Ello deviene en la posibilidad de transmitir la información genética viral a otra célula sin recurrir al habitual mecanismo de diseminación, que requiere la formación y egreso de viriones al exterior celular. Sorprendentemente, el virus varicela-zóster se disemina entre individuos como partícula viral libre, mientras que en un organismo determinado lo hace mediante la fusión de membranas contiguas, sin que se formen viriones para alcanzar dicho cometido.

En años recientes, se descubrió que la polarización de los linfocitos mediante los filamentos de actina, permite la transmisión de HTLV-1 entre dichas células. La estructura resultante se deno-

mina sinapsis infecciosa o sinapsis virológica. A diferencia de la que ocurre para la presentación antigénica, no requiere moléculas de histocompatibilidad. En dicha estructura se focaliza una cantidad de partículas para hacer eficiente la transmisión hacia la célula diana. Dicho evento ocurre también para la transmisión de los herpesvirus, así como del HIV entre linfocitos. Un ejemplo singular lo constituye la sinapsis virológica entre las células dendríticas y los linfocitos T, lo cual permite su infección en *trans*. Este evento es posible merced a la acción de lectinas tipo C como DC-SIGN y probablemente otras, que unen la partícula del HIV y la internalizan en vesículas endocíticas, sin promover la infección de la célula dendrítica. Mediante la "regurgitación" de las mismas al cabo de horas-días y al encontrarse la gp120 del HIV con el receptor CD4, se promueve la infección de los linfocitos que expresan dicho marcador. Las CD inmaduras y maduras envían las partículas virales a través de la vía endolisosomal hacia la sinapsis CD-linfocito T CD4⁺. Subsiguientemente, hay una segunda fase de transferencia desde las células dendríticas inmaduras mediante la síntesis viral *de novo*. Los eventos de trans-infección mediados por CD han sido también observados con herpesvirus, flavivirus (virus dengue), filovirus (Ébola) y otros. Ello significa que estos virus han encontrado un resquecio –verdadero talón de Aquiles– en la respuesta fisiológica del hospedero para montar la respuesta inmune inicial mediante la presentación antigénica. Es posible que esta estrategia tenga especial significado en aquellos virus que promueven infecciones latentes como herpes simplex o varicela-zóster, en los que la transmisión entre la célula neural y el epitelio debe realizarse a través de uniones estrechas entre ambas estirpes celulares.

Finalmente, existen factores que restringen la expresión de virus en una determinada célula. Ello no sólo puede deberse a la ausencia de receptores y o factores de transcripción. También puede ocurrir el empaquetamiento de moléculas que editan el RNA viral y que pueden actuar durante la transcripción inversa, impidiendo la síntesis de genomas "normales". Es el caso de la molécula APOBEC 3G, la que ha sido asociada a dicha restricción. Sin embargo, virus como HIV pueden sortear esta dificultad inhibiendo la misma mediante la proteína Vif (véase el ítem 6.3.1 *Bases genéticas y moleculares de la virulencia*).

6.3. MECANISMOS DIRECTOS DE LESIÓN CELULAR

En términos generales, los efectos de la infección viral en una célula pueden ser mediados por **cuatro mecanismos: 1) modificación de moléculas celulares; 2) adición de macromoléculas específicas virales a una estructura o complejo celular; 3) desarreglo o reorganización de estructuras celulares; y/o 4) construcción de nuevas estructuras celulares infectadas.**

La **lesión de la membrana celular** puede ocurrir por alteración de la permeabilidad o por inducción de sincicios.

La(s) causa(s) de **alteración de la permeabilidad de las membranas** infectadas con el consiguiente aumento del sodio y disminución del potasio intracelular son diversas; en algunos casos ello está asociado a la expresión de proteínas virales expresadas en la superficie de la célula. El ejemplo más reconocido es el de la proteína de matriz M2 de influenza A, que anclándose en la bicapa lipídica de la membrana celular forma un poro en ella (**viroporina**) funcionando como un canal de protones. En modo análogo, diversas proteínas del HIV (gp120 de envoltura, gp41 de transmembrana, Vpu, y Vpr) afectan la permeabilidad de membrana de diversas estirpes celulares formando algunas de ellas canales de membrana; por otra parte Nef afecta la concentración del K intracelular sin modificar el pH intracelular (Tabla 5.4).

La formación de **sincicios celulares** se observa ante la infección por diversos virus, como se mencionó en el ítem 5. La formación de sincicios en las infecciones por **virus sincicial respiratorio** y **parainfluenza 3** está asociada a la interacción de las respectivas proteínas F de fusión con una pequeña proteína celular con actividad de GTPasa denominada RhoA que facilita la formación sincicial, en asociación con la expresión de la citoqueratina 17. Este evento

ha sido postulado como un potencial blanco terapéutico. El sincicio promovido por el virus **sarampión** acaece cuando el péptido de fusión interactúa con la hemaglutinina H, formando un complejo fusogénico. El mismo es el responsable de lesiones *in vivo* con sincicios gigantocelulares en las hepatitis y neumonitis. Los sincicios producidos en la infección con **herpes simplex** son promovidos por la acción de glicoproteínas de envoltura (gE y gI), que interactúan con las membranas citoplasmáticas induciendo cambios en ellas, que inducen la formación de sincicios gigantes multinucleados (con inclusiones intranucleares) observados –por ejemplo– en las lesiones mucocutáneas asociadas. Asimismo, la formación de sincicios en las células infectadas con **HCMV** es principalmente debida a la interacción específica entre la glicoproteína viral gB (ubicada en una célula) y el complejo formado por gH/gL (ubicado en la célula contigua). Además de la interacción en *trans* antes mencionada es imprescindible la acción de moléculas de origen celular –no identificadas aún– que se expresarían en la superficie de ciertas estirpes celulares. Esto último explicaría el hecho de que HCMV no produce sincicios en todos los tipos celulares que infecta. HIV induce la formación de sincicios a través de sus glicoproteínas de envoltura gp 41 y gp 120. La formación de **sincicios por HIV en células *in vitro* se utiliza como marcador pronóstico de infección**, ya que aquellas cepas virales formadoras de sincicios se aíslan predominantemente en pacientes con una rápida progresión clínica y en estadios tardíos de la infección. Por el contrario, no es frecuente la detección de este efecto citopático *in vivo*. No obstante, se ha reportado el hallazgo de células grandes multinucleadas con detección intracitoplasmática de p24 en lesiones linfoepiteliales de la glándula parótida y en tejido linfoide hiperplásico del anillo de Waldeyer de pacientes con serología positiva para HIV.

La formación de estas células grandes multinucleadas *in vivo* permite el transporte intercelular de la progenie evitando la eventual acción de los anticuerpos neutralizantes, siendo éste un mecanismo más de evasión a la respuesta inmune utilizado por estos virus.

El **citoesqueleto cuenta con tres sistemas principales que controlan el tráfico de moléculas**: a) el de filamentos de actina; b) el de microtúbulos; y c) el de filamentos intermedios (proveen estabilidad mecánica a la célula). Las proteínas "motoras" de transporte llevan las diversas cargas a través de las "calles" de actina y las "autopistas" de microtúbulos. Dada la congestión del tráfico citosólico (300 mg/ml, ¡equivalente en viscosidad a la arena húmeda!), este sistema es crítico para múltiples procesos fisiológicos, y es usufructuado por múltiples virus. Algunos de ellos promueven **alteraciones sobre el citoesqueleto celular** ya sea mediante: 1) despolimerización de los filamentos por disminución del contenido de actina en los mismos (como ocurre con herpes simplex); 2) incorporación de componentes del citoesqueleto en estructuras celulares infectadas (por ejemplo, ciertos reovirus); o 3) interacción de moléculas virales y componentes del citoesqueleto (como ocurre, por ejemplo, con HIV al interactuar con los filamentos de actina al ingresar o egresar de la célula, y al secuestrar las moléculas motoras dineína y quinesina del sistema de microtúbulos, para el transporte de "larga distancia" de los componentes virales que entran y salen de la célula).

Los **cuerpos de inclusión** desplazan componentes celulares de lugares específicos alterando su normal actividad. Estos cuerpos frecuentemente consisten en fábricas de producción viral, conteniendo genoma y proteínas virales, así como partículas incompletas y/o viriones y membranas neoformadas. Estos cuerpos se visualizan, por ejemplo, en la infección por rabia (corpúsculos de Negri [véase la figura 9.14 del capítulo 9]) HCMV (intranucleares y ocasionalmente citoplasmáticos [figura 9.15 en dicho capítulo]), hepatitis C (cuerpos acidófilos citoplasmáticos), etc. Algunos virus a RNA como los reovirus, reemplazan la utilización de membranas celulares por la formación de cuerpos de inclusión (en este caso denominados virosomas) para focalizar el complejo replicativo viral. Diversos virus producen daño celular a través de la **inhibición de la síntesis de macromoléculas del hospedero**: entre ellos pueden

Proteínas	Localización	Función
Regulatorias		
Tat	Principalmente en el núcleo	Estimula la transcripción uniéndose a la secuencia TAR para promover el inicio y la elaboración del RNA viral.
Rev	Principalmente en el núcleo	Regula la producción de RNAm viral; al unirse a la región RRE facilita la exportación nuclear de transcritos de RNAm viral sin corte y empalme (<i>splicing</i>) o con un único sitio de <i>splicing</i> , permitiendo la síntesis de las proteínas estructurales.
Accesorias		
Nef	Citoplasma y membrana citoplasmática; Virión	Potencia la infectividad del virión. Puede aumentar o disminuir la replicación viral; inhibe la apoptosis de células CD4 ⁺ infectadas, y la promueve en linfocitos CD8 ⁺ que los reconocen; reduce la expresión de CD4 y CD8 en la superficie celular; inhibe la expresión de moléculas HLA principales (A, B, C) y estimula la de moléculas HLA-E, lo que altera el reconocimiento por los linfocitos T CD8 ⁺ y las NK, respectivamente.
Vif	Citoplasma	Aumenta la infectividad del virión; antagonista de la citidina desaminasa celular antiviral APOBEC3G; afecta el ensamblaje del virión y/o la síntesis de DNA viral.
Vpr	Virión	Detiene el ciclo celular en G2; facilita el ingreso del complejo de preintegración al núcleo.
Vpu	Proteína integral de membrana; perinuclear	Modula la liberación viral formando canales iónicos de membrana; interactúa con CD4 en el RE, impidiendo su expresión en superficie y promoviendo su degradación proteasómica; disrumpe la interacción CD4-glicoproteína 120 de envoltura.
Vpx	Virión	Facilita el ingreso del complejo de preintegración al núcleo; favorece el escape de la restricción proteasoma-dependiente en células dendríticas.

Tabla 5.4. Proteínas auxiliares del HIV.

mencionarse los picornavirus, herpesvirus y poxvirus. En otros casos, la **acumulación selectiva de componentes subvirales posee un efecto tóxico**, tal cual se ha demostrado con proteínas de la cápside de adenovirus.

Los eventos moleculares relacionados con la lesión celular por efecto viral directo están vinculados a **interacciones con los procesos celulares de transcripción, traducción, replicación del DNA y de maduración de proteínas**. En ciertos casos, la inhibición temprana de la síntesis proteica produce alteraciones en la replicación del DNA celular, pues ello requiere de proteínas de vida media corta. A su vez, esto altera la función de dicho DNA como templado para el RNA celular. Como consecuencia, se sintetiza cada vez menos RNAm de la célula hospedera y cesa el aporte de nuevos ribosomas. Sin embargo, la inhibición de la síntesis proteica obedece a causas no totalmente determinadas, ya que la disminución de proteínas celulares neoformadas precede a la disminución del RNAm celular. Se ha postulado un mecanismo que impediría que el RNAm celular localizado en el citoplasma sea traducido. En relación con ello, existen evidencias que sugerirían que los cambios de permeabilidad de la membrana inhiben más la traducción de RNAm de la célula hospedera que la de los RNAm virales. En etapas tardías, la simple acumulación de RNAm virales alcanza tal magnitud que la competencia con los RNAm celulares determina el cese de la síntesis proteica celular.

Diversos virus causan **alteraciones en los cromosomas** celulares. Ello fue inicialmente atribuido a la acción de enzimas lisosomales liberadas en estadios finales de células moribundas. Sin embargo, el DNA puede también fragmentarse como consecuencia del disparo de eventos apoptóticos, que a través de la activación de la caspasa 3 promueven la transformación –mediante clivaje proteolítico– de una DNAsa inactiva al estado activo, lo que genera la **fragmentación internucleosómica**. Los cuerpos apoptóticos son captados luego por células de estirpe macrofágica, lo que puede

facilitar la diseminación viral a otras regiones del organismo. A su vez, se han observado **translocaciones cromosómicas** en ciertos tumores asociados a virus que pueden indicar el sitio de inserción del proto-oncogén celular. Así, en el linfoma de Burkitt asociado al EBV, el oncogén *c-myc* puede ser translocado frecuentemente desde el cromosoma 8 hacia el locus de la cadena pesada H de inmunoglobulinas ubicado en el cromosoma 14: t(8;14). Dicho evento de translocación es mediado por la proteína celular AID (*Activation Induced cytidine Deaminase*) al formar los cortes en el DNA bicatenario, tanto del gen de Ig como del oncogén a translocar. Un evento de translocación t(8;14) en el cromosoma 14 se observa también en los linfomas No-Hodgkin asociados a la infección persistente por HCV (véase la figura 24.5.14 en el capítulo 24.5).

En otros casos, la **integración del genoma viral puede asociarse a la activación de genes críticos en la oncogénesis**: tal es el caso del genoma a DNA de HBV y de HPV al integrarse en regiones regulatorias críticas del gen codificante de la ribonucleoproteína telomerasa (hTERT: *human Telomerase Reverse Transcriptase*), involucrada en la inmortalización celular, evento imprescindible para la tumorigénesis. Sin embargo, estudios muy recientes documentaron que **no sólo los virus a RNA con transcriptasa inversa** (como los retrovirus HIV o HTLV) **pueden integrarse al DNA celular como provirus, sino también pueden hacerlo virus a RNA no retrovirales**, como se observó con el RNA del virus LCM, que luego de la recombinación ilegítima con el DNA de un retrotransposón denominado IAP (*Intracisternal A Particle*), promovió la síntesis del DNA complementario del RNA viral, el que se integró en el genoma celular dentro de un elemento IAP. Este inesperado hallazgo ha derribado otro dogma de la biología.

Ya se ha mencionado que la infección viral de una célula no causa necesariamente su lisis. Así, diversos arenavirus y el HBV son ejemplos clásicos de virus no citopáticos *in vivo* (el HBV no es

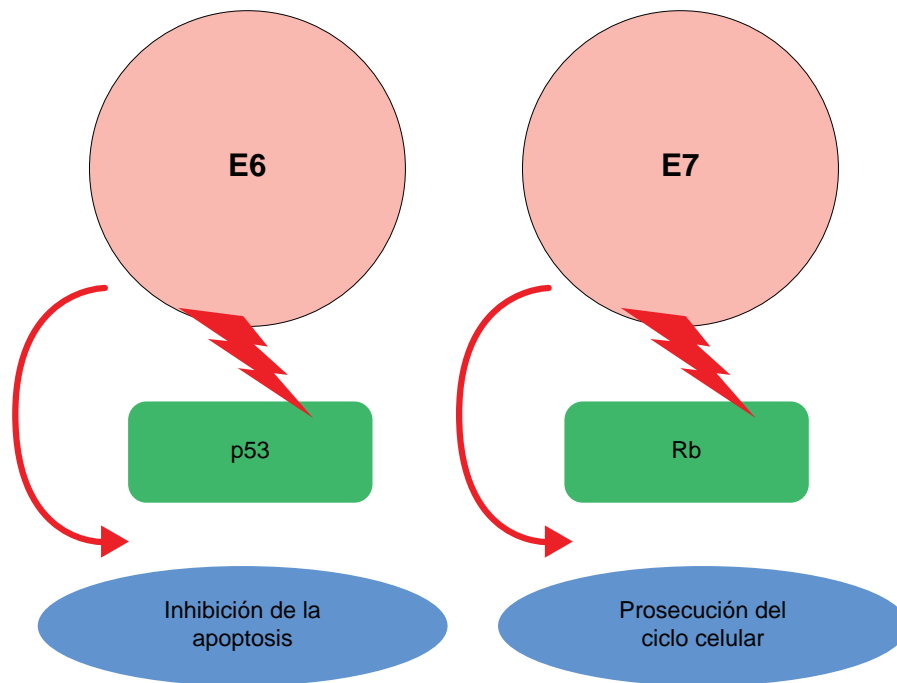


Figura 5.25. Principales efectos de las proteínas no estructurales tempranas E6 y E7 de genotipos de alto riesgo oncogénico del virus papiloma humano. Los tipos 16, 18 y 31 son los más frecuentemente asociados a tumores genitales. E6 inhibe la apoptosis celular mediante la inactivación proteasómica de p53. E7 promueve el pasaje G2 → M del ciclo celular, al secuestrar a Rb, lo que libera al factor de transcripción E2F necesario para dicho evento.

citopático en individuos inmunocompetentes). **En general, los virus no citolíticos que producen enfermedad lo hacen mediante mecanismos inmuno-mediados (véase el ítem 6.4).** Sin embargo, asombrosamente, en la infección experimental de ratones lactantes con el arnavirus LCM, si bien la producción de la progenie viral no causa la muerte celular, pueden producirse también **alteraciones de algunas funciones "de lujo"** celular, como la **inhibición parcial de la síntesis de hormona de crecimiento en células hipofisarias**, lo que deviene en una menor tiempo de supervivencia de los ratones infectados. Este efecto resulta de la actividad de una glicoproteína de envoltura viral que se asocia al tropismo de LCM por el epitelio glandular, y de la nucleoproteína viral que inhibe la síntesis de RNAm de la hormona.

Algunos virus como HBV o HPV pueden luego de décadas de infección persistente, promover también la **oncogénesis por mecanismos que incluyen la inactivación de proteínas codificadas por genes supresores de tumores (como p53 o Rb)**. Desempeñan un rol crítico en dicha inactivación las proteínas X del HBV y las proteínas tempranas E6 y E7 del HPV.

Como resultado de la **infección persistente por HPV**, pueden ocurrir **lesiones benignas hiperplásicas papilomatosas, o eventualmente (con la adición de cofactores inherentes al hospedero) desarrollarse lesiones malignas**. Existen 4 etapas en el desarrollo tumoral: a) la infección inicial del epitelio metaplásico en la zona de transición de los epitelios (zona de transformación cervical); b) la persistencia viral; c) la progresión de los epitelios persistentemente infectados hacia lesiones precancerosas; y d) la invasión a través de la membrana basal del epitelio. Las infecciones precancerosas se establecen al cabo de 5-10 años, en menos del 10% de las infecciones nuevas. El cáncer invasor puede ocurrir luego de muchos años, y aun décadas en una minoría de las mujeres con lesiones precancerosas, alrededor de los 35-55 años de edad, como consecuencia de la actividad de las **proteínas virales no estructurales E6 y E7 que promueven la inactivación de las proteínas supresoras de tumores p53 y Rb (retinoblastoma) respectivamente (Figura 5.25), y de cambios epigenéticos que silencian la transcripción génica mediante la metilación del**

DNA viral y celular en sitios ricos en los dinucleótidos CpG.

Otros virus a DNA pueden también asociarse a tumores, tales como el ya mencionado linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo o el linfoma inmunoblástico (EBV), o el sarcoma de Kaposi (HHV-8). También se pueden asociar a la génesis de tumores al menos dos virus a RNA, como se observa en un número muy limitado del total de infecciones por el retrovirus HTLV-1 (leucemia T del adulto) y en un significativo porcentaje de las infecciones crónicas por el virus hepatitis C (carcinoma hepatocelular y ciertos linfomas B). Se ha observado que el **EBV, el HBV y el HCV también inducen la inestabilidad cromosómica en los tumores** respectivamente generados, mediante la formación de radicales libres en la célula infectada. En el caso del EBV, la proteína EBNA-1 habitualmente presente en todos los tumores asociados a este virus (por ejemplo, el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo o el linfoma de Hodgkin), promueve en los linfocitos un aumento de la expresión de la subunidad catalítica Nox2 de la enzima NADPH oxigenasa que produce especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas ROS causan aberraciones cromosómicas, formación de cortes en el DNA bicatenario celular y participación de la respuesta de daño al DNA (Figura 5.26). Dicho daño es semejante al producido por los oncogenes celulares c-Myc y Ras que promueven una replicación aberrante, mediante el aumento del número de replicones activos y/o por la alteración de la progresión de la horquilla de replicación del DNA. Los ROS oxidan también a proteínas y lípidos, a través de los cuales afectan una plétora de vías de señalización entre las que se incluyen el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis.

Esta sucinta enumeración de algunos mecanismos de lesión celular muestra el **variado espectro de patogenicidad que distintos virus pueden ejercer sobre una célula u órgano determinados. Ello también ocurre al transpolar dichos efectos al hospedero.** Cabe subrayar, sin embargo, que la patogenicidad *in vitro* de los virus no se corresponde inequívocamente con la observada *in vivo*. Así por ejemplo, el virus rabia no produce efecto citopático en cultivos, mientras que resulta casi siempre letal *in vivo*. Por el contrario, muchos serotipos de virus ECHO inducen efecto citopático notorio en diversas

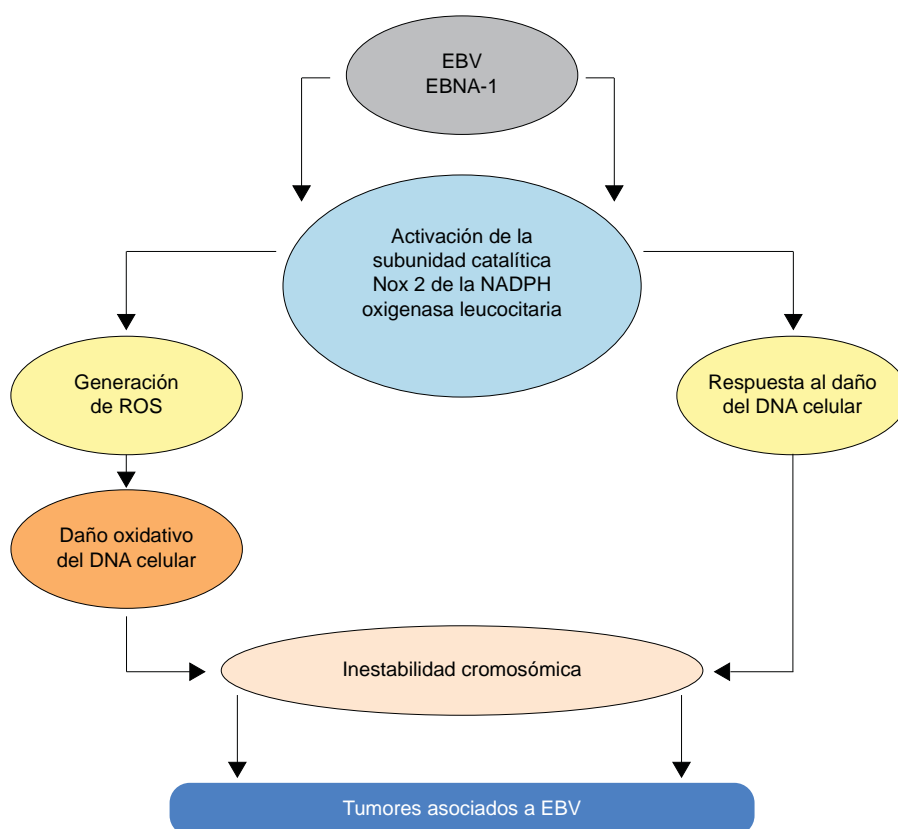


Figura 5.26. Inestabilidad cromosómica celular promovida por el virus Epstein-Barr. La proteína EBNA-1 induce la activación transcripcional de la subunidad Nox2 de la NADPH oxigenasa leucocitaria, lo cual se asocia a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la respuesta al daño del DNA celular. Como consecuencia, se produce la inestabilidad cromosómica asociada a rupturas del DNA bicatenario, y formación de cromosomas dicéntricos.

líneas celulares pero no causan habitualmente lesiones *in vivo*. El efecto patogénico del virus **polio** en motoneuronas del asta anterior de la médula espinal –mediante la inhibición de la maquinaria biosintética celular– se traduce en la destrucción de las mismas con el consiguiente **impedimento funcional de los músculos inervados** (polio paralítica). A su vez, los **rinovirus** producen la **muerte de células del epitelio nasal y del tracto respiratorio inferior lo cual favorece en un territorio susceptible, la sobreinfección bacteriana**. El virus **rubéola** puede infectar células embrionarias humanas sin causarles daño aparente, aunque su velocidad de crecimiento puede estar alterada, lo cual podría inducir un **retardo en la morfogénesis y el crecimiento de diversos órganos**. Ciertos rotavirus atípicos son causales de gastroenteritis asociadas a la formación de sincicios gigantes en el epitelio de las vellosidades intestinales.

Hasta aquí se han descrito algunos mecanismos directos de lesión celular. Sin embargo, diferentes cepas de un mismo virus pueden producir en el hospedero un grado diverso de lesión. Ello depende de determinantes moleculares y genéticos de virulencia de cada virus.

6.3.1. Bases moleculares y genéticas de la virulencia

Con el extraordinario avance de las técnicas de biología molecular y el consiguiente análisis de secuencias genómicas virales ha sido posible en algunos casos establecer las bases de la virulencia de ciertos virus (Tabla 5.5). El lector es referido a los capítulos específicos para una visión más global de los ejemplos que se incluyen a continuación, así como de los que aquí no se mencionan.

Polio. Al compararse la secuencia nucleotídica de la cepa parental virulenta de polio P3/León/37 con una derivada vacunal Sabin P3/12 a'b y una tercera cepa que había revertido a la virulencia, se observaron sólo 10 nucleótidos diferentes. Se pudo determinar que la neurovirulencia de la cepa parental, así como

la de aquella que revirtiera a la virulencia estaba asociada a la presencia de citosina (C) en la posición 472 en el extremo 5' del RNA –región no codificadora de proteínas– en contraposición con el uracilo (U) observado en la cepa vacunal (Figura 5.27). Se postula que el mecanismo por el cual una región no codificadora de proteínas induce la neurovirulencia, estaría asociado a dicha modificación de la secuencia nucleotídica, la que podría promover una alteración en la estructura secundaria del RNA viral, que –a su vez– afectaría su procesamiento posterior con factores celulares iniciadores de la traducción. La presencia de U en lugar de C en la cepa vacunal Sabin altera la interacción de la región genómica adyacente con la proteína PTB (*Polypyrimidine Tract Binding protein*), disminuyendo la eficiencia de traducción de la poliproteína viral en cepas atenuadas, lo cual limitaría la producción viral. Se han descrito otras regiones importantes para la neurovirulencia de los 3 serotipos de polio: la posición 480 en el extremo 5' de la región no codificadora del serotipo 1; la secuencia codificadora de los aminoácidos 95-101 de la proteína de la cápside VP1 en el serotipo 2 y la posición 2034 de la región codificadora de la proteína VP3 en el serotipo 3.

Junín. De manera análoga a los estudios realizados con la vacuna Sabin para polio, investigadores argentinos del grupo de Víctor Romanowski han comparado la secuencia nucleotídica del fragmento genómico L de las cepas virulentas de Junín XJ44 y XJ13 con la cepa vacunal atenuada Candid 1, utilizada para prevenir la Fiebre hemorrágica argentina. Al analizar la secuencia aminoacídica de las proteínas codificadas en el fragmento L, se documentaron 12 mutaciones puntuales en la proteína L características de la cepa vacunal. Por el contrario, el otro gen codificado en este fragmento (Z) se mantuvo conservado entre todas las cepas analizadas. Esto permite hipotetizar que esos 12 cambios de aminoácidos podrían estar asociados al fenotipo atenuado. Un estudio

VIRUS	FACTOR	EFEECTO
Polio	Mutación U472C en la región 5'UT	Neurovirulencia
Junín	12 cambios de aminoácidos en la proteína L	Atenuación en la cepa vacunal Candid 1
Rabia	Arg333 o Lys333 en el sitio antigénico III de la glicoproteína G	Virulencia
Dengue	Variantes no caracterizadas molecularmente de NS1	Contribución al aumento en la permeabilidad vascular → Fiebre hemorrágica y choque por dengue
HBV	Mutaciones A1762T y G1764A en el Promotor Básico del Core (PBC)	Asociado a hepatitis crónica activa y a mayor riesgo de desarrollar HCC en los genotipos A-D
Influenza	Serie de aminoácidos básicos (Arg) en el sitio de clivaje de la hemaglutinina por proteasas celulares	Permite la replicación viral en tejidos por fuera del tracto respiratorio → Enfermedad más grave
Rotavirus	Unión de NSP4 a un receptor celular	Enterotoxina viral → Diarrea secretoria
Coxsackie B	Proteasa 2A	Clivaje de la distrofina en miocardiocitos → miocardiopatía dilatada
Ébola	VP 35 con R en posición 312 del dominio de unión a IRF-3	Inhibe IRF-3 → extrema virulencia (90% de mortalidad)

Tabla 5.5. Factores asociados a la modificación de la virulencia viral: algunos ejemplos.

semejante con el fragmento S de la cepa Candid 1, permitió mapear las mutaciones de esta cepa vacunal respecto a otras en las regiones codificantes de las glicoproteínas de envoltura y la nucleoproteína de la cápside, habiéndose reportado que 2 cambios aminoacídicos en la glicoproteína G2 y 1 en la nucleoproteína N resultan respectivamente en la pérdida de 4 y 2 giros β de la estructura secundaria en lámina plegada exhibida por otras cepas, por lo que también podrían ser considerados marcadores de atenuación.

Rabia. En este caso, la presencia de los aminoácidos básicos arginina o lisina en la posición 333 del sitio antigénico III en la glicoproteína G se asocia a la virulencia, mientras que su sustitución por otros aminoácidos produce variantes atenuadas. Se desconoce el mecanismo de dicha atenuación aunque se ha postulado una diseminación y penetración al SNC más lenta al no poder invadir ciertas fibras nerviosas. Asimismo, el reemplazo en la fosfoproteína P viral del sitio de unión a la cadena liviana de dineína (LC8; una molécula involucrada en eventos de motilidad intracelular) potencia la atenuación antes mencionada.

HTLV. La expresión genómica de los retrovirus es regulada por elementos ubicados en la región 5' terminal (*Long Terminal Repeat* o LTR). El virus de la leucemia T humana (HTLV-1) al igual que otros miembros del género *Deltaretrovirus* (HTLV-2, HTLV-3 y HTLV-4) codifica en los genes *tax* y *rex* proteínas no estructurales regulatorias que actúan en *trans*: las proteínas homónimas Tax y Rex. La proteína **Tax regula la transcripción genómica** mientras Rex promueve el procesamiento y exportación nuclear del RNA viral, evento que es impedido por la proteína viral p30 (¡un verdadero Yin-Yang viral!). Existen evidencias que asocian a **Tax con el inicio de eventos que promueven el desarrollo de la leucemia T del adulto**, así como a la paraparesia espástica tropical. Esta proteína se une a otras (o a sus precursores) que tienen capacidad de unión a regiones del DNA potenciadoras de la transcripción (*enhancers*), activando así la transcripción de diversos genes celulares. Por el contrario, Tax trans-suprime la expresión de la DNA-polimerasa beta, asociada al proceso de reparación del DNA.

Dado que Tax es un importante blanco de la respuesta inmune, su expresión no es significativa en etapas tardías de la infección, como ocurre en pacientes con leucemia T del adulto, habiéndose establecido que otra proteína (codificada en la cadena complementaria del DNA proviral de HTLV-1) denominada **HBZ** (*HTLV-1 Basic leucine Zipper*) está asociada a la **mantención de la leucemia (Figura 5.28)**. **HBZ es estimulada por Tax, aunque el efecto es dependiente del sitio de integración proviral. A su vez, HBZ inhibe el efecto transactivador que ejerce Tax sobre los genes virales.** Tax es una proteína que puede interactuar con una miríada de proteínas celulares, para lo cual **posee múltiples sitios con una estructura intrínsecamente desordenada**. Ello permite a la proteína adoptar diferentes conformaciones, actuando cada subregión de la misma como módulos independientes, interactuando con distintas proteínas según la localización subcelular.

Tax interactúa con una serie de componentes de varias vías de señalización celular (MAP quinasas, JNK, proteínas G, AP-1, etc.). Entre los múltiples procesos promovidos por Tax se destacan los siguientes: 1) la activación y proliferación celular (por aumento de la actividad –entre muchos factores– de NF κ B (que por ejemplo promueve la expresión de IL-2 e IL-15) y E2F, así como de la quinasa PI3-K y disminución de la de la fosfatasa supresora de tumores PTEN [*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10*]); 2) la inhibición de la apoptosis (inhibiendo a las proteínas pro-apoptóticas p53 y Bax, y estimulando a las anti-apoptóticas Bcl-XL, IAP [*Inhibitor Apoptotic Protein*], survivina y FLIP [*FLICE Inhibitory Protein*] (inhibidoras de la apoptosis) y de genes supresores de tumores (TGF- β , p53 y PTEN); 3) la inestabilidad cromosómica (asociada al aumento de PCNA [*Proliferating Cell Nuclear Antigen*] y a la consiguiente inhibición (a altas concentraciones de Tax) del sistema de reparación del DNA mediado por NER [*Nucleotide Excision Repair*], así como a la translocación al citosol de la proteína MAD-1 (*Mitotic Arrest Deficiency-1*); 4) la inmortalización celular (mediante el aumento de la subunidad catalítica de la transcriptasa inversa celular telomerasa o hTERT

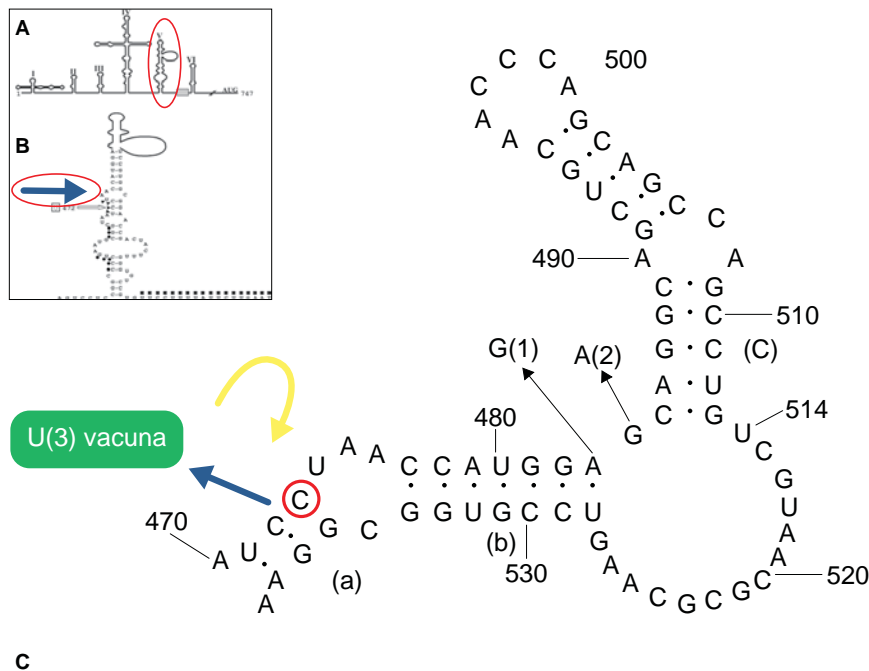


Figura 5.27. Esquema predictivo de la estructura secundaria del dominio V (nucleótidos 471 a 538) de la región 5' no codificante del poliovirus tipo 3 (cepa P3/Leon) y su relación con la neurovirulencia y la atenuación viral. A. Región 5' no codificante del RNA viral: se indica con el óvalo rojo el dominio V, el que se observa con mayor detalle en la imagen B. La flecha indica el sitio de la posición 472, crítica para la atenuación o virulencia del serotipo 3. C. Las flechas muestran la localización de las mutaciones asociadas a la atenuación de los serotipos 1, 2 y 3 de la vacuna Sabín, aclarado entre paréntesis. La mera sustitución de C x U en la posición 472 del serotipo 3, se asocia a la atenuación. Sin embargo, la reversión a la virulencia puede ocurrir (reemplazo de UxC). Dicho infrecuente evento, se asocia a los casos de polio parálisis observados en aproximadamente 1 de cada 3 millones de individuos vacunados con la vacuna Sabín. Debido a diferencias en las secuencias, la base 483 ocurre en el residuo 480 de la secuencia de Sabín 1, mientras que la 484 comprende el residuo 481 de la secuencia de serotipo 2 de Sabín. Las regiones con apareamiento de bases se designan como a, b, y c. De: Macadam AJ, *et al. J Virol* 80 (17): 8653-63. 2006. Reproducido con autorización.

(human Telomerase Reverse Transcriptase); 5) el rearrreglo del citoesqueleto (por sobreexpresión de la quinasa PI3-K e inhibición de la(s) fosfatasa(s) PTEN y/o SHIP [*Src Homology 2 domain containing Inositol polyphosphate Phosphatase*]), lo cual genera la lobulación nuclear característica de los LT de los pacientes con leucemia T del adulto); 6) la angiogénesis (asociada al aumento plasmático de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) y a la actividad de MMP9 [*Matrix Metallo Proteinase*] en las células endoteliales que mediante su actividad de gelatinasa disrumpe la membrana basal endotelial, permitiendo la extravasación de LT infectados a los tejidos diana; 7) la invasión al tejido óseo (por aumento de la actividad de RANKL-1 [*Receptor Activated NFκB Ligand*] que promueve la diferenciación de células progenitoras a osteoclastos, lo que promueve la reabsorción ósea y la consiguiente hipercalcemia. Otros eventos en los que Tax está directamente involucrada son la migración celular (interactuando con pequeñas GTPasas del citoesqueleto) y la formación de la sinapsis virológica.

Tax transactiva la transcripción del genoma de HTLV-1 actuando sobre la región LTR, y es imprescindible para la replicación (Figura 5.29). Inicialmente Tax libera al genoma de la actividad de proteínas represoras de la transcripción, como la histona deacetilasa-1 (HDAC-1) y/o la histona metilasa (HMT) al interactuar con ellas. Para esta transactivación viral se requiere un *enhancer* compuesto por tres secuencias de 21pb repetidas. Esta secuencia contiene un elemento de respuesta al cAMP (*cAMP Response Element* o CRE), la que junto a otra región contigua "corriente arriba" permite la transactivación del genoma proviral.

Entre los genes celulares transactivados se encuentran el de la cadena α del receptor para IL-2 (IL-2r α) y el de la cadena homónima del receptor para IL-15 (IL-15r α), el de las citoquinas IL-2, IL-13 e IL-15, el factor de crecimiento tumoral β (TGF-β), los on-

cogenes *c-fos* y *c-erg*, y el factor estimulador para la formación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). La expresión de moléculas HLA-I está aumentada por Tax en células gliales pero no en linfocitos T, donde –por el contrario– otra proteína viral (p12) inhibe su expresión en la membrana citoplasmática. Análogamente al requerimiento del *enhancer* de 21pb para transactivar la transcripción del genoma del HTLV-1, se necesita la secuencia *enhancer* a la que se une el factor transcripcional NFκB (*Nuclear Factor kappa B*) para transactivar los genes codificantes de IL-2, IL-2r α, IL-15, IL-15r α, TGF-β, GM-CSF, y el elemento de respuesta SRE (*Serum Responsive Element*) para los oncogenes *c-fos* y *c-erg*. El factor NFκB es –a su vez– activado por Tax al promover su liberación del complejo formado por dicho factor con la proteína IκB (que lo mantiene secuestrado en el citoplasma), mediante la fosforilación de ésta por la quinasa IKK (*IκB Kinase*), la que constitutivamente es activada en las células infectadas por HTLV-1 por TAK-1 (*TGF-β Activator Kinase*). Tax no sólo activa TAK-1, sino también promueve el reclutamiento de IκK hacia TAK-1, para favorecer su interacción.

A la región genómica proviral dentro del LTR que contiene el elemento de respuesta CRE se pueden unir diversas proteínas de la familia CREB/ATF. Entre ellas se encuentran la proteína CREB (*cAMP Response Element Binding*), CREM (*cAMP Response Element Modulator*), ATF (*Activating Transcription Factor*), etc. Estas proteínas tienen la posibilidad de unirse simultáneamente al DNA y a otras proteínas. Ello es posible merced a poseer tanto un dominio básico de unión al genoma celular en forma de homodímeros o heterodímeros de modo análogo al de un cierre tipo cremallera –mediado por estructuras de leucina (*leucine zipper structures*)–, y otro con el que pueden formar un complejo con Tax. Una vez estabilizados los complejos sobre el promotor ubicado en

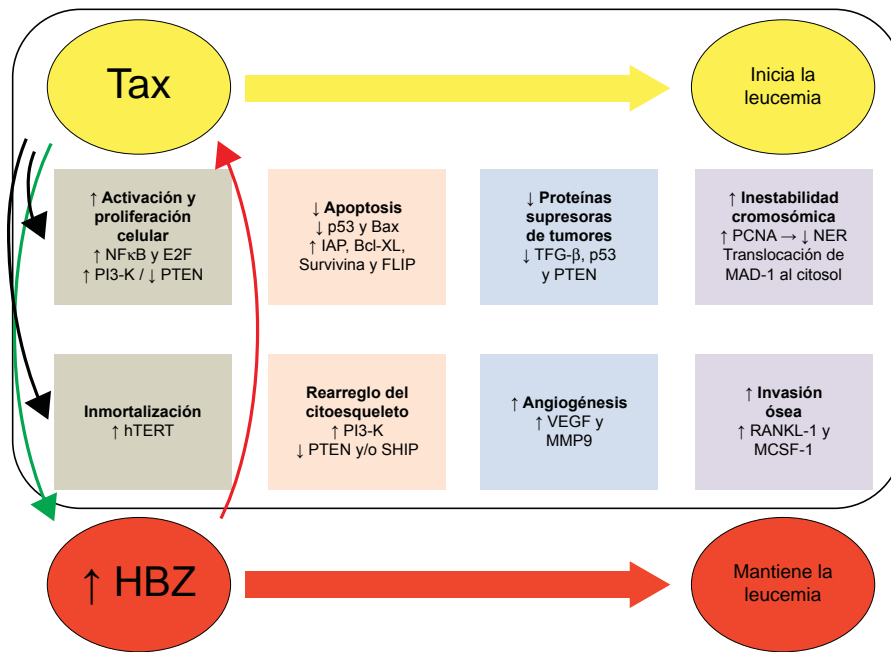


Figura 5.28. Efectos generales promovidos por la proteína Tax de HTLV-1. Múltiples vías de señalización reguladas por Tax (flechas negras) promueven la leucemogénesis y la invasión tumoral de otros tejidos como el óseo. Tax estimula también la expresión de HBZ (codificada en la hebra complementaria del DNA proviral; flecha verde) para mantener la leucemia. HBZ inhibe la actividad de Tax (flecha roja). Se indica el origen de algunas abreviaturas provenientes del inglés: **NFκB**: Nuclear Factor κ B; **PI3-K**: Phosphatidy Inositol 3 Kinase; **PTEN**: Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10; **Bax**: Bcl-2 Associated X protein; **Bcl-XL**: B cell lymphoma-extra Large; **IAP**: Inhibitor Apoptotic Protein; **FLIP**: FLICE Inhibitory Protein); **TGF-β**: Tumor Growth Factor; **PCNA**: Proliferating Cell Nuclear Antigen; **NER**: Nucleotide Excision Repair; **MAD-1**: Mitotic Arrest Deficiency-1; **hTERT**: human Telomerase Reverse Transcriptase; **SHIP**: Src Homology 2 domain containing Inositol polyphosphate Phosphatase; **VEGF**: Vascular Endothelial Growth Factor; **MMP9**: Matrix Metallo Proteinase; **RANKL-1**: Receptor Activated NFκB Ligand (véase la explicación en el texto).



el LTR proviral, Tax atrae factores que modifican las histonas y remodelan la cromatina. Esto permite la interacción genómica con factores de transcripción del aparato basal, que se unen a la región TATA dentro del LTR. Dicho complejo se estabiliza totalmente mediante la interacción de Tax con los factores TFIIA, TFIID y TBP (TATA Binding Protein). Una vez formado el complejo inicial, comienza la transcripción. Para continuar con la fase de elongación, es necesaria la fosforilación del dominio carboxílico de la RNA polimerasa II, evento ejecutado al reclutar Tax al factor P-TEFb (P-Transcription Elongation Factor b). La interacción entre Tax con miembros del complejo SWI/SNF (Switch/Sucrose Non Fermentable) evita la detención de la elongación transcripcional al permitir el acceso de diversos factores transcripcionales al DNA.

El extremo carboxílico de la proteína Tax contiene un conglomerado de aminoácidos ácidos, cuya delección se asocia a su inactivación funcional. Este dominio ácido se asemeja funcionalmente —aunque no es idéntico— al activador de *enhancers* VP16 (Trans-Inducing Factor α o α-TIF) de los herpesvirus.

En síntesis, Tax activa indirectamente la expresión de diversos genes virales y celulares.

HIV. No se conocen con precisión las bases moleculares que se correlacionen con variantes en la patogenicidad del virus HIV. Durante la fase aguda de la infección, ocurre una masiva depleción de la población de linfocitos T CD4⁺ CC35⁺ de memoria ubicados en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal, lo que conduce a un importante e irreversible daño funcional de la respuesta inmune mediada por la población de CD4⁺. La emergencia de una potente, pero finalmente ineficaz inmunidad humoral y celular anti-HIV, conduce a la fase crónica, caracterizada por un control sólo parcial de la replicación viral, activación celular persistente y merma progresiva del *pool* de linfocitos T *naïve* y de memoria, así como depleción de los linfocitos T CD4⁺ circulantes.

En común con otros retrovirus, HIV posee genes que codifican

la *core* (*gag*), la transcriptasa inversa, proteasa e integrasa (*pol*) y la envoltura (*env*). HIV además posee una serie de genes que codifican proteínas auxiliares regulatorias (Tat y Rev) y accesorias (Nef, Vif, Vpr, Vpu [para HIV-1], y Vpx [para HIV-2]), cuya localización, principales funciones y significado de sus denominaciones se indican en la Tabla 5.4. Sólo se hará énfasis aquí en los aspectos más relevantes de algunas de ellas y en el papel crucial de Nef y Vif en la patogénesis.

La actividad de Tat y Rev es esencial para la replicación. El DNA proviral contiene en sus extremos secuencias repetidas largas (LTR o *Long Terminal Repeats*) que funcionan como promotores de un bajo nivel basal de la transcripción. En el LTR existen sitios para la unión de múltiples factores de transcripción celular, como NFκB. Su liberación desde el citoplasma en las células activadas (disociándose de su inhibidor IκB), puede explicar la necesidad de dicha activación para la replicación del HIV. Tat transactiva la transcripción uniéndose a secuencias específicas del RNA viral denominadas TAR (Figura 5.30). Dicha unión permite una mayor procesividad de la RNA polimerasa II celular y por ende sintetizar los RNAm de tamaño completo en lugar de moléculas correspondientes a eventos de transcripción truncada. La expresión de Tat en ratones transgénicos induce lesiones semejantes a las observadas en el sarcoma de Kaposi, una lesión tumoral inducida por el HHV-8 en pacientes con SIDA, cuyo genoma es transactivado por Tat. Esta proteína puede inhibir la maquinaria enzimática de síntesis de microRNAs (miRNAs) celulares, así como la de RNA silenciadores virales con polaridad opuesta a los mensajeros del HIV denominados HAA (HIV Antisense initiator Antisense RNA) generados a partir de un elemento promotor HIVaNR (HIV antisense Initiator) presente en la cadena sentido del DNA proviral en ambos LTRs. Dichos miRNAs/siRNAs virales pueden regular la expresión de los RNAm virales, mediante la exacta complementariedad de sus bases con el comienzo y al final de la secuencia de dichos mensajeros. Por ende,

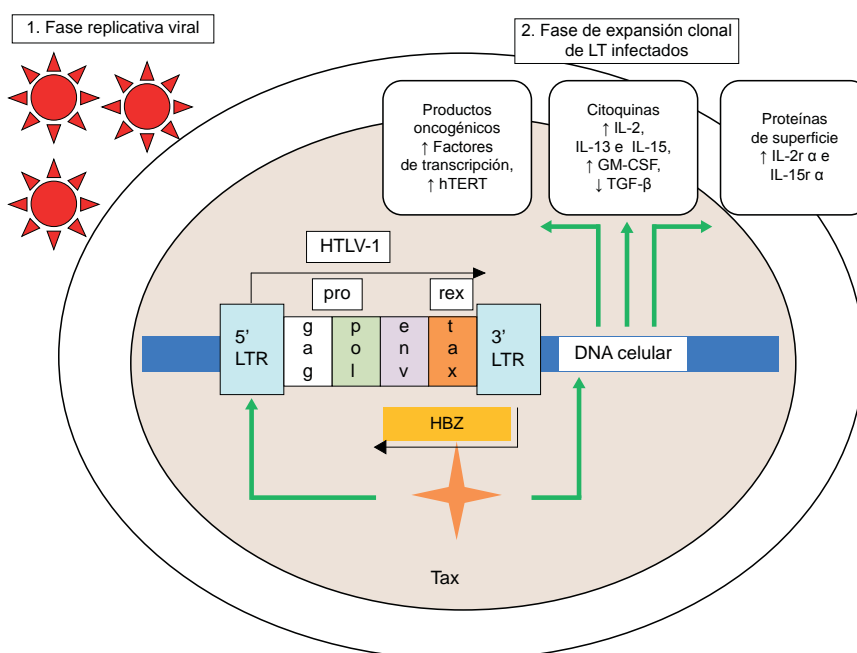


Figura 5.29. Efectos promovidos por la proteína Tax de HTLV-1. (1) En una primera etapa de promoción de la replicación viral la proteína Tax transactiva genes virales, uniéndose al potenciador (*enhancer*) de la transcripción ubicado dentro del LTR proviral. En un 5-10% de los individuos con infección persistente por HTLV-1, se produce la proliferación clonal de los linfocitos T (LT) infectados. Tax promueve la expresión de ciertos genes celulares pro-oncogénicos (inhibiendo la de aquellos que inhiben la transformación, como TGF-β), de citoquinas, así como de subunidades de sus receptores. Los promotores de algunos de estos genes poseen sitios potenciadores de la transcripción donde se une el factor NFκB (*enhancer* NFκB) y otros exhiben la secuencia SRE (*Serum Responsive Element*). Tax forma heterodímeros con la subunidad p50 de NFκB y promueve la expresión de los genes que poseen la secuencia de DNA del potenciador homónimo. A través de las citoquinas indicadas y sus respectivos receptores expresados en superficie se promueve la proliferación celular. El circuito IL-2 / IL2r induce un aumento de la expresión de la subunidad catalítica de la transcriptasa inversa celular telomerasa (hTERT), necesaria para la inmortalización celular.

los miRNAs son secuencias de RNA no codificantes que regulan la expresión génica. De lo expuesto, se infiere que Tat afecta no sólo aquellos miRNAs que obran como mecanismo celular de defensa específico contra HIV, sino el entorno global de los mismos en la célula infectada.

Las proteínas regulatorias Tat y Rev, y la accesoria Nef son sintetizadas inicialmente en la infección celular, mediante RNAs que exhiben 2 eventos de corte y empalme (*splicing*). Rev reconoce una región del RNA correspondiente al gen *env*, denominada RRE (*RNA responsive element*) que favorece la exportación nuclear de los RNAs que tienen dicha secuencia (en una hebra elongada inicialmente gracias a Tat y "sin tiempo" suficiente para que actúe totalmente la maquinaria de corte y empalme celular), lo que promueve la síntesis de la totalidad de las proteínas del HIV (Figura 5.30).

Nef es un factor viral necesario para la total virulencia del HIV, lo que resulta "nefasto" para el hospedero. Su expresión impulsa al menos 6 acciones críticas en la patogénesis: **1) promueve la internalización y degradación de CD4 en la superficie celular por la vía endosomal/lisosómica; 2) inhibe selectivamente el transporte a la membrana celular de ciertas moléculas del CMH-I (HLA-A más que -B, pero no de otras como HLA-C y -E), lo cual afecta el reconocimiento de las células infectadas con HIV por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, así como por células NK; 3) inhibe la expresión de HLA-II y de receptores para quimioquinas en la superficie celular; 4) promueve la activación celular mediante la interacción con la quinasa Pak-2 (*p21 activated kinase*); 5) aumenta la infectividad del HIV; y 6) inhibe la apoptosis de los LT CD4⁺ infectados promovida por Fas o TNF-α (a través de la vía Ask-1-dependiente) y promueve la de los linfocitos CD8⁺ que los reconocen (mediante la vía Fas/FasL, al aumentar la expresión de estas últimas en los CD4⁺), pero la promueve en dichas células mediante el aumento de expresión de PD-1 (Figura 5.31).**

Lo expuesto deviene en una alteración significativa de la respuesta inmune adaptativa.

La remoción de moléculas CD4 de la superficie celular es posible merced a que Nef una vez miristilado se ancla en la membrana plasmática, y promueve la disociación de p56^{LCK} (también denominada LCK) del complejo formado entre ésta y la cola citoplasmática de CD4. Al unirse a la proteína adaptadora AP-2, Nef también promueve un incremento en la formación de fositas de clatrina, dentro de las cuales se internaliza CD4, para iniciar su endocitosis y subsiguiente degradación lisosómica. La regulación negativa que Nef ejerce sobre las moléculas CD4 es independiente de su capacidad para incrementar la infectividad del HIV e inhibir la expresión de ciertas moléculas del CMH en la superficie celular. Esta **inhibición de la expresión de ciertas moléculas CMH-I se produce mediante una aceleración de la endocitosis de las mismas y un retardo en el reciclado hacia la superficie**. El primer evento está mediado por la inicial interacción entre Nef y la proteína celular PACS-2 (*Phosphofurin Acidic Cluster Sorting protein 2*) que al ser desplazada a la red del trans-Golgi, produce una cadena de eventos de fosforilación disparados por un miembro de la familia de las *src* quinazas (tirosina-quinazas) denominado SFK que promueve la fosforilación de Zap70-Syk y consiguientemente la unión de ésta con la Fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K), lo cual incrementa el nivel de PIP₃ y estimula la actividad del factor de intercambio nucleotídico de guanosina ARNO y la carga de GTP en la molécula ARF6 (*ADP-Ribosylation Factor 6*). El **retardo del reciclado de moléculas del CMH-I** hacia la superficie celular involucraría la formación de un complejo ternario entre la molécula del CMH-I, Nef (como puente facilitador) y la proteína celular API1, lo cual relocaliza a la primera en la región perinuclear. Sin embargo, la inhibición de CMH-I no es totalmente eficaz, ya que el hospedero monta una respuesta inmune citotóxica contra

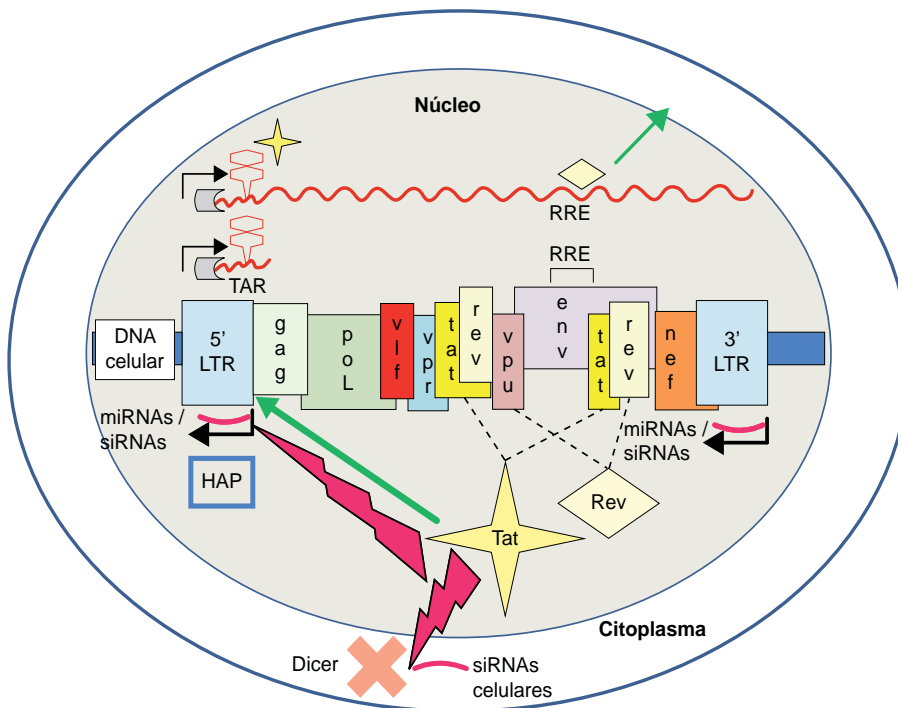


Figura 5.30. Esquema del genoma proviral del HIV y efectos de las proteínas reguladoras Tat y Rev. Los diversos genes virales están flanqueados por regiones repetitivas largas (5' y 3' LTRs) que poseen secuencias necesarias para la iniciación (promotores) y terminación transcripcional. El 5' LTR es reconocido por la maquinaria celular, ya que posee sitios de unión para diversos factores de transcripción celular (como las regiones genómicas potenciadoras [enhancers] de NFκB, Sp1, etc.), aunque exhibe un bajo nivel de actividad promotora. La diferente disposición vertical de los genes indica su correspondencia con cada uno de los tres marcos de lectura ubicados en una misma cadena. Las proteínas Tat y Rev (al igual que Nef) se sintetizan como resultado de eventos de corte y empalme (*splicing*). Tat reconoce y se une a una secuencia de RNA (TAR: *Trans-Activating Response element*) que forma una protuberancia con aspecto de asa-rulo ubicada inmediatamente corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción. En ausencia de Tat se produce una transcripción abortiva. Su presencia incrementa la procesividad y facilita la elongación del RNA. Al sintetizarse el RNA íntegro, se alcanza a producir una secuencia de reconocimiento para REV, denominada RRE (*Rev Responsive Element*), merced a lo cual se produce la exportación nuclear del RNA sintetizado. Rev contrarresta el efecto supresor de la exportación asociado a secuencias desestabilizadoras ricas en A/U, presentes en las regiones genómicas *gag* y *pol*. En la misma región del DNA proviral que codifica TAR (la subregión repetida R) y hasta la subregión U3 (*Untranslated 3'*) dentro del LTR, pero en sentido opuesto, existe un elemento promotor iniciador transcripcional antisentido (en inglés *HIV antisense initiator* o *HIVaINR*) del que deriva un RNA antisentido (*HIVaINR antisense RNA*), a partir del cual se codifica(n) la(s) proteína(s) HAP (*HIV Antisense Protein*). El RNA sintetizado puede operar también como un precursor de miRNAs / siRNAs virales complementarios a las primeras bases del RNA viral (con polaridad sentido), regulando su expresión. TAT puede suprimir o inactivar (por interacción directa) la actividad de los RNA silenciadores de la propia expresión de los genes del HIV y también regular la producción de algunos siRNAs celulares (y potencialmente virales) al inhibir a la RNasa III celular Dicer que los genera en el citoplasma.

HIV, aunque la misma no logra limitar la infección. La **activación celular por Nef está asociada a la unión y activación de la quinasa PAK2**, que fosforila la proteína reguladora del citoesqueleto MERLIN (*Moesin-Ezrin-Radixin-Like Protein*) encargada de unir a la actina con las glicoproteínas de la membrana celular. El **aumento de la infectividad promovido por Nef** está asociado a tres potenciales acciones: a) **inhibir la barrera de actina que impide el ingreso viral**; b) **evitar que las cápsidas que entran a la célula sean degradadas en el proteasoma**; c) **inhibir una proteína celular (aún no caracterizada) que interfiere con la interacción entre la envoltura viral y la molécula CD4, impidiendo su producción celular e incorporación al virión**.

La expresión de **Vif** está críticamente vinculada a la **infectividad del HIV**, ya que su ausencia deviene en la generación de partículas defectuosas con múltiples cápsidas. Su **acción principal** está mediada por la **inhibición de la proteína celular APOBEC3G** (*Apolipoprotein B mRNA-Editing Catalytic polypeptide 3G*), una citidina desaminasa que experimentalmente puede convertir células permisivas para HIV en no permisivas. APOBEC3G transforma residuos de dC en dU del DNA del HIV en un contexto de dinucleótidos dCdC, con un gradiente decreciente de actividad desde el extremo 5' al 3' de la hebra (Figura 5.32). Estas mutaciones tornan

defectuoso el molde para la síntesis del RNA genómico, pues en lugar de incorporarse a éste un residuo G, lo hará una A, reduciendo la aptitud replicativa (*fitness*) del genoma. APOBEC3G es activa al unirse a hebras de DNA monocatenario, aunque también puede unirse al RNA monocatenario, sin activarse. Esto último es importante pues APOBEC3G no sólo promueve la hipermutación de la cadena negativa de DNA sintetizada, sino que también —en ausencia de Vif— es incorporada al virión, al unirse al RNA viral. APOBEC3G también tiene actividad antiviral independiente de su actividad como desaminasa. Vif promueve su inhibición tanto al inducir su degradación proteasómica luego de atraer al complejo E3 ubiquitina-ligasa (*Cullina-5/elongina B/elongina C/Rbx1*), como también por mecanismos independientes del proteasoma.

HBV. La transcripción del RNA pregenómico del HBV es controlada por el promotor del *core*, el cual consiste en un promotor básico del *core* (BCP) y dos elementos regulatorios, uno positivo (RE [+]) y otro negativo (RE [-]). El BCP contiene el sitio de unión principal para una variedad de factores de transcripción incluido el factor nuclear hepatocitario 4 (HNF4) y el factor de transcripción 1 de uno de los promotores de la albúmina de pollo (COUP-TF1). **Las mutaciones más frecuentemente detectadas en el BCP son A1762T y G1764A**, las cuales reducen la unión del COUP-TF1 al

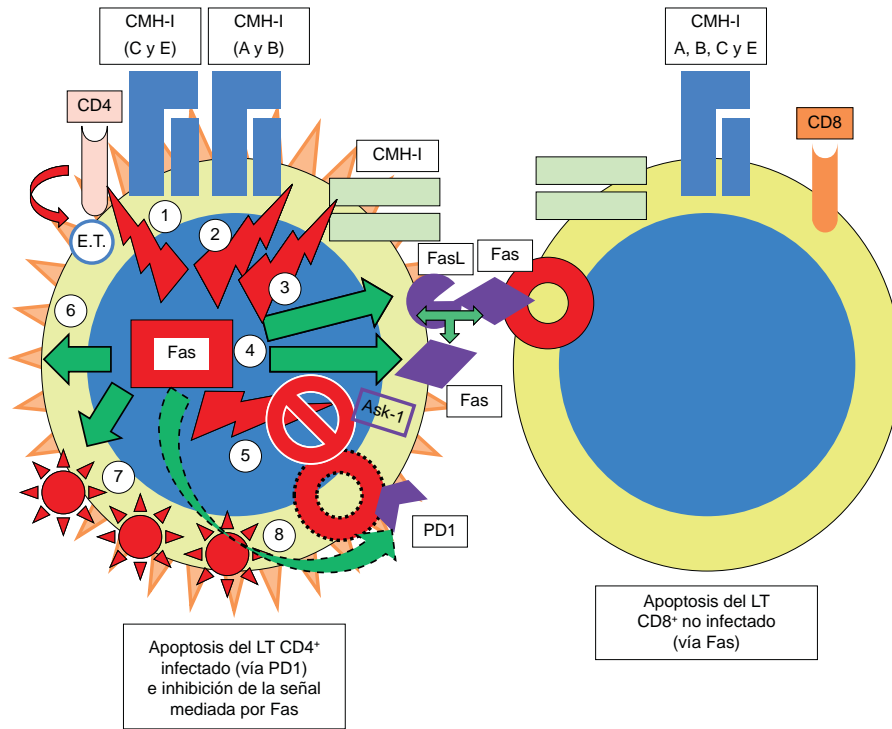


Figura 5.31. Efectos de la proteína Nef del HIV. La miristilación de Nef promueve la remoción de moléculas CD4 de la superficie celular. También inhibe la presentación de algunas moléculas de histocompatibilidad de clase I (A y -en menor medida- B, pero no C ni E) y II en la membrana plasmática. Nef también aumenta la infectividad del HIV y promueve la activación de los linfocitos T CD4+. Mediante la interacción Fas/FasL induce la apoptosis de los LT CD8+ que reconocen a los CD4+ infectados.

Corpus Editorial

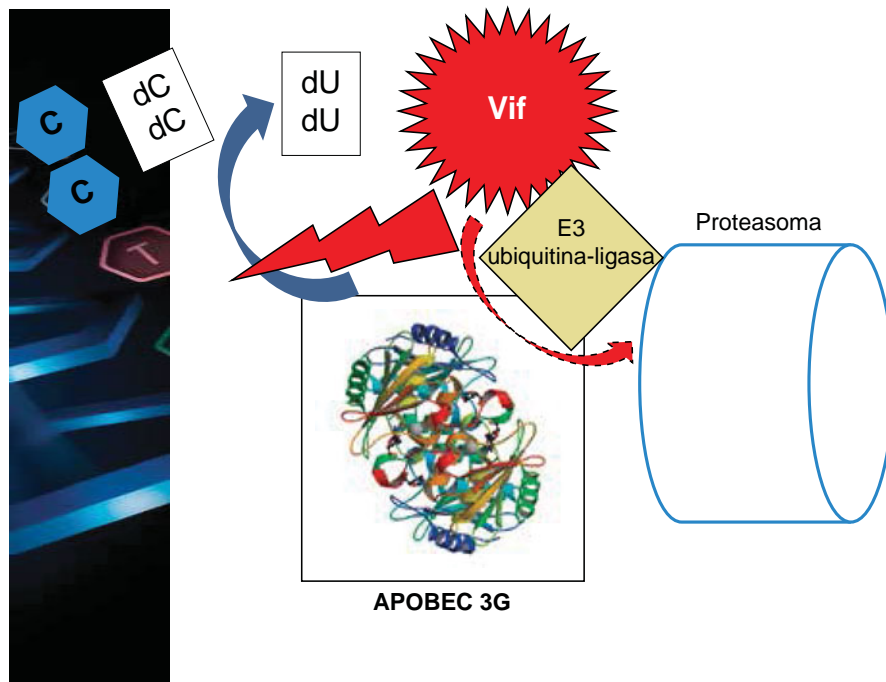


Figura 5.32. Inhibición de la citidina desaminasa celular APOBEC3G por la proteína Vif del HIV. APOBEC3G se une al DNA proviral monocatenario promoviendo la sustitución dC por dU, lo que hará que el RNA viral luego sintetizado incorpore una A, en lugar de una G (hipermutación G → A), afectando su funcionalidad. También puede unirse al RNA monocatenario viral incorporándose al virión. Vif promueve la inhibición de APOBEC3G por mecanismos dependientes e independientes de su degradación en el proteasoma.

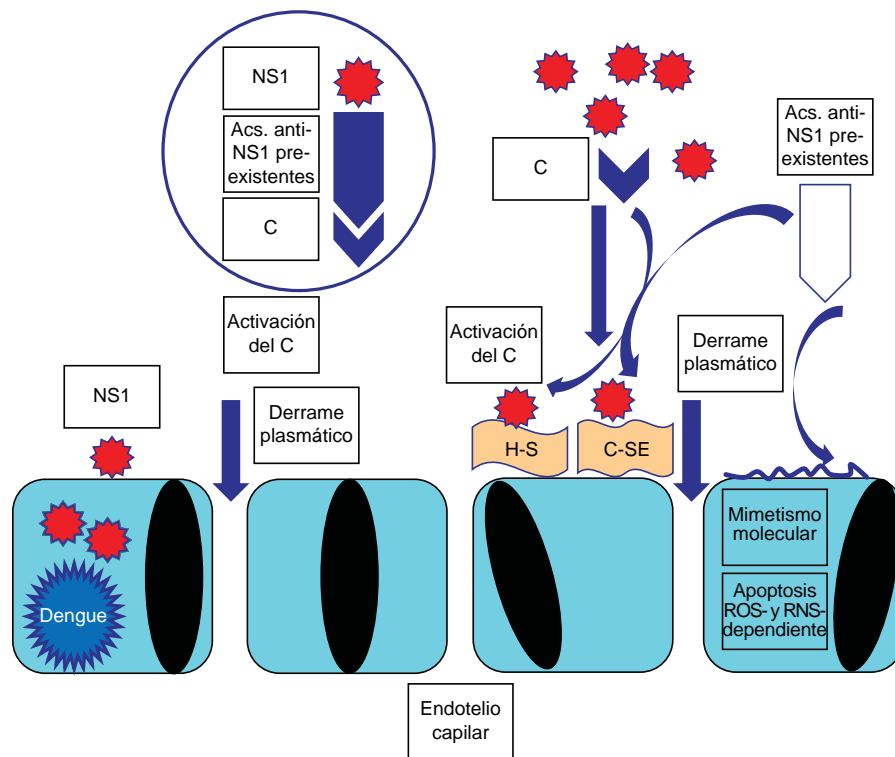


Figura 5.33. Participación de la proteína no estructural 1 (NS1) del virus dengue en el derrame plasmático observado en casos graves de la enfermedad homónima. El choque y la fiebre hemorrágica por dengue están parcialmente promovidos por la activación del sistema Complemento (C). La formación de inmunocomplejos (NS1 y anticuerpos [Acs] específicos pre-existentes por una infección anterior) en circulación o sobre la superficie endotelial activa la cascada del sistema complemento, aumentando la permeabilidad capilar. Debido al mimetismo molecular, los anticuerpos anti-NS1 también reconocen antígenos expuestos en la superficie de las células endoteliales, lo que desencadena mecanismos apoptóticos, con participación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). H-S: heparán sulfato; C-S E: condroitín sulfato E.



BCP y generan un nuevo sitio de unión para el factor de transcripción específico del hígado HNF1. Estos cambios en la unión a factores de transcripción probablemente sean la causa de la disminución en los niveles de RNAm de pre-core y en la síntesis de HBe Ag observada en estudios de transfección *in vitro* con variantes que poseían estas dos mutaciones. Algunos autores postulan un aumento en la replicación debido a estas mutaciones, ya que –contrariamente a lo que ocurre con las mutantes e⁻ (también denominadas e⁻ minus)– las **mutaciones A1762T y G1764A** son más frecuentes en pacientes con hepatitis crónica activa antes y después de la seroconversión HBe Ag → anticuerpos anti-HBe. Estas mutaciones, están **asociadas a un peor curso evolutivo de la infección en pacientes infectados con ciertos genotipos (A, B, C y D) del HBV** (véase el Capítulo 24.3).

La proteína X del HBV (HBx) se comporta como un transactivador de la transcripción de genes virales y celulares, a la vez que modula el Ca²⁺ citosólico, promueve la actividad del factor transcripcional STAT-3, acelera el paso por los puntos de chequeo del ciclo celular, y estimula la actividad de la telomerasa (ribonucleoproteína asociada a la inmortalización), eventos que promueven la tumorigénesis. En ratones transgénicos, la sola expresión de HBx produce el hepatocarcinoma. A su vez –y como consecuencia del solapamiento del BCP y del gen x– las mutaciones A1762T y G1764A se traducen en cambios aminoacídicos en la proteína HBx. HBx mutada une eficazmente a HNF1 *in vivo*, aumentando la unión al DNA y el efecto transactivador de este factor, justificando que aquellos pacientes con infección crónica por una cepa de HBV que presenta estas mutaciones tienen un mayor riesgo de desarrollar hepatocarcinoma celular.

La proteína HBx salvaje se comporta como un transactivador de la transcripción para genes no sólo del HBV, sino también de

otros virus como HIV, sobre el que también promueve un aumento de la replicación. En este caso, su acción transactivadora sobre el promotor ubicado en el LTR proviral del HIV es sinérgica con la proteína transactivadora Tat de éste, lo que podría contribuir a una progresión más rápida al SIDA en los pacientes coinfectados con HIV-HBV.

Dengue. La glicoproteína no estructural 1 (NS1) de este virus es un factor importante tanto en la replicación del genoma viral como en la alta virulencia de este agente. Se la puede encontrar tanto en el compartimiento intracelular –co-localizando con el RNA viral doble cadena (forma replicativa)– como en el exterior celular en su forma soluble. La acumulación de NS1 soluble en suero de pacientes infectados –así como los niveles elevados de IFN- α , TNF- α e IL-10– se correlaciona con la gravedad de la enfermedad y es por esto que se ha postulado que esta proteína contribuiría con los cambios de permeabilidad vascular a través de la activación de la cascada de complemento dependiente de anticuerpos, observados en los pacientes con fiebre hemorrágica y choque por dengue (Figura 5.33). Si bien no se han dilucidado aún los mecanismos exactos mediante los cuales la proteína NS1 soluble se presenta en la superficie de células infectadas y no infectadas, se ha postulado para estas últimas la unión de la proteína viral a glicosaminoglicanos (heparán sulfato y condroitín sulfato E) que se encuentran en la superficie celular, principalmente en células endoteliales. Se ha demostrado que la exposición de NS1 sobre la superficie de células endoteliales presenta una marcada especificidad por hígado, riñón, pleura y peritoneo, a diferencia de intestino o cerebro. Lo anterior explicaría el selectivo derrame vascular que ocurre en las infecciones graves por dengue y que estaría relacionado con la relativa habilidad de las células endoteliales de los diferentes tejidos para unir a la NS1 soluble

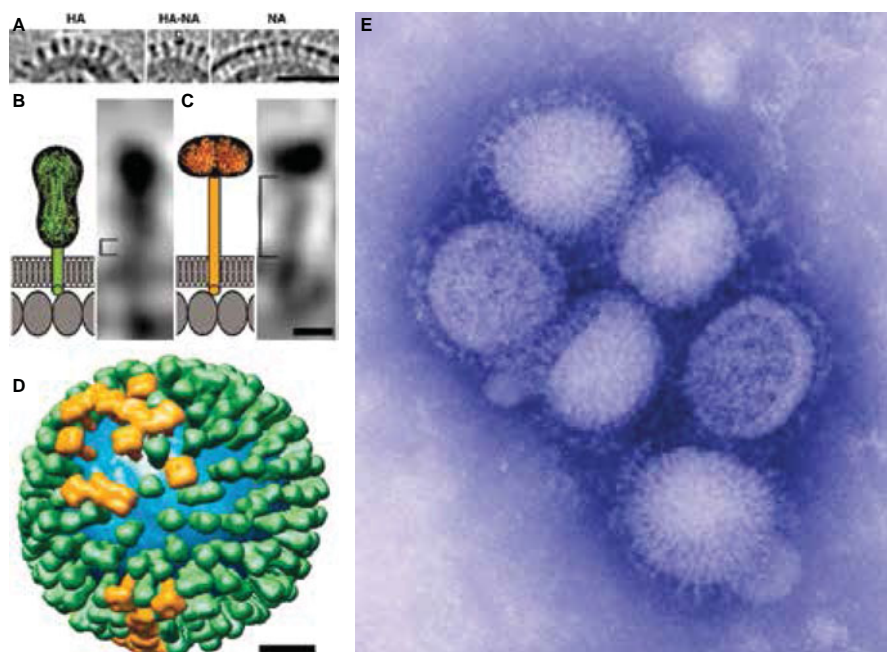


Figura 5.34. Virus influenza. A-D: distribución de las hemaglutininas (HA) y neuraminidasas (NA) en la superficie del virus influenza, según su disposición espacial. Se observa un *cluster* de hemaglutininas (panel "A", a la izquierda), una molécula de neuraminidasa en un *cluster* de hemaglutininas (panel "A", al centro) y un *cluster* de neuraminidasas (panel "A", a la derecha). Los paneles "B" y "C" muestran dentro del recuadro respectivo la estructura de HA y NA. La barra horizontal indica 5 nm. El panel "D" muestra un modelo de distribución de HA (en verde) y NA (en amarillo), así como de la capa lipídica de envoltura (en azul). La barra indica 20 nm. E. M.E. de partículas virales de influenza A (H1N1) causante del brote de 2009. Se observan partículas ovales o esféricas con espículas correspondientes a la expresión en su superficie de moléculas de HA y NA. La barra horizontal indica 100 nm.

Fuente: las imágenes de los paneles "A-D" fueron publicadas por Harris A. *et al.* PNAS 2006, 13: 19123-7. Reproducido con autorización. La imagen del panel "E" fue obtenida del sitio *web* www.cdc.gov (CDC: Centers for Disease Control and Prevention, EE.UU.).

y mediante esto ser blanco de la reactividad cruzada de los anticuerpos específicos anti-NS1 durante una infección secundaria. Recientemente, se ha comprobado en un modelo experimental murino *in vivo* que otro de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la hemorragia por dengue, es la producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y oxígeno (ROS) por parte de las células endoteliales infectadas. El óxido nítrico (NO) reacciona con superóxido (O_2^-) para formar peroxinitrito (OONO $^-$), el cual nitrila al aminoácido tirosina y forma nitrotirosina. La expresión de la enzima óxido-nítrico sintetasa inducible (iNOS) y de nitrotirosina en el tejido hemorrágico se ve estimulada sinérgicamente por TNF- α , lo cual promueve la apoptosis de las células endoteliales, con el subsiguiente derrame vascular.

Influenza. Una **mayor replicación del virus influenza se asocia a una mayor virulencia**, por lo que se introducirá al lector inicialmente en este tema. Dos características sobresalen de su RNA: 1) su inestabilidad; y 2) su plasticidad. Ambas características posibilitan la **evolución particular e impredecible** de este agente en la naturaleza.

El virus es capaz de padecer cambios hasta en aproximadamente un 50% de su secuencia aminoacídica en las glicoproteínas de envoltura (hemaglutinina [abreviado HA en el texto y H en la nomenclatura de subtipo] y neuraminidasa [NA y N, respectivamente]; figura 5.34) y conservar aún su función (Tabla 5.6). Algunas de dichas sustituciones (o en otras proteínas virales) se asocian a cambios antigénicos (Figura 5.35 A y B).

Por ser influenza un virus con genoma a RNA que utiliza para su replicación un complejo de polimerasas virales (PA, PB1 y PB2) que no tienen capacidad de lectura de prueba (corrección de errores al momento de la copia del templado de RNA), éstos pueden ocurrir en el proceso de copia de las bases complementarias al templado (**mutaciones**). Estas mutaciones –así como las promovidas por la presión de selección positiva del sistema inmune– promueven

cambios antigénicos menores en las glicoproteínas de envoltura (en inglés *antigenic drifts*) y se asocian a las epidemias anuales observadas. La ocurrencia de **algunas mutaciones específicas puede afectar el tropismo del virus por un determinado hospedador u órgano, la virulencia de las cepas y su transmisibilidad.**

La **segmentación del RNA viral favorece su reasociación** (mezcla de segmentos genómicos de diferente origen) cuando en una misma célula hospedera coexisten dos o más virus influenza diferentes. El evento de reasociación génica del RNA de influenza ha dado origen a grandes cambios fenotípicos abruptos en el virus (habitualmente se afectan las glicoproteínas de envoltura HA y NA, y las polimerasas PB1, PB2 y PA), lo cual se tradujo en las pandemias de 1957 (H2N2) y 1968 (H3N2), sin participación directa de porcinos. La designación de dichos subtipos dentro del tipo A de virus influenza indica los **cambios antigénicos mayores** entonces ocurridos (en inglés *antigenic shifts*) en las respectivas hemaglutininas y neuraminidasas, observándose la sucesiva (H1N1→H2N2→H3N2) o concomitante circulación (desde 1977 hasta el presente H3N2 y H1N1) de cepas de influenza A (además de la B). La pandemia de 1918 (H1N1) ocurrió por un "salto" de especie de un virus totalmente aviar transmitido al hombre (Figura 5.36). En síntesis, los cambios antigénicos mayores pueden involucrar cepas de diverso origen, como por ejemplo porcino / humano, aviar / humano, o aun porcino / aviar / humano (como se documentó con el virus influenza A H1N1 de "origen porcino", emergente en 2009).

La secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina (H1) de influenza A H1N1 pandémica 2009 difiere sustancialmente de la correspondiente a cepas de influenza estacional circulantes en 2008 (también de la familia H1) y consiguientemente, de la actual vacuna en uso para humanos. A modo de ejemplo, estimaciones preliminares documentaron un 27,2% de cambios al compararse la cepa emergente A/California/08/2009 (H1N1) con la de la

Segmento de RNA	Proteínas codificadas	Algunas funciones de importancia asociadas a las proteínas virales
1	PB2 (polimerasa básica 2)	<ul style="list-style-type: none"> Polimeriza el RNA viral complementario (con polaridad [+])
2	PB1 (polimerasa básica 1) PB1-F2 (proteína codificada en el 2do. marco de lectura de este segmento del RNA viral)	<ul style="list-style-type: none"> Polimeriza el RNA viral complementario (+) Promueve la muerte de células del sistema inmune (macrófagos alveolares tipo II; células dendríticas) mediante apoptosis mediada por las mitocondrias; regula a PB1
3	PA (polimerasa ácida)	<ul style="list-style-type: none"> Polimeriza el RNA viral (-)
4	HA (hemaglutinina)	<ul style="list-style-type: none"> Promueve la adsorción viral a receptores celulares de ácido siálico, por lo que determina el rango de especie
5	NP (nucleoproteína)	<ul style="list-style-type: none"> Protege el material genético viral en la célula Transporta el RNA viral al núcleo Colabora con la actividad de la PA
6	NA (neuraminidasa)	<ul style="list-style-type: none"> Libera las partículas virales de sustancias mucoides y permite el egreso viral de la célula, por lo que está implicada en la transmisibilidad viral
7	M1 (proteína de matriz 1) M2 (proteína de matriz 2)	<ul style="list-style-type: none"> Promueve la interacción entre la nucleocápside y la envoltura viral Actúa como canal iónico de transmembrana que permite la acidificación viral necesaria para proseguir la infección intracelular
8	NS1 (proteína no estructural 1) NS2 / NEP (proteína no estructural 2 / proteína de exportación nuclear)	<ul style="list-style-type: none"> Inhibe la actividad antiviral inducida por el sistema Interferón, al impedir el reconocimiento celular del RNA viral por el "sensor" celular RIG-1 (limitando la inducción de aquél), y al bloquear la actividad de las proteínas celulares PKR y CPSF30 Regula la transcripción / replicación viral Se asocia al transporte de nucleocápsides hacia la membrana citoplasmática (junto a M1)



Tabla 5.6. Relación entre los segmentos del genoma a RNA viral y las proteínas codificadas por influenza tipo A.

cepa estacional A/USA/WRAMC-1154048/2008 (H1N1); (Figura 5.35.A). En modo análogo, la secuencia aminoacídica de la neuraminidasa exhibe un 18,2% de sustituciones respecto a la de cepas circulantes en 2008. Estos cambios tan importantes se encuadran entre los denominados **cambios "mayores", aun cuando el virus sigue perteneciendo al subtipo H1N1 de virus**. Los cambios observados en la hemaglutinina del nuevo virus están concentrados en los 5 sitios antigénicos (A-E) responsables de inducir anticuerpos neutralizantes; además el sitio C exhibe la **sustitución aminoacídica Asp277Asn** (ácido aspártico → asparagina en la posición 277 de la hemaglutinina) que "introduce" un nuevo sitio de glicosilación que podría "enmascarar" dicho determinante antigénico (Figura 5.35.B).

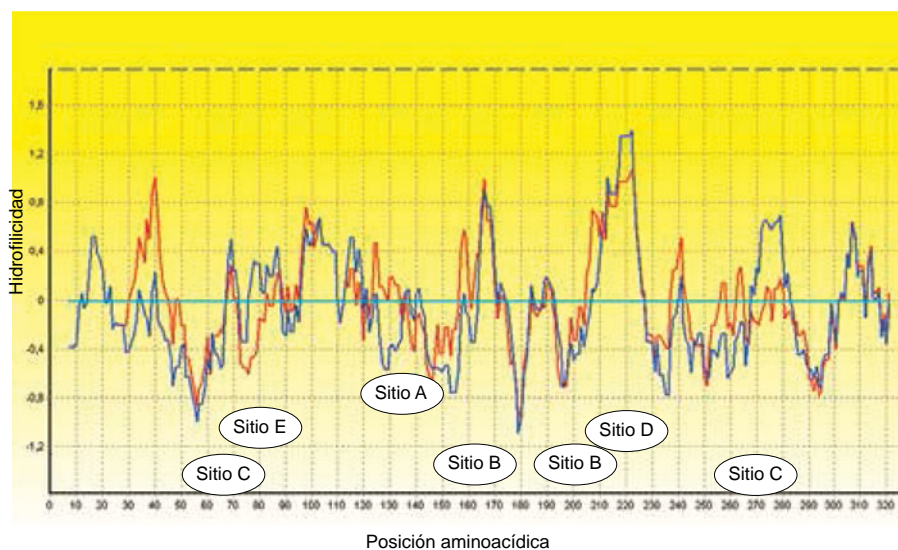
Al presente, se ignora el comportamiento que tendrá dicho virus emergente pandémico 2009 (Figuras 5.34, panel B, y 5.37), en función de la actual circulación de cepas causantes de la influenza estacional por virus tipo A subtipos H1N1 y H3N2. También se desconoce el comportamiento que el nuevo virus podría tener en un determinado hospedador ante la eventual coinfección con el virus aviar altamente patogénico influenza tipo A subtipo H5N1 (Figura 5.38).

La virulencia del virus influenza tiene un origen multigénico (Tabla 5.7), ya que se asocia a la expresión de los genes codificantes de la HA, la NA, la polimerasa básica 1 (PB1), PB2, y de las proteínas no estructural 1 (NS1) y PB1-F2 (PB1 *Frame2*,

codificada en forma parcialmente superpuesta aunque en un marco alternativo de lectura al correspondiente a PB1; es expresada en una significativa proporción de cepas del tipo A). Sin embargo, en el genoma de las primeras cepas analizadas en 2009 del nuevo virus emergente influenza tipo A(H1N1), PB1-F2 exhibe una señal de terminación en el codón 12, que la tornaría funcionalmente inactiva, ya que excluye la región que codifica el dominio peptídico para su localización mitocondrial (y por ende su función proapoptótica).

Aunque no se conocen con certeza todos los factores que determinan la patogenicidad y virulencia de los virus influenza, se puede afirmar que algunos de éstos se asocian a un amplio tropismo tisular y a la habilidad de replicar sistémicamente. A nivel molecular, uno de los **determinantes de alta patogenicidad y virulencia es la presencia de una serie de aminoácidos básicos** (arginina o lisina) **en el sitio de clivaje de la HA**, lo que le permite utilizar las proteasas presentes en una extensa gama de tejidos y por ende replicar en ellos, provocando así una enfermedad más grave. Este evento conduce a las manifestaciones sistémicas observadas en pacientes infectados con el tipo A subtipo H5N1 de influenza (un agente de gripe aviar). Dichas secuencias aminoacídicas básicas no se encuentran presentes en las deducidas luego del secuenciamiento nucleotídico de las primeras cepas de virus influenza A(H1N1) emergente en 2009. A través de la HA, la partícula viral se adsorbe a la célula mediante la unión a receptores de ácido siálico ubicados

A



B

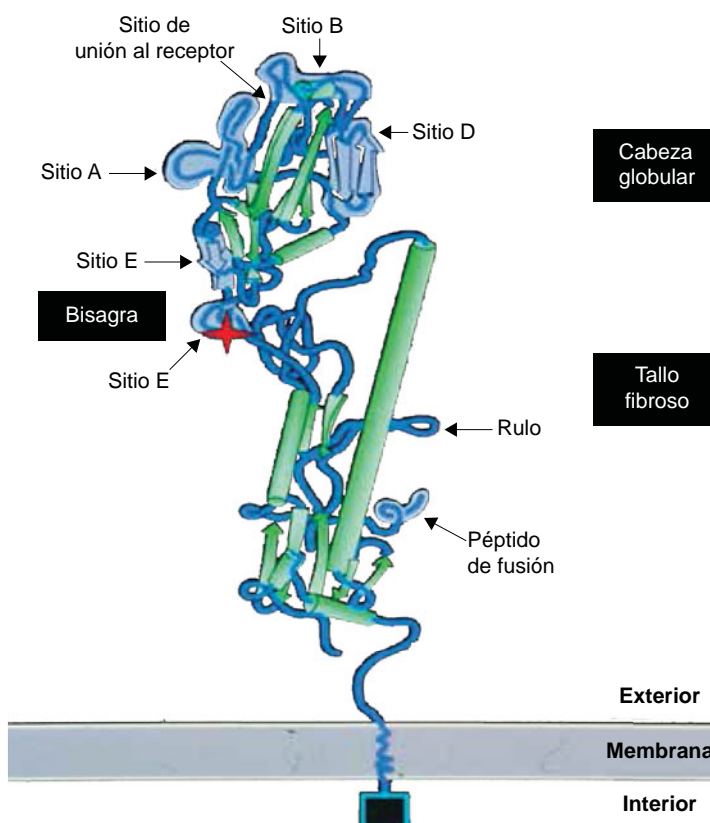


Figura 5.35. A. Perfil de hidrofiliidad de la hemaglutinina de las cepas de influenza A/California/08/2009 (H1N1) emergente en 2009 y A/USA/WRAMC-1154048/2008 (H1N1) que circuló en 2008. Los valores positivos de hidrofiliidad frecuentemente se asocian a sitios antigénicos. Se indica la posición aproximada del inicio de los 5 sitios antigénicos A-E (rotulados fuera de escala para su mejor visualización), observándose diferencias significativas entre ambas hemaglutininas. (Cortesía de Julieta Trinks; Depto. Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA). **B. Esquema de un monómero de hemaglutinina insertado en una membrana exhibiendo los sitios antigénicos A-E, indicados en el panel A.** La estrella pintada en rojo indica el nuevo sitio de glicosilación dentro del sitio antigénico C debido a la sustitución Asp→Asn en la posición 277, lo que modifica su antigenicidad.

Genes asociados a la patogenicidad / virulencia	Genes asociados a la transmisibilidad
Múltiples	Múltiples
HA	HA
NA	NA
PB1	PB1
PB1-F2	
PB2	
NS1	

Tabla 5.7. Factores virales asociados a la patogenicidad /virulencia y transmisibilidad del virus influenza A. Se indican las abreviaturas de los genes virales codificantes de diferentes proteínas. **HA:** hemaglutinina; **NA:** neuraminidasa; **PB1:** polimerasa básica 1; **PB1-F2:** proteína codificada en un marco de lectura alternativo (*Frame 2*) del gen PB1; **PB2:** polimerasa básica 2; **NS1:** no estructural 1.

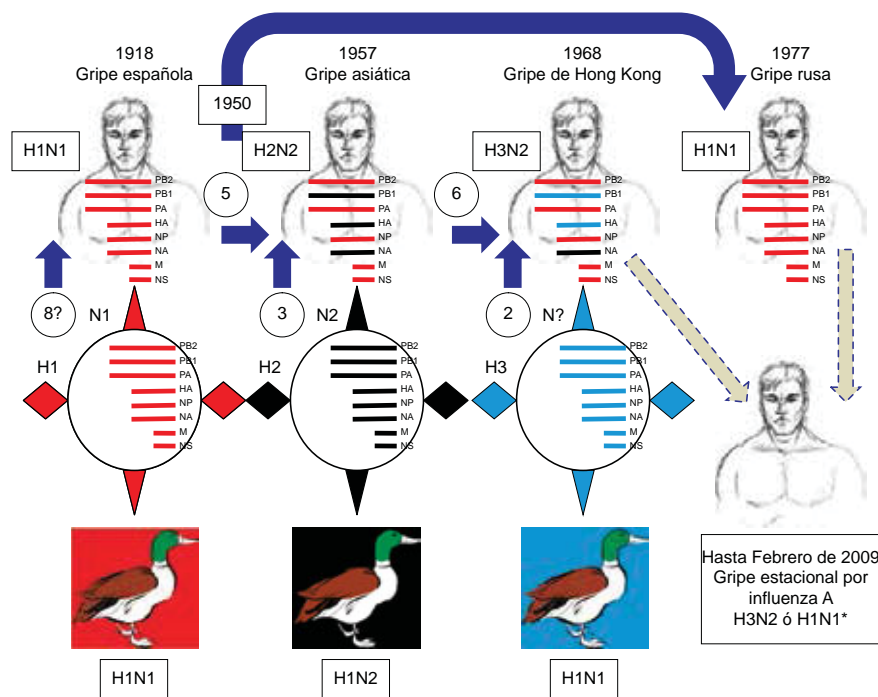


Figura 5.36. Origen de los virus influenza A asociados a pandemias previas y a la gripe estacional. *Un nuevo virus emergente A/2009/H1N1 inició la primer pandemia del siglo XXI.

en la superficie celular; también promueve la liberación del genoma viral al citoplasma celular al fusionar la envoltura de la partícula viral capturada con la membrana de la vesícula endocítica. La HA induce la producción de anticuerpos neutralizantes protectores. Es un homotrímero que es procesado proteolíticamente para generar dos subunidades, la HA1 y la HA2. El clivaje post-traduccional necesario para que el virus sea infeccioso es llevado a cabo por proteasas celulares similares a la tripsina.

La actividad de la NA es crítica para la liberación de las partículas virales que quedan adheridas a la membrana citoplasmática, lo que permite la diseminación viral al producirse el egreso mediante brotación. Las polimerasas PB1 y PB2 (junto con la PA) participan en la constante evolución viral asociada a la emergencia de mutaciones nucleotídicas y a eventuales cambios aminoacídicos y de los correspondientes perfiles de glicosilación, debido a la falta de lectura de prueba inherente al complejo enzimático de polimerización. Esta es la base de los cambios antigénicos menores (*antigenic drift*) que contribuyen a evadir la respuesta inmune del hospedero y promueven la patogenicidad estacional asociada a cada epidemia causada por influenza tipo A, que requiere la

preparación periódica de nuevas vacunas. PB2 es también asociada a la diferente propagación viral y virulencia en distintos tejidos y especies: son críticos los residuos aminoacídicos en las posiciones 627 (Glu: ácido glutámico; ó Lys: lisina) y 701 (Asp: ácido aspártico; ó Asn: asparagina). Las cepas aviares altamente patogénicas H5N1 y el nuevo virus H1N1 pandémico 2009 (cuyo segmento de RNA codificante de PB2 es de origen aviar según se observa en el 3er. recuadro [con líneas gruesas] desde la izquierda en la base de la figura 5.37) exhiben 627Glu, mientras las cepas humanas circulantes hasta 2008 portaban Lys en dicha posición.

La sustitución aminoacídica Glu → Lys en la posición 627 les confiere a las cepas de origen aviar H5N1 y H7N7 (causantes de un brote en Holanda en 2003) una eficiente replicación y alta virulencia en ratones. Por ende, dicha mutación Glu627Lys se asocia en cepas aviares a la adaptación viral para propagarse en células humanas y determina una alta patogenicidad en mamíferos. Sin embargo, 627Lys parecería no ser totalmente imprescindible, ya que otras mutaciones compensatorias pueden proveer la adaptación a mamíferos cuando la antedicha mutación está ausente. La presencia de Glu ó Lys en la posición 627 de PB2 deter-



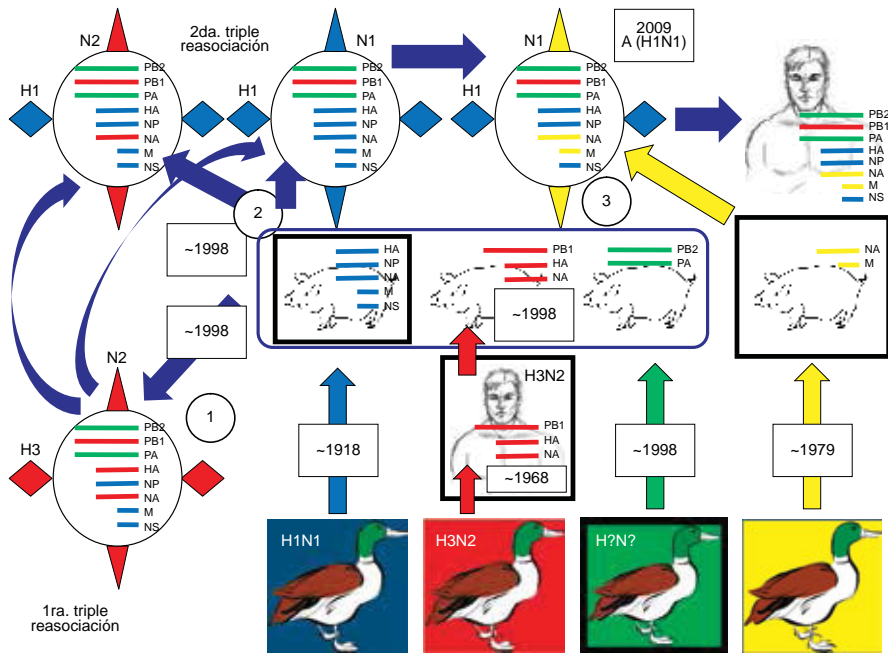


Figura 5.37. Origen del virus influenza A H1N1 causante del brote de 2009. Se trata de un virus que reconoce genes de origen porcino, humano y aviar (indicado con recuadros negros gruesos). Para una mejor visualización, sólo se indican los genes que participaron en el surgimiento de este virus emergente. En diferentes momentos del siglo XX genes de influenza aviar se transmitieron a porcinos o al hombre, y de éste al cerdo. **1.** En porcinos de EE.UU. se produjo aproximadamente en 1918 una primera triple reasociación de genes de influenza (recuadro azul tenue), generando virus A (H3N2). **2.** Este virus experimentó un segundo evento de reasociación con influenza A H1N1 (causante de la influenza porcina clásica), lo que generó virus A (H1N2) y (H1N1). **3.** El linaje porcino norteamericano de los virus con la triple reasociación genética, experimentó la mezcla con genes de influenza porcina de linaje eurasiático.



mina, respectivamente, la menor o mayor capacidad viral de replicar a 33°C. Para una adecuada propagación viral interhumana a través del estornudo y la tos, es imprescindible que el virus pueda replicar en el tracto respiratorio superior, donde existe dicha temperatura. Los sitios de replicación preferenciales de las cepas H5N1 son –entre otros– el tracto respiratorio inferior en el hombre y el intestino en las aves, los cuales exhiben temperaturas superiores a 33° C (37° C y 41° C, respectivamente). La limitación relativa para replicar a 33° C determinaría la ineficiente transmisión interhumana observada en los primeros años de influenza aviar causada por el subtipo H5N1. De allí que para una eventual propagación pandémica del virus influenza A H5N1 (cuyos genes son en su totalidad de origen aviar; figura 5.38), se haya postulado la crucial presencia de 627Lys en PB2 (mutación Glu→Lys), ya que posibilitaría la propagación tanto en el tracto respiratorio bajo como alto. Sin embargo, la presencia de 627Glu en las cepas inicialmente caracterizadas en 2009 de influenza A (H1N1) y la significativa transmisibilidad interhumana, sugieren que otros marcadores aún desconocidos están presentes en este agente emergente. En 2012 se demostró que cepas circulantes de influenza A (H5N1) diferían sólo en 3-4 nucleótidos respecto a dos virus creados experimentalmente por dos grupos de investigación. Dichos virus exhibían el mismo subtipo de hemaglutinina (H5) con sustituciones aminoacídicas promovidas mediante mutagénesis en los genes codificantes de la HA y PB2 (a partir de una cepa H5N1) y luego propagada en hurones, o mediante mutagénesis y reasociación genética (quimera conteniendo el gen H5 mutado, en un esqueleto de 7 fragmentos de RNA del virus pandémico 2009 A (H1N1), carente de su propio gen codificante de la HA [H1]). Ambos virus "creados" exhibieron transmisión entre hurones infectados experimentalmente. Si bien no se ha demostrado que dichas mutaciones sean las mismas que las que podrían asociarse a la transmisión interhumana, estos resultados demuestran la transmisión del virus aviar entre mamíferos y alertan sobre el riesgo de una eventual pande-

mia por cepas H5N1 en caso de adquirir los cambios observados (Figura 8.2). La "creación" de estos nuevos virus de laboratorio ha producido un intenso debate ético en la comunidad científica internacional.

La proteína NS1 es la principal responsable de la evasión a la respuesta inmune que exhibe este virus. Por su capacidad de unión a y secuestro del RNA bicatenario viral (durante la replicación genómica) afecta la capacidad de los receptores celulares de la respuesta inmune innata (como las helicasas RIG-1: *Retinoic acid Inducible Gene*: gen inducible por ácido retinoico), que promueven el disparo de la síntesis de interferón (Figura 5.39). También NS1 inhibe CPSF30 (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*: factor de especificidad de clivaje y poliadenilación), un factor que participa en el procesamiento de pre-mensajeros celulares, incluido el del interferón (IFN)-β. A su vez, inhibe en múltiples sitios la vía de señalización del interferón (α y β), así como a algunas de las proteínas inducidas por dicha citoquina, lo que favorece la replicación viral. Además específicamente interactúa con proteínas tales como la PKR (proteína quinasa dependiente de RNA) que promueve la apoptosis, la proteína RNasa L (que degrada el RNA viral) y la 2', 5' Oligo-Adenilato sintetasa que activa la RNasa L (latente) celular que degrada el RNA viral. La proteína NS1 del nuevo virus emergente influenza A (H1N1) está truncada debido a un codón de terminación prematuro que excluye la región del dominio de reconocimiento proteína-proteína (denominado ligando para dominos PDZ [acrónimo de las primeras letras de las tres proteínas en las que se descubrió su presencia: *Post synaptic density protein*, *Drosophila disc large tumor suppressor*, y *Zonula occludens-1 protein*]) involucrado en la señalización celular y en la virulencia de las cepas causantes de la pandemia de 1918 y en las de influenza aviar H5N1.

Finalmente, es necesario destacar que la proteína PB1-F2 está codificada por muchas pero no todas las cepas del tipo A (especialmente su prevalencia es menor en las cepas huma-

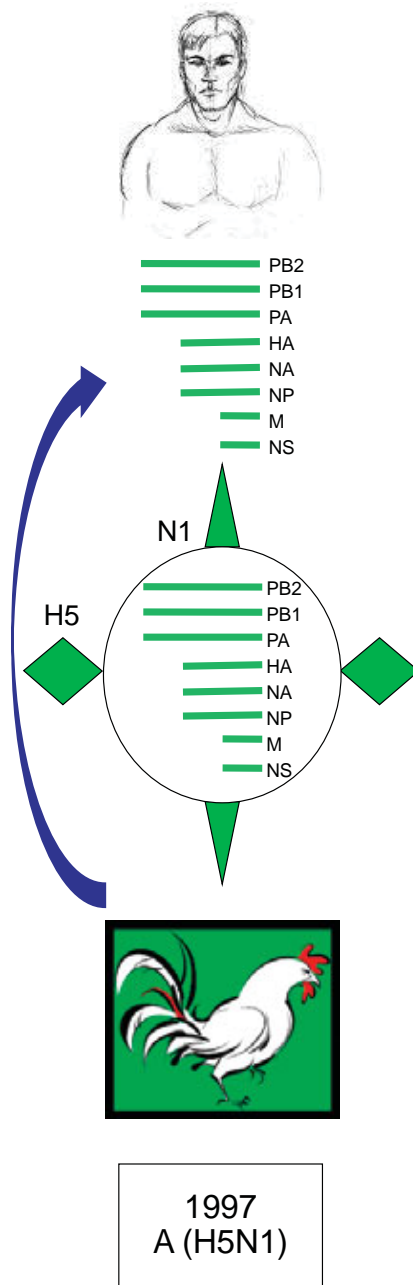


Figura 5.38. Origen aviar de los genes de influenza A (H5N1).

nas de influenza A H1N1 que circularon en los últimos años). **PB1-F2**, exhibe (entre otras) una localización mitocondrial que produce su alteración morfológica, la consiguiente pérdida del potencial de membrana mitocondrial y **promueve la apoptosis** de los macrófagos alveolares tipo 2. Esto afecta la respuesta inmune del hospedero al inhibir una adecuada presentación de los antígenos virales a los linfocitos T CD4⁺ ayudadores (se impide el nexa entre la respuesta innata y la adaptativa!). Adicionalmente, la eliminación de dichas células, facilita la sobreinfección bacteriana. Todas las cepas que originaron pandemias en el siglo XX (H1N1 en 1918, H2N2 en 1958 y H3N2 en 1968) así como las cepas altamente patogénicas del subtipo H5N1 productoras de influenza aviar hacia fines de la década de 1990 y hasta la actualidad) expresaron PB1-F2. Como se indicó en un párrafo anterior, el virus emergente A(H1N1) pandémico 2009, codifica en el gen PB1-F2 un péptido truncado, que carece del dominio de anclaje mitocondrial. En la Tabla 5.8 se reseña

las características de virulencia y transmisibilidad de las diferentes cepas de virus influenza A.

Rotavirus. Hasta fines de la década de 1990 se postulaba que la diarrea causada por rotavirus era debida –exclusivamente– a un proceso de mala-absorción causado por la destrucción masiva de los enterocitos maduros. Sin embargo, este modelo no sólo no podía explicar el cuadro de diarrea diferencial entre adultos y niños menores de 3 años, sino que tampoco se ajustaba a los numerosos casos de diarrea sin daño morfológico aparente del epitelio intestinal. Esto cambió en 1996 cuando se postuló a la proteína no estructural 4 (NSP4) de rotavirus como la primera enterotoxina viral. Actualmente se postula su efecto sobre los enterocitos de las vellosidades y células de la cripta, mediante su liberación desde enterocitos infectados y su unión a un receptor aún no identificado, aun en células no infectadas. La unión de NSP4 soluble a ese receptor celular –diferente del receptor viral y con nivel de expresión dependiente de la edad del hospedero– activaría una serie de eventos que provocarían como consecuencia una diarrea secretoria. Si bien como se mencionó anteriormente esta proteína viral es considerada una enterotoxina, ésta sólo se asemeja a las toxinas bacterianas – como las de *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*– en que en ambos casos no se observa daño morfológico aparente (Tabla 5.9). NSP4 es capaz de estimular los plexos del sistema nervioso autónomo, habiéndose postulado que dicho evento contribuiría hasta en un 60% del volumen de la diarrea.

6.3.2 Bases moleculares y genéticas de la persistencia

¿Qué mecanismos determinan la mantención o erradicación viral en el organismo? La respuesta a este interrogante no es única ni válida para todos los virus. Un primer y obvio requisito para la instalación de una infección persistente es que el virus sólo cause daño tisular o enfermedad leve en el hospedero. Así en algunos virus se produce una expresión limitada de algunos genes, la que está en ciertos casos, influida por la respuesta celular o general del hospedero.

Los factores que regulan la instalación y/o mantención de una infección persistente pueden ser clasificados según su origen (viral o del hospedero) o según cuál sea su efecto (disminuir el potencial lítico del virus o evadir la respuesta inmune). En la Tabla 5.10 se mencionarán sólo algunos ejemplos ilustrativos.

Virus hepatitis C. El lector es referido al capítulo específico 24.5 donde el tema es desarrollado *in extenso*. En esta sección sólo se hará referencia a la relación existente entre la **infección persistente por HCV y la generación de micro RNAs (miRNAs) y RNA interferentes pequeños (small interfering RNAs o siRNAs)**, miembros del sistema celular de interferencia a RNA (RNAi). Los miRNAs y los siRNAs son dúplex de 21-25 nt, que tienen la capacidad de unirse a secuencias complementarias específicas de RNA, regulando la expresión génica; ambas moléculas difieren en su biogénesis (véase el capítulo 7: "Mecanismos de defensa").

Existen resultados contrapuestos respecto al potencial rol de estas moléculas en la patogénesis de esta infección. La **modulación negativa** de la expresión génica **por miRNAs** puede ocurrir mediante la degradación de dichas secuencias blanco de RNA exactamente complementarias, aunque en los metazoarios, la mayoría de los miRNA se unen a la región 3' UTR (3' *Untranslated Region*) mediante complementariedad parcial, lo que produce un bloqueo de la iniciación traduccional, una inhibición de etapas subsiguientes de la misma, y/o la formación de "cuerpos de procesamiento" con posterior degradación del genoma diana. Sin embargo, recientemente, se han detectado **miRNAs que pueden estimular la expresión génica**, según el/los sitio(s) de unión al RNA mensajero específico. Se ha podido determinar que –en muchos casos– los miRNAs forman parte esencial de la respuesta inmune innata mediada por interferón.

El HCV es un paradigma entre los agentes causales de infección persistente, ya que aproximadamente tres cuartas partes de los individuos infectados la desarrolla. Este evento está asociado básicamente a dos aspectos: a) la evolución viral vinculada con la

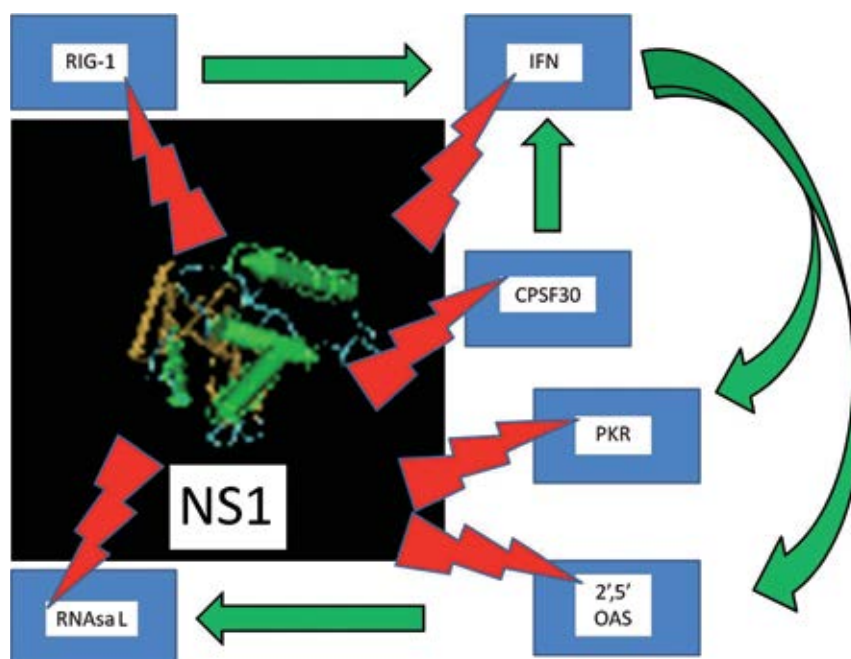


Figura 5.39. Efectos de la proteína NS1 de influenza. Mediante la inhibición del sensor celular RIG-1 (una helicasa) NS1 inhibe la inducción del sistema Interferón (IFN). Además interactúa con e inhibe a diversas moléculas antivirales inducidas por Interferón, tales como la proteína quinasa dependiente de RNA (PKR) que promueve la apoptosis, la 2', 5' oligoadenilato sintetasa (2', 5' OAS) que estimula la actividad de la RNasa L (latente) celular (que degrada el RNA viral). Además NS1 secuestra e inhibe CPSF30 (*Cellular cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*), un factor celular requerido para el procesamiento 3'- terminal de los RNA pre-mensajeros, incluido el del interferón β. Análogamente, NS1 inhibe factores de transcripción como IRF-3 y JNK, necesarios para la síntesis del interferón. La imagen de NS1 de la cepa de influenza H5N1 (A/Vietnam/1203/2004) corresponde a su estructura cristalográfica obtenida mediante rayos X, a una resolución de 2,2 Å. Dicha cepa estuvo asociada a una mortalidad del 60% en un brote de Vietnam en 2004. De: Bornholdt Za y Prasad BV. *Nature* 456: 985-8, 2008. Reproducido con autorización.

replicación genómica de la RNA polimerasa del HCV sin lectura de prueba y por ende con una elevada tasa de mutaciones bajo la presión de selección de la respuesta inmune; y b) la afectación de dicha respuesta del hospedero. El HCV interactúa con los dos principales componentes del sistema de interferencia a RNA: los miRNAs y los siRNAs.

Como otros virus, el HCV puede modificar la actividad de los miRNAs celulares, mediante estructuras que funcionan como supresoras virales de los RNA de interferencia (en inglés, *Viral Suppressors or RNA interference o VSR*). Estos verdaderos factores de virulencia pueden alterar el perfil de miRNAs de una determinada célula, y por ende de su transcriptoma. En el caso del HCV, ello parecería ocurrir como consecuencia de la capacidad viral de evolucionar rápidamente, en contraste con la lenta evolución de los miRNAs celulares. Al igual que otros virus a RNA, HCV está enriquecido en secuencias que pueden ser blanco de la acción de microRNAs (miRNAs) humanos, tales como miR-196, miR-199a, miR-296, miR-351, miR-431 y miR-448, los que pueden inhibir experimentalmente la generación de replicones (unidad de ácido nucleico con capacidad de replicación, regulada por proteínas) *in vitro*. Más aún miR-196 y miR-448 pueden inhibir la replicación del HCV *in vitro*. Las secuencias diana para los miRNAs están llamativamente conservadas entre los diferentes genotipos del HCV. Algunos autores postulan que el HCV puede mutar para evadir la eventual actividad antiviral de ciertos componentes del sistema de RNAi, lo cual contribuiría tanto a la instalación de la infección persistente como a la aparición de reactivaciones en la infección crónica (Figura 5.40). Sin embargo, otros grupos de investigación postulan que el sistema de RNAi en humanos, no tendría un efecto antiviral como ocurre en plantas e invertebrados, sino que sería necesario para la replicación viral. A este respecto, se ha documentado la existencia de miRNAs

hepatocito-específicos como el miR-122. Este miRNA constituye el 70% (unas 67 000 copias) de los que se localizan en dicha célula. Sorprendentemente, –y en contraposición con los anteriormente descritos– miR-122 no sólo no inhibe la replicación del HCV, sino que es un factor necesario para su propagación en hepatocitos al promover la traducción de proteínas, mediante la estabilización del RNA viral con los ribosomas celulares, contribuyendo al hepatotropismo del HCV. Contrariamente a otros miRNAs, miR-122 se une a la región 5'UTR del RNA viral. Este es el primer miRNA conocido en la Virología que regula positivamente la expresión viral, lo que lo yergue en un potencial blanco terapéutico en pacientes con hepatitis C crónica. Este miRNA se encuentra significativamente disminuido en pacientes con hepatitis C crónica que responden pobremente desde el punto de vista virológico a la subsiguiente terapéutica con Interferón, no habiéndose demostrado una asociación con los niveles de carga viral del HCV.

Las proteínas estructurales del HCV pueden también inhibir la actividad de siRNAs celulares. Se ha demostrado que el core inhibe a la ribonucleasa celular Dicer (que cliva el IRES del genoma viral y el RNA del intermediario replicativo) encargada de generar los fragmentos de RNA bicatenarios precursores de los siRNAs. Asimismo, la interacción directa de las proteínas estructurales –especialmente E2 de la envoltura del HCV– con la proteína Argonaute-2 del complejo RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) elude la actividad del sistema de RNAi. Se ha postulado que estas estrategias del HCV contribuyen a la persistencia viral.

Debe aún establecerse si los eventos de inhibición de miRNAs y siRNAs por el HCV propugnan un escape a una respuesta antiviral (como argumentaron múltiples grupos de investigación entre 2007 y 2009), si en realidad corresponden a pasos obligatorios de la biología del HCV para promover su propia replicación (como lo postularon contemporáneamente algunos), o si debe analizarse

CARACTERÍSTICA	Influenza A(H1N1) causante de pandemia en 1918	Influenza A(H2N2) causante de pandemia en 1957	Influenza A(H5N1) aviar	Influenza A (H1N1) y A(H3N2) estacional	Influenza A(H1N1) pandémico (2009)
Transmisión interhumana	+++ / ++++	+++ / ++++	- → ± (extremadamente restringida)*	++	+++
Gravedad clínica	++++	+++	++++	++	++ / ++++**

Tabla 5.8. Comparación preliminar y provisoria entre la infección por influenza A (H1N1) pandémica 2009 y las producidas por otros virus influenza A. *: Hasta Julio de 2012. **: Las primeras semanas de penetración y propagación del virus emergente en la población de México se asociaron a una gravedad comparable a la exhibida por el virus causante de la pandemia de 1957, con significativa mortalidad. En semanas subsiguientes, se observaron desde casos afebriles con leve o moderado compromiso del tracto respiratorio, hasta neumonías graves, estimándose la tasa de mortalidad en 0,55% en los primeros 25 000 casos confirmados mediante estudios virológicos moleculares (datos de la Organización Mundial de la Salud al día 8 de Junio de 2009).

CARACTERÍSTICAS	ENTEROTOXINA BACTERIANA*	ENTEROTOXINA VIRAL**
Daños morfológicos Absorción de D-glucosa vía SGLT1 Absorción de Cl ⁻ por los enterocitos de las vellosidades Secreción de Cl ⁻ por las células de la cripta Secreción neta de Cl ⁻ Mediadores intracelulares en la secreción de Cl ⁻	No Normal Disminuida Aumentada Masiva cAMP o cGMP	No Defectuosa Aumentada Normal Moderada Ca ⁺⁺

Tabla 5.9. Características principales de las diarreas asociadas a toxinas de origen bacteriano y viral. *: *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*. **: Proteína no estructural 4 (NSP4) de rotavirus. **SGLT1**: transportador 1 de sodio y glucosa. Adaptado de Lorrot M & Vasseur. *M. Virol J* 4:31, 2007.



VIRUS	FACTOR ASOCIADO A PERSISTENCIA	EFEECTO
Coxsackie	Deleciones en la región I del RNA genómico	Menor tasa de replicación en miocardio → infección persistente en miocardio
Sarampión	Defecto en la expresión de los genes M, H y F	Infección abortiva en encéfalo → PEES
LCMV	La cepa clon 13 de LCMV exhibe mayor tropismo por células reticulares fibroblásticas (CFR) y dendríticas. Posee 2 aminoácidos diferentes respecto a la cepa Armstrong: 1 en la glicoproteína de envoltura y otro en la polimerasa	Modificación del tropismo viral. Estimulación en CFR de la expresión de PD-L1 → inmunotolerancia, mayor replicación viral y agotamiento de LT
HBV	El HBe Ag atraviesa placenta	Delección clonal de LT específicos para HBe Ag y HBc Ag → inmunotolerancia

Otros ejemplos de factores asociados a la persistencia viral se abordarán en los capítulos específicos de aquellos virus que producen infecciones persistentes.

Tabla 5.10. Factores asociados a la persistencia viral: algunos ejemplos. **PEES**: panencefalitis esclerosante subaguda. **LCMV**: Virus de la coriomeningitis linfocitaria. **PD-L1** (*Programmed Death –Ligand 1*): ligando de la proteína de muerte programada PD; **LT**: linfocito T; **HBV**: virus hepatitis B; **HBe Ag** y **HBc Ag**: antígeno e y antígeno del core del virus hepatitis B.

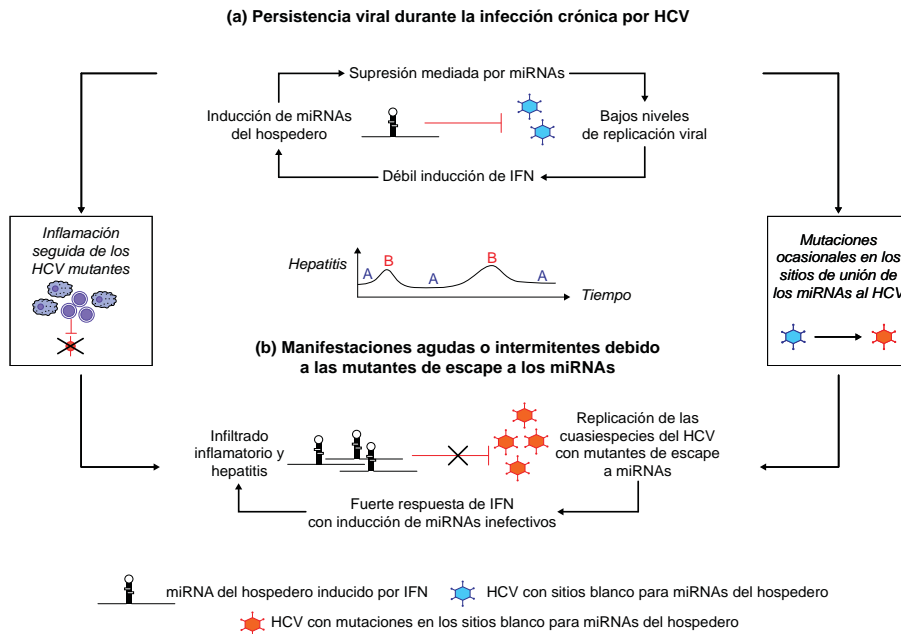


Figura 5.40. Mutantes de escape del HCV a los miRNAs celulares se asocian a la infección persistente.

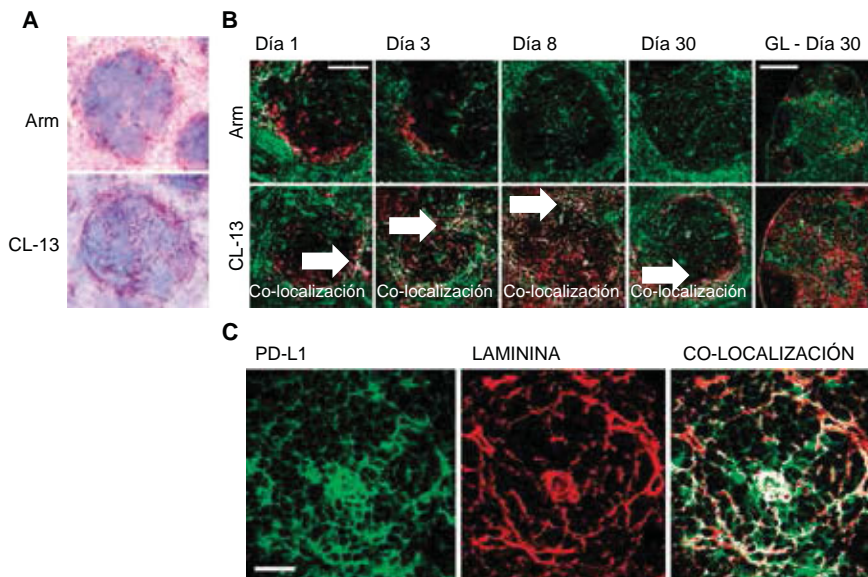


Figura 5.41. Patrón reticular de la infección del bazo de ratones infectados con el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV). **A.** Microscopía óptica de cortes histológicos de bazo de ratones infectados 3 días antes con la cepa Armstrong (Arm) o CL-13 de LCMV marcados para detección de antígenos virales, utilizando hematoxilina como tinción de contraste. **B.** Bazo y ganglio linfático periférico (GL, a la derecha) marcados para detección de antígenos del citoesqueleto de las células reticulares fibroblásticas (verde) y para antígenos de LCMV (rojo) a los 1, 3, 8 y 30 días post-infección (p.i.). Las regiones de color blanco indican co-localización. Obsérvese que la infección con la cepa Armstrong se limita a los 8 días, mientras que la producida por la cepa LCMV CL-13 persiste aún a los 30 días p.i. Al día 1 post-infección, ambas cepas se localizan en la zona marginal, exhibiendo un grado similar de infección. A los 3 días p.i. la cepa LCMV CL-13 pudo detectarse en la pulpa blanca y más intensamente en la pulpa roja, alcanzando el máximo al día 8 p.i. y permaneciendo en altos niveles hasta el día 30 p.i. Contrariamente, la infección con la cepa Armstrong permaneció localizada en la zona marginal, siendo controlada al día 8. Los antígenos de la cepa LCMV CL-13 (pero no Armstrong) co-localizaron con las células reticulares fibroblásticas. Aumento: 20x (bazo) y 10x (GL). Barra de escala: 100 µm (bazo) y 400 µm (GL). **C.** Microscopía confocal de cortes histológicos de bazo de ratones infectados con LCMV CL-13 marcados para PD-L1 (verde) y laminina (rojo). Las regiones en blanco indican co-localización. La expresión de PD-L1 (*Programmed death-Ligand 1*) en las células reticulares fibroblásticas evita su muerte, al interactuar con la proteína inhibitoria PD1 expresada por linfocitos T CD8⁺. Aumento: 63x. Barra de escala: 25 µm. De: Mueller SN, *et al.* PNAS 104: 15430–35, 2007. Reproducido con autorización.

individualmente cada molécula del sistema RNAi, sin que puedan proponerse generalizaciones. **De hecho, la actividad de células T CD56⁺ mediante la vía IFN- γ \rightarrow JAK-STAT \rightarrow IFN α/β inhibe la concentración del miR-122 proviral y aumenta la del miR-196a antiviral en hepatocitos.**

Coxsackie. Es conocido que el daño agudo en el miocardio infectado con virus Coxsackie B ocurre por mecanismos directos (asociados –entre otros– a la estructura espacial del IRES del RNA viral que interactúa con factores de transcripción específicos, y a la expresión de una proteasa viral que cliva a la distrofina afectando el citoesqueleto), e indirectos (mediados por la respuesta inmune celular T). Un ejemplo de la disminución del potencial lítico viral para mantener una infección persistente es el producido por ciertas cepas cardiovirulentas de Coxsackie B en células cardíacas humanas. Se ha documentado la presencia de cepas con deleciones de hasta 26 nt. en la región I del RNA genómico en muestras histológicas de corazón provenientes de pacientes con miocarditis agudas. Está comprobado que la afectación de esta región genómica produce una marcada disminución en la tasa de replicación viral. Se ha postulado que estos **genomas deletados** se encuentran en todos los tejidos donde replica Coxsackie B, pero que por factores microambientales (por ejemplo, factores de transcripción específicos de células cardíacas, etc.) superarían en número –y en escaso tiempo– a los genomas salvajes. Cabe destacar que al tener una menor tasa de replicación –son casi indetectables las cápsidas virales y los RNA tanto de polaridad (–) como (+)– las cepas con genomas deletados evaden eficientemente a la respuesta inmune antiviral del hospedero, permitiendo con esto la instauración y mantenimiento de la infección persistente.

Sarampión. La panencefalitis esclerosante subaguda (PEES)

consiste en una forma de infección persistente abortiva, progresiva y fatal que ocurre varios años después del inicio de la misma. El virus sarampión infecta el SNC aunque los neocomponentes de la replicación viral no se incorporan a la membrana celular para formar virus completos. Como consecuencia de esta restricción –dependiente de la célula hospedera– se acumulan nucleocápsidas en el interior de las células nerviosas. Esta patología ocurre en presencia de infiltrados B y T, y elevados títulos de anticuerpos anti-sarampión. Existe un defecto en la expresión de los genes de envoltura viral y del gen M codificante de la matriz viral, con la consiguiente formación anormal de partículas. **El defecto genético subyacente consiste en la masiva hipermutación A \rightarrow G y U \rightarrow C del genoma viral recuperado a partir del SNC.** Mediante hibridación *in situ* se ha podido demostrar en el SNC secuencias genómicas de virus sarampión antes de la aparición local de niveles detectables de antígenos virales. Si bien no se forman viriones, se producen complejos de nucleoproteínas, con diseminación trans-sináptica de genomas y requerimiento de la proteína viral de fusión, pero en ausencia del receptor viral. La recuperación de virus infeccioso a partir del encéfalo sólo se obtiene mediante cocultivo con células permisivas.

LCM. Este fascinante modelo experimental murino es desarrollado en este capítulo por la crucial trascendencia que tuvo su conocimiento en la comprensión de otras infecciones persistentes del humano (como las producidas por HBV, HCV y HIV). La **cepa viral Armstrong de LCM** produce en el ratón una **infección aguda**, mientras que la **cepa clon 13** de este virus (LCMV CL-13) promueve una **infección persistente, asociada a agotamiento de la respuesta T**. Ambas cepas virales sólo difieren en 2 aminoácidos: 1 en sus respectivas glicoproteínas de envoltura y

RESPUESTA	PRINCIPALES COMPONENTES	MECANISMO EFECTOR	EJEMPLO
INNATA	<ul style="list-style-type: none"> - Macrófagos y neutrófilos - NKT - macrófago - \uparrow expresión en superficie celular del receptor para C3a 	<ul style="list-style-type: none"> - Radicales libres: O₂ - NO, ONOO⁻ - IL-13 - Reclutamiento de eosinófilos 	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatitis C (y muchas otras infecciones) - Enfermedad inflamatoria pulmonar crónica (post-infección viral) - Hiper-reactividad aérea en la enfermedad por RSV agravada por vacunación previa
ADAPTATIVA			
<ul style="list-style-type: none"> - Celular 	<ul style="list-style-type: none"> - CD4⁺ Th1 - CD4⁺ Th2 - CD8⁺ citotóxicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Reclutamiento de mononucleares y neutrófilos que liberan enzimas proteolíticas, radicales libres y TNF-α (hipersensibilidad retardada) - ? - Reclutamiento de eosinófilos - Haplotipos específicos de IL-13, IL-4 e IL-10 - Perforinas, TNF-α, Fas/FasL, IFN-γ, IL-1β - Reclutamiento de monocitos y neutrófilos 	<ul style="list-style-type: none"> - Queratitis por virus herpes simplex - Neumonía en la enfermedad por RSV agravada por vacunación previa - Hepatitis por HBV - Miocarditis por virus Coxsackie B - Síndrome pulmonar por hantavirus Sin Nombre
<ul style="list-style-type: none"> - Humoral 	<ul style="list-style-type: none"> - Anticuerpos 	<ul style="list-style-type: none"> - Inmunocomplejos - Anticuerpos heterotípicos facilitadores 	<ul style="list-style-type: none"> - Dengue hemorrágico

Tabla 5.11. Mecanismos indirectos de daño histórico mediados por la respuesta inmune. *: La enfermedad por RSV agravada por vacunación previa se caracteriza por neumonía e hiper-reactividad aérea. La padecieron niños que habían sido vacunados en la década de 1960 con una vacuna inactivada y que luego se expusieron a la infección con cepas salvajes de dicho virus.

otro en la polimerasa. Recientemente, se ha documentado que la infección de células dendríticas constituye un blanco importante en la infección por la cepa LCMV CL-13. Sorprendentemente, se pudo determinar que ésta infecta mayor número de células dendríticas que la cepa Armstrong, ya que el aminoácido de diferencia en su glicoproteína de envoltura le confiere mayor afinidad por el receptor alfa-distroglicano presente en dicha estirpe celular. Esta **diferencia en el tropismo como determinante del curso de la infección** –crónica vs aguda– determina la producción inicial de **IL-10** y la estimulación de la expresión de la molécula pro-apoptótica **PD-L1** (*Programmed Death-Ligand 1*) en las células dendríticas luego de la infección con la cepa LCMV CL-13, que promueve la inactivación de LT a través de su interacción con **PD-1** (véase la figura 8.8 en el capítulo 8). Mediante dichos eventos, esta cepa de LCMV produce una marcada disminución en la inmunopatología mediada por los LT CD8⁺ citotóxicos que limitan la infección viral, previniendo así la destrucción de las células infectadas, (favoreciendo en este sentido al hospedero) y a su vez permitiendo la consiguiente persistencia viral en la infección crónica. A su vez, –y a diferencia de la cepa Armstrong– LCMV CL-13 infecta significativamente células reticulares fibroblásticas (constituyentes del estroma linfóide en bazo y ganglio) lo que coadyuva a la inmunosupresión y a la persistencia viral. Dado que dichas células proveen una microarquitectura tridimensional para la migración, reclutamiento y activación de los linfocitos en los órganos linfáticos secundarios, su infección y compromiso funcional facilita la rápida diseminación viral y su persistencia (Figura 5.41A y B). La expresión de PD-L1 en las células reticulares fibroblásticas infectadas con LCMV CL-13 (Figura 5.41.C) evita la inmunopatología local mediada por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, pero compromete crucialmente tanto la respuesta inmune en curso como la futura.

La administración de anticuerpos anti-receptor de IL-10 (o el uso de animales genéticamente deficientes para producir dicha citoquina) o anti-PD-L1 bloquea la inmunosupresión por vías independientes, y transforma la infección persistente crónica en aguda, restableciendo la actividad T y proveyendo memoria inmunológica. Estas investigaciones básicas constituyeron una herramienta singular para la comprensión de la patogénesis molecular de infecciones persistentes del humano con compromiso de la respuesta T (por HIV, HBV, HCV, etc.) y para el análisis de una potencial modulación terapéutica.

6.4. MECANISMOS INDIRECTOS DE LESIÓN CELULAR

Como se mencionó en párrafos anteriores, los virus pueden o no ser citopáticos. Habitualmente, en el hospedero inmunocompetente una infección aguda por un virus citopático es eliminada por una adecuada respuesta inmune. En contraposición, los virus no citopáticos pueden causar infecciones persistentes en las que la mayoría de las manifestaciones clínicas de la enfermedad son promovidas probablemente por mecanismos indirectos asociados a la participación (muchas veces exacerbada) de la respuesta inmune, a la cual se denomina **inmunopatología**. La misma puede ser causada por la respuesta inmune innata (por ejemplo, la formación de radicales libres), y/o adaptativa celular (principalmente T) y/o humoral (B) (Tabla 5.11). Un caso especial lo constituyen algunas **enfermedades de naturaleza autoinmune** en las que se dispara una respuesta antitular, a la que posiblemente contribuirían algunas infecciones virales (debido al mimetismo molecular de ciertos epítomos virales con algunos celulares). El análisis de secuencias aminoacídicas mediante ordenadores ha demostrado homología entre regiones de proteínas básicas de la mielina humana y proteínas de diferentes virus, entre los cuales se encuentran los tipos A y B del virus influenza, sarampión, Epstein-Barr, parotiditis, vacinia, varicela-zóster y otros. Ello podría asociarse a las **neuritis** y **encefalomielitis desmielinizantes post-infecciosas** a veces observadas como reacción inmunológica cruzada. En ellas, el virus no necesita estar presente, una vez que se ha disparado la respuesta inmune, para producir las lesiones en

las células diana que comparten los determinantes antigénicos con las proteínas virales. Este **mimetismo molecular** también contribuye –parcialmente– al desencadenamiento de manifestaciones graves por virus dengue mediadas por anticuerpos anti-NS1 que producen reacciones cruzadas sobre antígenos de superficie del endotelio capilar (Figura 5.33).

En casos muy particulares, puede desencadenarse abruptamente un **síndrome de respuesta inflamatoria sistémica** (semejante al observado en el choque tóxico y la sepsis tóxica causados por otros microorganismos), la que es inducida por una súbita liberación de citoquinas (¡una verdadera tormenta de citoquinas proinflamatorias!).

Los mecanismos indirectos de **daño histórico mediados por los linfocitos T son los más y mejor estudiados, aunque también las células NK, las NKT, los polimorfonucleares y los macrófagos participan** en grado y circunstancias diversas en las lesiones mediadas y moduladas por LT. El daño tisular puede estar mediado principalmente por la población de **linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ citotóxica**. La población de LT CD4⁺ a su vez puede corresponder a la que posee un perfil de actividad Th1 o Th2.

Radicales libres. Su generación durante la respuesta inflamatoria puede estar asociada al **daño promovido** principalmente por el óxido nítrico (NO) producido a partir de la oxidación de L-arginina (dando origen a citrulina y NO) y por el anión superóxido (O₂⁻) generado por la enzima xantina oxidasa presente en fagocitos. Ambas especies pueden reaccionar entre sí formando peroxinitritos (ONOO⁻), que –a su vez– pueden mediar los efectos tóxicos del O₂, ya que algunos virus y células no son afectados por este último. El aumento de NO en una célula puede obedecer al aumento de su síntesis (por miembros de la familia de las NO sintetasas (NOS) o a un defecto en su eliminación. Las NOS pueden expresarse constitutivamente en neuronas y células endoteliales, o inducirse (activándose la enzima inducible iNOS) debido a la acción de citoquinas proinflamatorias como IL-1, TNF-α e IFN-γ, principalmente en macrófagos. **Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno modulan la permisividad celular a la replicación viral.** Los radicales libres mencionados son importantes mediadores de la respuesta inflamatoria y pueden participar del daño histórico, como fue demostrado en múltiples infecciones, incluyendo las producidas experimentalmente con virus influenza y citomegalovirus en el pulmón de ratones. El contenido lipídico enriquecido del SNC es particularmente susceptible a la peroxidación lipídica, un proceso de daño autocatalítico de estructuras lipídicas que genera productos de desecho, que pueden alterar macromoléculas celulares. El daño oxidativo es un componente de la encefalitis causada por herpes simplex tipo 1, la enfermedad neurodegenerativa promovida por HIV, y de la panencefalitis esclerosante subaguda producida por virus sarampión.

Ciertos virus al infectar una célula también pueden inducir la producción de radicales libres (efecto viral directo) lo que puede promover la **inestabilidad cromosómica** y el eventual desarrollo de tumores, tal como se observa en un determinado porcentaje de las infecciones persistentes producidas en hepatocitos por HBV y HCV o en linfocitos B por EBV.

Circuito NKT-Macrófago-IL-13. La activación de este eje de la inmunidad innata provee el nexo entre la infección viral aguda inicial y –a través de una respuesta innata activada persistentemente– el daño histórico de la enfermedad crónica. Estos hallazgos tienen especial relevancia en la comprensión de los mecanismos patogénicos subyacentes del asma y de la enfermedad obstructiva crónica pulmonar del humano (Figura 5.7).

Linfocitos T CD4⁺. Estos linfocitos modulan gran parte de la respuesta inmune, produciendo un vasto conjunto de citoquinas, y reclutando y activando células inespecíficas como los polimorfonucleares neutrófilos y monocitos que pueden promover el daño histórico (reacción de hipersensibilidad retardada), mediante la liberación de TNF-α, enzimas proteolíticas y radicales libres. Como regla preliminar (y muy general), se asume que las infec-

ciones persistentes por virus no citopáticos, promueven una respuesta **CD4⁺** inmunopatológica, mientras que ante la infección por virus citopáticos, dicha respuesta celular es protectora, aunque pueden promoverse también eventos de daño tisular.

Linfocitos T CD4⁺ Th1. En base a estudios experimentales realizados en ratones inoculados con diversos virus, se ha demostrado que ciertas infecciones virales persistentes del encéfalo promueven una respuesta mediada por linfocitos CD4⁺ Th1, postulándose la participación del TNF- α y de radicales libres producidos por macrófagos activados como causa del daño (véase el ítem anterior). El TNF- β podría estar asociado a los eventos de desmielinización de los oligodendrocitos. **La queratitis estromal herpética** (una grave lesión ocular que produce opacidad y puede conducir a la ceguera) **está mediada por linfocitos T CD4⁺ Th1** (que expresan los receptores para quimiocinas CCR5 y CXCR3), con la participación de polimorfonucleares y células presentadoras de antígeno. La atmósfera local de IFN- γ , IL-1- α , IL-6 e IL-12 es importante en la patogénesis, observándose que los **niveles de MIP1- α elevados agravan la lesión**. En ciertas circunstancias también participan células NK y linfocitos B. La queratitis acontece como consecuencia de la inicial infección del epitelio corneal, que promueve un infiltrado inflamatorio en el estroma, producto de la activación de células no infectadas allí localizadas (activación celular *bystander*).

Linfocitos T CD4⁺ Th2. Esta estirpe celular está involucrada en las lesiones observadas en la **bronquiolitis por virus sincicial respiratorio (RSV)**, como se demostró al utilizar ratones inmunosuprimidos infectados con RSV (en los que las lesiones eran limitadas) y reconstituidos con la población **CD4⁺ Th2** (agravándose las mismas). Este virus es causa de enfermedad grave en ancianos y en menores de 2 años. Aunque el mecanismo de lesión no se conoce en profundidad, es probable que el reclutamiento de eosinófilos en el tejido dañado sea mediado por productos derivados de los linfocitos Th2.

Modulación de la respuesta innata y del balance entre linfocitos T CD4⁺ Th1 y Th2. En la década de 1960 se desarrolló una vacuna a virus completo inactivada para evitar la grave bronquiolitis asociada a RSV. Sorpresivamente, se documentó que aquellos que habían sido vacunados, desarrollaban posteriormente, ante la infección con el virus salvaje, un cuadro aun más crítico (**enfermedad por RSV agravada [ERA] por la vacunación previa**) que el que padecían los no vacunados, asociado a hiper-reactividad aérea y neumonía con infiltrados eosinofílicos, siendo estos dos los componentes principales de la ERA. Ello devino en la suspensión de la aplicación de dicha vacuna. Aproximadamente 4 décadas después se pudo descubrir el enigmático evento. El científico argentino Fernando Pollak y su grupo establecieron en un modelo murino y en material de autopsia de los niños que habían padecido la ERA, que **la hiper-reactividad aérea y la eosinofilia pulmonar eran mediadas por inmunocomplejos**. Más aún, en subsiguientes estudios documentaron el rol modulador negativo de C5 sobre la expresión del receptor para C3a, (C3aR) ya que el uso de ratones C5-deficientes, exhibían un aumento del C3aR en células epiteliales y en el músculo liso bronquial. El uso de antagonistas para C3aR se asoció a la atenuación de la secreción bronquial, la hiper-reactividad aérea y la eosinofilia pulmonar. Ante niveles normales de expresión de dicho receptor, la eosinofilia es promovida por la actividad de linfocitos CD4⁺ Th2, la que es regulada negativamente por el IFN- γ secretado desde los linfocitos T CD8⁺. Recientemente, el mismo grupo estableció que la falta de protección de la vacuna inactivada administrada en esa época y la consiguiente ERA es atribuible a la falta de avidéz de los anticuerpos por epítopes protectores, dada la restringida estimulación de receptores Toll-símil (TLR) que impedía una adecuada maduración de la afinidad.

Linfocitos T citotóxicos (CTLs) CD8⁺. Estas células desempeñan un rol crucial en la limitación y eliminación de las infecciones virales, mediante mecanismos no citolíticos (mediados principalmente por IFN- γ y TNF- α) y citolíticos (mediados por perforinas, ya que ni las granzimas ni el sistema Fas/FasL serían

tan relevantes). Sin embargo, esta población celular a su vez puede reclutar células inespecíficas como polimorfonucleares neutrófilos y monocitos que amplifican la reacción inflamatoria y promueven daño hístico.

La infección experimental con el virus LCM permitió establecer las bases del conocimiento donde lesiones tisulares son mediadas por linfocitos T CD8⁺, población que a través de perforinas promueve el daño celular, y mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α y TNF- β) atrae otras células inflamatorias. **El HBV no produce habitualmente *per se* alteraciones morfológicas en hepatocitos** de humanos inmunocompetentes, a pesar de los muy elevados niveles de producción viral diaria (10^{11} - 10^{12} partículas) por períodos que pueden extenderse varias décadas. **Es la respuesta inflamatoria inespecífica (neutrófilos y macrófagos) dependiente totalmente de la presencia de los linfocitos T CD8⁺, la que amplificará la lesión hepatocítica también promovida por éstos.** La eventual eliminación de la infección viral ocurre por mecanismos no citolíticos (mediados por IFN- γ y TNF- α) y por mecanismos inmunes citolíticos, tal como se documentó en fascinantes experimentos en ratones transgénicos y en primates. Un ratón que expresa el transgén del antígeno de superficie del HBV (HBs Ag) no desarrolla patología (pues reconoce al antígeno como propio). Sin embargo, al ser inmunizado adoptivamente con CTLs CD8⁺ histocompatibles y específicos para epítopes del HBs Ag desarrolla en pocas horas un infiltrado hepático constituido por estas células, que semeja las lesiones observadas en la hepatitis B del humano, y en las que se visualizan células apoptóticas. Estudios realizados en chimpancés por Francis Chisari, documentaron que –inicialmente- las CTLs CD8⁺ promueven la eliminación no citolítica del virus en hepatocitos, siguiendo días después una eliminación citolítica (con suba de las transaminasas). **Los CTLs CD8⁺ son imprescindibles para promover la patología, pero la lesión es fundamentalmente asociada a la presencia de macrófagos y polimorfonucleares y a las citoquinas liberadas en el sitio de la lesión.** También la **miocarditis aguda** promovida en humanos por el virus **Coxsackie B** está asociado a la actividad de **CTLs CD8⁺**, y –según el modelo experimental murino– fundamentalmente relacionada con la actividad de **perforinas**. Ratones genéticamente deficientes en la producción de las mismas, desarrollan lesiones leves, aunque se produce igualmente la eliminación viral. Las lesiones son probablemente exacerbadas por citoquinas como IL-1 β y TNF- α y por quimiocinas (que atraen más linfocitos) como MIP-1 α . Lesiones mediadas por CTLs CD8⁺ han sido reportadas también en el síndrome pulmonar por el hantavirus Sin Nombre.

Anticuerpos facilitadores e inmunocomplejos. El dengue es una enfermedad conocida como "fiebre quebrantahuesos", asociada a intensa cefalea, exantema y a dolores de espalda y miembros. Existen **4 serotipos del virus dengue**, los que no inducen protección heterotípica. Más aún, la infección por este virus puede asociarse a **cuadros severos cuando acaece en un individuo que previamente hubo sido infectado por un serotipo diferente al de la infección en curso**. Dicho evento está relacionado con el rol que desempeñan anticuerpos circulantes no neutralizantes frente a epítopes del virus infectante. Dichos anticuerpos son reconocidos por receptores para Fc γ de los monocitos periféricos normalmente no susceptibles, que facilitan el ingreso viral y promueven una mayor replicación viral en el organismo ("potenciación viral"). Ello deviene en una mayor producción de citoquinas proinflamatorias, que atraen más linfocitos, los que –a su vez– producen más citoquinas. Éstas y otros mediadores químicos, favorecen el derrame plasmático asociado a la fiebre hemorrágica por dengue. La **"potenciación viral" promovida por anticuerpos heterotípicos no protectores** es una de las causas postuladas para la mayor incidencia de la fiebre hemorrágica por dengue y el choque por dengue. La fiebre hemorrágica por dengue puede ocurrir en la primoinfección con una incidencia de 1:14000 infecciones, pero la misma asciende a 1:90 en la reinfección con un serotipo diferente, observándose el choque por dengue en 1 de cada 50 individuos reinfectados de esta manera. Avalando el rol de los an-

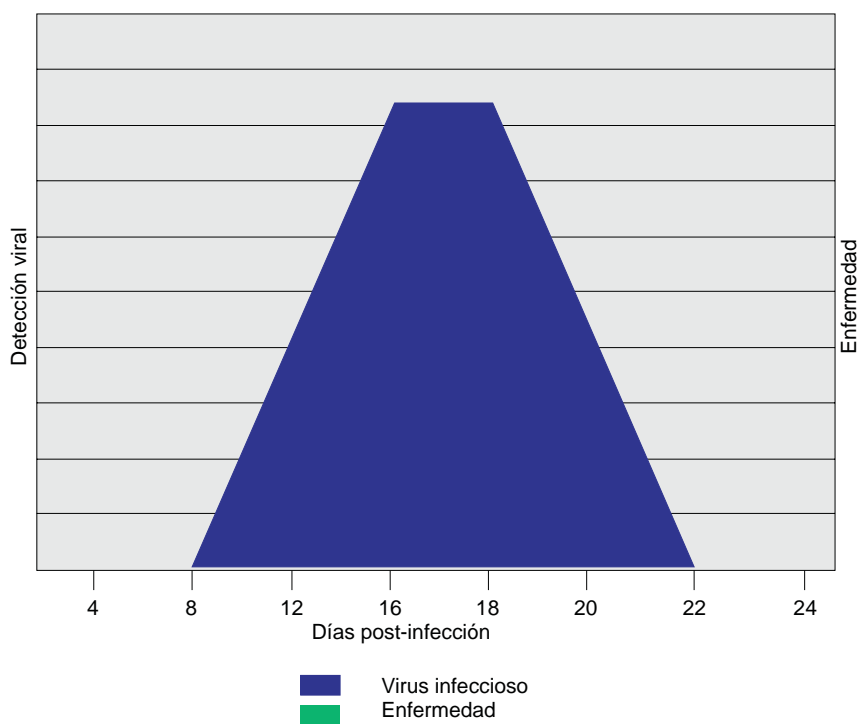


Figura 5.42. Infección aguda subclínica. Ejemplo: infección por virus hepatitis A dentro del primer año de vida.

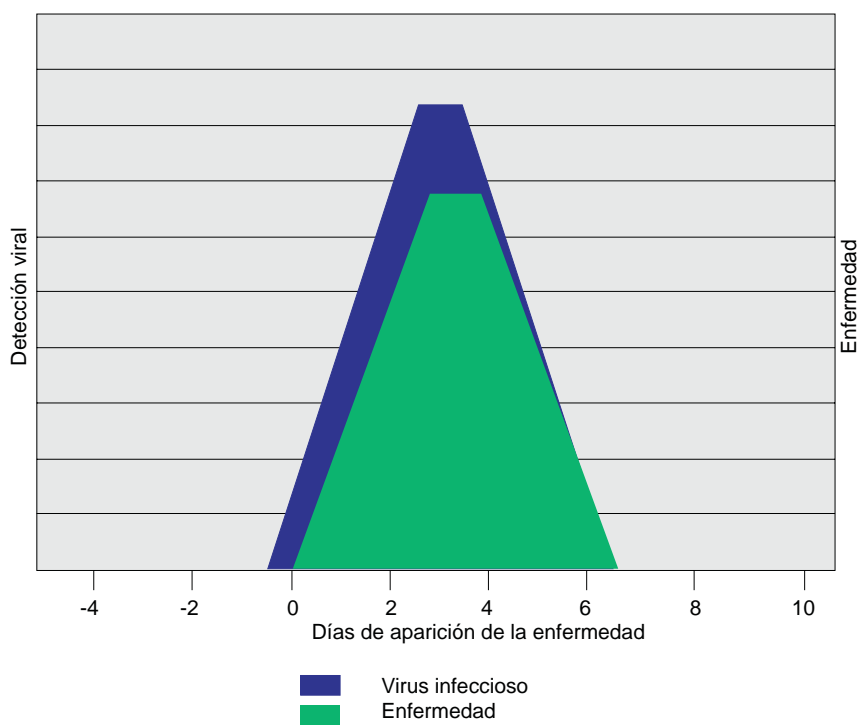


Figura 5.43. Infección aguda con manifestaciones clínicas. Ejemplo: infección por virus sarampión.

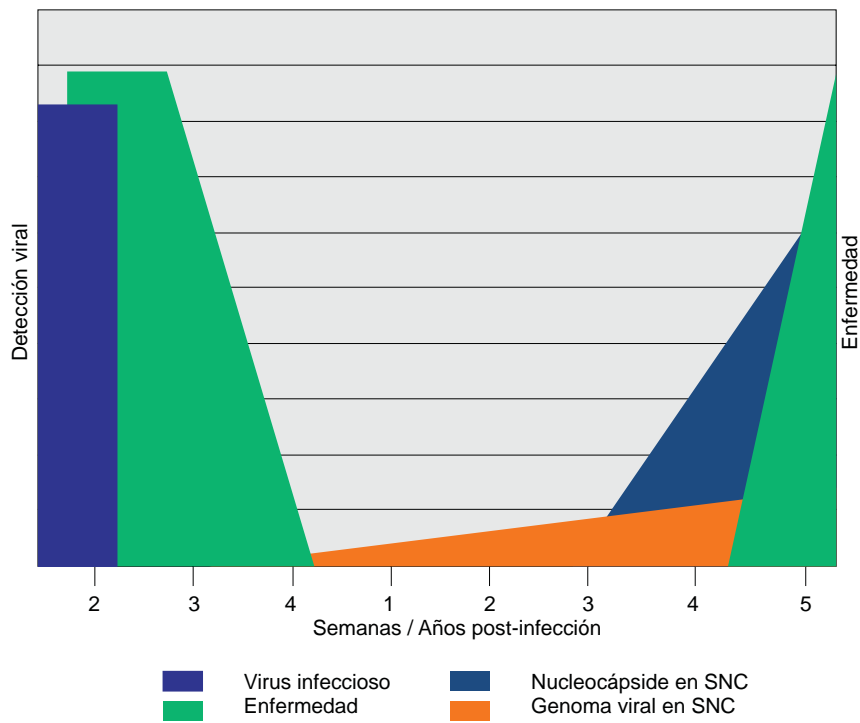


Figura 5.44. Infección persistente lenta abortiva con manifestaciones tardías. Ejemplo: panencefalitis esclerosante subaguda (PEES) por virus sarampión.

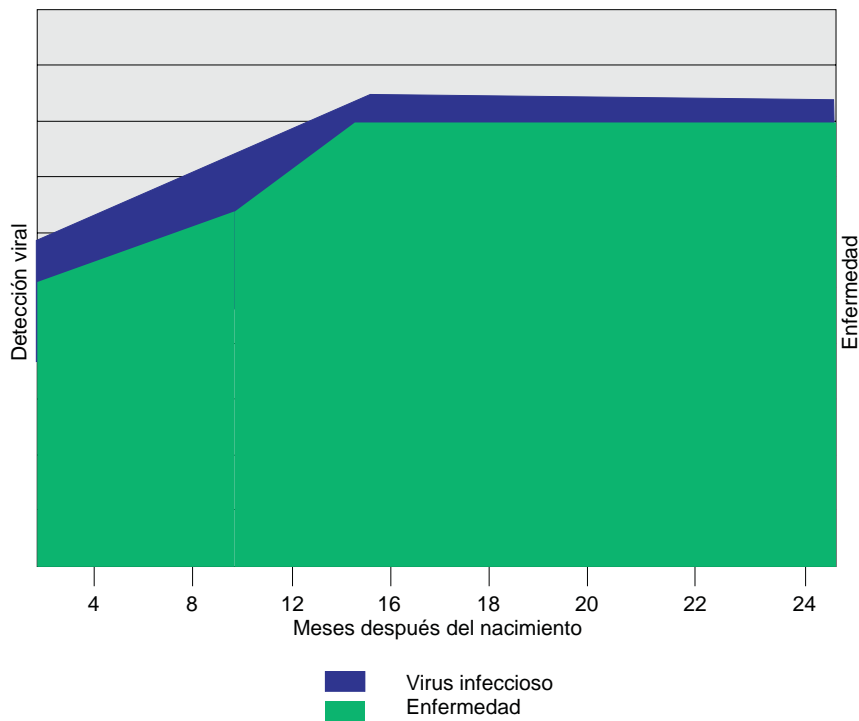


Figura 5.45. Infección persistente con manifestaciones clínicas. Ejemplo: rubéola congénita.



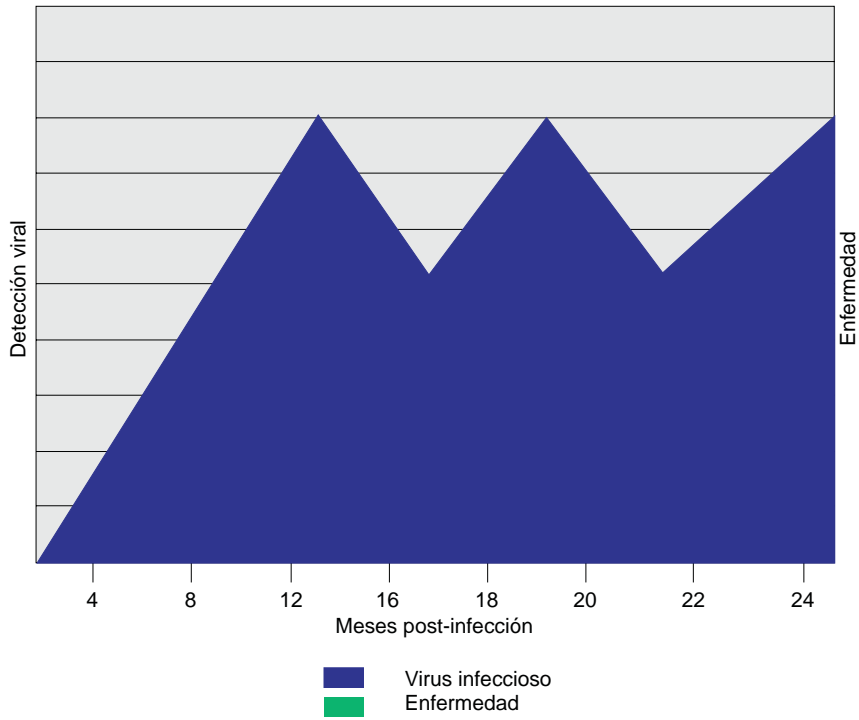


Figura 5.46. Infección persistente subclínica. Ejemplo: infección neonatal por virus hepatitis B.

Corpus Editorial

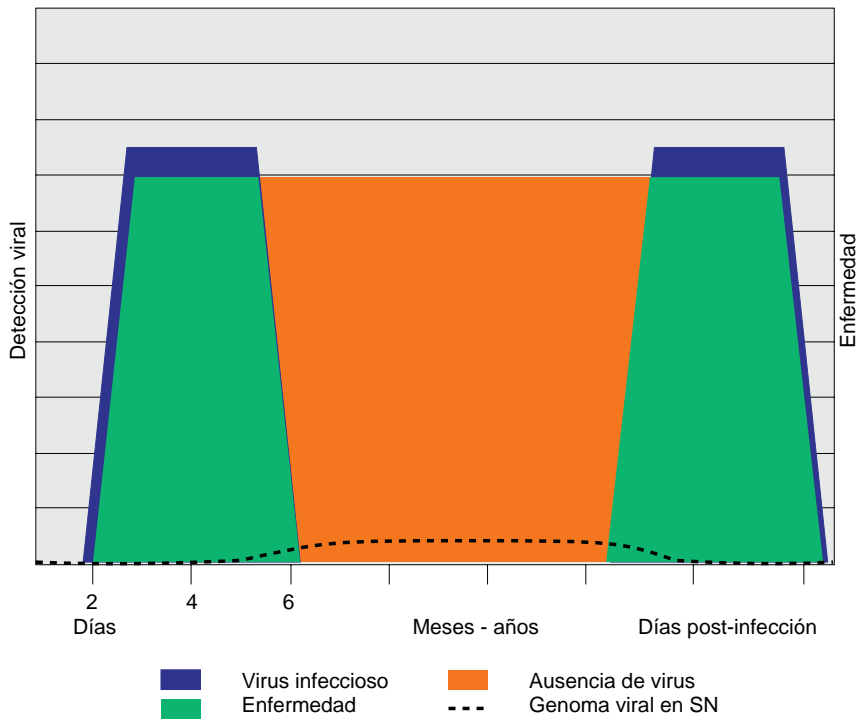


Figura 5.47. Infección persistente latente. Ejemplo: infección por virus herpes simplex.

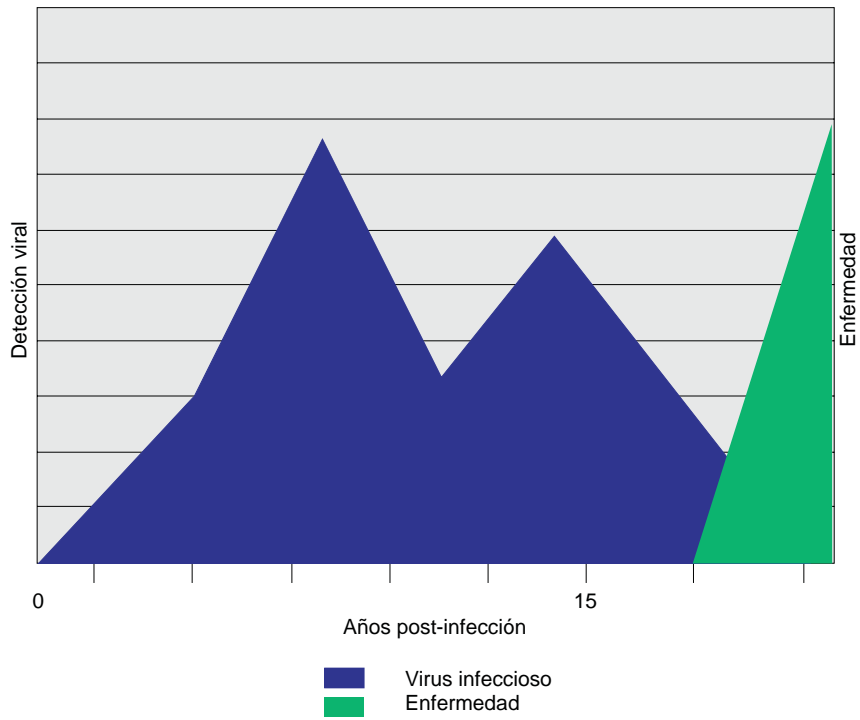


Figura 5.48. Infección persistente con transformación celular tardía. Ejemplo: infección por virus hepatitis B asociado al hepatocarcinoma.

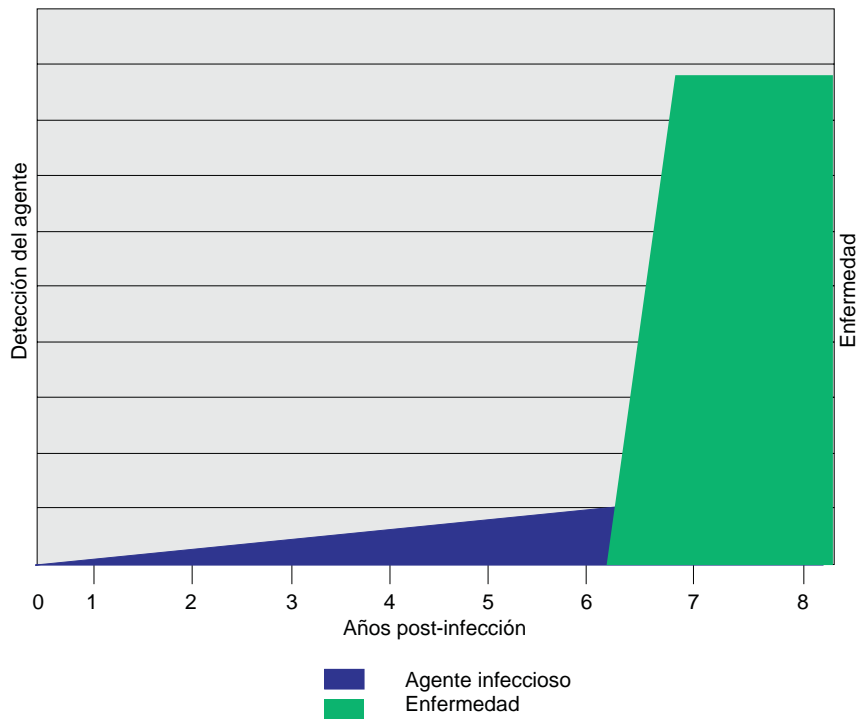


Figura 5.49. Infección persistente lenta. Ejemplo: kuru.



ticuerpos facilitadores en esta infección, se ha documentado una alta incidencia de casos graves de infección por **dengue en menores de 1 año nacidos de madres que le transfirieron pasivamente a través de la placenta anticuerpos IgG contra un serotipo diferente al de su propia infección**. El riesgo de dengue hemorrágico disminuye ostensiblemente en los niños con el devenir del tiempo, asociado a la concentración y vida media de la IgG materna transferida.

Depósito de inmunocomplejos. Los inmunocomplejos promueven la activación del sistema complemento y del sistema de quininas (éstas a través del factor Hageman) y la agregación plaquetaria. El factor quimiotáctico del complemento atrae polimorfonucleares que a su vez liberan enzimas lisosomales. Estas, en combinación con las aminas vasoactivas liberadas, desencadenan las lesiones inflamatorias que producen el daño celular. Si la reacción continúa más allá del período agudo, los polimorfonucleares son reemplazados por células mononucleares. Los factores que determinan el grado de daño mediado por complejos inmunes son los siguientes: tamaño del complejo, proporción relativa del antígeno y del anticuerpo, naturaleza de la red del complejo, tipo de antígeno, especificidad del anticuerpo y su avidéz por el antígeno, clase y subclase de inmunoglobulinas y grado de activación de macrófagos.

Si los inmunocomplejos se forman en exceso de antígenos y con anticuerpos de baja afinidad, no serán removidos de circulación mediante las células retículo-endoteliales que poseen receptores para Fc. Probablemente se formen inmunocomplejos en la mayoría de las infecciones virales: la existencia de antígenos virales en exceso al momento de generarse la respuesta inmune constituye un paso transitorio hacia el posterior exceso de anticuerpos. Sin embargo, la formación de inmunocomplejos puede ser prolongada en el caso de las infecciones persistentes, como se conoció inicialmente en la infección de ratones lactantes inmunocompetentes infectados con virus LCM que desarrollan inmunocomplejos circulantes asociados a glomerulonefritis. En las infecciones persistentes se liberan partículas virales o algunos de sus antígenos de manera continua en presencia de una respuesta de anticuerpos cualitativamente deficiente (baja afinidad o dirigida contra epítopes no críticos) o en cantidades mínimas.

El **daño hístico mediado por complejos inmunes puede localizarse en riñón** (por ejemplo, **glomerulonefritis** observadas en el curso de las hepatitis B por complejos formados por el antígeno de superficie y el anticuerpo específico [HBs Ag / anti-HBs] u otro antígeno también secretado desde la célula (HBe Ag) con el anticuerpo específico [anti-HBe], o en infecciones por HCV, HCMV, HIV o sarampión), **pequeños vasos de la piel** (algunos exantemas virales o en los pródromos de la enfermedad por HBV), **pequeñas arterias (arteritis)** en infectados con HCMV, HIV o sarampión; **periarteritis nodosa** observada en pacientes con hepatitis B), o **artikulaciones (artritis)** observada con algunos arbovirus, erythrovirus [parvovirus] humano B19, o rubéola). Otro sitio preferencial de depósito de inmunocomplejos es el **plexo coroideo**. A su vez, se han detectado depósitos de antígenos de virus sarampión y de sus anticuerpos específicos en el SNC de pacientes con panencefalitis esclerosante subaguda (PEES). Estudios recientes sugieren que las hepatitis B fulminantes se asocian a inmunocomplejos formados por antígeno del core del HBV (HBe Ag) expresados en hepatocitos y anticuerpos específicos sintetizados en el hígado por plasmocitos, con depósito de complemento. En modo análogo, se ha observado que los casos graves de gripe pandémica H1N1/2009 en personas de mediana edad estuvieron asociados a la presencia de anticuerpos circulantes anti-hemaglutinina H1 de baja avidéz y al depósito pulmonar de inmunocomplejos de baja avidéz con activación del complemento.

7. MODELOS DE INFECCIÓN

El desenlace de una infección viral en el organismo humano es variable. Puede ocurrir una infección subclínica o bien desarrollarse signos y síntomas inducidos por la alteración celular ocasionada

por el virus y/o la respuesta del hospedero. La resultante final es dependiente de múltiples factores: dosis infectante, puerta de entrada, vía de diseminación, tropismo viral, virulencia del microorganismo, edad, estado nutricional y carga genética del hospedero y su respuesta inmune innata y adaptativa frente al agente.

7.1. INFECCIONES AGUDAS

Muchos virus producen infecciones limitadas en el tiempo. Estos virus son eliminados del organismo en pocos días o semanas. Para ello, el hospedero desarrolla diversos mecanismos de la respuesta innata (por ejemplo, el sistema interferón) y adaptativa (anticuerpos e inmunidad celular) de defensa.

Cierta proporción de las infecciones virales agudas del ser humano cursa en forma asintomática: se produce la replicación viral en ausencia de manifestaciones clínicas. Son las llamadas infecciones agudas subclínicas o inaparentes (Figura 5.42). Ello ocurre, por ejemplo, en el 90% de las infecciones con virus polio, el 25% de los infectados con virus parotiditis y en más del 80 % de las infecciones con virus hepatitis A (casi en el 100% de las que acontecen durante el primer año de vida).

Se ha postulado que la síntesis temprana de interferón, con el consiguiente estado antiviral que éste induce sobre las células, favorecería el curso subclínico de algunas infecciones virales.

Por el contrario, en ciertas infecciones agudas la replicación viral se acompaña de síntomas clínicos; ello se observa frecuentemente en influenza (Figura 5.43), fiebre amarilla, el 10 % de los infectados con polio (de éste porcentaje sólo el 10 - 40% desarrolla enfermedad paralítica) y muchas otras infecciones.

El virus sarampión también produce habitualmente una infección aguda sintomática (muy alta patogenicidad). Sin embargo, en una proporción de 1-2 de cada 1 000 000 de enfermos se puede observar una rara complicación tardía: es la panencefalitis esclerosante subaguda (PEES), la que se analiza en el próximo ítem.

7.2. INFECCIONES PERSISTENTES

Ciertos virus pueden permanecer en el organismo por períodos prolongados (meses, años y aun durante toda la vida). Son los agentes productores de infecciones persistentes. Éstas pueden –a su vez– estar o no asociadas a manifestaciones clínicas.

Entre las infecciones persistentes comprendidas en el primer grupo podrían mencionarse la PEES y la infección congénita con virus rubéola.

La PEES es una forma de infección persistente lenta abortiva en la cual el virus sarampión infecta el SNC aunque los neocomponentes de la replicación viral no se incorporan a la membrana celular para formar virus completos. Como se mencionó en una sección anterior, existe un defecto en la expresión de los genes M, H y F, con la consiguiente formación anormal de partículas. Como consecuencia de esta restricción –dependiente de la célula hospedera– se acumulan nucleocápsides en el interior de las células nerviosas. Mediante hibridación *in situ* se ha podido demostrar en el SNC secuencias genómicas de virus sarampión antes de la aparición local de niveles detectables de antígenos virales (Figura 5.44). La recuperación de virus infeccioso a partir del encéfalo sólo se obtiene mediante cocultivo con células permisivas. La PEES es una enfermedad casi invariablemente letal que resulta de la persistencia de una infección abortiva.

En la rubéola congénita, el recién nacido infectado exhibe una amplia variedad de anormalidades, que incluyen las cardiopatías congénitas, defectos oculares, sordera, retardo del crecimiento, púrpura trombocitopénica, osteítis, hepatitis, neumonía, encefalitis y lesión cerebral con alteraciones mentales. Se comprueba una continua replicación y excreción viral, la que se puede prolongar más allá del primer año de vida y en algunos tejidos –como el cristalino ocular– hasta los 3 o 4 años después de ocurrido el nacimiento (Figura 5.45).

Un ejemplo característico de infección persistente asintomática

se observa en los portadores crónicos de virus hepatitis B (Figura 5.46). Diversos factores han sido asociados a su producción: temprana edad de la infección primaria –usualmente asintomática–, baja concentración viral del inóculo, factores genéticos, etc. Se calcula en más de 400 000 000 el número de portadores crónicos del HBV en el mundo, siendo éstos el principal reservorio para la continua diseminación horizontal (por vía sexual y parenteral) y vertical (madre-hijo) del virus.

En algunas infecciones persistentes el virus puede continuar replicándose (infecciones crónicas productivas), mientras que en otras puede mantenerse en alguna forma subviral no infecciosa conservando su capacidad para replicarse en algún momento posterior (infecciones latentes) asociándose a episodios agudos de enfermedad. Esta última variedad de infección persistente se observa en las infecciones por virus herpes simplex y varicela-zóster. En el primer caso, el virus entra al organismo a través de piel y mucosas. Muchas infecciones primarias pueden cursar en forma subclínica. En otros casos, se observan típicas lesiones vesiculosas producto de la infección lítica local de las células epiteliales parabasales e intermedias acompañadas de una respuesta inflamatoria. El virus herpes simplex deviene latente luego de la infección primaria, y se dirige por los nervios sensitivos hasta los ganglios correspondientes. Las bases moleculares de la latencia en células nerviosas se describieron en el ítem 5.2.1 Diversos estímulos como la fiebre, la tensión emocional, la luz solar y los traumatismos pueden precipitar la reactivación viral por un mecanismo hasta ahora desconocido. Después de la reactivación, el virus (en forma de subcomponentes) se traslada posiblemente por vía nerviosa sensitiva y establece una nueva infección en piel o mucosas (Figuras 5.15 y 5.47).

La división de las infecciones virales persistentes en diversos tipos no es siempre excluyente: el virus hepatitis B es capaz de causar (además de la infección aguda) una infección persistente productiva en los hepatocitos y exhibir una replicación restringida en el carcinoma hepatocelular (Figura 5.48). La patogenia del hepatocarcinoma no ha sido aclarada, aunque se ha demostrado que después de 3 o más décadas de infección crónica con virus hepatitis B la incidencia de aquél es 200 veces más elevada que en la población general. En el hepatocarcinoma se observa la integración del genoma viral en el de la célula hospedera. Se ha reportado la mutagénesis insercional en los genes *hTERT* y *PDGF*, o la activación de oncogenes como el de la ciclina A2. Es posible que el virus hepatitis B inicie una serie de eventos que conduzca a la injuria hepatocelular crónica, y que ésta a su vez, estimule la regeneración celular crónica. La producción persistente de los hepatocitos podría favorecer la acumulación de mutaciones al azar en el genoma celular, algunas de las cuales podrían ser transformantes y conducir a la adquisición de un fenotipo celular

maligno. El hallazgo de que el gen X del virus hepatitis B posee capacidad transactivadora transcripcional que se extiende más allá del virus hepatitis B a otros virus así como a genes celulares, sugiere que podría también participar en el proceso de transformación.

Más aún, confirmando lo arbitrario –aunque didáctico– de la subclasificación de las infecciones persistentes, el EBV produce una infección productiva en el epitelio faucial y una infección latente en linfocitos. De manera análoga, el HIV está latente en linfocitos T no activados y se multiplica en linfocitos T activados y monocitos.

Algunas infecciones persistentes poseen un período de incubación muy prolongado en las que el tropismo por el hospedero y la susceptibilidad del órgano blanco son restringidos. Los virus y agentes no convencionales (priones) que las producen causan las denominadas infecciones lentas. En esta categoría de infecciones pueden incluirse la panencefalitis esclerosante subaguda (mencionada anteriormente como rara complicación tardía de pacientes que padecieron sarampión), la leucoencefalopatía multifocal progresiva asociada al poliomavirus JC, la panencefalitis rubeólica y la infección por algunos lentivirus como el visna de las ovejas. También se incluyen a los agentes de la enfermedad de Creutzfeldt - Jakob, el kuru (Figura 5.49) y el agente del scrapie en las ovejas (*scrapie* = rascado). Este segundo grupo de enfermedades se caracteriza por producir degeneración neuronal, estado espongiiforme de la sustancia gris, hipertrofia e hiperplasia astrocítica, en ausencia de fenómenos inflamatorios. Llamativamente, no se detecta respuesta inmune humoral o celular en el hospedero. El origen más probable del kuru podría haber correspondido a un caso esporádico de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en Nueva Guinea el que, merced a los ritos canibalísticos de la tribu Fore (en la isla de Guam) fue diseminado a dicha población, emergiendo entonces una cepa diferente de un mismo agente. La replicación de este agente es lenta a través de los años alcanzándose títulos de 10^8 dosis infectantes por gramo de encéfalo.

8. CONCLUSIONES

La patogenia de las infecciones virales está influenciada por múltiples factores dependientes del agente y del hospedero. Con el advenimiento de la biología molecular se ha comenzado una nueva era, la que permitirá acercarse al objetivo de relacionar estructura y funcionalidad de las biomoléculas. La permanente investigación en este campo sin duda proporcionará las bases para un mejor desarrollo de medidas racionales de profilaxis y terapéutica en las diversas infecciones virales.

Bibliografía

- Akhova O, Bainbridge M, Misra V. "The neuronal host cell factor-binding protein Zhangfei inhibits Herpes simplex virus replication". *J Virol* 2005; 79: 14708-18.
- Alché LE, Basualdo JA, Candurra NE, Cavallaro L, Coto C, Damonte EB, *et al.* "Opinión de expertos. El caso del virus de influenza aviar. Tema: Manipulación genética del virus de influenza aviar H5N1 para facilitar su capacidad de infección a un huésped mamífero". *Química Viva* 2012; 11:1. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v11n1/opinion.html>
- Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt Ch, Kasinrer W, *et al.* "Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E". *PLoS Pathog* 2007; 3:1798-1812.
- Chapman NM, Kim KS, Drescher KM, Oka K, Tracy S. "5' terminal deletions in the genome of a coxsackievirus B2 strains occurred naturally in human heart". *Virology* 2008; 375:480-91.
- Cheng VC, To KK, Tse H, Hung IF, Yueng KY. "Two years after pandemic influenza A/2009/H1N1: what have we learned?" *Clin Microbiol Rev* 2012; 223-63.
- Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernández JZ, Batale JP *et al.* "Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease". *Nature* 2009; 1:34-41.
- Farci P, Díaz G, Chen Z, Govindarajan S, Tice A, Agulto L, *et al.* "B cell gene signature with massive intrahepatic production of antibodies to hepatitis B core antigen in hepatitis B virus-associated acute liver failure". *Proc Natl Acad Sci USA*; 107:8766-71.
- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello, Skalka AM. "Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses". 3rd. Edition. ASM Press. Washington, 2009.
- Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, Hanage WP, Van Kerkhove MD, Déirdre Hollingsworth T, *et al.* "Pandemic potential of a strain of Influenza A (H1N1): early findings". *Science*. 2009; 324:1557-61.
- Gambotto A, Barratt-Boyes SM, de Jong MD, Neumann G, Kawaoka Y. "Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus". *Lancet* 2008; 37:1464-75.
- Goñi, SE Iserte JA, Ambrosio AM, Romanowski V, Ghiringhelli PD, Lozano ME. "Genomic features of attenuated Junín virus vaccine strain candidate". *Virus Genes* 2006; 32:37-41.
- Henke UI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, *et al.* "microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA". *EMBO J* 2008; 27:3300-10,
- Herold S, Steinmueller M, von Wulffen W, Cakarova L, Pinto R, Pleschka S, *et al.* "Lung epithelial apoptosis in influenza virus pneumonia: the role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-inducing ligand". *J Exp Med* 2008; 205:3065-77.
- Kim EY, Battaile JT, Patel AC, You Y, Agapov E, Grayson MH, *et al.* "Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease". *Nature Med* 2008; 14:633-40.
- Lin, CL & Kao JH. "Hepatitis B viral factors and clinical outcomes of chronic hepatitis B". *J Biomed Sci* 2008; 15:137-45.
- Lorrot M & Vasseur M. "How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea?" *Virology J* 2007; 4:31.
- Macadam AJ, Ferguson G, Stone DM, Meredith J, Knowlson S, Auda G, *et al.* "Rational design of genetically stable, live-attenuated Poliovirus vaccines of all three serotypes: relevance to poliomyelitis eradication". *J Virol* 2006; 80:8653-63.
- Mahajan VS, Drake A, Chen J. "Virus-specific host miRNAs: antiviral defenses or promoters of persistent infection?" *Trends in Immunol* 2008; 30:1-7.
- Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Tabata T, Pereira L. "Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis". *Am J Pathol* 2006; 168:1210-26.
- Mondotte JA, Lozach P, Amara A, Gamarnik AV. "Essential role of Dengue virus envelope protein N glycosylation at Asparagine-67 during viral propagation". *J Virol* 2007; 81:7136-48.
- Mueller SN, Matloubian M, Clemens DM, Sharpe AH, Freeman GJ, Gangappa S, *et al.* "Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection". *Proc Nat Acad Sci USA* 2007; 104:15430-35.
- Novel swine-origin Influenza A (H1N1) virus investigation team. "Emergence of a novel swine-origin Influenza A (H1N1) virus in humans". *N Engl J Med* 2009; 360:2615-21.
- Rambaut A, Pybus OG, Nelso MI, Viboud C, Taubenberger JK, Holmes EC. "The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus". *Nature* 2008; 453: 615-619.
- Reed JL, Brewah YA, Delaney T, Welliver T, Burwell T, Benjamin E, *et al.* "Macrophage impairment underlies airway occlusion in primary respiratory syncytial virus bronchiolitis". *J Infect Dis* 2008; 198:1783-93.
- Rojek, JM, Kunz, S. "Cell entry by human pathogenic arenaviruses". *Cell Microbiol* 2008; 10: 828-35.
- Russell CA, Fonville JM, Brown AE, Burke DF, Smith DL, James SL, *et al.* "The potential for respiratory droplet-transmissible H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host". *Science* 2012; 336:1541-7.
- Salomon R, Webster RG. "The influenza virus enigma". *Cell* 2009; 136: 402-10.
- Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. "MicroRNAs expressed by Herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs". *Nature* 2008; 454:780-3.
- Van Hoeven N, Pappas C, Belser JA, Maines TR, Zeng H, García Sastre A *et al.* "Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air". *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:3366-3371.

Oncogénesis viral

Norberto A. Sanjuan

INTRODUCCIÓN

El éxito obtenido desde mediados del siglo XIX en el control de las enfermedades infecciosas a través de vacunas llevó a que desde comienzos del siglo XX se intentara encontrar una etiología viral de varias neoplasias malignas humanas. De esa forma, en 1908 Ellerman y Bang describieron el hallazgo de un virus asociado a leucemias experimentales, a lo que luego se le sumaron otros varios descubrimientos de virus relacionados con cánceres. Ello llevó a que en la década de 1970 se invirtiera mucho esfuerzo y dinero para encontrar, por ejemplo, a un virus productor de algún tipo de leucemia humana con el fin de elaborar una vacuna protectora. Todos esos esfuerzos fallaron y en la actualidad se acepta que si bien existen virus relacionados con la génesis de cánceres en la especie humana, estos son siempre cofactores, es decir actores necesarios pero no suficientes para provocar el desarrollo de una neoplasia maligna. Sin embargo, algunos virus oncogénicos son excelentes herramientas para estudiar en forma experimental el desarrollo de distintos tipos de neoplasias. Esto significa que en la actualidad, más que intentar descubrir la existencia de virus que por sí mismos provoquen cánceres, se emplean los virus oncogénicos para comprender mejor el proceso detallado del desarrollo de las neoplasias.

Como introducción al tema es aconsejable aclarar las diferencias que existen entre los conceptos de *transformación celular* y de *neoplasia maligna* o cáncer. La transformación celular es un proceso que puede observarse *in vitro* en el cual las células se immortalizan, luego de que en un cultivo fueron infectadas con un virus determinado; dichas células son capaces de crecer en medios con bajas concentraciones de agar, lo que evidencia una independencia del anclaje al sustrato, pueden formar pluricapas, lo que indica la pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto y, eventualmente, pueden desarrollar tumores si son inoculadas en ratones inmunodeficientes. En cambio, el fenómeno de oncogénesis siempre se da en animales (o humanos) e implica la adición lenta y sucesiva de varias mutaciones críticas en algunos genes regulatorios del crecimiento celular. El hecho de que un virus sea capaz de provocar transformación celular *in vitro* no indica en absoluto que pueda inducir una neoplasia humana.

MECANISMOS ONCOGÉNICOS

Existen dos grandes grupos de virus oncogénicos: los retrovirus, que tienen un genoma compuesto por RNA, y los virus que contienen DNA como elemento de información genética. Ambos tipos difieren en los mecanismos empleados para desarrollar una neoplasia.

En el caso de los retrovirus existen dos grandes grupos: los exógenos y los endógenos. Los exógenos son los que pueden infectar a un animal desde el exterior, mientras que los endógenos forman parte del genoma de los animales, pueden expresarse parcialmente y pueden ser heredados. Existen eventualmente recombinaciones entre un virus exógeno y uno endógeno, como se verá más adelante. Cabe citar que la inmensa mayoría de estos virus forman parte de modelos netamente experimentales, que provocan sobre todo leucemias o sarcomas en animales endocriados. Estos modelos no tienen una contraparte humana y parecen bastante artificiales como para explicar la génesis de una neoplasia en el hombre. El único retrovirus humano asociado a una neoplasia maligna es, hasta hoy, el HTLV-I.

Los mecanismos por los cuales los retrovirus pueden ser oncogénicos son básicamente tres. En el primero (cuyo ejemplo es el virus del sarcoma de Rous de los pollos) el virus tiene en su genoma la codificación necesaria para sus tres genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, y, además, un oncogén viral, el *v-src*. Este último constituye una versión mutada y altamente transformante del proto-oncogén celular *c-src* que es un gen normal. El virus adquirió ese oncogén a través de la evolución biológica y lo hizo en su forma mutada. Cabe señalar que la expresión de una sola copia del oncogén *v-src* en una célula es suficiente para transformarla mientras que la sobre-expresión del proto-oncogén *c-src* no lo hace. Este virus tiene, entonces, todos los genes necesarios para replicar y producir progenie y también un oncogén cuya expresión lleva a la transformación celular. El mecanismo de transformación es, por lo tanto, muy fácil de comprender, pero este tipo de virus es absolutamente excepcional dentro de los retrovirus oncogénicos. El segundo mecanismo lo emplean aquellos retrovirus que también han incorporado en su genoma a un oncogén que es la variante mutada de un proto-oncogén celular normal pero, a diferencia del ejemplo anterior, al haber incorporado al oncogén han perdido parte de alguno de los tres genes estructurales. Es decir, estos retrovirus pueden transformar pero no pueden replicar por sí mismos porque les falta la maquinaria genética necesaria para ello. Para replicar requieren de una co-infección en un modelo que tenga un retrovirus endógeno que sí aporta los tres genes estructurales aunque no tiene ningún oncogén. El tercer mecanismo lo emplean los retrovirus que carecen de oncogén pero que tienen los tres genes estructurales. En este caso, para que un virus provoque una neoplasia tiene que realizar múltiples ciclos de replicación, durante los cuales impactará en el genoma celular innumerables veces en forma de provirus. La mayoría de esas veces la incorporación del retrovirus no producirá cambio alguno en la célula pero, por azar, en un momento dado el virus impactará en un gen regulatorio o en su promotor y provocará la transformación celular. A este mecanismo se le denomina *mutagénesis por inserción* y es el que emplea el HTLV-I.

A diferencia de los virus oncogénicos con RNA, los que poseen DNA pertenecen a familias y a géneros muy distintos y cada uno de ellos utiliza diferentes estrategias para la transformación celular. Existen aquí virus humanos que tienen la capacidad de inducir neoplasias en animales y transformar células de otras especies *in vitro*, como por ejemplo algunos adenovirus que, no obstante, nunca hasta hoy han sido asociados al desarrollo de neoplasias humanas. Otros, sin embargo, sí están asociados a cánceres de la especie humana, basado esto en datos epidemiológicos, clínicos y moleculares. Los miembros más conspicuos de este grupo de virus son el Epstein-Barr, el herpes humano 8 (HHV-8), el virus de la hepatitis B y el virus papiloma humano (HPV). Los tres primeros serán tratados extensamente en otros capítulos, de tal forma que en éste se profundizarán los aspectos más importantes del HPV. Aunque tomemos al HPV como al virus prototipo que interviene en la etiopatogenia de algunas neoplasias mucocutáneas, debemos recordar que a comienzos de 2008 se descubrió un nuevo virus polioma asociado a la etiología del carcinoma de células de Merkel de la piel. Esta es una neoplasia maligna rara, pero constituye un ejemplo de cómo los virus polioma pueden estar involucrados en algunos cánceres cutáneos. Muy recientemente hemos reportado la detección de antígenos de virus polioma en el tipo más frecuente de neoplasias benignas de los anexos cutáneos humanos como son los pilomatri-

comas. No obstante, el significado de este hallazgo todavía debe ser constatado en forma independiente por otros investigadores.

Se ha detectado también que algunos virus papiloma humanos (denominados "beta-papilomavirus") pueden producir infecciones latentes en la piel del humano y eventualmente lesiones cutáneas posteriores, a diferencia de los "alfa-papilomavirus" que producen lesiones preneoplásicas y neoplásicas en las mucosas, entre ellas la genital.

EL VIRUS PAPILOMA HUMANO: SU PARTICIPACIÓN EN LA ONCOGÉNESIS

Estos virus son icosaédricos y desnudos y tienen un genoma con DNA bicatenario. Hasta hace poco se los agrupaba junto con los virus polio como *Papovavirus* pero las diferencias genéticas halladas hicieron que hoy se los considere como miembros de la familia *Papillomaviridae*, que es independiente de la *Poliomaviridae*. Como todo virus, tiene genes tempranos, que son regulatorios y genes tardíos que codifican a las proteínas estructurales.

Los genes tempranos de mayor importancia son el E2, el E5, el E6 y el E7, mientras que el gen tardío más preponderante es el L1. El gen E2 regula negativamente la expresión de los genes E6 y E7, siendo estos dos últimos los oncogenes virales, mientras que el E5 también tiene actividad transformante (provoca hiperplasias epiteliales en animales transgénicos) y aumenta la síntesis de DNA y la proliferación de los queratinocitos. Las diferencias en la secuencia del gen L1 es la que determina que existan más de 100 tipos (que no son *serotipos*) de HPV, algunos de ellos altamente oncogénicos, como el 16, el 18 y el 31, y otros sólo productores de neoplasias benignas denominadas verrugas. Los HPV altamente oncogénicos se asocian al cáncer de cuello uterino, pero también al de vulva y al de pene.

Anualmente se registran en todo el mundo 470000 nuevos casos de cáncer de cuello uterino y, dado que la gran mayoría de ellos ocurren en Latinoamérica, el sudeste asiático y el África sub-Sahariana donde las condiciones sanitarias son malas, de ese total de casos nuevos 233000 serán mortales.

Se acepta que la primoinfección con HPV ocurre fundamentalmente luego del comienzo de la actividad sexual y que el virus es transmitido por esta vía. No obstante, se ha planteado que ésta no es la única manera de adquirir la infección, ya que el virus puede permanecer viable por períodos muy prolongados de tiempo en fomites. No se conoce exactamente de qué manera el HPV interactúa con receptores del epitelio del cuello uterino y qué mecanismos emplea para alcanzar la capa basal de ese epitelio, pero se propone que los microtraumas producidos durante el coito facilitarían la infección. De cualquier forma, el sector del cuello uterino donde se originan las neoplasias es la zona de transición entre el epitelio plano-estratificado del exocervix y el epitelio cilíndrico simple del endocervix. Una vez alcanzada la capa basal, el HPV permanece con su DNA circularizado en forma episomal en el núcleo de las células y va madurando a medida que maduran los queratinocitos, de manera tal que en la capa más superficial del epitelio se forman células vacuolizadas con núcleos excéntricos irregulares y picnóticos denominadas *coilocitos* que contienen virus infecciosos que una vez liberados infectarán a nuevas células o a otra persona. Esta fase del ciclo replicativo viral es lítica, puesto que destruye finalmente al queratinocito.

No obstante, en un momento del ciclo de replicación y al cabo de un período que puede llevar más de 10 años, el virus integra su

genoma al de la célula, generalmente a través del gen E2. De esta forma, E2 es inactivado y, dado que normalmente actúa inhibiendo la expresión de E6 y de E7, estos dos últimos se transcribirán sin inconvenientes. El producto del gen E6 interactúa con la proteína celular p53, la compleja con ubiquitina y la degrada a través del proteasoma, mientras que el producto de E7 se une a la proteína pRB inactivando su función. De este modo el HPV provoca por un lado la inactivación de una proteína (p53) que tiene como función detectar alteraciones en el DNA celular y, si las encontrara, llevar a la muerte celular por apoptosis y, por el otro, hace que la célula entre permanentemente en el ciclo de replicación. La consecutiva acumulación de mutaciones indeseadas llevará con el tiempo a la adquisición de un fenotipo neoplásico. No obstante, se sabe que estos factores son necesarios pero no suficientes para la génesis de una neoplasia. La expresión de E5 y el efecto de los estrógenos, la dieta y eventualmente otras infecciones concomitantes como las producidas por el virus herpes simplex del tipo 2 también actuarían como cofactores para el desarrollo de un cáncer de cuello uterino. Se han desarrollado por lo menos 2 vacunas que ya están comercializadas y que intentan evitar la infección por los tipos de virus papiloma productores de lesiones genitales frecuentes y/o potencialmente malignas. Hasta hoy se recomienda su aplicación en niñas a partir de los 11 años en dos dosis consecutivas. La vacuna parece ser efectiva pero es extremadamente cara para los sectores sociales que más la necesitan y encierra el riesgo de que, si fuera administrada sin educación sanitaria concomitante, induciría a la población que la recibiera a suponer que estará exenta de toda otra infección venérea, lo que —obviamente— no es cierto. Conceptualmente la vacuna puede ser administrada siempre que no se abandonen las demás medidas profilácticas de enfermedades de transmisión sexual como son, por ejemplo, el uso de preservativos, el conocimiento de los compañeros sexuales, el control médico periódico y la detección precoz de signos de enfermedad venérea, así como la necesidad de la vacunación contra el virus hepatitis B.

Uno de los puntos críticos en la oncogénesis por virus con DNA es la relación que hay entre la replicación viral y la inducción de neoplasias. Como se explicó arriba, uno de los puntos más difíciles de comprender es cuándo una infección que era productiva y provocaba lisis celular cambió a una infección del tipo transformante. Este proceso ha sido estudiado empleando ratones transgénicos que expresan cada una de las proteínas transformantes de HPV solas o en conjunto y también empleando virus polio en animales de experimentación. Este último virus codifica a los oncogenes mT y LT que actúan de manera distinta a la explicada para los oncogenes E6 y E7 del HPV. El oncogén mT (que es el más importante) se une al producto del proto-oncogén celular *c-src* y, mediante una serie de fosforilaciones sufre un cambio estérico que le permite interactuar, a su vez, con varios péptidos involucrados en los mecanismos de transducción de señales como son el Shc, las proteínas 14-3-3, la fosfatidil inositol-3-kinasa, etc. Pero lo llamativo es que esto ocurre tanto durante la fase lítica de la infección por el virus como durante la inducción de neoplasias. De tal forma que no está claro cuál es el punto o *switch* que determina el pasaje de un tipo de infección a otro y que es independiente de la mera expresión de los oncogenes virales. En este sentido, el estado de permisividad celular, la interacción de proteínas virales con diferentes factores de transcripción celulares y quizás las propias bases genéticas de los huéspedes están siendo intensamente estudiados en la actualidad.

Bibliografía

- Dahl J, You J, Benjamin, T. "Induction and utilization of an ATM signaling pathway by polyomavirus". *J Virol* 2005; 79: 13007-17.
- Lambert PF, Ozbun MA, Collins A, Holmgren S, Lee D, Nakahara T. "Using an immortalized cell line to study the HPV life cycle in organotypic raft cultures". *Methods Mol Med* 2005; 119:141-55.
- Sanjuan N, Porrás A, Otero J, Perazzo S. "Expression of major capsid protein VP-1 in the absence of viral particles in thymomas induced by murine polyomavirus". *J Virol* 2001; 75:2891-9.
- Uren AG, Kool J, Berns A, van Lohuizen M. (2005). "Retroviral insertional mutagenesis: past, present and future". *Oncogene* 2005; 24:7656-72.
- Sanjuan NA, Símula S, Casas J, Woscoff A. "Detection of polyomavirus major capsid antigen (VP-1) in human pilomatricomas". *Medicina (Buenos Aires)* 2010; 70:159-62.

Mecanismos de defensa del hospedador frente a las infecciones virales

José Raúl Oubiña - María Laura Minassian - Verónica Lidia Mathet

1. INTRODUCCIÓN

1.1. HISTORIA

Los términos "inmunidad" e "inmune" provienen del latín *immunitas* e *immunis*, respectivamente. Dichos vocablos eran utilizados en época de los romanos, para referirse a aquellos individuos exentos de cumplir determinados deberes, tales como pagar impuestos o cumplir el servicio militar. Fue el poeta Lucano (Marcus Annaeus Lucanus 39-65 d.C.) en su celeberrimo poema épico "Farsalia" (*Bellum civile*) donde se narra la lucha entre César y Pompeyo por el poder de Roma, quien utilizó metafóricamente el término "inmune" para referirse a la legendaria resistencia contra mordeduras de serpientes de los integrantes de la tribu Psylli del Norte de África. Por extensión, dicho vocablo se utiliza desde entonces para aquellos mecanismos que evitan al paciente pagar el tributo de la enfermedad.

Sin embargo, la noción de que la "inmunidad" conferida por el padecimiento de una enfermedad infecciosa puede proteger había sido previamente reflejada por el historiador griego Tucídides, quien describió que la plaga de Atenas (para algunos investigadores, probablemente fiebre tifoidea) ocurrida hacia el 430 a.C. "nunca afectaba dos veces a un mismo hombre".

Un experimento natural ocurrido en las remotas islas Feroe (**Føroyar** en feroés, **Færøerne** en danés, lo que significa "Islas de corderos") en el siglo XVIII mostraría las bases que correlacionan hoy la protección con la memoria inmunológica. El "experimento" comenzó en 1781 con un brote epidémico de sarampión en las mencionadas islas. Durante los subsiguientes 65 años no hubo casos de dicha enfermedad entre los isleños, hasta que en 1846 una nueva epidemia afectó entre el 75 y el 95% de los habitantes. Fue el médico danés Ludwig Panum quien estudió la epidemiología del brote y relató que "entre los muchos individuos adultos o ancianos que habían padecido la epidemia de 1781, ninguno fue atacado por segunda vez". El mejor control interno de este experimento natural quedó también documentado ya que "aquellas personas mayores que no habían padecido sarampión con anterioridad, enfermaban al exponerse a la infección". Estos clásicos estudios de Panum permitieron obtener dos valiosas conclusiones: a) que la protección contra el sarampión era de larga duración; y b) que no era necesaria la reexposición al virus para mantener por períodos prolongados la inmunidad protectora. Este último aspecto proveyó una crucial pista acerca de lo que se conoce actualmente como memoria inmunológica. Esta propiedad, fue subsiguientemente corroborada en las epidemias de fiebre amarilla ocurridas en Virginia, EE.UU., y de poliomielitis entre esquimales de Alaska.

1.2. GENERALIDADES

Los mecanismos de defensa del hospedador contra las infecciones virales han sido descriptos como una *sinfonía* de factores (*instrumentos* de distintos mecanismos) específicos e inespecíficos. La información obtenida del estudio de infecciones virales naturales o experimentales permitió evaluar la importancia relativa de ambos mecanismos, ya que éstos varían de acuerdo a los diferentes virus que se consideren. Siguiendo con la imagen metafórica, al igual que en una sinfonía, existen momentos donde debe "actuar"

un instrumento como solista mientras que en otros es el conjunto instrumental el que se expresa en su totalidad.

En la delicada hipotética balanza que mide el "peso" de los atributos virales (patogenicidad, virulencia, evasión a la respuesta inmune) y los del hospedador, éste impone el vigor de su respuesta inmune (Figura 7.1).

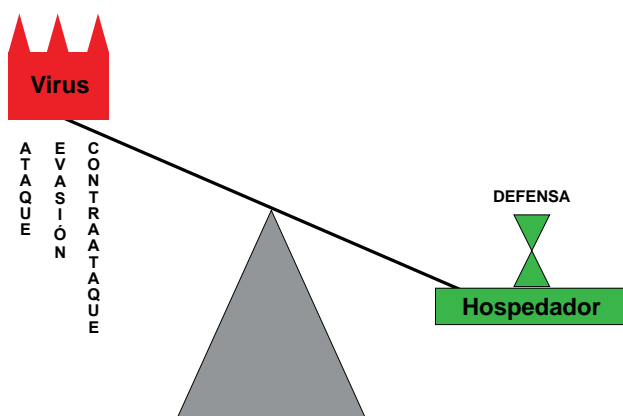


Figura 7.1. Relación virus-hospedador. Los mecanismos de defensa de éste prevalecen sobre los que promueve la infección viral.

Uno de los mayores avances en la Medicina moderna ha sido el desarrollo de vacunas contra muchas de las infecciones virales graves y aun mortales. Las vacunas actúan en general induciendo la formación de anticuerpos específicos contra epítopes críticos de la superficie viral, que –habitualmente– impiden su adecuada adsorción a los receptores o correceptores celulares, aunque también actúan mediante otros mecanismos (véase el ítem 3.1.2). De esta manera, cuando el hospedador es expuesto a la infección natural, los anticuerpos preformados neutralizarán/limitarán al virus infectante y acortarán el curso de la infección. Se ha estimado que la vida media de los anticuerpos contra ciertos virus es muy larga, alcanzando los 50 años para el virus varicela-zóster y los 200 años para sarampión y parotiditis. Ciertas vacunas, principalmente las elaboradas con virus atenuados, pueden inducir también mecanismos de citotoxicidad T-dependientes, cruciales para la eliminación de virus en las células que pudieren infectarse. Más recientemente, estudios realizados con vacunas experimentales documentaron que es posible lograr también una respuesta T (además de la respuesta humoral correspondiente) mediante el uso de vacunas a DNA. Estos hallazgos han abierto prometedoras expectativas para su futura utilización en humanos.

Clásicamente, se consideraba a los anticuerpos como el único factor de defensa contra los virus. Sin embargo, en las últimas décadas se demostró que factores inespecíficos y la inmunidad celular específica tienen un papel fundamental en la recuperación del paciente en muchas enfermedades virales.

Los mecanismos más eficientes con los que el hospedador se defiende de las infecciones virales dependen decisivamente del modo por el cual los virus se diseminan dentro del hospedador.

Los virus pueden diseminarse por tres vías. El primer tipo de diseminación es a través del líquido extracelular. La progenie

viral neoformada (que incluye partículas infectantes –viriones– y defectivas no infectantes) es liberada por lisis a ese líquido. A través del mismo, los viriones podrán infectar a otras células. Debido a esta travesía viral, es posible, por ejemplo, inhibir –en un cultivo infectado experimentalmente *in vitro*– el ingreso viral a células vecinas susceptibles a la infección con los tres serotipos del virus polio mediante anticuerpos monoclonales antirreceptor para este virus. Ello resulta factible merced a que la diseminación de este agente es obligatoriamente realizada a través de una etapa extracelular. De manera análoga, se produce la neutralización viral *in vivo* cuando interactúan anticuerpos dirigidos contra sitios críticos de la estructura viral más externa, que en el caso del virus polio consiste en una neutralización de los epítopes serotipo-específicos de su cápside. Al circular libres en el torrente sanguíneo (fase virémica), estos viriones podrán ser neutralizados por dichos anticuerpos específicos.

Sin embargo, la infección por virus que promueven la lisis celular también induce *in vivo* una respuesta inmune mediada por células citotóxicas. Su papel está dirigido a la eliminación de células infectadas aun antes de su eventual lisis, lo cual promoverá la erradicación de la infección.

El segundo tipo de diseminación es por brotación de célula a célula, es decir por contigüidad. Este proceso no es en sí mismo causa de un daño grave a la célula, aunque en la membrana, antes de la brotación, se anclan las glicoproteínas virales, desplazando a las proteínas celulares. De hecho, múltiples virus que emergen por esta vía no son citolíticos (entre ellos los togavirus como el agente etiológico de la rubéola, los virus parainfluenza, etc.). Sin embargo, existen otros virus que emergiendo por brotación sí inducen la destrucción celular, aunque por mecanismos no vinculados a este proceso, como lo es la apoptosis. Por ejemplo, los virus herpes se diseminan de célula a célula por brotación en las membranas de células contiguas, sin necesidad de pasar por el líquido extracelular. Sin embargo, estos virus pueden provocar la muerte de las células infectadas productivamente como resultado de la expresión de ciertos genes virales (véase el capítulo 23.2 "Herpes simplex").

Debido a que generalmente los anticuerpos no neutralizan virus en el interior celular (se conocen los fascinantes y excepcionales ejemplos en los que el virus de la rabia puede neutralizarse en cultivo de células de neuroblastoma mediante anticuerpos mo-

noclonales internalizados, o el virus hepatitis B (HBV) en el interior de hepatocitos mediante anticuerpos específicos internalizados mediante endocitosis), el mecanismo de defensa principal frente a virus brotantes no líticos en esta etapa del ciclo de infección está mediado por células citotóxicas. Sin embargo, cuando alguno de los virus envueltos no citolíticos pasa a la circulación en forma de partícula libre (por ejemplo, ante el egreso por el polo basolateral de una célula polarizada), queda expuesto a la acción de los anticuerpos neutralizantes (como en el caso del virus parotiditis, del virus Junín o del HBV). En modo análogo, durante los últimos años se ha explorado la posibilidad de que anticuerpos intracelulares (o "intracuerpos") experimentalmente elaborados, y constituidos (en los de primera generación) por una cadena única peptídica con los dominios variables de las cadenas pesada y liviana de la Ig unidas por un péptido puedan expresarse en el interior celular, preservando la afinidad del anticuerpo parental y redireccionarse a diversos compartimientos e inhibir ciertos virus. Estos "intracuerpos" han mostrado su versatilidad en la inhibición experimental de eventos tempranos y tardíos de la replicación *in vitro* del HIV, lo que es un terreno de investigación en el campo de la terapia génica (véase el ítem 3.1.2).

En síntesis, tanto los virus desnudos como envueltos que eventualmente invadan el torrente circulatorio podrán perder su infectividad si el hospedador desarrolla una adecuada respuesta de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, en muchas ocasiones sólo a través de mecanismos mediados por células podrá erradicarse definitivamente la infección. La mayoría de los virus, aunque no todos, induce una respuesta mixta humoral y celular. El grado de participación de cada una de ellas variará según el virus en cuestión.

El tercer tipo de diseminación es por integración del genoma viral al de la célula. El **provirus queda integrado** al genoma de la célula hospedadora y puede permanecer en ese estado por un cierto tiempo. Cuando la célula se divide, dará lugar a nuevas células hijas que llevarán en su genoma el provirus integrado. El provirus puede activarse dando lugar a la formación de nuevos viriones que irán a infectar a otras células (véase el capítulo 5). Los retrovirus (por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana –HIV–, así como diversos virus productores de leucemias/linfomas) son ejemplos de este tipo de diseminación. Aún se desconoce cuál podría ser un mecanismo de defensa eficiente y suficiente para controlar la infección por HIV.

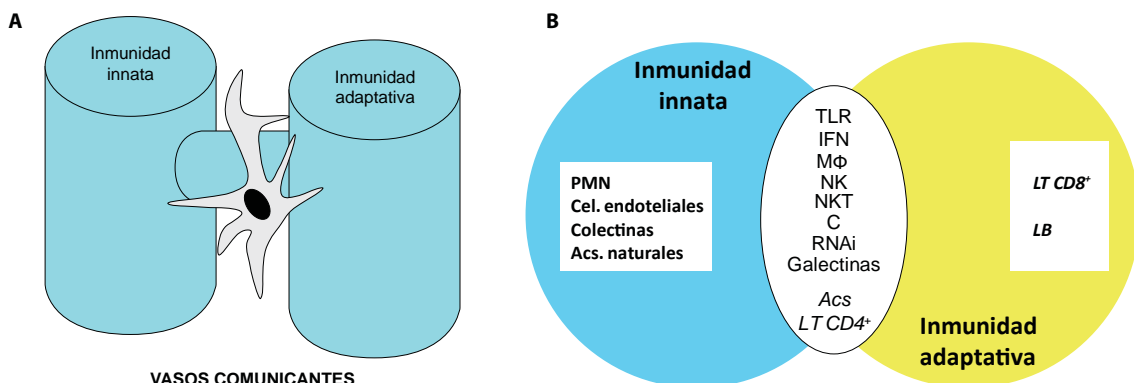


Figura 7.2. Inmunidad innata y adaptativa. **A.** La inmunidad innata y la adaptativa son como dos grandes vasos comunicantes. Una y otra están estrechamente vinculadas participando varios de sus respectivos componentes en la actividad de ambas, como ocurre con las células dendríticas. **B.** Componentes de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa. PMN: polimorfonucleares; Acs: anticuerpos; C: sistema del complemento; CD: células dendríticas; TLR: receptores Toll-símil (*Toll Like Receptors*); IFN: interferón; MΦ: macrófagos; LT: linfocitos T; LB: linfocitos B. RNAi: interferencia de RNA mediada por siRNA (*small interfering RNA*) y microRNA (miRNA). Véase que algunos elementos forman parte de ambos compartimientos (intersección de conjuntos), aunque cumplen funciones más preponderantes para uno u otro. Observe el lector que en la región correspondiente a dicha intersección de conjuntos, los elementos que corresponden fundamentalmente a la inmunidad adaptativa –aunque participan de la innata– se mencionan también con letra itálica: los anticuerpos pueden participar de la citotoxicidad mediada por células NK, y los linfocitos T CD4⁺ activan también a dichas células. Los macrófagos, las NK, las NKT y las células dendríticas modelan la actividad de la inmunidad adaptativa, a través de las señales enviadas a los linfocitos T, dependientes de su interacción con determinados PAMP. El sistema del complemento no sólo participa en la inmunidad innata, sino también en la virólisis inmune mediada por anticuerpos y en la regulación de la actividad de linfocitos T CD8⁺.

Característica	Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
Desarrollo en la evolución de las especies	Muy antiguo	Más reciente
Codificación genética de receptores	Línea germinal	Recombinación somática
Característica del reconocimiento	Rígido	Flexible y con memoria
Receptores	Receptores de reconocimiento de patrones o RRP (Toll, RLH [<i>Rig1 like helicases</i> : Rig1, Mda5], sensor citosólico de DNA, etc.)	Receptores B (Ig) y T (TCR)
Elemento reconocido	Patrones moleculares asociados a patógenos o PAMP	Epítopes lineales o conformacionales (por el receptor B) o lineales en el contexto de moléculas del CMH (por el receptor T) o glicolípidos (por CD1)
Especificidad	Amplio rango: Sí, altamente específicos (RRP) o No (barreras naturales)	Sí, con exquisita capacidad discriminativa
Afectación intrínseca por contacto previo con antígeno	No	Sí

Tabla 7.1. Cuadro comparativo entre la inmunidad innata y la adaptativa.

A continuación, se intentará puntualizar algunos de los factores (y los mecanismos cuando fueren conocidos) que participan en la resistencia a la infección viral. En dicha resistencia participan mecanismos de naturaleza no inmune e inmune, siendo ésta innata o adaptativa (Figuras 7.2 A y B). Por razones de espacio, sólo se hará énfasis en aquellos eventos vinculados a los mecanismos inmunes de la defensa antiviral del hospedador, y a algunos conceptos recientemente incorporados a la Inmunología. El lector es referido a textos generales de Inmunología para ampliar temáticas particulares de esta ciencia fascinante.

2. RESISTENCIA INESPECÍFICA E INMUNIDAD INNATA

Si bien la respuesta inmune innata (del latín *innatus*, nacer o producirse en) fue considerada inespecífica hasta años recientes, el descubrimiento de receptores celulares de reconocimiento de patrones (RRP) presentes en agentes patógenos, estableció indubitablemente la especificidad del reconocimiento, aunque éste es de naturaleza diferente al de la inmunidad adaptativa (Tabla 7.1). Por ello, la resistencia inespecífica no es un sinónimo de respuesta innata. Sin embargo, la inmunidad innata también comprende la presencia de barreras naturales como la piel sin especificidad alguna. Por lo expuesto, se considera que la inmunidad innata exhibe un amplio rango de especificidades, definiéndose como perteneciente a la misma a los elementos celulares y solubles que no están afectados intrínsecamente por el contacto previo con el antígeno.

Los factores que modelan la inmunidad innata a los virus son múltiples: entre ellos, merece destacarse la **edad** del hospedador, en casos muy especiales también el **sexo**, su **estado nutricional** y **factores genéticos**. **La inmunidad innata comprende fenómenos de regulación post-transcripcional de los RNAs virales mediados por siRNA (*small interfering RNA*) y miRNA (micro RNA), interferencia en la replicación viral mediados por el sistema Interferón (IFN), actividad de colectinas, anticuerpos naturales y del sistema complemento (C), así como la función de las células macrófágicas, dendríticas, NK y NKT, y las epiteliales de la piel y las mucosas intestinal y pulmonar. Los componentes más relevantes de la inmunidad innata antiviral son las células dendríticas (CD) y NK, los diferentes RNA interferentes y el sistema IFN.**

La **edad** del hospedador puede determinar la susceptibilidad o la resistencia a determinados virus. Por ejemplo, los neonatos infectados con HBV, mediante transmisión perinatal desarrollan

infecciones persistentes, ya que no son capaces de eliminar el virus de su organismo, probablemente por una inadecuada respuesta de su sistema inmunológico frente a la infección y por el efecto tolerogénico del antígeno soluble HBe. Como advertirá el lector en el capítulo 23.3, no todas las cepas (las denominadas e', ni el genotipo G) del HBV expresan dicho antígeno, por lo que el efecto tolerogénico no podrá promoverse en estos casos.

Desde el punto de vista de las infecciones experimentales, se ha observado diferente susceptibilidad de ratones a la infección con arenavirus según su edad. Los ratones lactantes de 24-48 h de vida inoculados por vía intracerebral con el virus Junín –agente de la fiebre hemorrágica argentina– son altamente sensibles y mueren como consecuencia de una encefalomiелitis mediada por linfocitos T (LT). Por el contrario, los ratones adultos (más de 20 días) de casi todas las cepas estudiadas hasta el presente exhiben resistencia a la infección con el mismo virus, desarrollando una infección inaparente con síntesis de anticuerpos específicos. Esta diferencia en el comportamiento se atribuye a la maduración de la respuesta inmune y al desarrollo en los animales adultos de una respuesta específica supresora.

La edad también desempeña un papel relevante en infecciones por virus estacionales influenza A (H1N1) y A (H3N2), observándose frecuentemente una progresión más grave de la infección en ancianos que en jóvenes o adultos. **La observación en las primeras semanas de la pandemia de gripe de 2009 por influenza A(H1N1) de que entre los casos iniciales el grupo más afectado era el de niños y jóvenes (y adultos menores de 60 años) causó significativa intriga en la comunidad científica. La ulterior dilucidación de la estructura cristalográfica de la hemaglutinina del virus pandémico en 2009 y su comparación con el de 1918 (que también había circulado en años subsiguientes), demostró estrechas semejanzas, que explican la inmunidad observada en un cierto porcentaje de individuos mayores de 60 años.**

El **sexo** puede estar también asociado a una diferente evolución de algunas infecciones virales. Tal es el caso de la hepatitis C, en la que se ha documentado que existe una asociación entre una menor tendencia al desarrollo de eventos cirróticos en mujeres (pero no en varones) que expresan el genotipo GG del promotor de IL-10 (asociado a alta producción de IL-10), lo que conlleva al desenlace dual de una menor capacidad de eliminar el virus del organismo en la infección crónica, pero con una menor tendencia a la fibrosis (uno de los tres elementos del proceso cirrótico, junto a la necrosis y la regeneración hepatocítica).

En total discrepancia con la hipótesis de larga data que indicaba que la transferencia pasiva de IgA (o eventualmente otras moléculas solubles) de origen materno mediante la lactancia confiere protección a ambos sexos por igual, muy recientemente se ha observado que dicha alimentación promueve efectos diferentes en la prevención de infecciones virales respiratorias, confiriendo protección a las niñas, pero no a los niños, lo que sugiere la activación de mecanismos regulados por hormonas específicas u otras moléculas diferencialmente expresadas en ambos sexos.

En niños desnutridos, muchas infecciones virales revisten mayor gravedad que en niños eutróficos. Ello se observa, por ejemplo, en la evolución más grave de diversas infecciones gastrointestinales o respiratorias. Esto se debe a que la desnutrición implica una desventaja para el normal desarrollo de la respuesta inmune.

Sorprendentemente, estudios efectuados en ratones infectados con el virus Coxsackie B5 demostraron también una alteración de la respuesta a dicho virus, como consecuencia de la alimentación hipercolesterolémica, habiéndose sugerido que la susceptibilidad aumentada sería debida a la disfunción de macrófagos hepáticos y a trastornos de la movilización de monocitos desde el lecho sanguíneo.

Los **factores genéticos** condicionan la presencia o ausencia de receptores en las membranas celulares que permitirán la adsorción de los virus, es decir, el primer paso de la replicación viral. Por esta razón, el ser humano no se infecta generalmente con virus de animales (excepto en el caso de zoonosis) o con virus de plantas o bacterias. La susceptibilidad a formas graves de algunas infecciones virales se ha asociado a ciertas estructuras genéticas: por ejemplo, existe mayor frecuencia de hepatitis crónicas en individuos que expresan alelos específicos del complejo mayor de histocompatibilidad: por ejemplo B8 o DR3. Asimismo, se ha informado que el alelo DRB1*1302 tanto en niños como en adultos se asocia en Gambia significativamente a la recuperación frente a la infección con HBV, en contraste con quienes desarrollan una infección persistente. Ello ha permitido postular que ese alelo podría conferir protección. Con respecto a la infección por HIV, se ha documentado que existe un bajo porcentaje de individuos que puede padecer múltiples exposiciones al virus sin infectarse y que otros aún infectándose sobreviven sin disminuir o disminuyendo mínimamente su nivel de LT CD4⁺ en presencia de una baja carga viral (RNA viral plasmático) durante el devenir de los subsiguientes años (habitualmente más de 7). Trabajadoras sexuales, drogadictos, personal de salud con múltiples accidentes laborales, hemofílicos y bebés nacidos de madres serológicamente positivas para HIV son algunos de los grupos en los que se han documentado el fenómeno de exposición múltiple sin infección. También entre drogadictos, hombres homosexuales, mujeres y niños se observó la presencia de individuos no progresores por períodos prolongados. Algunos de estos casos están relacionados con la expresión de receptores mutados para quimioquinas como el CCR5Δ32. Dado que las variantes macrófago-trópicas del HIV utilizan como correceptor principal la molécula CCR5 (un receptor para quimioquinas), una delección de 32 pb (un polimorfismo) en dicho correceptor influye en el evento de ingreso viral a dichas células, lo cual hace resistentes a las mismas a cepas virales macrofagotrópicas

que lo utilizan para su ingreso celular. Dado que cada individuo exhibe dos copias alélicas del gen que codifica CCR5, pueden observarse casos de individuos homocigotas (CCR5Δ32-Δ32) o heterocigotas (CCR5 salvaje-Δ32). El 1% de la población caucásica es homocigota para la delección Δ32 y el 20% es heterocigota para la misma. Si bien los individuos homocigotas para CCR5Δ32 no se infectan con cepas que utilizan dicho correceptor, sí pueden hacerlo por otras que empleen un correceptor diferente, por lo que las prácticas sexuales –así denominadas– "seguras" están igualmente recomendadas para este grupo. La heterocigosidad CCR5 salvaje-Δ32 está fuertemente asociada también a la resistencia a la transmisión sexual hombre-hombre y hombre-mujer del HIV, aunque no hay evidencias concluyentes acerca de su influencia en la infección de bebés infectados en la etapa perinatal, cuando se las comparó con aquellos que portaban los alelos salvajes.

Con un efecto inverso, se ha demostrado que un número menor de copias que el correspondiente al promedio poblacional de una región genómica de duplicación segmentaria que comprende la que codifica la quimioquina CCL3L1 (MIP-1 α P, un ligando para CCR5 y también un potente supresor del HIV-1) se asocia a un incremento en la susceptibilidad al HIV/SIDA.

2.1. CÉLULAS QUE PARTICIPAN EN LA INMUNIDAD INNATA

En la figura 2B se indican algunas de las células de la inmunidad innata. Si bien también participan los polimorfonucleares neutrófilos, eosinófilos y basófilos, los macrófagos y las células endoteliales, se hará especial énfasis en la participación de las células dendríticas y las NK por su rol decisivo en la inmunidad antiviral. Los mecanismos de acción puestos en ejecución por las células polimorfonucleares y macrófagos, así como el rol de las endoteliales se describen en libros de texto de Inmunología, y exceden los objetivos de este capítulo.

2.1.1. Células dendríticas: su rol como "puente" entre la respuesta inmune antiviral innata y la adaptativa

Las CD corresponden a una población heterogénea celular que desempeñan un papel preponderante durante la transición de la respuesta inmune antiviral innata a la adaptativa, a través de la secreción de citoquinas inmunomoduladoras y como células **presentadoras de antígenos** requeridas para la activación y proliferación de células T. A diferencia de los macrófagos y linfocitos B (LB) –las otras células presentadoras de antígenos profesionales, **las CD son las únicas que pueden activar LT vírgenes, induciendo una respuesta inmune primaria** (Tabla 7.2). Además, las CD se encuentran en sitios dentro del organismo donde los virus inician su multiplicación antes de diseminarse a otros órganos blancos de la infección, por lo que sensan señales del medio ambiente indicativas de su presencia.

Subpoblaciones de células dendríticas. Desde el punto de vista funcional, las CD se clasifican en dos estadios: inmaduras o maduras. La CD inmaduras se especializan en la captación de antígenos en tejidos periféricos y en sensar eventos de inflamación / infección madurando hacia diferentes perfiles. Las CD maduras



Tipo celular	CMH-II	Moléculas coestimulatorias	Función como célula presentadora de antígeno
Célula dendrítica (CD)	Constitutiva ↑↑ en CD maduras	Constitutiva (baja) ↑↑ en CD maduras	Activación de LT vírgenes e inicio de R.I. Activación de LT efectores y de memoria Inducción de la R.I. secundaria
Macrófago (MΦ)	Constitutiva (baja) ↑ en MΦ activados	Constitutiva (muy baja) ↑ en MΦ activados	Activación de LT efectores y de memoria Inducción de la R.I. secundaria
Linfocito B (LB)	Constitutiva (baja) ↑ en LB activados	Constitutiva (baja) ↑ en LB activados	Activación de LT efectores y de memoria Inducción de la R.I. secundaria

Tabla 7.2. Comparación entre diferentes células presentadoras de antígeno profesionales. R.I.: Respuesta inmune.

Característica	CD inmaduras	CD maduras
Ubicación	Tejidos periféricos	Órganos linfáticos secundarios
Capacidad endocítica	+++	+
Capacidad de procesamiento de antígenos	+++	+
Moléculas coestimuladoras y CMH-I y II	+	+++
Capacidad de presentar antígenos a LT vírgenes	+	+++
Expresión de CCR7 ⁺	+	+++

Tabla 7.3. Diferencias entre células dendríticas maduras e inmaduras. *La mayor expresión de CCR7 en las CD maduras se asocia a la capacidad de interactuar con los ligandos CCL19 y CCL21, direccionando así a esta población celular hacia las células endoteliales linfáticas y las HEV (*High Endothelial Venules*, vénulas del endotelio alto) de las zonas T de los órganos linfáticos secundarios.

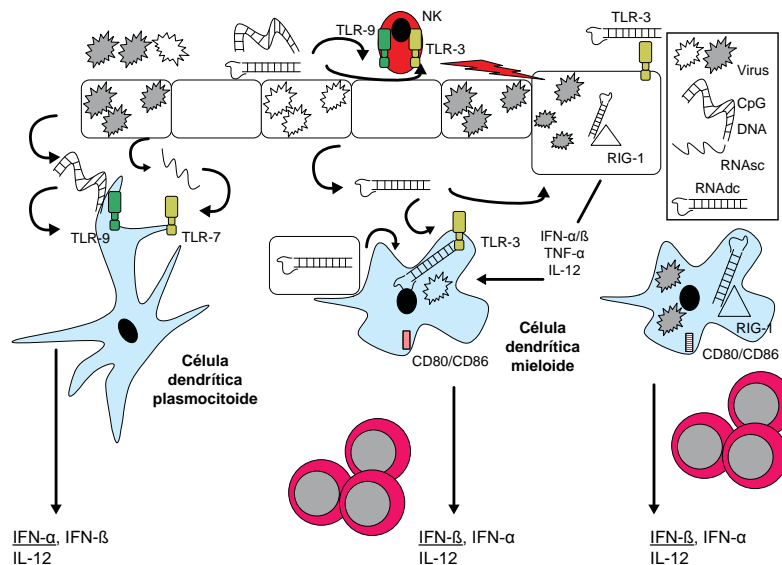


Figura 7.3. Reconocimiento de la infección viral por células dendríticas (CD). 1) Las células (por ejemplo fibroblásticas) infectadas con virus liberan al medio motivos DNA bicatenario conteniendo motivos CpG y RNA monocatenario (RNAsc) que son reconocidos por receptores TLR-9 y TLR-7, respectivamente, expresados en los endosomas de las CD plasmocitoides (CDp). Estas células producen principalmente IFN- α , y también IFN- β e IL-12. 2) Otras células infectadas con virus pueden liberar RNAdc, que es reconocido por TLR-3, lo que puede estimular la liberación de IFN- β e IFN- α , junto a IL-12. La expresión de TLR-3 varía con la estirpe celular, ya que se la ha observado en la superficie de fibroblastos y en vesículas intracelulares (endosomas) de CDm. 3) La proteína RIG-1 (*Retinoic acid Inducible Gene-1*; una proteína miembro de la familia de las helicasas, o RLH [*Rig-1 Like Helicasas*]) al igual que su análoga Mda5 (*Melanoma differentiation antigen 5*) pueden sensar la presencia de RNAdc cuando el mismo se encuentra en el citosol. La proteína adaptadora IPS-1 (*Interferon β Promoter Stimulator-1*) también denominada MAVS (*Mitochondrial Anti-Viral Signalling*), VISA o CARDIF media los efectos de RIG-1 en la activación del IFN- β , a la vez que mediante un dominio de transmembrana se localiza en mitocondria, con lo que esta organela parecería también participar de la respuesta innata. Se ha postulado la existencia de otro sensor citosólico para DNA, aún no identificado. 4) Las NK a través de receptores TLR-3 y TLR-9 reconocen la infección ejerciendo el efecto citotóxico sobre aquellas células infectadas que expresan moléculas del CMH-I disminuidas en su superficie. 5) Las células fibroblásticas infectadas pueden sensar dicho evento utilizando receptores presentes en su superficie celular como TLR-3 o en el citosol, como RIG-1, lo que induce la producción de IFN- α/β y otras citoquinas que estimulan la actividad de las CDm.

exhiben la capacidad única de activar linfocitos T vírgenes o *naïve* (Tabla 7.3).

A su vez, las CD se clasifican según su morfología, ontogenia y marcadores de superficie en CD plasmocitoides (CDp) y mieloides (CDm) o "convencionales". Estas últimas incluyen a las células epidérmicas de Langerhans (en homenaje a Paul Langerhans quien describió por vez primera en 1868 las células dendríticas de la epidermis), y a las dérmicas y las intersticiales. Mientras las células dendríticas mieloides inmaduras (CD11c⁺, CD123^{bajo}) residen en la piel y mucosas, las plasmocitoides inmaduras (CD11c⁻, CD123^{alto}) lo hacen en la circulación y en los órganos linfáticos secundarios. Estas últimas no pueden activar linfocitos T vírgenes. La expresión intracelular de los receptores TLR-9 y TLR-7 (véase más adelante)

en las células plasmocitoides, les permite reconocer tanto el DNA viral como el RNA viral monocatenario. Estas células desempeñan un papel central en la producción de IFN tipo I, que alcanza niveles 100 a 1000 veces superiores a los de otras células nucleadas del organismo, por lo cual cumplen un rol decisivo en la respuesta antiviral ante una infección aguda.

Reconocimiento de la infección viral por las CD. Estas células son capaces de detectar a los virus a través de los TLR (*Toll Like Receptors*, los receptores tipo Toll o Toll-símil) y de otros receptores (Figura 7.3), procesar y presentar los antígenos virales en el contexto de las moléculas CMH de clase II a las células T, las cuales –a su vez– promoverán la respuesta inmune adaptativa.

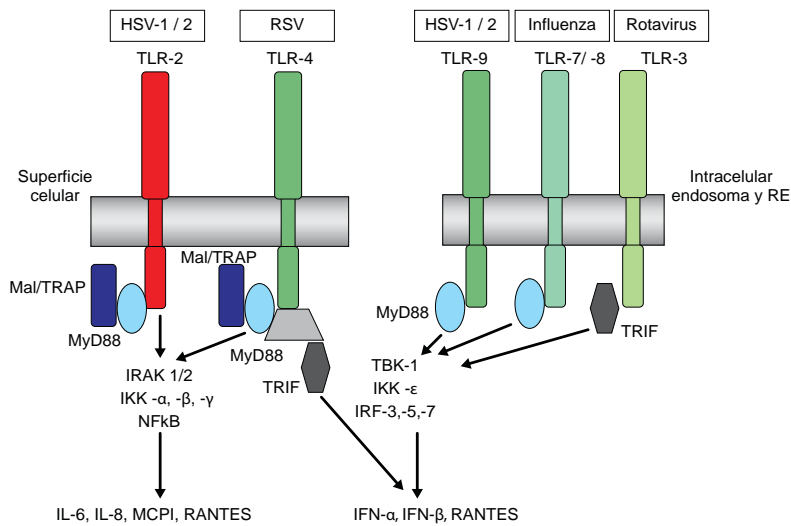


Figura 7.4. Vías de señalización intracelular a través de los receptores TLR, a nivel de la membrana citoplasmática (TLR-2 y TLR-4) y en el intracelular (endosoma o RE). Obsérvese el papel de la molécula adaptadora MyD88 en las vías de señalización de todos ellos, excepto con TLR-3, que lo hace exclusivamente a través de la molécula TRIF. A través de sucesivos eventos de fosforilación iniciados por las quinasas IRAK- 1 / -2 y TBK-1, los factores transcripcionales NF κ B e IRF (*Interferon Regulatory Factor*) -3, -5 y -7 son translocados al núcleo, donde inducen la expresión de citoquinas proinflamatorias e IFN de tipo I. La interacción entre patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) con el receptor TLR-2 promueve la activación de linfocitos Th2. Por el contrario, la interacción entre dichos PAMP con TLR-4, TLR-7/-8, TLR-9 y TLR-3 se asocia al desarrollo de una respuesta Th1. En ciertas ocasiones, el TLR-4 puede también promover una respuesta mediada por IL-6 que conduce a la activación de Treg.

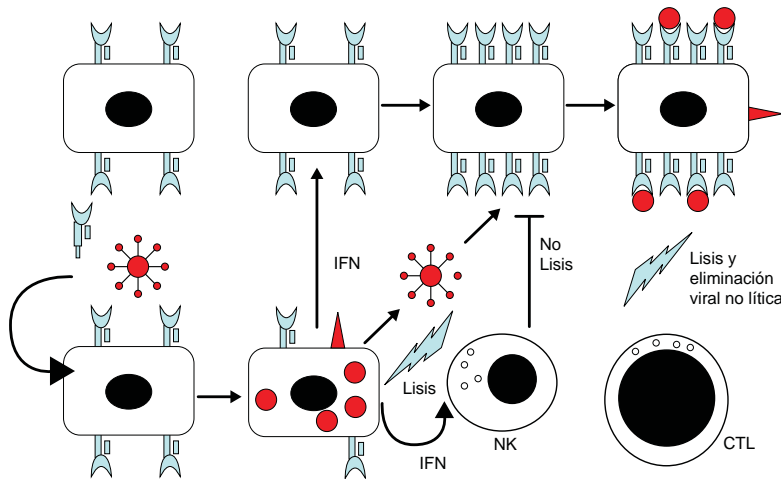


Figura 7.5. Reconocimiento de la infección viral por células NK y linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺. Células permisivas a la infección viral, son atacadas por un virus determinado. Como resultado inicial de la infección, disminuye la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase I en la superficie celular. Esto torna a las células infectadas, inicialmente pasibles de la actividad citotóxica de las NK. La célula infectada promueve la liberación de IFN que estimula a las NK y promueve la expresión de moléculas del CMH-I en las células infectadas. Ello constituye una señal inhibitoria para las NK, y estimuladora para los CTL que reconocen péptidos virales en el contexto de dichas moléculas. La eliminación viral se produce mediante mecanismos líticos (Fas/Fas-L; perforina-granzima B) o de inhibición no lítica de la replicación viral, mediada por citoquinas (IFN- γ y TNF- α).

El término Toll fue introducido por C. Nüsslein-Volhard y E. Wieschaus al descubrir una mutante letal que afectaba el desarrollo embrionario de la mosca blanca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Cuando Wieschaus mostró el perfil de la cutícula de los embriones infértiles a Nüsslein-Volhard, éste exclamó "¡Toll!" que en el idioma alemán significa ¡Fantástico!. Subsiguientemente, se demostró que la molécula Toll era crucial en el desarrollo de inmunidad anti-fúngica. En los mamíferos, se ha reconocido la existencia de una familia de proteínas similares a Toll, los receptores tipo Toll o Toll-símil. Estos receptores están presentes en las células de la respuesta innata así como en células endoteliales, epiteliales y fibroblastos.

Los TLR son una clase de receptores de reconocimiento de patrones (RRP) descritos recientemente. Integran una familia de receptores –tanto extra como intracelulares– que es responsable del reconocimiento de agentes infecciosos permitiendo la iniciación de la respuesta inmune, primariamente innata y luego adaptativa (Figura 7.4).

Si bien todas las células del organismo pueden producir y secretar IFN- α / - β luego de una correcta estimulación, las CD luego de la estimulación viral son las mayores productoras de IFN. Las CDp y las Cdm difieren en su habilidad para reconocer diferencias asociadas con los patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) a través de



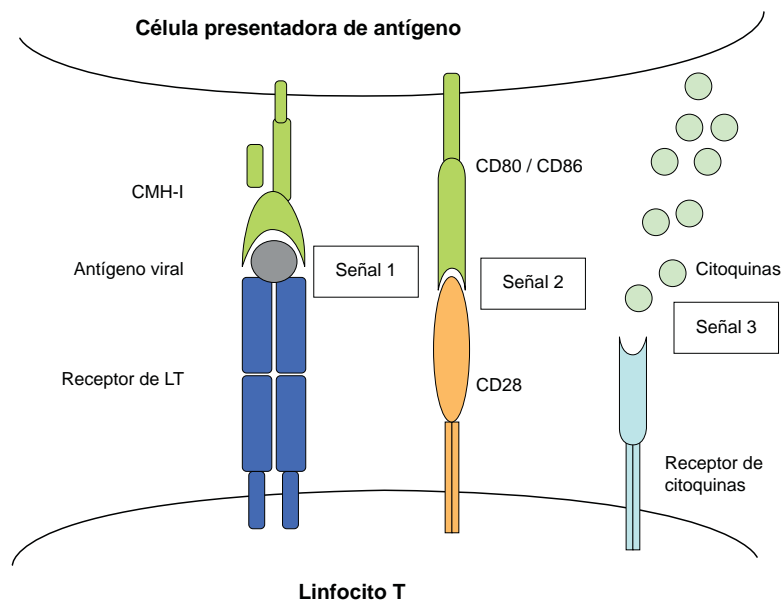


Figura 7.6. Señales requeridas para la activación de un linfocito T. En la sinapsis inmune entre una célula presentadora de antígeno (CPA) y un linfocito T, se requieren tres señales para activar a este último. La señal 1, consiste en la presentación del péptido antigénico en el contexto de moléculas del CMH-I de la CPA. Una segunda señal de activación es provista por la célula presentadora a través de la interacción entre las moléculas coestimuladoras CD80 / CD86 con CD28. (Si la interacción se produce con CTLA-4 [Cytotoxic T Lymphocyte Antigen -4], la señal es inhibitoria). La señal 3 es provista por las citoquinas liberadas que interactúan con los receptores presentes en el linfocito T.

diversos TLR presentes en la superficie de las CD. Por ejemplo, las CDp expresan TLR-9 que reconoce DNA bacteriano y viral; mientras que las CDm expresan TLR-4 que responde a los LPS, pero no al DNA microbiano. De aquí que la respuesta innata no deba considerarse verdaderamente inespecífica.

Al menos 11 TLR están codificados en el genoma humano, cada uno de los cuales es capaz de detectar a un PAMP específico, pero sólo diversos TLR han sido asociados a la inducción de la síntesis de IFN- α / - β . Entre ellos se pueden mencionar a TLR-3, -4, -8 y -9. TLR-3 está involucrado en el reconocimiento de RNAdc extracelular, es por esto que este TLR no está asociado a la detección de virus intracelular. TLR-4 detecta PAMP en proteínas, tal como se describió para la proteína F del virus sincicial respiratorio y la proteína Env del virus del tumor mamario murino (MMTV). A su vez, los TLR-8 y -9 han sido recientemente descritos como moléculas asociadas a endosomas; mientras que el primero detecta RNAsc, el segundo es activado por DNAdc no metilado (CpG DNA).

Luego del reconocimiento de un PAMP por un TLR específico, la porción intracelular del receptor (denominada TIR) interactúa con diversas moléculas adaptadoras tales como MyD88 (*Myeloid Differentiation factor 88*), TIRAP (*Toll-Interleukin 1 Receptor domain-containing Adaptor Protein*), TRIF/TICAM (*TIR domain-Containing Adaptor Molecules*) o TRAM (*TRIF Related Adaptor Molecules*). Estas moléculas adaptadoras -a su vez- interactúan con IRAK (*IL-1 Receptor-Associated Kinase*) para transducir la señal que va a culminar con la fosforilación del inhibidor de NF κ B (I κ B) y la consiguiente translocación de NF κ B al núcleo para estimular la transcripción de las citoquinas proinflamatorias y de IFN- α / - β . Se ha descrito también, que la expresión de IFN- β puede ocurrir a través de TLR-3 y TLR-4, por una vía independiente de MyD88 (Figura 7.4).

Como se leerá más adelante, la secreción de IFN no es solamente esencial para establecer una adecuada respuesta inmune antiviral innata, sino que es igualmente crucial para disparar la subsiguiente respuesta inmune adaptativa. La expresión de IFN- β y γ es también de vital importancia para la maduración de las CD y la subsiguiente expresión de los genes estimulados por IFN, conocidos como ISG (*Interferon Stimulated Genes*). La maduración

de estas células está caracterizada por la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-12 y TNF- α (*Tumor necrosis factor- α*), y la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 y CD86). IL-12, -a su vez- promueve la diferenciación de LT hacia el perfil Th1, seguida de la secreción de IFN- γ . En este proceso de promoción de la respuesta Th1 también participan la IL-18, la IL-23 y la IL-27.

Interacción de las CD con otras células. Las células dendríticas tienen un "diálogo cruzado" con células de la inmunidad innata (por ejemplo, NK, NKT y LT $\gamma\delta$) y adaptativa (LT y LB). A continuación, se describirán algunos aspectos de las interacciones con células NK y LT.

Interacción con las células NK. Ante la captura de un antígeno (lo cual puede ocurrir mediante endocitosis o macropinocitosis), **las CD maduras liberan IL-12, IL-15 e IL-18 activando a las NK y promoviendo mediante contactos receptor-ligando su maduración** (CD56^{bright} [del inglés, brillante] a CD56^{dimm} [del inglés, débil]) A su vez, **las NK secretan TNF- α e IFN- γ , lo cual promueve la maduración de las CD, y destruyen a las CD inmaduras** (mediante el reconocimiento a través de su receptor NKp30). **Este diálogo intercelular es crucial para el devenir de la respuesta inmune.** Por una parte, a la función inicialmente conocida de las dendríticas de activar LT *naïve*, se le agrega la de hacerlo también con las NK. Por otra, estas células definen el perfil de CD que migrará a los órganos linfáticos secundarios, donde dichas CD podrán iniciar la respuesta adaptativa al presentar los antígenos a los LT *naïve* (CD maduras), o bien promover efectos tolerogénicos (CD inmaduras no eliminadas por las NK). **Las células NK constituyen un pilar esencial de la respuesta inmune innata.** Según las definiera Karre metafóricamente en 1997, estas células "*reconocen al submarino extraño*" que podría significar la presencia de un patógeno dentro de una célula (así como también el advenimiento de una célula tumoral). Es decir, son capaces de reconocer -por ejemplo- la presencia de un virus en una célula sin necesidad de esas señales en superficie (los péptidos presentados en el contexto de CMH-I o II) propios de la respuesta adaptativa mediada por los LT. En lugar de tener que reconocer una constelación de péptidos diferentes provenientes de un número incontable de patógenos, la

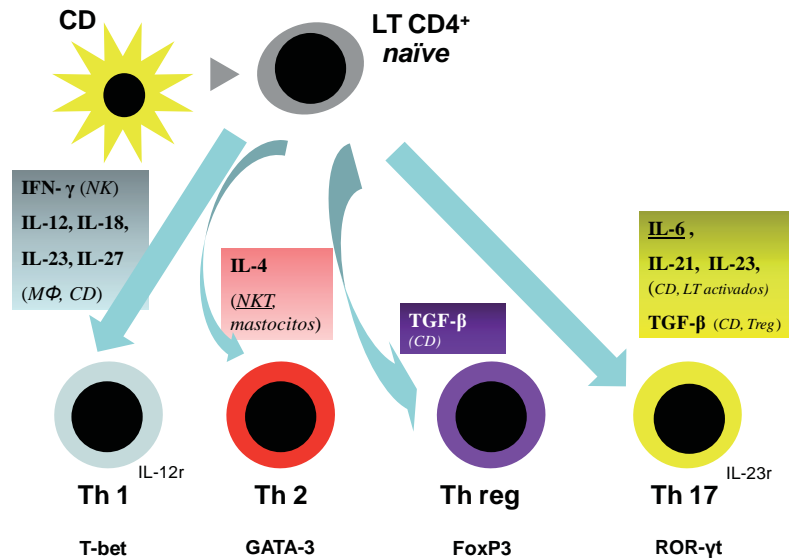


Figura 7.7. Subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺. Los linfocitos T (LT) CD4⁺ naïve interactúan con las células dendríticas (CD). Luego de recibir las señales de activación 1 y 2 indicadas en la figura 7.6, y dependiendo del ambiente de citoquinas local (señal 3) se producirá la diferenciación hacia los linajes Th1, Th2, Treg o Th17. Se indica el origen principal de dichas citoquinas en letra cursiva, entre paréntesis. Los factores transcripcionales decisivos para la diferenciación de cada linaje se indican al pie de cada subpoblación de LT. Las subpoblaciones Th1 expresan el receptor para IL-12 (IL-12r) y las Th17 el receptor para IL-23 (IL-23r). Las palabras subrayadas enfatizan un rol preeminente.

señal a detectar consiste en la disminución o ausencia de moléculas del CMH-I en la superficie celular (ligandos de receptores inhibitorios de las NK), irrespectivamente del patógeno involucrado. (Figura 7.5). Asimismo, los virus pueden promover los efectos citotóxicos de las NK mediante la expresión de ligandos para los receptores activadores de las mismas. En general, esta respuesta de las NK ocurre tempranamente durante la infección viral, lo cual significa un obvio beneficio para el hospedador, mientras se forja la respuesta adaptativa.

Las células NK comprenden –según la expresión de moléculas de superficie– las subpoblaciones en NK CD56^{dim} CD16^{bright} y NK CD56^{bright} CD16^{dim}, las que contribuyen –respectivamente– en una proporción 9:1 a la población de NK circulantes en sangre periférica. La primera subpoblación corresponde a la que promueve eventos citotóxicos mediados por perforinas y por el sistema FasL-Fas (moléculas expresadas –respectivamente– en las NK y en las células blanco) que conduce a la apoptosis, mientras que la segunda estirpe es responsable de la secreción de citoquinas regulatorias, fundamentalmente IFN- γ . Ambas subpoblaciones están involucradas crucialmente en la respuesta inmune antiviral. Por todo lo expuesto, se acepta que **las células NK cumplen un rol decisivo en la respuesta innata, y modulan el inicio de la respuesta adaptativa.**

Interacción con los LT. Las CD son las responsables de definir tres aspectos cruciales de la respuesta de los LT: si deben o no responder, cómo responder y dónde hacerlo. Para ello las CD disponen de un sistema sustentado en al menos tres (y para algunos autores, probablemente cuatro) señales: 1) interacción entre el TCR y las moléculas del CMH; 2) interacción entre las moléculas coestimulatorias CD80, CD86 y el ligando específico CD28 de los LT; y 3) activación de las subpoblaciones Th1, Th2, Treg o Th17 (Figura 7.6).

Una vez que la CD reconoce la presencia de un PAMP determinado a través de un TLR específico, la señal recibida produce una impronta en dicha célula. Dependiendo del PAMP reconocido, las CD producirán señales diferenciales que interactuarán con distintas poblaciones linfocitarias.

Las CD mieloides inmaduras distribuidas en los tejidos periféricos reconocen la presencia de patógenos antigénicos mediante fagocitosis, macropinocitosis y a través de la expresión de lectinas

"tipo C" y de receptores para Fc (ϵ y γ). Las CD llegan hasta los sitios de la inflamación dado que expresan receptores para quimioquinas inflamatorias tales como CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CXCR1 y CXCR2 que guían a las células hacia los sitios donde están presentes sus ligandos (IL-8, MCP-1, RANTES, entre otros). Una vez allí, –y ante estímulos diversos que incluyen principalmente al reconocimiento de PAMP por los TLR– las CD disminuyen la expresión de los receptores mencionados y comienzan el proceso de maduración incrementando la del receptor CCR7, para el que existen dos ligandos. Uno es la quimioquina de los órganos linfáticos secundarios SLC (*Secondary Lymphoid Chemokine*) / CCL21 y el otro, el ligando de una quimioquina inducida por el virus Epstein-Barr (*Epstein Barr virus-induced molecule 1 Ligand Chemokine; ELC / CCL19*), producida por las CD en las áreas T-dependientes de los ganglios regionales.

Según el TLR involucrado en el reconocimiento del PAMP, se producirán diversas citoquinas, las que promoverán una maduración de CD de diferentes perfiles. Subsecuentemente, como resultado del daño histico inflamatorio (por infección o necrosis), las CDm que expresan CCR7 migran desde la región inflamatoria a través del vaso linfático aferente hacia la región paracortical T-dependiente de los ganglios linfáticos regionales, atraídas por CD maduras residentes que producen ELC / CCL19 y que atraen también a LT vírgenes o recién activados. Se produce entonces un mayor nivel de moléculas CMH-II, de las coestimulatorias CD40, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), así como de diversas moléculas de adhesión. Merced a la actividad aumentada de NF κ B, se incrementa la producción de ciertas citoquinas (IL-12, TNF- α , IL-1), óxido nítrico sintetasa inducible, y diversas quimioquinas. La maduración de las CD puede ocurrir también como respuesta a citoquinas y otros mediadores producidos por leucocitos presentes en el sitio de la infección o por células residentes, tales como IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IFN tipo I, o PgE2, así como por contacto con otras células de la respuesta innata (por ejemplo, NK, NKT o LT $\gamma\delta$). En el ganglio linfático la maduración de la CD es completa sólo al producirse la interacción con los LT. Los LT CD4⁺ y los LT CD8⁺ utilizan diferentes mecanismos que incluyen: 1) interacciones entre CD40 (en la CD) / CD40L (en el LT CD4⁺ activado); 2) interacciones entre Fas (en la CD) y FasL (en el LT CD4⁺ activado); y 3) la secreción de IFN- γ y TNF- α producidos por LT CD8⁺ activado. Los

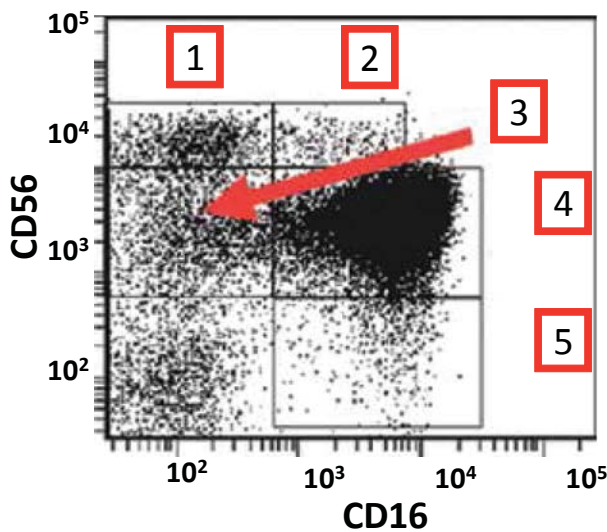


Figura 7.8. Subpoblaciones de células NK en sangre periférica humana, según la expresión relativa de CD16 y CD56. Linfomononucleares de sangre periférica fueron teñidos con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, y anti-CD56 conjugados con cinco fluorocromos diferentes. Se seleccionó la población CD3⁺ y CD19⁻ (células NK) para visualizar la expresión de CD56 versus CD16. 1: CD56^{bright} CD16⁻; 2: CD56^{bright} CD16^{dim}; 3: CD56^{dim} CD16⁻; 4: CD56^{dim} CD16⁺; 5: CD56⁻ CD16⁺. Fuente: Poli A et al; *Immunology* 126, 456-465, 2009. Reproducido con autorización.

de las CDp acontece merced a la actividad autócrina del TNF- α y del IFN- γ producidos por ellas mismas, así como a los niveles de IL-3 producidos por eosinófilos, basófilos y mastocitos ante infecciones parasitarias. La primera vía de maduración, promueve la síntesis de más IFN- γ y consiguientemente, la diferenciación de LT CD4⁺ hacia el perfil Th1. En contraposición, la síntesis de IL-3 promueve la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 que induce la diferenciación de LT CD4⁺ hacia el perfil Th2. Esta opción biológica y la subsiguiente "decisión" celular tiene críticas implicancias en la respuesta inmune antiviral.

2.1.2. Células NK. Esta población celular constituye una muy importante barrera para limitar las infecciones virales. Representando aproximadamente un 20% de los linfocitos, estas células granulosas **participan tanto de la respuesta innata como en la inmunorregulación de la respuesta adaptativa** (Figura 7.2). Al igual que las CD, deben ejercer muchas veces su labor en un solitario ambiente de células aún no infectadas. Sin embargo, a diferencia de aquéllas, el mecanismo de reconocimiento es totalmente diferente. Cuentan para ello con la expresión de al menos dos tipos de receptores que detectan las células infectadas (y también las tumorales): los receptores de activación KAR (*Killer cell Activating Receptor*) y los receptores de inactivación KIR (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptor*) e ILT-2 (*Immunoglobulin Like Transcript 2*). Mediante los receptores de activación, las NK son capaces de reconocer sobre las células infectadas la expresión de componentes virales, tales como las glicoproteínas ancladas en la membrana citoplasmática de aquellos virus que brotan desde la célula al medio extracelular. Mediante los receptores KIR e ILT-2, las NK evitan su activación al reconocer sobre la superficie de las células infectadas la expresión de moléculas CMH-I. La transducción de señales generada por la vía de inactivación al reconocer la expresión de moléculas del CMH-I bloquea la respuesta a los receptores de activación.

Habitualmente, las infecciones virales se asocian a una disminución de la expresión de moléculas CMH-I, lo que permite a las células NK -al detectar la pérdida de la "señal de lo propio"- inferir que esa célula se comporta "extrañamente". El resultado es la activación de una cascada de señales que culminan con la liberación de perforinas y granzimas, que promoverán la apoptosis de la célula diana mediante la activación de caspasas. Asimismo, se produce una masiva secreción de citoquinas (principalmente IFN- γ y TNF- α) que contribuye a la limitación de la infección viral. Las NK pueden producir el efecto citotóxico, la secreción de citoquinas o ambos mecanismos. Estas funciones se asocian a la expresión fenotípica diferencial de los marcadores CD16 (receptor de baja afinidad para la porción Fc de IgG) y CD56 (molécula de adhesión que media la adherencia homotípica). Existen al menos 5 subpoblaciones (Figura 7.8): [1] CD56^{bright} CD16⁻, que constituye el 50-70% de la población CD56^{bright}; [2] CD56^{bright} CD16^{dim} que representa el restante 30-50% de dicha población; [3] CD56^{dim} CD16⁻; [4] CD56^{dim} CD16^{bright}; y [5] CD56⁻ CD16^{bright}. La subpoblación CD56^{bright} CD16^{dim} promueve el efecto mediado por citoquinas, mientras que la subpoblación CD56^{dim} CD16^{bright} se asocia a la citotoxicidad natural y a la que es dependiente de anticuerpos. Aproximadamente un 90% de las NK circulantes en sangre periférica corresponden a estas últimas, mientras que en los ganglios linfáticos prevalece la subpoblación CD56^{bright} CD16^{dim}, ya que expresan el receptor CCR7 para las quimioquinas CCL19 y CCL21 que promueven su atracción hacia dichos órganos.

Las células NK pueden también reconocer un tipo especial de molécula de histocompatibilidad de clase I: las moléculas no clásicas HLA-E. Estas moléculas expresan en su superficie péptidos de las secuencias de señalización correspondientes a otras moléculas de histocompatibilidad. Sorprendentemente, agentes como el citomegalovirus humano (HCMV) aumentan la expresión de HLA-E, lo cual logra "engañar" a las NK que reconocen un número importante de moléculas de histocompatibilidad en la superficie celular, por lo que no se activan. Análogamente, HIV inhibe la expresión de HLA-A, HLA-B y HLA-C, pero no HLA-E, lo que contribuye a la evasión de dicho virus a la respuesta inmune.



linfocitos T activados secretan también una citoquina de la superfamilia TNF denominada RANKL (*Receptor Activator of NF κ B Ligand*; también designada CD254 o TRANCE) que contribuye a la maduración de las CD y prolonga la supervivencia de éstas, al permitir una interacción más prolongada con los LT. La expresión del péptido (por ejemplo, viral) en el contexto espacial de moléculas CMH-II promueve una significativa proliferación de LT ayudadores (LT helper), cuyo perfil Th1, Th2, Th17 o Treg dependerá de la producción y combinación de ciertas citoquinas en el microambiente celular (por ejemplo, IL-12, IL-4, IL-23, IL-6, TGF- β e IFN- γ , entre otras; Figura 7.7). El perfil Th1 es imprescindible para la defensa antiviral contra la mayoría -aunque no todas- las infecciones virales del hospedador.

Las CD también activan LT CD8⁺ mediante la presentación de péptidos (por ejemplo, virales) en el contexto de moléculas CMH-I, lo cual promueve la generación de un número significativo de células citotóxicas. Si bien es innecesaria la señalización a través de CD40, los LT CD4⁺ participan de esta activación, probablemente mediante otras señales, como las mediadas por algún miembro de la superfamilia de TNF.

En ausencia de inflamación, una pequeña proporción de las CD también migra desde los tejidos periféricos hacia los ganglios linfáticos regionales (migración basal), habiéndose sugerido que dichas células son responsables de inducir un efecto tolerogénico. Recientemente, se han dilucidado las bases de su funcionamiento, el que está mediado por la galectina-1, con producción de IL-27 por las CD, la que -a su vez- induce la síntesis de IL-10 por linfocitos T (véase el ítem 4).

Las CDp migran desde la circulación sanguínea atravesando las vénulas del endotelio alto hacia las áreas T de los órganos linfáticos secundarios, al tejido linfático asociado a las mucosas y a la zona marginal esplénica. Para lograrlo, expresan L-selectina y CCR7, lo que les permite interactuar con los ligandos de L-selectina expresados en las vénulas mencionadas, y con ELC / CCL19 y SLC / CCL21 expresados por las células estromales de las áreas T-dependientes de los órganos linfáticos secundarios. La maduración

Por otra parte, las NK participan de la respuesta adaptativa al reconocer mediante receptores para Fc la presencia de IgG específica para los antígenos virales reconocidos sobre superficies celulares. Esta interacción IgG-NK deviene en un evento de citotoxicidad (citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente o ADCC, según sus siglas en inglés).

La respuesta inmune mediada por las células NK es especialmente importante para el control de virus de la familia *Herpesviridae* (por ejemplo, varicela-zóster, herpes simplex, HCMV), ya que se ha documentado que en su ausencia dichas infecciones siguen un curso grave.

2.1.3. Células NKT

Estas células están presentes en todos los órganos linfoides, pero su concentración es mayor en la médula ósea y el hígado, constituyendo en éste último órgano aproximadamente el 30% de las células linfoides (véase la figura 24.1.2). Poseen los receptores de las NK y de los LT. Se activan mediante la interacción de su receptor T con glicolípidos (como la beta-glicosilceramida, un metabolito de las vías anabólica y catabólica de glicoesfingolípidos complejos) presentados por CD1d (una molécula no polimórfica CMH-I similar), expresada por células presentadoras de antígeno como las CD, los macrófagos y los LB de la zona marginal. **Su activación promueve señales madurativas a las CD, las NK y los linfocitos, por lo cual participa tanto en la respuesta innata como en la adaptativa. Una vez activadas, las NKT pueden secretar en minutos / horas IFN- γ y TNF- α (promoviendo la diferenciación hacia la respuesta adaptativa Th1), o IL-4 e IL-13 (inductoras de la respuesta Th2). La paradoja de esta estirpe celular reguladora es que puede tanto promover como suprimir la respuesta inmune. Las NKT incluyen tanto subpoblaciones CD4⁺ como CD4⁻. La subpoblación CD4⁺ promueve respuestas Th1 y Th2, mientras que las CD4⁻ inducen principalmente respuestas Th1. La subpoblación CD8⁺ se comporta como las doblemente negativas CD4⁻ CD8⁻ NKT, produciendo aún menos IL-4 que estas últimas.**

Otra subpoblación de NKT exhibe el receptor para IL-25, importante para promover la respuesta Th2 (incluyendo la alergia y la hiperreactividad aérea). Esta subpoblación celular (única que posee tal receptor) es crítica para la producción de IL-4 e IL-13 (y escasa cuantía de IFN- γ) y ha sido recientemente vinculada con el desencadenamiento de procesos asmáticos luego de la infección por virus sincicial respiratorio (RSV). Finalmente, otra subpoblación de NKT es productora de la citoquina proinflamatoria IL-17. Al igual que los LT CD4⁺ productores de dicha molécula, exhiben el factor transcripcional ROR γ t y el receptor para IL-23.

De lo expuesto, se desprende que existen **múltiples subpoblaciones funcionales de NKT**: las mismas **varían ampliamente entre individuos, y pueden participar tanto de mecanismos de defensa como de lesión tisular.**

La mayoría de las células NKT humanas expresan la cadena invariante α del TCR codificada por los genes V α 24J α 18, y un número restringido pero no invariante de cadenas β de dicho TCR. Estas NKT "invariantes" o clásicas, se conocen como NKT de tipo I. Las de tipo II, si bien son también restringidas por las CD1d, expresan un set más amplio de cadenas α en su TCR y reconocen antígenos hidrofóbicos, incluyendo sulfátidos, lisofosfatidilcolina, y aun pequeñas moléculas aromáticas no lipídicas. Existen otras subpoblaciones de NKT (agrupadas como las dos anteriores dentro de las denominadas NKT-símil) restringidas por diversas moléculas CD1 (CD1a, CD1b, CD1c), o por MR1 (como son las células MAIT (*Mucosal Associated Invariant T*), cuya función recién comienza a dilucidarse.

Habiéndose descrito que diversos virus tales como HIV, herpes simplex y HHV-8 (agente del sarcoma de Kaposi), han desarrollado estrategias para inhibir la adecuada expresión de CD1d en la superficie de las células infectadas, se ha inferido que las NKT podrían desempeñar un rol trascendente en la inmunidad antiviral. Si bien los virus no exhiben glicolípidos en su estructura, se ha

demonstrado que las NKT participan en la respuesta innata y en la regulación de la adaptativa. Las NKT invariantes (NKT-de tipo I) regulan la actividad de las NK, las células mieloides-derivadas supresoras, las CDm y las CDp.

Muchos pacientes que padecen una enfermedad linfoproliferativa ligada a X, exhiben mutaciones en la línea germinal de la proteína SAP (*Signaling lymphocyte activation molecule Associated Protein* o *SLAM Adaptor Protein*) y carecen de NKT de tipo I. Dado que dicha molécula también regula la actividad de las NK y de los LT convencionales, la susceptibilidad aumentada a la infección por EBV no debe ser relacionada únicamente con el defecto de las primeras. Otros pacientes con enfermedad linfoproliferativa ligada a X, ostentan una mutación en la proteína XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) la que se asocia a una disminución selectiva del número de NKT. Ante la infección por EBV, se produce también un aumento de la apoptosis de otras poblaciones linfoides. En modo análogo, en el síndrome de Wiskott-Aldrich, existe una deficiencia de las NKT de tipo I, asociada a la mutación de la proteína WAS, la que afecta tanto al funcionamiento de la respuesta innata como adaptativa. Este defecto torna a los pacientes especialmente susceptibles a las infecciones y al linfoma B asociado a EBV.

Pacientes infectados con HIV exhiben dentro del primer año después de la seroconversión, una disminución selectiva de las NKT de tipo I. Estas células CD4⁺ son especialmente sensibles a las cepas con tropismo por el correceptor CCR5, ya que presentan un aumento de su expresión en la membrana plasmática. La disminución de las NKT parecería producirse por una sobreexpresión del receptor Fas que las torna susceptibles a la apoptosis (véase el ítem 5). En la etapa crónica de la infección por HIV, el compromiso funcional de esta estirpe celular está asociado a la sobreexpresión de la proteína pro-apoptótica PD-1 (*Programmed Death-1*).

Las células NKT (junto a las NK) desempeñan un papel relevante en la detección inicial de la infección por HBV por la respuesta innata, lo cual precede a la oportuna y eficaz subsiguiente respuesta adaptativa. En pacientes con hepatitis C crónica, las células NKT activadas exhiben un aumento en la producción de IL-13 y cantidades equivalentes de IFN- γ a las producidas en individuos normales, lo que indica su desviación hacia un perfil de respuesta Th2.

2.1.4. Linfocitos T $\gamma\delta$.

Su denominación tiene en cuenta que a diferencia de la mayoría de los LT maduros que exhiben en su superficie un receptor T (TCR) constituido por un heterodímero compuesto por cadenas proteicas *alfa* y *beta* (complejo $\alpha\beta$) - en estas población CD3⁺ el TCR está formado por cadenas *gamma* y *delta* (complejo $\gamma\delta$).

En la sangre periférica de individuos adultos sanos, los LT $\gamma\delta$ representan el 1-10% de los LT circulantes, mientras que esta proporción es mucho mayor en otras localizaciones anatómicas, como el epitelio de la piel o el intestino delgado.

Al igual que el TCR $\alpha\beta$, las cadenas proteicas γ y δ son codificadas por genes sometidos a rearreglos durante la maduración intratímica de los LT, a partir de un conjunto de genes germinales (V, D, J y C). Sin embargo, y en contraste con las células T $\alpha\beta$, el repertorio de genes germinales V γ y V δ disponibles es muy limitado. En humanos, sólo hay 6 genes V γ expresados, cinco de los cuales (V γ 2, 3, 4, 5, 8) pertenecen a la familia V γ I mientras que la familia V γ II contiene un único miembro V γ 9. El número de genes V δ disponibles es igualmente pequeño. No obstante, la diversidad combinatoria del repertorio de los TCR $\gamma\delta$ es tan grande como la del repertorio de los TCR $\alpha\beta$.

En la sangre periférica de individuos sanos, existe un marcado predominio dentro de la población de LT $\gamma\delta$ de células que expresan V γ 9 junto con V δ 2. En la mayoría de los individuos, las células V γ 9V δ 2 representan el 50-95% de los LT $\gamma\delta$ en sangre periférica. En cambio, entre los LT $\gamma\delta$ del pulmón, la piel e intestino delgado predominan aquellas células que expresan V δ 1 en combinación con varios elementos V γ .



Los LT $\gamma\delta$ son células de inmunovigilancia implicadas en el **desarrollo de respuestas innatas** en enfermedades infecciosas y tumores y en la **iniciación de repuestas inmunes adaptativas**, que actúan durante la presentación antigénica, el reclutamiento y la activación celular, en procesos inflamatorios, y en la reparación tisular.

Con respecto a la selectividad y el modo de reconocimiento antigénico, los LT $V\gamma9V\delta2$ parecen haber evolucionado para responder a un conjunto único de moléculas que no desencadenan respuesta en los LT $\alpha\beta$. Los LT $\gamma\delta$ no reconocen (o raramente lo hacen) péptidos procesados por células presentadoras de antígenos (CPA) a partir de complejos proteicos antigénicos, sino que detectan compuestos antigénicos no peptídicos de bajo peso molecular, tales como metabolitos fosforilados y antígenos lipídicos.

Más aún, no requieren la presentación de dichos ligandos por moléculas del CMH de clase I o II, lo que se correlaciona con la ausencia de expresión de CD4 o CD8 en la mayoría de los LT $\gamma\delta$. La activación de los LT $V\gamma9V\delta2$ mediada por el TCR requiere del reconocimiento de fosfoantígenos.

Al igual que los LT $\alpha\beta$, dicha activación es modulada también por señales coestimuladoras. Los LT $V\gamma9V\delta2$ expresan frecuentemente NKG2D, miembro del grupo de los receptores de citotoxicidad natural que lleva una señal de activación luego de su unión específica a los ligandos correspondientes, como MICA A/B o miembros de la familia de proteínas de unión a UL16 (ULBP).

Existen evidencias que indican que **los LT $\gamma\delta$ expresan también en su superficie varios tipos de receptores de tipo Toll, siendo los TLR- 1, -2 y -3 los más abundantes**, los cuales pueden reconocer el RNA viral y el RNAm endógeno liberado por células necróticas. La activación de los LT $\gamma\delta$ puede ser potenciada directamente por ciertos ligandos de TLR desencadenando un efecto coestimulador directo como un aumento en la expresión de CD69 y secreción de citoquinas como IFN- γ . O bien, dicha activación puede ocurrir indirectamente mediante la liberación de IFN tipo I, como producto de la activación de células dendríticas por ligandos de TLR.

Las respuestas inmunes desencadenadas por los LT $\gamma\delta$ comprenden tanto acciones citotóxicas y no citotóxicas. Los LT $\gamma\delta$ activados despliegan una amplia actividad citotóxica utilizando tanto mecanismos dependientes de la vía de Fas/FasL como la de perforinas/granzimas. Por lo tanto, los LT $\gamma\delta$ pueden lisar una amplia variedad de células tumorales, o bien, lisar macrófagos infectados y de esta manera, limitar la propagación de microorganismos infecciosos. Las acciones no citotóxicas incluyen la producción y liberación de varias moléculas solubles, como citoquinas (IFN- γ , TFN- α , IL-1 α , IL-4, IL-6, GM-CSF, etc.) y quimioquinas (MIP-1 α/β , RANTES, SDF-1, MCP-2, etc.). Esta respuesta innata es seguida por respuestas inmunes adaptativas humerales y celulares

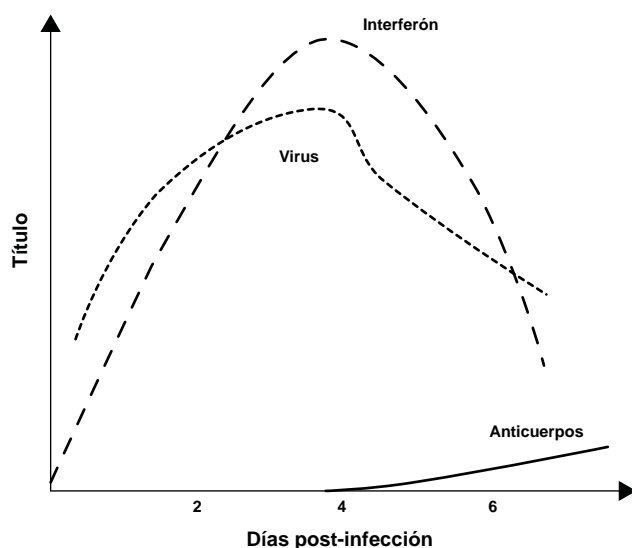


Figura 7.9. Cinética de la producción de interferón ante una infección viral. Clásico experimento donde se observa que la infección experimental de ratones con virus influenza es limitada aún antes de la detección de anticuerpos específicos. El interferón sérico comienza a elevarse a las pocas horas de iniciada la infección, aún antes de que pueda detectarse el virus infeccioso en los pulmones del animal infectado como resultado del reconocimiento de patrones moleculares de patógenos. El título de virus comienza a descender coincidiendo con los elevados niveles de interferón.

influenciadas por muchos de estos factores. Citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ continúan suprimiendo el proceso infeccioso en órganos vitales sin destruir células importantes y también pueden estimular la potencia antiviral de los LT $\alpha\beta$ citotóxicos. Más aún, se ha demostrado que ciertos LT $\gamma\delta$ producen citoquinas como el factor de crecimiento de queratinocitos y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), atribuyéndose a los LT $\gamma\delta$ por lo tanto una función especializada en el control de la integridad epitelial, fibroginogénesis y reparación de heridas.

Merece destacarse la interacción continua existente entre los LT $\gamma\delta$ y las CD. Como fue mencionado anteriormente, las células dendríticas pueden activar mediante IFN de tipo I a los LT $\gamma\delta$, al mismo tiempo que éstos son capaces de sentir la presencia de patógenos e inducir la maduración, activación funcional, migración y presentación antigénica de las dendríticas.

Tipo	IFN	Receptor	Función	Célula productora
I	12 a 20 α (dependiendo de la especie)	IFNAR	Actividad antiviral Modulador de la respuesta inmune	Toda célula nucleada
	1 β			
	1 τ			
	1 ω			
	1 κ			
II	1 γ	IFNGR	Modulador de la respuesta inmune Actividad antiviral	NK NKT CD4 ⁺ (Th1) CD8 ⁺ (CTL)
III	1 a 3 λ	CRFII	Actividad antiviral Modulador de la respuesta inmune	Células nucleadas

Tabla 7.4. Principales características de los interferones correspondientes a los tipos I, II y III.

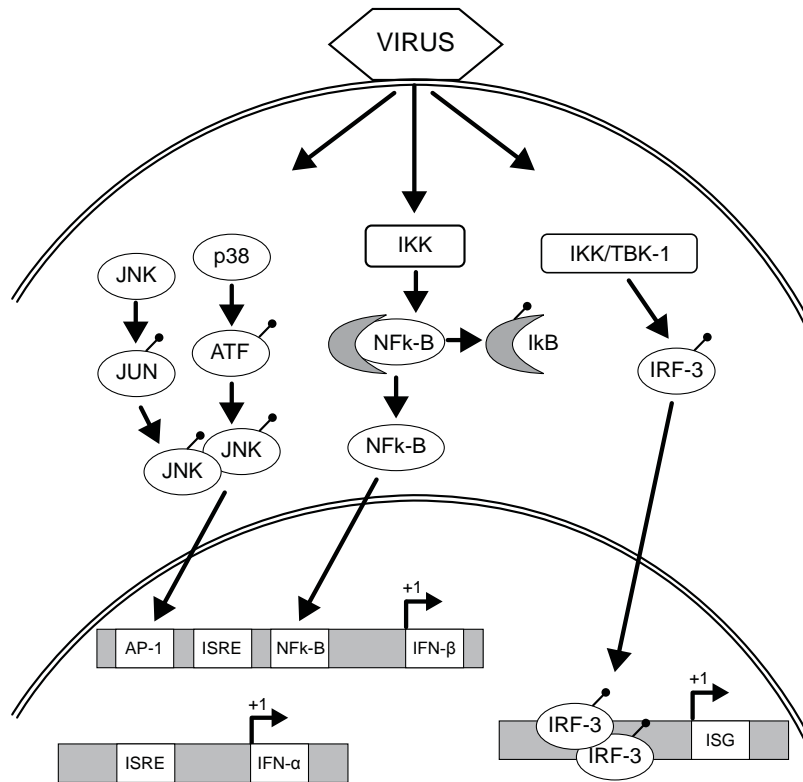


Figura 7.10. Eventos tempranos de la regulación transcripcional del Interferón- α / - β . Véase el texto.

Los LT $\gamma\delta$ activados producen grandes cantidades de IFN- γ y TNF- α en respuesta a fosfoantígenos. TNF- α estimula la expresión de HLA-DR, CD83 y CD86 en la superficie de las células dendríticas, facilitando su maduración. Mientras tanto, el IFN- γ tendría un papel importante en la inducción de IL-12 por parte de las CD, lo cual sería responsable de la producción de IFN- γ por los LT $\alpha\beta$.

Más aún, estudios recientes han sugerido que los LT $\gamma\delta$ cumplirían funciones como CPA. Los LT V γ 9V δ 2 activados expresarían en su superficie moléculas normalmente asociadas a las CPA como las proteínas coestimuladoras CD80/CD86, el ligando de integrina CD54 y el receptor coestimulador CD40. De hecho, se ha demostrado, utilizando LT CD4⁺ como células respondedoras, que los LT $\gamma\delta$ activados son formidables células procesadoras y presentadoras de antígenos siendo muchas veces más efectivos que los LT $\alpha\beta$ y monocitos. Más aún, los LT $\gamma\delta$ – CPA serían comparables a las células dendríticas maduras con respecto a su capacidad de incorporar y procesar antígenos proteicos solubles, e inducir la proliferación de los LT CD4⁺. De esta manera, los LT $\gamma\delta$ constituirían **un nuevo nexo entre la inmunidad innata y adaptativa**.

Actividad antiviral de los LT $\gamma\delta$. Los LT $\gamma\delta$ desempeñan una amplia actividad antiviral contra diferentes agentes como retrovirus, flavivirus, paramixovirus, ortomixovirus, picornavirus, coronavirus, rhabdovirus, arenavirus, herpesvirus, hepadnavirus, y ortopoxvirus. Dicha actividad desempeñaría un rol defensivo crucial, especialmente considerando que por su número relativamente grande (aproximadamente uno de cada 30 linfocitos de sangre periférica en adultos es un LT V γ 9V δ 2) pueden responder rápidamente (típicamente, no se requiere procesamiento antigénico para la activación irrestricta del CMH en los LT V γ 9V δ 2) y liberar factores antivirales solubles.

Varios estudios sugieren una acción antiviral potente de los LT V γ 9V δ 2 contra HIV. Esta acción puede ser ejercida mediante mecanismos citotóxicos y no citotóxicos, como la liberación de β -quimioquinas inhibitorias del HIV (CCL3 [MIP-1 α], CCL4 [MIP-1 β] y CCL5 [RANTES]), que bloquean los correceptores

CCR5. La eficacia de la inhibición viral es comparable con la de los LT CD8⁺.

Se ha descrito en la sangre periférica y mucosas de individuos infectados con HIV, una expansión de los LT V δ 1 a expensas de un descenso en los niveles de los LT V γ 9V δ 2. Estos incrementos de los LT V δ 1 responderían a una activación crónica de dichas células o a un efecto inducido por cambios en los niveles de citoquinas que ocurren durante la progresión de la infección viral. Más aún, la subpoblación de LT V δ 1 es capaz de lisar LT CD4⁺ no infectados, lo cual indicaría que este incremento contribuye directamente a la inmunopatogénesis asociada al HIV. Cabe destacar que la pérdida de los LT V γ 9V δ 2 también sería un factor contribuyente en el establecimiento de la persistencia viral en la etapa SIDA mediante una reducción de los niveles de citoquinas de tipo I. Además, la proteína Tat codificada por el genoma del HIV interferiría con la homeostasis de los LT $\gamma\delta$, al competir con las quimioquinas por la unión a receptores CXCR3 y CXCR4 expresados por los LT $\gamma\delta$.

La expansión y activación de las subpoblaciones de los LT $\gamma\delta$ ha sido observada en pacientes infectados con HCV. En estos casos, los LT $\gamma\delta$ hepáticos exhiben niveles elevados de actividad citotóxica contra diferentes blancos (inclusive hepatocitos primarios). Asimismo, los LT $\gamma\delta$ secretan TNF- α , IL-8 e IFN- γ . Esta última es una citoquina clave en el reclutamiento y activación de LT citotóxicos, células NK y macrófagos, y de mecanismos intracelulares que suprimen la replicación viral sin ejercer un daño directo sobre la célula infectada. Durante la infección crónica, los LT V δ 1 liberarían citoquinas Th1 contribuyendo a los procesos de inflamación y necrosis hepática. En comparación con otros pacientes, los individuos coinfectados con HIV y HCV muestran un número aumentado de LT V δ 1 periféricos e intrahepáticos, lo cual explicaría el mayor grado de inflamación hepática que se observa en éstos. En conjunto, estos resultados sugerirían que los LT V δ 1 desempeñarían un papel en la patogenia hepática asociada al HCV. En cambio, –y en forma análoga a lo que acontece con HIV– se ha observado una disminución de los LT V γ 9V δ 2, lo que contribuye al desarrollo

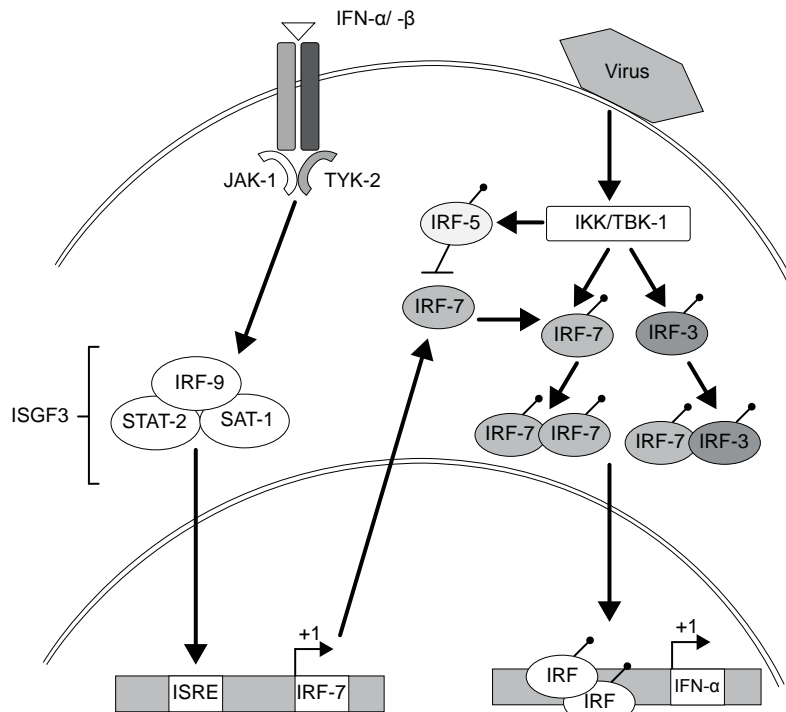


Figura 7.11. Eventos tardíos de la regulación transcripcional del Interferón-α / -β. Véase el texto.

de una respuesta inmune celular debilitada y a la naturaleza persistente de la infección por HCV.

2.2. FACTORES SOLUBLES QUE PARTICIPAN EN LA INMUNIDAD INNATA

2.2.1. Interferones

El estudio de los fluidos de cultivos celulares infectados con virus permitió a Isaacs y Lindenmann demostrar en 1957 la presencia de "una proteína" que protegía contra una amplia variedad de virus y que fue entonces designada con el nombre de *Interferón*.

Hoy se sabe que los IFN son péptidos que promueven la actividad antiviral en células tratadas con los mismos. Los efectos antivirales de los IFN son inespecíficos con respecto al agente inductor, ya que activan las células sobre las que actúan, contra todos los virus. La inducción de esta activación es genéticamente restringida: a diferencia de las interleuquinas, los IFN solamente pueden ser activos en limitado grado sobre células de una especie diferente a la de las que originaron su síntesis.

Los IFN constituyen el primer mecanismo defensivo contra la infección viral que opera en el hospedador. Su acción comienza al cabo de pocas horas de iniciada la infección. Los IFN participan significativamente en la limitación de las infecciones virales, lo cual contribuye a la ocurrencia de un gran número de infecciones subclínicas.

Clásicos estudios experimentales realizados en ratones en los años 60 del siglo XX, demostraron que los títulos máximos de virus influenza alcanzados en el pulmón decrecían ante el aumento del título de interferón en una infección primaria, aun antes que se detectara la síntesis de anticuerpos neutralizantes específicos contra la hemaglutinina de envoltura. Es decir, en este caso la eliminación viral ocurría antes de transcurrida una semana, previo al momento de la seroconversión (Figura 7.9).

Durante las infecciones virales, los IFN participan en numerosas interacciones inmunes como inductores, reguladores y efectores, ya sea de mecanismos antivirales correspondientes a la respuesta innata como a la adaptativa (Figura 7.2B)

Teniendo en cuenta la naturaleza de los receptores que los reconocen así como su homología aminoacídica, los IFN consti-

tuyen una familia de proteínas que ha sido subdividida en tipo I (comprende los IFN-α y -β), tipo II o inmune (IFN-γ) y una nueva familia de IFN (IFN-λ). Los IFN de tipo I abarcan una variedad de genes de tipo α (14 – 20 según la especie), un único gen de tipo β, y los menos estudiados IFN-κ (kappa), -τ (tau) y -ω (omega). Los IFN-λ han sido reconocidos recientemente y comprenden las inicialmente denominadas interleuquinas 28 y 29. En este capítulo sólo se desarrollarán aquellos aspectos salientes vinculados con los IFN-α, -β, -γ y -ω.

Se describirán a continuación los mecanismos de regulación de la producción de interferones, las células que los producen y el rol que aquellos cumplen en las infecciones virales

Esta familia de citoquinas comprende a los IFN de tipo I (α, β, τ, ω, y κ), de tipo II (γ) y los de tipo III (λ) (Tabla 7.4). Mientras que los IFN de tipo I ejercen sus efectos biológicos a través de un receptor común (IFNAR), los del segundo tipo lo hacen a través de uno específico (IFNGR). La nueva familia de IFN-λ está compuesta por 3 miembros: IFN-λ1 (o IL-29), IFN-λ2/3 (o IL-28A/B). Estos IFN actúan a través de un receptor heterodimérico (CRFII: *Class II cytokine Receptor Family*) que comprende la cadena α del receptor para IL-28 (IL-28Rα) –la cual es específica para este tipo de IFN- y la cadena β del receptor para IL-10 (IL-10Rβ).

Interferones de tipo I. Inducción del IFN-α / -β

Los IFN-α y -β son los primeros en producirse ante una infección viral. La activación de la expresión de IFN-α / -β puede ocurrir como consecuencia de la detección celular de:

- a. determinantes virales presentes en el virión que interactúan con receptores extracelulares o del compartimiento endosómico;
- b. factores virales liberados al citoplasma luego de la infección o producidos en alguna etapa del ciclo de replicación viral, que se unen a receptores intracelulares; y
- c. factores virales transportados / liberados desde el citoplasma que interaccionan con receptores extracelulares.

Como se puede observar en los casos "b" y "c" es necesario que la célula se infecte para que se produzca la inducción de la síntesis de IFN-α / -β, mientras que en el primer caso este evento es innecesario. En este último ejemplo, factores virales extracelulares

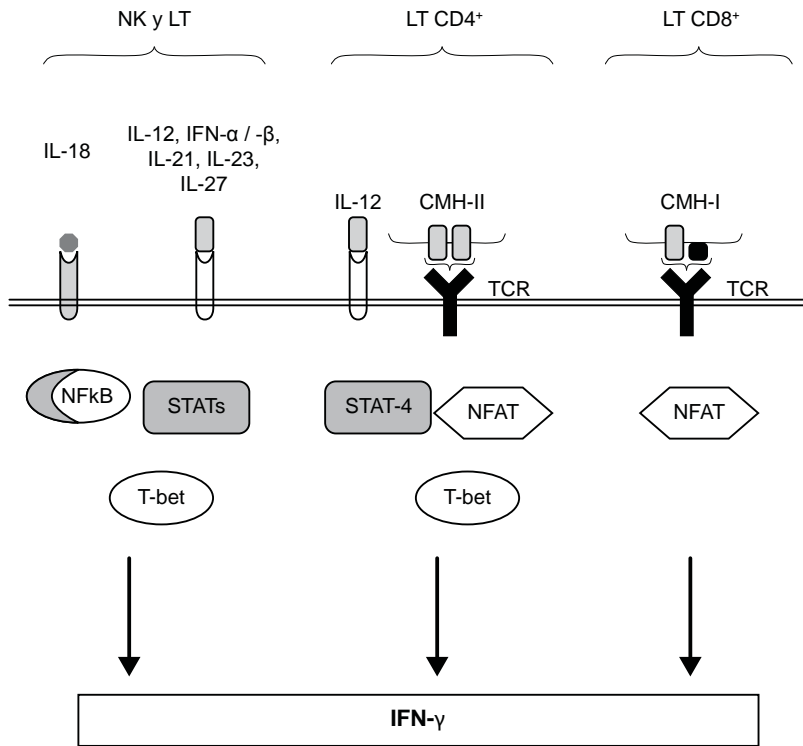


Figura 7.12. Inducción de Interferón γ. Véase el texto.

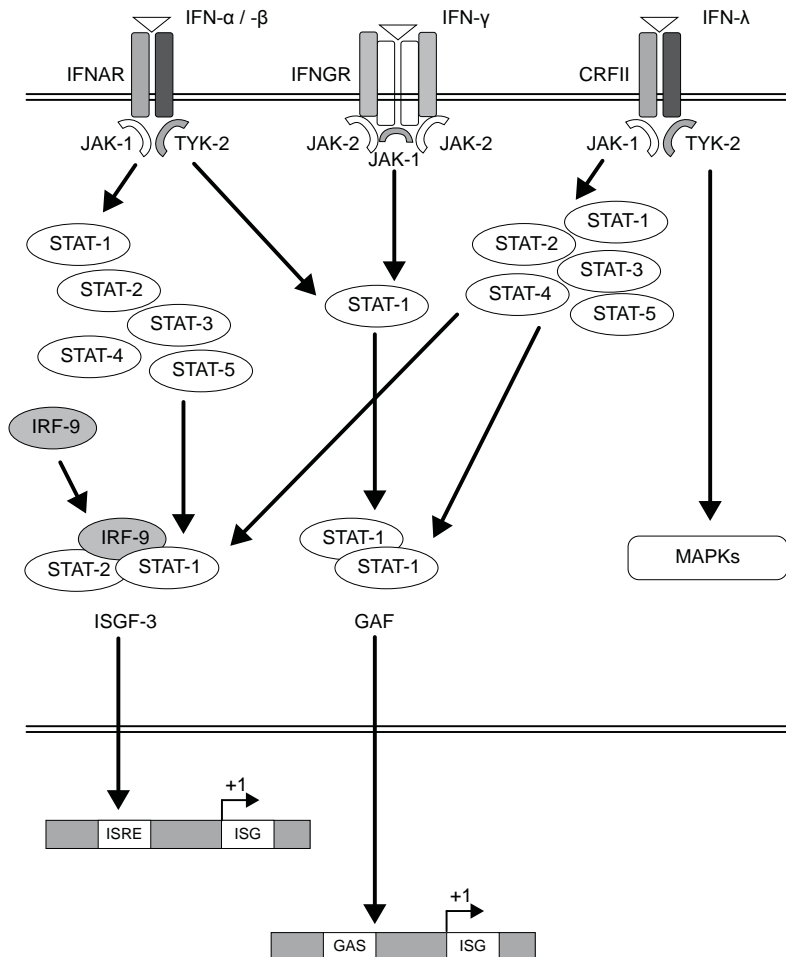


Figura 7.13. Vías de señalización de los interferones tipo I, II, y III. Véase el texto.



ISG	Función
Mx	GTPasa: inhibe la replicación de ciertos virus con genoma a RNA
2'-5' OAS/RNAsa L	Enzimas: a) 2'-5' OAS estimula a RNAsa L b) RNAsa L degrada RNAs virales y celulares
PKR	Serina-treonina proteína-quinasa: a) fosforila eIF2 α e impide la traducción de RNAm virales y celulares b) promueve la apoptosis
ISG 15	Ubiquitina-símil. Permite la degradación de las proteínas por el proteasoma
ISG 20	3'-5'exonucleasa: degrada específicamente RNAsc
P56	Une a la subunidad 3e del eIF3 impidiendo la traducción de los RNAm virales
ADAR	Enzima modificadora de RNAdc: cataliza la desaminación de las adeninas a inosinas, desestabilizando la estructura secundaria del RNAdc
PML	Miembro de la familia proteica TRIM: a) interviene en la apoptosis b) inhibe la transcripción c) participa en los eventos celulares producidos como respuesta al DNA dañado
GBP-1	GTPasa: a) inhibe la replicación de virus con genoma RNA b) es predominantemente inducida por INF- γ

Tabla 7.5. Diversos genes inducidos por interferón. ISGs: (*Interferon Stimulated Genes*): genes estimulados por interferón. 2'-5' OAS: 2'-5'oligoadenilato sintetasa. **PKR:** proteína-quinasa dependiente de RNA. **ADAR** (*RNA specific Adenosine Deaminase*. 1): adenosina desaminasa 1 específica de RNA. **PML** (*Promyelocytic Leukemia protein*): proteína de leucemia promielocítica. **GBP-1** (*Guanylate-Binding Protein 1*): proteína 1 de unión a guanilato. **eIF2 α :** factor eucariótico de iniciación de la traducción 2 α . **eIF3:** factor eucariótico de iniciación de la traducción 3. **RNAsc:** RNA de simple cadena. **RNAdc:** RNA de doble cadena.

Corpus Editorial pueden activar la síntesis de IFN- α / - β al interactuar con receptores extracelulares RRP que reconocen ciertos PAMP en las moléculas virales.

Regulación transcripcional del IFN- α / - β .

La regulación de la transcripción de los genes que codifican para los IFN- α y - β puede dividirse temporalmente en dos partes: las correspondientes a eventos tempranos y a tardíos.

Eventos tempranos. En los eventos tempranos la regulación transcripcional de los IFN- α / - β se produce a través de diversas vías de transducción de señales, las cuales no requieren síntesis proteica *de novo*. En todas estas vías el último paso es la activación de un factor de transcripción que se transloca del citoplasma al núcleo y activa la transcripción de diversos genes. Las 3 vías hasta el presente mejor estudiadas son las siguientes (Figura 7.10):

- Las proteína-quinasas activadas por el estrés (SAPKs) como JNK (*c-JUN N-terminal Kinase*) y MAPKp38 son reclutadas para activar por fosforilación los factores de transcripción JUN y ATF-2, respectivamente; ello resulta en la formación del factor de transcripción AP-1 (*Activated Protein-1*), que se transloca al núcleo y activa la transcripción de los genes de IFN- α / - β .
- El complejo heterodimérico IKK (α , β , y γ) al activarse fosforila a I κ B, la cual libera y deja activo a NF κ B. Una vez activa, NF κ B se transloca al núcleo y activa la transcripción de los genes de IFN- α / - β .
- La estimulación del complejo IKK- ϵ / TBK1 (*TANK-Binding Kinase 1*) produce la fosforilación por parte de éste del factor preexistente IRF-3 (*IFN Regulatory Factor-3*), el cual al activarse se transloca al núcleo y activa la transcripción de diferentes genes: ISG (*IFN Stimulated Genes 15, 54 y 56*), IP-10 (*IFN- γ -Inducible Protein-10*), iNOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*) y CCL5 (RANTES).

Eventos tardíos. Los eventos tardíos de regulación de la transcripción de los genes de IFN- α y - β son activados por la acción conjunta de determinantes virales y de los mismos IFN- α y - β , en un proceso de retroalimentación positiva (*feed-back* positivo). Una

vez secretados estos IFN se unen a su receptor IFNAR y estimulan la transcripción de IRF-7 a través del factor de transcripción ISGF3. Una vez en el citoplasma, IRF-7 junto con IRF-3 son fosforilados por el complejo de quinasas activadas por virus IKK- ϵ / TBK1. El heterodímero IRF-7 / IRF-3 al activarse migra al núcleo donde induce la transcripción de diversos genes, entre ellos IFN- α / - β (Figura 7.11).

Interferones de tipo II. Inducción del IFN- γ

El IFN- γ es una citoquina que no está inducida directamente por los agentes microbianos, sino que se encuentra dentro del segundo grupo de moléculas que son inducidas en respuesta a la estimulación de un receptor por una CPA o por citoquinas que se secretaron previamente durante la infección.

Diversas citoquinas han sido implicadas en la inducción de la expresión de IFN- γ ; entre ellas se encuentran las siguientes: IL-1, IL-2, IL-12, IL-18, IL-15, IL-21, IL-23, IL-27, IFN- α / - β y TNF- α . Dentro de estas citoquinas, el inductor primario de IFN- γ es la IL-12; esta interleuquina sola es suficiente para inducir importantes cantidades de IFN- γ en células T y NK; no obstante, también actúa de manera sinérgica con otras citoquinas como IL-2, TNF- α y en particular con IL-18. A su vez, en las células T la acción conjunta de IL-12 e IL-18 puede estimular la producción de IFN- γ sin la necesidad de estimulación antigénica.

Cabe mencionar que los IFN- α y - β pueden tanto inducir como inhibir la expresión de IFN- γ , dependiendo del contexto en el cual actúen. En este sentido, se observó que los IFN- α / β pueden inhibir la expresión de IL-12 y producir disminución en la expresión de IFN- γ mediada por STAT-1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) de manera transitoria; por otra parte, estos mismos IFN actúan estimulando la expresión de IFN- γ activando STAT-4. El tipo de efecto que producen los IFN- α / - β sobre la expresión de IFN- γ parece estar influenciado por el nivel de expresión de STAT-1, ya que se observó que altos niveles de este factor de transcripción favorecen la regulación negativa, mientras que niveles menores producirán una regulación positiva.

Como en las infecciones virales en las cuales se producen grandes cantidades IFN- α / - β no se induce IL-12 -debido a la regulación negativa ejercida por dichos IFN- la inducción de IFN- γ se ve estimulada directamente por IFN- α / - β .

Además de la estimulación de la expresión de IFN- γ por la unión de las citoquinas a su receptor, las células T y las NK pueden expresar este tipo de IFN por estimulación de otros tipos de receptores celulares, como es el caso del TCR. Si bien las vías de estimulación mediadas por el TCR son diferentes, éstas pueden actuar de manera sinérgica con las vías inducidas por citoquinas (Figura 7.12).

Regulación transcripcional del IFN- γ

La expresión de IFN- γ está regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional. El control transcripcional de la expresión de esta citoquina esta dado por la acción de diferentes factores de transcripción, entre ellos: NF κ B, NFAT (*Nuclear Factor Activating Transcription*), STAT, T-bet, AP-1, CREB-ATF, GATA-3 y ying-yang1 (Figura 7.12). Existe un requerimiento diferencial de los diversos factores de transcripción mencionados, dependiendo del tipo celular y de la vía de señalización inducida, pero en general todos actúan como reguladores positivos de la expresión de IFN- γ , induciendo su expresión.

Fracción	Actividad
C1q	Opsonización para facilitar la fagocitosis; eliminación de los cuerpos apoptóticos; procesamiento y eliminación de los inmunocomplejos
C3a	Mediador peptídico de la inflamación; promueve la contracción del músculo liso, el aumento de la permeabilidad vascular, la degranulación de eosinófilos, basófilos y células cebadas, la liberación de histamina y la agregación plaquetaria
C3b	Opsonización de partículas para facilitar la fagocitosis; solubilización de inmunocomplejos
C3c	Liberación de neutrófilos desde la médula ósea; lisis de leucocitos
C3dg	Ayudante molecular; regulación de la respuesta adaptativa
C4a	Promueve la contracción del músculo liso y el aumento de la permeabilidad vascular
C4b	Opsonización para facilitar la fagocitosis, procesamiento y eliminación de los inmunocomplejos
C5a	Mediador peptídico de la inflamación; promueve la contracción del músculo liso, el aumento de la permeabilidad vascular, la degranulación de eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monocitos y células cebadas, y la liberación de enzimas hidrolíticas de los neutrófilos
C5b, C6, C7, C8, C9	Complejo lítico de ataque a membranas (celulares o virales)
Bb	Inhibidor de la migración celular e inductor de la diseminación de monocitos y macrófagos

Tabla 7.6. Funciones biológicas de las diferentes fracciones del sistema Complemento.

Además de la regulación transcripcional –antes mencionada– la expresión de IFN- γ está regulada por mecanismos post-transcripcionales. Recientemente, se documentó que el RNAm de IFN- γ humano puede controlar su propio nivel de traducción. En este sentido, se observó que la formación de una estructura tridimensional en este mensajero media la activación de la PKR, la cual a su vez inhibe la síntesis de proteínas.

IFN de tipo III. Inducción de IFN- λ

Hasta la actualidad, no se ha podido dilucidar los mecanismos exactos que gobiernan la expresión de IFN- λ . No obstante, se ha demostrado que al igual que los IFN- α / - β , la expresión del IFN- λ es inducida por factores virales, siendo las primeras citoquinas en sintetizarse ante una infección viral. Estos inductores virales pueden ser intracelulares como en el caso de IFN- α / - β - como consecuencia de la replicación viral, o extracelulares. Estos últimos pueden activar la síntesis del IFN- λ al interactuar con los receptores RRP que reconocen diferentes PAMP. Del mismo modo que ocurre con los IFN- α / - β , los TLR-3, -4, -7/-8 y -9 pueden inducir la expresión de IFN- λ .

El IFN- λ fue detectado hasta el momento en las mismas células en las que se detecta la expresión de IFN- α / - β : CPA, CDP, CDM y diversas células nucleadas.

Cascadas de transducción de señales activadas por los interferones de tipo I, II y III

Luego de la unión a su receptor específico, los distintos tipos de IFN estimulan la transcripción de diferentes genes (ISG), para llevar a cabo las diversas funciones biológicas asociadas a estas citoquinas (Figura 7.13).

Luego de la interacción IFN/receptor se activa la cascada de transducción de señales de las proteína-quinasa denominadas JAKs/SATs. Al activarse se dirigen al núcleo para unirse a regiones regulatorias de los genes ISG, denominadas ISRE (*IFN-Stimulated Response Element*) para aquellos genes que responden a los IFN de tipo I, o GAS (*IFN-Gamma Activated Sequence*) para aquellos que responden a los de tipo II. El IFN- λ también estimula las regiones regulatorias ISRE y GAS a través de la vía de transducción de señales de las JAK/STAT.

Los IFN de tipo I –principalmente IFN- α / - β - se unen a sus receptores específicos IFNAR-1/ -2, tras lo cual se activan las tirosina-quinasa TYK-2 y JAK-1 por fosforilación, las que a su vez fosforilan a IFNAR-1 y reclutan a STAT-2 para que se una al receptor. STAT-2 es fosforilado, facilitando su interacción con STAT-1 –a través de su dominio SH2– y la consiguiente activación de este último factor. El heterodímero activo STAT-2/STAT-1 deja el sitio del receptor para unirse a IRF-9 y formar el complejo ISGF3. Este complejo migra al núcleo y actúa como factor de transcripción al unirse a la región regulatoria genómica ISRE estimulando la transcripción de los genes ISG.

De manera análoga, al unirse el IFN- γ a su receptor (IFNGR-1/ IFNGR-2) permite la activación de las tirosina-quinasa JAK-1 y JAK-2. Una vez activas, las JAK fosforilan al receptor, el que -a su vez- recluta y activa a STAT-1. STAT-1 forma homodímeros activos denominados GAF; éstos migran al núcleo para unirse a la secuencia genómica regulatoria GAS y promover la transcripción de los genes ISG.

Luego de la interacción de IFN- λ con su receptor específico, se induce una cascada de transducción de señales que culmina con la formación de los complejos ISGF-3 y GAS, así como la activación de diferentes STAT (STAT-1, -3, -4 y -5). Los factores de transcripción antes mencionados se unen a las secuencias regulatorias ISRE y GAS, las cuales regulan la transcripción de los genes ISG. Estudios recientes implican al IFN- λ en la activación de las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) por una vía independiente de las STAT.

Genes estimulados por interferones de tipo I, II y III

Los IFN estimulan más de 300 genes (denominados globalmente "ISG" según su abreviatura en inglés), los cuales tienen funcio-

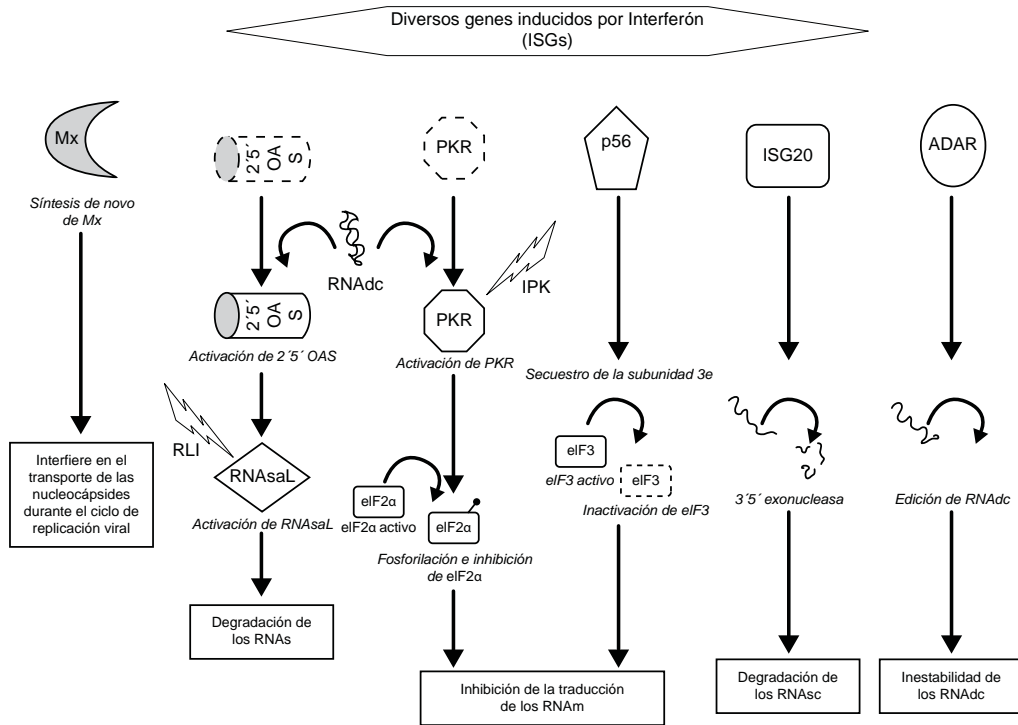


Figura 7.14. Genes inducidos por Interferón y efectos producidos por la expresión de los mismos. Véase el texto.

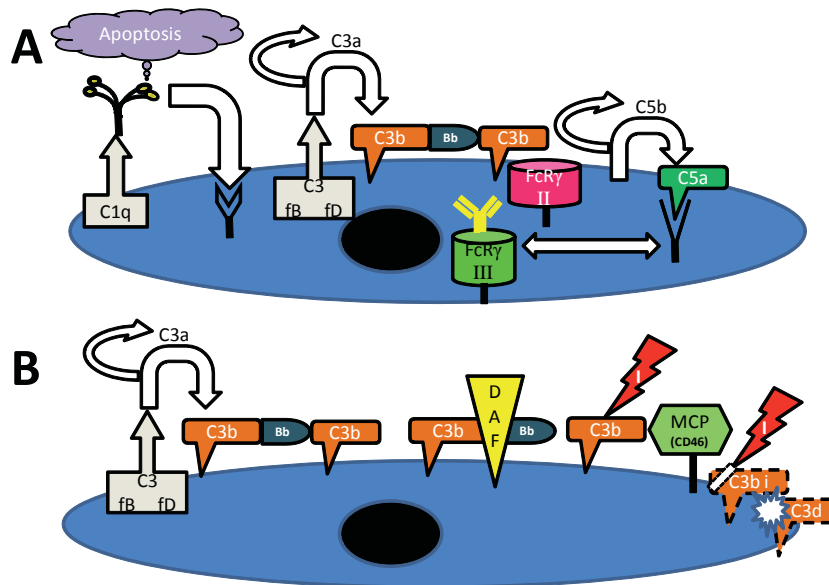


Figura 7.15. Interacciones entre componentes del sistema Complemento y las células presentadoras de antígenos. Los macrófagos y las células dendríticas (CD) inmaduras elaboran todos los componentes de la vía clásica y alternativa de activación del sistema. Además, dichas células expresan receptores para C1q, C3b, iC3b, C3a, C5a y para la fracción Fc de las Igs. **A.** C1q es fundamental para el reconocimiento y eliminación de las células apoptóticas por parte de los macrófagos y CD. La producción de C3b, Factor B y factor D, promueve el depósito de C3bBb sobre la superficie celular, lo cual puede clivar más C3b para formar C3bBbC3b, la C5 convertasa de la vía alternativa. Esta proteasa u otras serina-proteasas sintetizadas por los macrófagos pueden clivar C5, produciendo C5a y C5b. Existe un circuito de retroalimentación entre C5a y el FcR (receptor para Fc), por el cual la síntesis de C5 y su clivaje están aumentados por los anticuerpos unidos a FcγRIII. A su vez, la unión de C5a a los receptores expresados sobre la superficie de los macrófagos, aumenta la expresión de FcγRIII e inhibe la del receptor inhibitorio FcγRIIB. **B.** Las proteínas regulatorias del sistema complemento depositadas sobre la membrana plasmática de macrófagos y CD modulan la interacción con los linfocitos T (LT) y los linfocitos B (LB). El factor acelerador del decaimiento (denominado DAF o CD55) de la actividad del complemento es una molécula de glicosilfosfatidilinositol anclada en la membrana que promueve una más rápida disociación de Bb del complejo C3bBb. Ello restringe la cantidad de C3b unida a la superficie de las células presentadoras de antígenos. El cofactor proteico de membrana (en inglés, MCP) también denominado CD46 es una glicoproteína que regula la actividad del complemento actuando como cofactor de I, para clivar C3b produciendo la proteína enzimáticamente inactiva C3bi, y luego C3d. DAF y MCP están también expresadas en los LT, modulando su respuesta. Como consecuencia del corte y empalme (*splicing*) alternativo, MCP se expresa con dos colas citoplasmáticas diferentes que modulan divergentemente la respuesta T. (Adaptado de Wasnowska *et al.*, 2007).

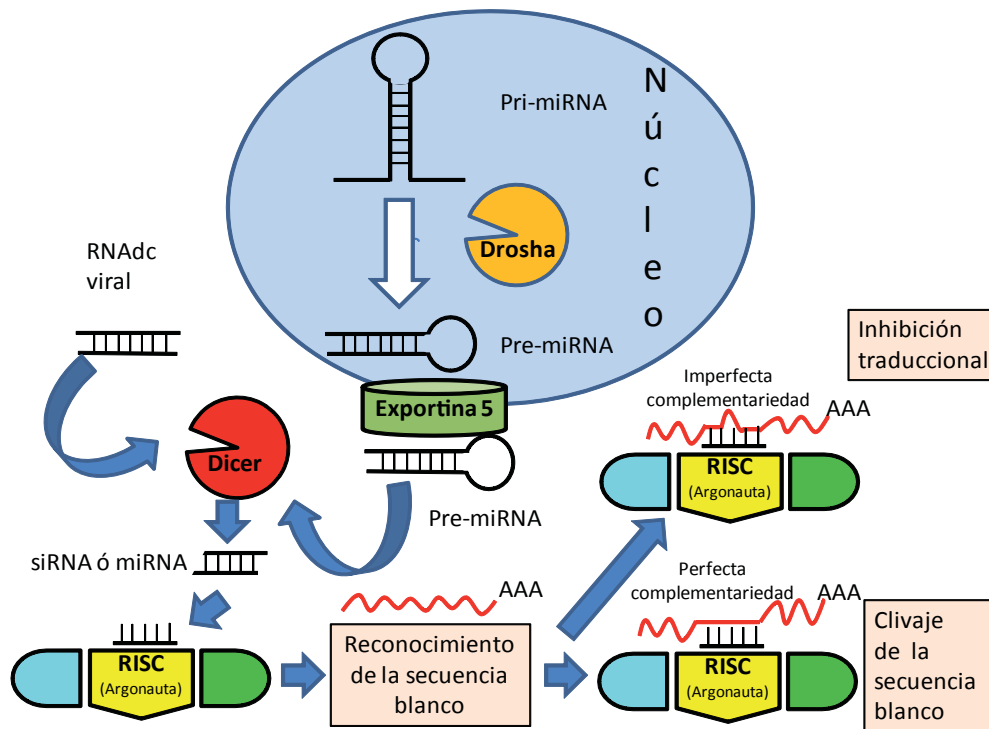


Figura 7.16. Generación de miRNA o siRNA. Los miRNA primarios (pri-miRNA) –consistentes en hebras de varios cientos a varios miles de nucleótidos (nt) de RNA monocatenarios que forman regiones complementarias en asa y otras no complementarias como bucles–, son procesados en el núcleo por la ribonucleasa Drosha, que los transforma en estructuras en asa-bucle de unos 70 nt (pre-miRNA). Estas moléculas egresan del núcleo a través de la exportina 5. En el citoplasma, estos pre-miRNA o el RNA viral bicatenario son procesados por la enzima Dicer (una RNasa III con un sitio activo de RNasa H-símil), que las transforma en pequeñas moléculas de RNA bicatenarias de aproximadamente 21-23 nt. Las mismas son ensambladas en el complejo de silenciamiento inducido por RNA o RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*). Una de las cadenas es eliminada del RISC, quedando el complejo listo para su encuentro con el RNA blanco. Allí la enzima Argonata 2 (Ago) es responsable de la actividad del complejo. Los miRNA en general sólo exhiben complementariedad parcial con el RNAm blanco, lo que conduce a una inhibición de la traducción del mismo. Sin embargo, algunos miRNA y los siRNA muestran complementariedad exacta con la secuencia del RNAm blanco, lo que promueve el clivaje de las moléculas de doble cadena formadas. El proceso descrito se repite en ciclos sucesivos. En años recientes se ha documentado que algunos virus codifican miRNA en sus genes, y que ciertos siRNA pueden también originarse a partir de pseudogenes celulares.

nes antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. Los IFN inducen proteínas como enzimas, factores de transcripción, glicoproteínas de superficie, citoquinas, quimioquinas y un gran número de factores que aún no han sido caracterizados. Hasta el presente, sólo algunas proteínas con funciones antivirales han sido caracterizadas. Las más estudiadas son las siguientes (Figura 7.14): las proteínas Mx, la 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2'-5' OAS) / RNasaL (una RNasa en estado latente) y la proteína-quinasa dependiente de RNA (PKR).

Las proteínas Mx son GTPasas que inhiben la replicación de diversos virus con genoma RNA pertenecientes a las familias *Orthomyxo-Paramyxo-*, *Rhabdo-*, *Picorna-* (*Hepatovirus*) y *Bunyaviridae*, de un modo no totalmente dilucidado. A diferencia de otros ISG, las proteínas Mx no se expresan constitutivamente en las células y su expresión no es inducida directamente por los virus o las moléculas de RNAdc. Por el contrario, la expresión de estas proteínas es estimulada exclusivamente por acción del IFN- α / - β a través de la cascada de transducción de señales de las JAK/STAT. De manera inversa, las proteínas 2'-5' OAS y la PKR se expresan constitutivamente en la célula en una forma inactiva. Los niveles basales de estas proteínas son estimulados por IFN- α / - β o IFN- γ y la actividad de ambas enzimas es activada por RNAdc. La 2'-5' OAS cataliza la síntesis de 2'-5' oligoadenilatos que activan a la enzima RNAasa L, la cual –a su vez– degrada los RNA tanto virales, como celulares dando lugar a la inhibición de la replicación viral. La PKR es una serina-treonina proteína-quinasa que fosforila al factor eucariótico de iniciación de la traducción 2a (eIF2a), como

consecuencia de lo cual se bloquea la traducción de los RNAm virales y celulares. Una síntesis de los diversos ISG se detalla en la Tabla 7.5.

2.2.2. El sistema Complemento

Este sistema está compuesto por **al menos 18 proteínas séricas y un número casi igual de proteínas que se unen a membranas y actúan secuencialmente. El C participa tanto en la respuesta innata como en la adaptativa** (Figura 7.1 y Tabla 7.6). Este sistema funciona a través de tres vías: la clásica, la alternativa y la de unión a mananos. Su nombre deriva de las observaciones iniciales en las que su actividad fue considerada como complementaria a la de los anticuerpos y por lo tanto, un componente crítico de la respuesta adaptativa. Actualmente, se considera a este sistema también como una herramienta central de la respuesta innata, así como de la modulación de la respuesta de LT.

Este sistema exhibe 4 acciones biológicas principales: 1) la **lisis osmótica** de las células o de los virus envueltos, al promover la formación de poros en las respectivas membranas por polimerización de los componentes C5b, C6, C7, C8 y C9 (complejo de ataque); 2) la **activación de la inflamación** ya que C3a, C4a y C5a se unen a las superficies endoteliales y a diversas clases de linfocitos, para potenciar la respuesta ante antígenos extraños; 3) la **opsonización** de agentes exógenos como los virus mediante la unión a su superficie de C3b y C1q que son reconocidos por células fagocíticas que portan receptores para los mismos (por ejemplo, el receptor CR1) en sus superficies, los que –a su vez– promueven la endocitosis;

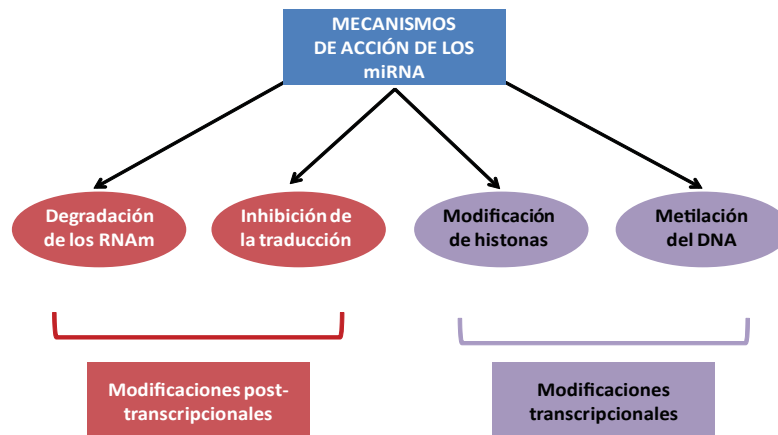


Figura 7.17. Mecanismos de regulación génica mediados por miRNA.

Respuesta adaptativa			Respuesta innata
Linfocitos B	Linfocitos T convencionales	Linfocitos T regulatorios	
miR-17~92 miR-101 miR-150 miR-155 miR-181a	miR-17~92 miR-101 miR-150 miR-155 miR-181a	miR-146 miR-150 miR-155	miR-125b miR-132 miR-146 miR-155 miR-223

Tabla 7.7. Participación de diversos miRNAs en la regulación de la respuesta adaptativa e innata.

y 4) la **solubilización de los inmunocomplejos** formados por los antígenos de virus no citopáticos y anticuerpos específicos que se depositan en riñón u órganos linfoides.

Dado que el sistema C puede tanto promover el daño como la curación ante una infección, debe ser delicadamente regulado, lo cual es particularmente relevante ante la vía alternativa que se activa espontáneamente. La **regulación de la cascada del C** ocurre merced a **al menos 3 mecanismos**: 1) el **gran tamaño de algunas de las proteínas** constitutivas, que no les permite dejar el torrente circulatorio ante una infección, y que promoverá la lisis celular sólo si existe un significativo daño que exponga a las células infectadas a la circulación; 2) la **brevísimas vida media (milisegundos) de ciertas fracciones**, que les impide actuar a distancia del sitio de una infección; 3) la existencia de **proteínas inhibitorias del suero y otras fijadas a la superficie de membranas** (CD46 [cofactor proteico de membrana], CD55 o DAF [factor acelerador de la caída de la actividad de C3 y C5 convertasa], CD59 [protectina] y CR1 [receptor 1 del C]) que se unen a ciertas fracciones del C (como C3b y C4b) impidiendo su acción. Por esta razón, la unión espontánea de C3b a las superficies de las células del organismo, no promueve la activación de la cascada del C (Figura 7.15), evento que sí ocurre en las envolturas de muchos virus que al carecer de proteínas inhibitorias como DAF y CR1 son susceptibles a la actividad lítica del C, promovida especialmente por la vía alternativa. Sorprendentemente, HIV es resistente a dicha acción, ya que porta en su envoltura las proteínas CD46, DAF y CD59 de origen celular. La activación a través de la vía clásica, alternativa o de las lectinas conduce al clivaje de las fracciones C3 y C5 del sistema del C, lo que genera los productos C3a, C3b, C5a y C5b. Los receptores para C3a y C5a pertenecen a miembros de la familia de las rodopsinas unidas a proteínas G de transmembrana, mientras que los receptores para C3b pertenecen a las familias reguladoras de la activación del C (como DAF) y a las $\beta 2$ integrinas. DAF es importante para restringir la activación del C sobre células seleccionadas. DAF también está involucrada en la activación celular mediada por

tirosina-quinasa de los LT, al producirse el entrecruzamiento sobre la superficie de estas células (Figura 7.15).

2.2.3. Colectinas

Su nombre deriva del inglés (*Collagenous C-type lectins*) Estas proteínas plasmáticas tienen similitud estructural y biológica con C1q, por lo que pueden activar el sistema C. Estas lectinas tipo C con capacidad de unión a carbohidratos incluyen a las conglutininas, la proteína de unión a manosa (MBP), CL-43, y las proteínas pulmonares surfactantes (SP) SP-A y SP-D. Se unen a la superficie de células y –presumiblemente- de virus, pudiendo a veces sustituir la actividad de C1q para activar la cascada del complemento. En algunos casos pueden inhibir o potenciar la infectividad de diferentes virus. Las conglutininas bovinas inhiben al virus influenza de los subtipos H1 y H3. MBP en ausencia de complemento inhibe la infectividad del HIV; sin embargo, la adición de MBP a la gp120 del HIV activa la cascada del complemento, lo cual puede incrementar su infectividad, al promover la infección productiva de células con receptores CR1 o CR3, tornando lo que en otros casos es una barrera de defensa antiviral en un excelente trampolín potenciador de la infección.

El verdadero rol de las colectinas *in vivo* aún no ha sido adecuadamente definido.

2.2.4. Anticuerpos naturales

Corresponden a aproximadamente el 2% del total de IgG e IgM séricas. Su formación –previa a la infección viral– obedece a la respuesta inducida contra antígenos ricos en galactosa (Gal α (1,3)-Gal), presentes en las proteínas de superficie glicosiladas. Estos antígenos se forman por la actividad de la enzima galactosil transferasa, ausente en el hombre y en primates superiores, pero presente en primates inferiores, otros animales y también en bacterias. La producción de Gal α (1,3)-Gal en el intestino humano por parte de las bacterias que lo colonizan, promueve una respuesta del hospedador que se traduce en la formación de anticuerpos específicos. Los vi-

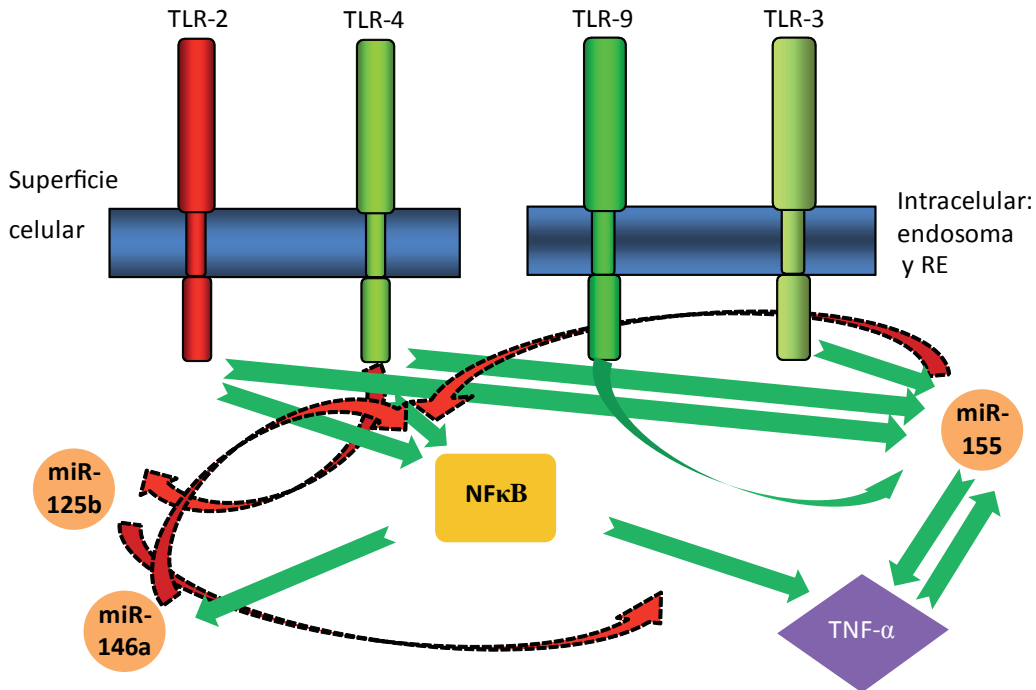


Figura 7.18. Regulación de la respuesta inmune innata por miRNA. Los receptores tipo Toll (TLR) reconocen componentes virales y activan las cascadas de señalización intracelular que promueven la respuesta inflamatorias (Figura 7.4) y/o la liberación de moléculas antivirales. Recientes evidencias muestran que la inducción de miR-146 por componentes bacterianos sirve como una molécula de retroalimentación negativa en dicha vía. La inducción de miR-146 en los monocitos actúa como supresor de la vía de señalización entre los TLR y el TNF- α . Tanto componentes bacterianos como virales inducen miR-155, lo cual puede promover tanto la supresión como la activación de esta vía. En contraposición, los lipopolisacáridos bacterianos a través de la interacción con TLR-4 suprimen miR-125b, el que inhibe la producción de TNF- α a nivel post-transcripcional. miR-125b desempeña –a su vez– un rol esencial en el mantenimiento de la latencia del HIV en los linfocitos T CD4⁺ de reposo. Las flechas con bordes continuos indican vías estimulatorias; las que exhiben bordes discontinuos reflejan vías inhibitorias.

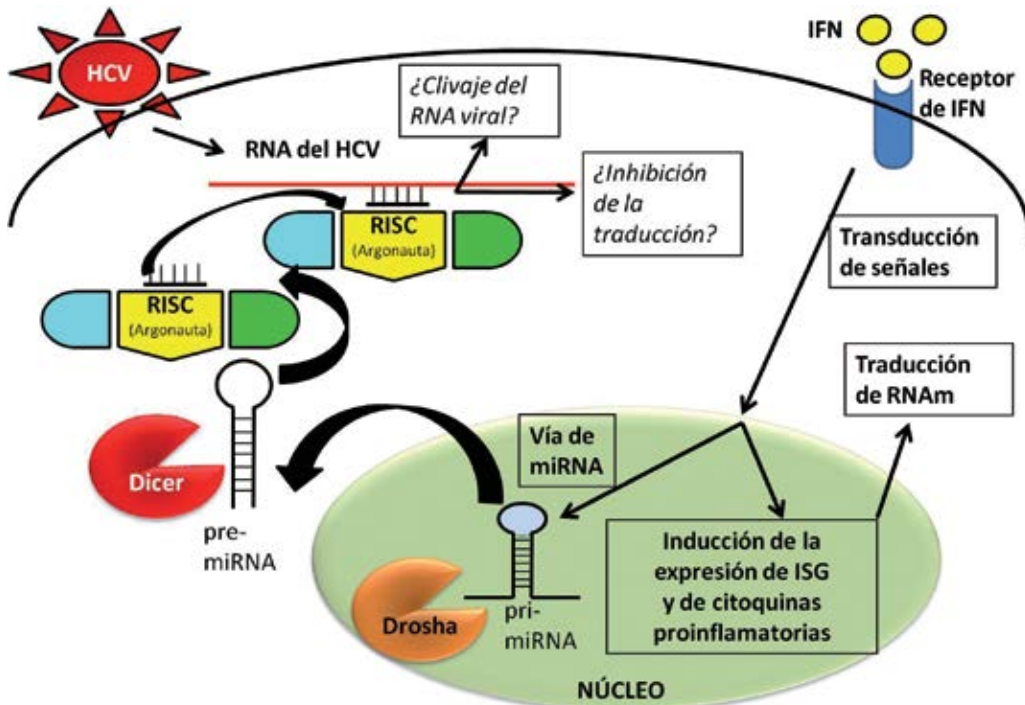


Figura 7.19. Generación de miRNA en la infección por HCV. La estimulación promovida por el Interferón (IFN) sobre receptores específicos induce la expresión de genes estimulados por dicha molécula (ISG) y la generación de miRNA. Éstos pueden inhibir la expresión del genoma viral por mecanismos no totalmente dilucidados. En contraposición, el miR-122 celular es requerido para la replicación viral, lo que lo constituye en un potencial blanco terapéutico.

rus y las células extrañas que exhiben los mencionados azúcares en su superficie son reconocidos por los anticuerpos naturales, que al fijar el complemento, promueven un nexo de colaboración inmediata entre la respuesta innata y la adaptativa. Es probablemente atribuible a estos "anticuerpos naturales", que muchos virus que infectan otros hospedadores, no afectan al hombre.

2.3. RNA INTERFERENTES: MIRNA Y siRNA

La regulación de la expresión génica tanto en procariotas como en eucariotas se lleva a cabo mediante mecanismos pre- y post-transcripcionales. Entre los primeros se encuentran implicadas las secuencias genómicas encargadas de direccionar la transcripción génica (promotores, silenciadores y potenciadores [*enhancers*]) y la acción diferencial de los factores de transcripción; entre otros. Dentro de los mecanismos de regulación post-transcripcional de la expresión génica se encuentra la *interferencia* de RNA (RNAi), la cual es implementada por diversas enzimas (Polimerasas, RNAsas) y otras proteínas, así como por moléculas de RNA complementarias a los RNAm que se pretende regular. Hasta el momento se han descrito varios tipos de moléculas de RNA no codificantes con polaridad anti-RNAm—las cuales tienen una extensión de unos pocos nucleótidos— como es el caso de los *small*—también designados *short-interfering RNA* (siRNA) y de los micro RNA (miRNA). Estas moléculas de RNA con polaridad anti-mensajero se unen por complementariedad (exacta o parcial) a la molécula de RNAm blanco e inhiben su eventual traducción por diversos mecanismos, como son la degradación de la molécula diana por acción de las RNAsas (mecanismo disparado por los siRNA) o la inhibición de la correcta acción de la maquinaria de traducción por un impedimento estérico (acción producida por los miRNA). Recientemente se ha documentado la acción reguladora positiva de los miRNA sobre algunas moléculas de RNAm al promover o facilitar la traducción de los mismos.

Hasta 2008, se consideraba establecido que los miRNA y los siRNA diferían en al menos dos aspectos. Los primeros, habían sido considerados el resultado de un mecanismo endógeno de regulación epigenética de los propios genes celulares. En contraposición, los siRNA habían sido definidos como la expresión de una respuesta defensiva de la célula para preservar la propia integridad de su genoma, ante el ingreso de ácidos nucleicos "intrusos" (virus, transposones, transgenes, etc.). Asimismo, los miRNA aparecían como resultado de la síntesis a partir de moléculas precursoras de RNA con estructura de asa (bicatenaria) - bucle (monocatenaria). Como contrapartida, se establecía que los siRNA eran sintetizados a partir de largas hélices de RNA bicatenario. Sin embargo, dada la similitud del tamaño exhibido por los miRNA y siRNA, así como las funciones inhibitorias secuencia-específica, inmediatamente se sugirió su relación biogenética y mecanística. Ambas moléculas son dependientes de la actividad de dos familias de proteínas: la ribonucleasa *Dicer* (escinde el RNA precursor) y *Ago* (Argonauta) que es fundamental para la función efectora de silenciamiento génico en el complejo RISC (*RNA-Induced Silencing Complexes*). La tríada constituida por *Dicer*, *Ago* y las moléculas de RNA de 21-23 nucleótidos constituyen la base del sistema de silenciamiento de los RNAs.

En 2008, dos grupos de investigación demostraron independientemente que los siRNA de mamíferos no sólo pueden tener un origen exógeno (exo-siRNA) como ocurre ante el ingreso de RNA bicatenario viral, sino también endógeno (endo-siRNA), por ejemplo, a partir de dúplex que comprenden transcritos anti-sentido derivados de pseudogenes apareados con RNAm de los genes emparentados.

Los siRNA que se generan a partir del clivaje de moléculas de RNA bicatenario viral, tienen la capacidad de suprimir la infección por virus, tal como se ha documentado en la mayoría de los linajes eucarióticos incluyendo plantas, nematodos y hongos. Aunque algunos datos aún son motivo de controversia, se ha establecido que los miRNA celulares provienen de RNA

precursores endógenos de unos 70 nucleótidos. Se estima que el 30% de los genes humanos está regulado por RNAi. En una quincena de virus pertenecientes a 3 familias (*Herpesviridae*, *Polyomaviridae* y *Retroviridae*) se han descrito también más de 140 miRNA que intentan favorecer la infección.

Los más de 500 miRNA identificados hasta el momento en células de mamíferos son transcritos casi exclusivamente por la RNA polimerasa II (se ha descrito un *cluster* de miRNA en el cromosoma 19 humano, diseminado entre secuencias Alu, que son sintetizados por la RNA polimerasa III). Las moléculas precursoras primarias de miRNA (pri-miRNA) son procesadas por la enzima *Drosha* concomitantemente con DGCR8 (*Di George-syndrome Critical Region protein 8*) para producir moléculas de pre-miRNA, las cuales son exportadas desde el núcleo vía exportina 5 hacia el citoplasma, donde son liberadas mediante hidrólisis de GTP.

Las moléculas de pre-miRNA son procesadas en el citoplasma por la enzima *Dicer* (una RNAsa III) generando los dúplex de 19-24 nucleótidos denominados miRNA que son incorporados al RISC. La actividad de *Dicer* requiere del cofactor TRBP (*Transactivating Region RNA-Binding Protein*; región transactivadora de la proteína de unión al RNA). El RISC contiene un componente central: la proteína Argonauta. El RISC utiliza al miRNA asociado a su estructura para reconocer al RNAm que exhiba una secuencia complementaria. En base al grado de complementariedad entre las moléculas de miRNA y de RNAm, RISC puede promover la degradación del mensajero o la inhibición de su traducción (Figura 7.16). También los miRNA promueven modificaciones transcripcionales, al inducir la modificación de histonas de la cromatina y la metilación del DNA (Figura 7.17).

Estos mecanismos de silenciamiento génico post-transcripcional son utilizados tanto por algunos agentes virales (HSV-1, HSV-2, EBV, HCMV, HPV, etc.) para regular la expresión de genes propios y/o genes del hospedero—en mecanismos de persistencia, regulación de la latencia, oncogénesis y evasión a la respuesta inmune—, como por la propia célula hospedadora para silenciar/estimular tanto genes propios como virales (HIV, HBV, HCV). Si bien los mecanismos de regulación génica post-transcripcional se conocen hace varios años, la importancia de los mismos en la respuesta inmune antiviral recién está siendo dilucidada. Más aún, si bien hace ya varios años se determinó que la RNAi representa un componente vital de la respuesta inmune innata antiviral en plantas y animales invertebrados, sólo recientemente se ha logrado determinar la importancia de este mecanismo de defensa en los animales vertebrados.

Los miRNA cumplen un rol preponderante en los procesos celulares de proliferación, diferenciación y apoptosis, así como en el desarrollo del sistema inmune y su respuesta frente a los patógenos. Algunas de estas moléculas son cruciales tanto para el desarrollo del sistema inmune—como por ejemplo miR-181a y miR-223—mientras que otras regulan procesos importantes de la respuesta adaptativa como son la presentación antigénica (miR-155) y la señalización desde el receptor T (miR-181a). Algunos ejemplos se observan en la Tabla 7.7.

Luego de una infección viral, los hongos, las plantas y los animales invertebrados producen siRNA como principal mecanismo de defensa antiviral. Por el contrario, cuando una célula de mamífero es infectada por un virus se induce la producción de miRNA capaces de eventualmente silenciar los RNAm virales. Esta inducción se produce tanto como consecuencia de la activación de diversos TLR como por la unión de los IFN- α , - β y - γ a su receptor.

Se ha determinado que miR-155 junto con miR-146 y miR-132 están involucrados en la inmunidad innata al regular la respuesta inflamatoria aguda luego del reconocimiento del patógeno por los TLR en monocitos y macrófagos (Figura 7.18). La expresión inducible de miR-155 se observó tanto durante las infecciones bacterianas y virales, así como luego de la exposición de las células a citoquinas pro-inflamatorias como los IFN o TNF. Por el contrario, el incremento de miR-146 se observó restrictivamente luego de una infección bacteriana o de la inducción con IL-1 o TNF. Am-

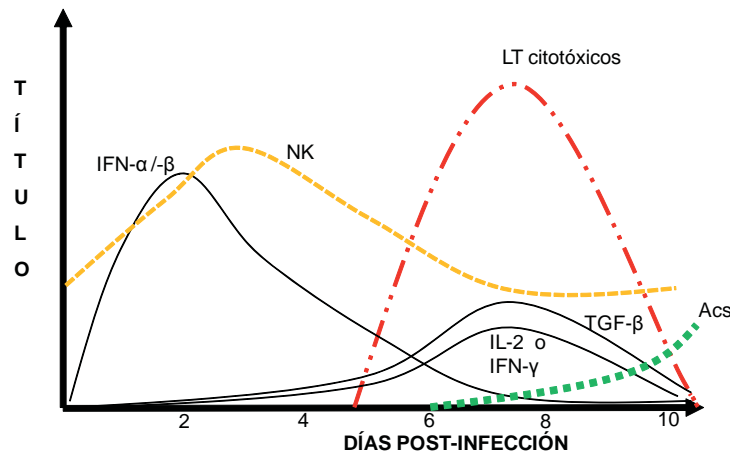


Figura 7.20. Cinética de la respuesta inmune innata y adaptativa. En una respuesta inmune primaria, los interferones (IFN) α y β se elevan tempranamente en el curso de la infección. Ello estimula la actividad de las células NK. Sus mecanismos de reconocimiento de las células infectadas preceden a la de los LT citotóxicos CD8⁺, que requieren una adecuada presentación de péptidos virales antigénicos en el contexto del CMH-I. Los anticuerpos comienzan a ser detectables alrededor de la primera semana post-infección. Los niveles séricos de las citoquinas IL-2 e IFN- γ cursan en paralelo con la actividad de los LT citotóxicos, siendo precedidos por el de TGF- β , el que continúa detectable unos pocos días después de tornarse indetectables los primeros.

Los miRNA son componentes de la cascada de retroalimentación negativa que atenúa la vía de señalización de los TLR. Mientras que miR-146 limita la expresión de IRAK-1 y TRAF-6, miR-155 restringe la expresión de FADD, RIP e IKK (véanse las vías de señalización de la apoptosis, al final del capítulo). miR-125b desempeña un rol esencial en la mantención de la latencia del HIV en los linfocitos T CD4⁺ en reposo.

La unión de los IFN- α , - β y - γ a sus respectivos receptores no sólo estimula la expresión de un gran número de genes (por ejemplo, ISG) sino que además recientemente se pudo determinar que estas citoquinas inducen la síntesis de diversos miRNA. A su vez, se ha establecido que diversos miRNA controlan la expresión de diferentes ISG, como un mecanismo de retroalimentación negativa que limitaría los efectos nocivos de los IFN sobre los tejidos infectados. Como era de esperar, algunos virus portan en su genoma secuencias codificantes para microRNA virales; que como se mencionó anteriormente son utilizados tanto para regular la expresión de genes virales como para evadir la respuesta antiviral montada por los miRNA celulares.

De todo lo expuesto, se deduce que **los miRNA celulares pueden regular la respuesta inmune** (modulando la proliferación, activación y apoptosis de los LB, los LT convencionales y los Tregs) **y formar parte de la misma.**

A continuación se mencionarán algunos ejemplos, recientemente conocidos donde los miRNA poseen una significativa participación en el curso de la infección viral correspondiente.

2.3.1. Los RNAi en las infecciones virales

HCV. En pos de determinar la contribución de los miRNA en el efecto antiviral desencadenado por los IFN, Pederson y col. estudiaron células estimuladas con IFN- β mediante la tecnología de microdisposiciones de RNA. Estos estudios pioneros determinaron que debido a la acción del IFN- β se induce en las células –además de la expresión de los ISG ya conocidos– la producción de diversos miRNA (miR-1, miR-30, miR-128, miR-196, miR-296, miR-351, miR-431 and miR-448) los cuales presentaron perfecta complementariedad con el genoma de HCV (Figura 7.19). El alineamiento de secuencias nucleotídicas de cepas de HCV pertenecientes a 6 genotipos diferentes mostró que el sitio de unión de los miRNA antes mencionados podría producirse tanto en regiones del genoma viral conservadas entre todos los genotipos, así como en regiones específicas de ciertos genotipos. Además estos miRNA fueron inducidos rápidamente –al cabo de 30 minutos– luego de la administración a las células del IFN- β y de una manera dosis-dependiente. Cabe des-

tañar que la inducción de la expresión de los ISG correspondientes se produce 8 horas después de la unión del IFN con su receptor, lo que sugiere que el mecanismo antiviral ejercido por los miRNA representa la primera línea de defensa contra los patógenos. Más aún, conjuntamente con los mecanismos antivirales antes mencionados se observó que el Interferón β inhibe la síntesis de miR-122. Este miRNA específico del hígado estimula la replicación del HCV en las células infectadas al unirse al extremo 5' UTR del genoma viral. Este mecanismo favorecería la acumulación del genoma viral en el complejo replicativo y/o controlaría la traducción de la poliproteína viral. Es concebible que miR-122 se transforme en un blanco terapéutico en pacientes infectados con HCV.

HIV. Recientemente se ha podido determinar que diversos miRNA celulares (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 y miR-92-1) limitan la replicación del HIV, y que éste a su vez inhibe la síntesis de los miRNA antes mencionados. Se ha podido determinar que miR-17-5p y miR-20a inhiben la traducción de los RNAm virales. De manera inversa, el HIV estimula la síntesis de diversos miRNA celulares que favorecerían su replicación; en tal sentido se ha reportado el aumento de los niveles de miR-122, miR-370, miR-373 y miR-297 en la infección con HIV. En estudios de microdisposiciones de RNA en células T de pacientes infectados con HIV se pudo determinar no sólo que los niveles de miRNA son variables entre los distintos pacientes, sino que se vio disminuida la síntesis de varios miRNA celulares.

Recientemente, Chable-Bessia y cols. determinaron que la acción antiviral de los miRNA no sólo está llevada a cabo por las moléculas de micro RNA, sino que además varios de los componentes de la maquinaria celular de RNAi serían los responsables de la inhibición de la replicación del HIV. En tal sentido, dichos autores determinaron que las RNAsas celulares y algunos de las moléculas asociadas (Drosha, Dicer y DGCR8) responsables del procesamiento de las moléculas de miRNA inhiben la replicación viral en células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectados con HIV. Se ha podido observar también que los mRNA virales se asocian y co-localizan con componentes del RISC (RCK/p54, GW182, LSM-1 y XRN1) los cuales regulan negativamente la traducción de los mensajeros virales. Interesantemente, el *knock-down* de RCK/p54 o DGCR8 resulta en la reactivación viral en los linfo-mononucleares de sangre periférica aislados de pacientes infectados con HIV tratados con HAART.

Influenza. Mediante análisis computacional se ha podido determinar que varios miRNA celulares están implicados en la pato-

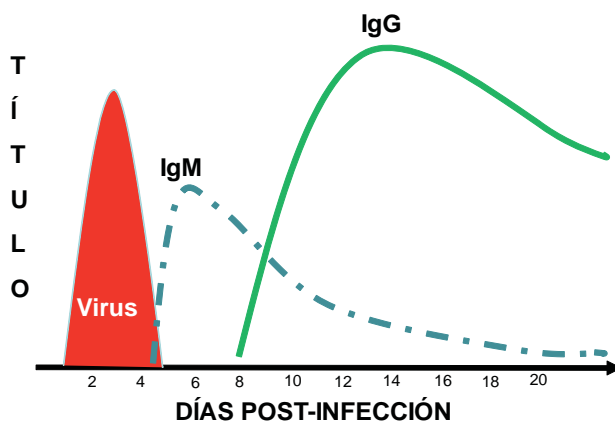


Figura 7.21. Cinética de la respuesta humoral mediada por IgM e IgG ante una infección aguda viral.

génesis y el tropismo del virus influenza A (subtipo H5N1). En tal sentido, se estima que miR-507 y miR-136 tienen potenciales sitios de unión a los mensajeros de la polimerasa básica viral PB2 y a la hemaglutinina, respectivamente. Más aún, mediante la utilización de la metodología de microdisposiciones de RNA para estudiar la expresión de los miRNA en diferentes tejidos humanos se pudo determinar que miR-136 es específico de pulmón. Otra cuestión interesante es que estos miRNA están ausentes en el genoma de los pollos, mientras que un gran número de los miRNA humanos (160 de los 336 analizados) tienen miRNA homólogos en el genoma aviar. Este hallazgo –entre otros factores– podría explicar las diferencias en la infectividad y letalidad del virus en pollos y humanos.

3. INMUNIDAD ADAPTATIVA

La infección viral desencadena en el hospedador inmunocompetente el desarrollo de mecanismos específicos de inmunidad adquirida tanto a nivel humoral (anticuerpos), como celular, dirigidos contra distintos constituyentes del virión, así como contra proteínas

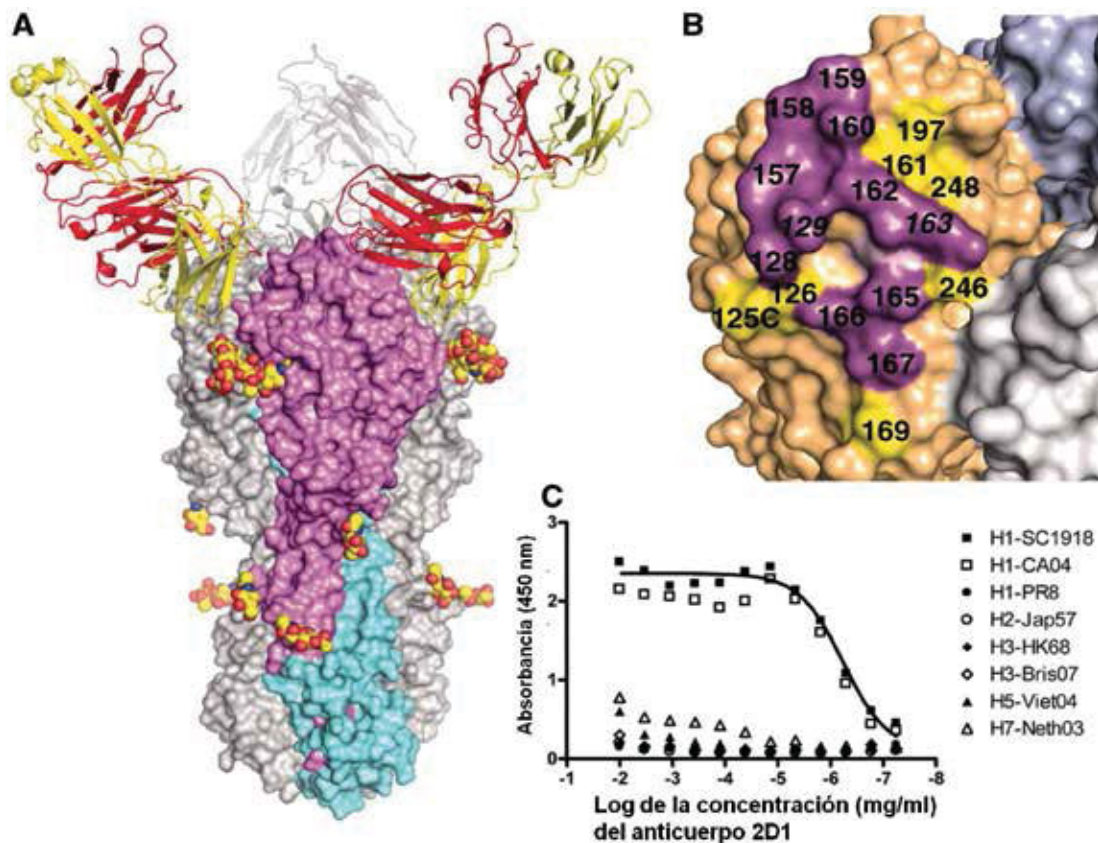


Figura 7.22. Imagen cristalográfica de la hemaglutinina del virus influenza A(H1N1) de 1918 unida a un anticuerpo que también promueve la neutralización cruzada con la hemaglutinina del virus pandémico 2009. **A.** Interacción entre el sitio Sa de la hemaglutinina viral (vértice del dominio de unión al receptor) y el fragmento Fab de un anticuerpo anti-hemaglutinina proveniente de un sobreviviente a la infección por el virus pandémico de 1918. La superficie de interacción comprende 743 Å² sobre la hemaglutinina y 763 Å² sobre el Fab. En amarillo, se muestran las cadenas pesadas H, y en rojo, las livianas L. En magenta se exhibe la subunidad HA1 y en celeste la subunidad HA2 de uno de los tres monómeros de la estructura trimérica de la hemaglutinina, el resto de cuya superficie se observa en gris. Las cadenas hidrógenadas N-unidas se indican en amarillo (átomo de carbono) y en rojo (átomo de oxígeno). **B.** A mayor aumento, se observan los residuos del sitio antigénico Sa y su relación con las "huellas" del Fab al interactuar con la hemaglutinina. El epítopo conformacional de la hemaglutinina está constituido por los residuos 125 a 129 y 157 a 169. Los aminoácidos que forman la superficie de interacción con la Ig se exhiben en magenta, mientras que los que forman parte del epítopo conformacional, pero están fuera del sitio "canónico" Sa están pintados en amarillo. Los aminoácidos del sitio Sa que no están en contacto con la Ig se ven en color marrón claro. Las cepas SC 1918 y CA04 no exhiben sitios de N-glicosilación en el sitio Sa, mientras que la cepa vacunal Brisbane07, como tantas otras de influenza estacional, han adquirido sitios de potencial glicosilación en los aminoácidos 129 y 163 (en *italica*). **C.** El anticuerpo 2D1 exhibe en ensayos de ELISA una fuerte afinidad por las hemaglutininas de los virus pandémicos de 1918 (1918 HA) y 2009 (CA04HA), pero no por los virus PR8 (Puerto Rico 8) y otras hemaglutininas de diversos subtipos de influenza. Fuente: Xu *et al.*; *Science* 328:357-60, 2010. Reproducido con autorización.

Virus	Inmunización pasiva protectora	Fuente
Rabia	Sí	Suero hiperinmune equino o gammaglobulina hiperinmune humana
Hepatitis A	Sí	Gammaglobulina estándar humana
Hepatitis B	Sí	Gammaglobulina hiperinmune humana
Junín	Sí	Plasma humano de convaleciente de fiebre hemorrágica argentina

Tabla 7.8. Inmunidad humoral en infecciones virales: algunos ejemplos en los que la inmunización pasiva artificial es suficiente para conferir protección. También se ha establecido el carácter protector de la administración profiláctica de gammaglobulina específica humana ante la exposición al virus sarampión, así como de los anticuerpos específicos en la prevención de la poliomielitis.

no estructurales expresadas durante la infección. La magnitud de la respuesta dependerá de múltiples factores, tales como la naturaleza del virus, la puerta de entrada del mismo, su forma de diseminación, etc. Tanto la inmunidad humoral como la celular son fundamentales para limitar y eliminar la infección e inducir resistencia duradera a las reinfecciones.

Diferentes estructuras virales antigénicas pueden ser expuestas al sistema inmune del hospedador como consecuencia de una infección viral. Ello puede deberse a la circulación linfo-hemática de virus libres (o de algún componente subviral particulado o soluble) o a la expresión de antígenos virales procesados en las células infectadas y expuestos en la superficie de su membrana citoplasmática. En el caso de las partículas virales intactas en circulación se produce la estimulación del sistema inmune humoral por parte de los antígenos de superficie (presentes en la envoltura de algunos virus o bien en la cápside de aquellos que son desnudos). En otros casos, también se detectan anticuerpos contra productos de degradación o clivaje de componentes virales circulantes. Los LT citotóxicos no pueden reconocer las proteínas virales (aisladas) en circulación, ya que no están presentadas en el contexto de antígenos del CMH-I.

La expresión de antígenos de superficie del virión, o bien de proteínas internas (por ejemplo, nucleoproteínas de virus envueltos y algunas polimerasas) u otras no estructurales producidas durante la replicación viral luego de su procesamiento, como péptidos en la membrana citoplasmática de las células infectadas en el contexto del CMH-I inducirá el reconocimiento de las células infectadas, por los LT citotóxicos efectores. Es por ello que las infecciones causadas por virus que egresan de la célula al líquido extracelular mediante lisis son fundamentalmente controladas por la respuesta humoral, mientras que aquellos que lo hacen por brotación sin lisis son limitadas principalmente por mecanismos de inmunidad mediada por células. En este caso, los anticuerpos pueden participar en la neutralización viral (por ejemplo, si existe viremia), o en la lisis de células infectadas con participación del sistema del C o de ciertas células citotóxicas con receptor para Fc, como macrófagos y NK.

Dos son las características principales de la respuesta inmune adaptativa: la especificidad y la memoria. Ante un primer encuentro con el virus, la respuesta adaptativa puede demorar varios días en aparecer; en contraposición, ante un reingreso por el mismo virus (o aún por uno relacionado antigénicamente), se produce una "¡furiosa!" respuesta al cabo de horas - 2 días, que tiende a limitar la misma y que acompaña a las defensas innatas también "movilizadas".

De allí que múltiples infecciones virales que acontecen durante la infancia pueden proveer protección en la adultez, y –en ciertos casos– durante toda la vida. En modo análogo, un primer encuentro con un antígeno vacunal, promoverá una respuesta inmune adaptativa que será protectora –frecuentemente– durante muchos años para el individuo inmunizado. Las bases de esta memoria inmunológica son aún debatidas, habiéndose postulado que la vida media prolongada de los linfocitos de memoria que perduran años en el organis-

mo son responsables de la rápida respuesta adaptativa secundaria, al producir una veloz proliferación y una enérgica síntesis de productos protectores. Es motivo de investigación si dichas células son "secuestradas" en depósitos del organismo, o si son constantemente producidas. Se sabe que la IL-15 es necesaria para la mantención de algunas (aunque no todas) las células T de memoria. Se ha postulado que la presencia de inmunocomplejos asociados a la superficie de las células foliculares dendríticas por períodos prolongados, permitiría la liberación de antígenos en bajas concentraciones a través del tiempo, lo cual promovería una persistente memoria inmunológica.

A diferencia de los receptores para PAMP de la respuesta innata codificados en la línea germinal, los receptores de las células de la respuesta adaptativa son formados mediante rearrreglos genéticos durante el desarrollo del organismo. **Cada LT y LB posee en su superficie receptores para unirse a un determinado péptido o epítotope.** La respuesta antiviral es posible dado que **los linfocitos presentes en el organismo han "sobrevivido" al proceso de selección que elimina aquellos clones reactivos contra péptidos o epítotos propios.** Se cree que dichas células entran a la circulación sanguínea, y de allí se dirigen al sistema linfático o a los diversos tejidos del organismo. **A estos linfocitos se los considera naïve o "vírgenes", ya que no exhiben una diferenciación completa y no producen la "respuesta final efectora"** correspondiente a tal diferenciación (ya sean los anticuerpos, la muerte celular o las citoquinas que eliminan la infección viral de dichas células). **Al unirse a los péptidos o epítotos específicos a sus respectivos receptores, se produce una rápida respuesta inmune caracterizada por la especificidad y diversidad de la misma, asociada a una pronta adquisición de su capacidad efectora.** Al producirse la unión entre el péptido o el epítotope y el receptor específico, son escasas las células inicialmente involucradas: aproximadamente 1:1 000 a 1:100 000. Dado que dicha cuantía es ciertamente insuficiente para lograr limitar la infección, es la estimulación de células previamente no involucradas en la respuesta específica la que lo permitirá. En 1 a 2 semanas el número de linfocitos específicos para un determinado péptido o epítotope se incrementa más de 1.000 veces merced a que **linfocitos precursores adquieren la capacidad de dividirse, madurar y producir anticuerpos o citoquinas que limiten la infección. Estos son los linfocitos activados, los que originarán clones "hijos" con la misma especificidad.**

Si bien se describirán a continuación separadamente los componentes humoral y celular de la respuesta inmune adaptativa, es menester tener presente su interrelación: los LB son ayudados por una subpoblación de células T y, en ciertas circunstancias, suprimidos por otra subpoblación T. A su vez, determinadas células citotóxicas pueden ejercer sus efectos dependiendo de la presencia de anticuerpos como mediadores. En la figura 7.20 se muestra la cinética de algunos de los componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa.

3.1. INMUNIDAD HUMORAL

La respuesta sérica de anticuerpos que se produce luego de un primer contacto con un virus (respuesta primaria) es bifásica, presen-

tando un pico inicial a los 5 - 8 días post-infección, seguido de otro a los 15-20 días.

Esto se debe a la **aparición secuencial de IgM y luego de IgG específicas**. La IgA aparece en suero en menor cantidad, después de la IgM e IgG. **La IgM decae a niveles no detectables en tiempos variables para cada infección viral, en general al cabo de 2 o 3 meses. Por ello, su detección permite frecuentemente realizar un diagnóstico de infección reciente.** Por el contrario, la IgG específica permanece en circulación meses o años, y a veces durante toda la vida (Figura 7.21).

La intensidad y duración de esta respuesta depende de la puerta de entrada y de la forma de diseminación del virus. Si éste se disemina mediante viremia, la estimulación antigénica será intensa y afectará a todo el tejido linfoide del organismo (ganglios, bazo, médula ósea). Por ello, la respuesta de anticuerpos será de gran magnitud. **En las respuestas secundarias a las infecciones virales (reinfecciones) puede haber una respuesta anamnésica de IgM (de corta duración), seguida de una importante producción de IgG.**

Por el contrario, cuando el virus penetra por vía mucosa y queda restringido a ellas, por ejemplo, en infecciones respiratorias o intestinales, existirá una producción local de IgA secretoria, pero la respuesta sérica será de magnitud restringida.

Cuando un antígeno se une específicamente al receptor B que lo reconoce (Ig asociada a la superficie de un LB), se inicia una cascada de transducción de señales, lo que **promueve la división celular**. La progenie clonal se diferencia en **células B de memoria de larga duración y en plasmocitos efectores de vida media corta**. Éstos no sintetizan más Ig para su unión a la membrana plasmática, sino que secretan al mismo anticuerpo (¡más de 2000 moléculas por segundo!).

Es menester destacar que la estimulación producida por pequeñas dosis de antígeno(s) viral(es) durante períodos cortos induce la síntesis de IgM solamente. Una vez que el estímulo cesa, el nivel de IgM disminuye hasta niveles no detectables. Por el contrario, la estimulación viral intensa, induce la síntesis de IgM y luego de IgG e IgA. Al cesar dicha estimulación, el nivel de IgM decae como en el primer caso, pero el de IgG se mantiene por períodos variables. Ante un segundo contacto con el mismo antígeno viral, en el primer caso se producirá nuevamente una respuesta primaria de IgM, mientras que en el segundo habrá una respuesta inmune aumentada de tipo anamnésica.

Se ha detectado IgA secretoria específica antiviral en secreciones respiratorias, oculares, intestinales, genitales y en la leche materna. La IgA se sintetiza localmente en los nódulos linfoides de la submucosa. Muchos virus inducen la síntesis de IgA, como por ejemplo se observa en infecciones producidas por virus cuya puerta de entrada es respiratoria (influenza, miembros de la familia *Paramyxoviridae*, adenovirus, rubéola, etc.), o entérica (virus hepatitis A, rotavirus, etc.).

La producción local de IgA puede estimularse como consecuencia de infecciones naturales o de inmunizaciones por vía mucosa (tal como se observa en la prevención anti-poliomielítica empleando la vacuna Sabin).

La respuesta de IgA será más intensa si se inmuniza con un virus capaz de replicar. En este caso habrá producción de IgA secretoria y también de IgA sérica. Por el contrario, si el virus no es capaz de replicar y se inmuniza por vía mucosa, la respuesta será solamente de IgA secretoria y de escasa magnitud. Esto sucede en la administración experimental por vía mucosa de vacunas inactivadas.

La IgA tiene importancia en la resistencia a reinfecciones con virus respiratorios. La leche materna, que contiene IgA específica protege contra numerosos virus respiratorios y entéricos, aunque recientemente se ha observado que la misma ejerce un efecto protector diferenciado dependiente del sexo ante las infecciones virales respiratorias (véase el ítem 2 en este capítulo).

3.1.1. Los anticuerpos en el control de las infecciones virales

Los anticuerpos desempeñan en las infecciones virales diversas funciones: 1) eliminación de la infección primaria; 2) limitación

de la viremia; y 3) limitación de la enfermedad y prevención de las reinfecciones. Algunos ejemplos del uso actual de los anticuerpos antivirales en la inmunización pasiva se exhiben en la Tabla 7.8.

Como respuesta a los antígenos virales circulantes o asociados a células infectadas se pueden producir anticuerpos específicos contra todos los constituyentes inmunogénicos del virión con los que el organismo toma contacto. Los anticuerpos dirigidos contra constituyentes externos del virión serán capaces de "neutralizar" la acción del virión, por lo cual se denominan *neutralizantes*. Estos anticuerpos están dirigidos contra glicoproteínas y lipoproteínas (en los virus envueltos) y contra polipéptidos de la cápside (en los virus desnudos).

Los anticuerpos circulantes constituyen una barrera para evitar que los virus libres en el espacio extracelular o en la sangre, puedan alcanzar los órganos que son blanco de la replicación. Estos anticuerpos son habitualmente eficaces ante eventuales reinfecciones, lo cual constituye el fundamento de la inmunización activa mediante vacunación. También la inmunización pasiva mediante la transferencia de anticuerpos específicos, permite disminuir la morbi-mortalidad de numerosas enfermedades virales.

Cuando la infección viral es generalizada (sarampión, poliomielitis, rubéola, etc.) la inmunidad específica que se desarrolla luego de la infección es de larga duración, en general de por vida y se debe a la presencia de anticuerpos neutralizantes en circulación.

Habitualmente, la inmunidad es tipo-específica lo que significa que protege contra el mismo tipo antigénico, pero no contra serotipos diferentes, los que serán capaces de producir reinfecciones en ese hospedero. Cuando las infecciones quedan localizadas en las mucosas (por ejemplo en infecciones del tracto respiratorio), la IgA secretoria es la que previene la colonización y evita las reinfecciones mediante la neutralización del virus infectante. Esta respuesta local de IgA es de corta duración (1 a 4 años); por ello se pueden producir reinfecciones por el mismo serotipo y se selecciona en la comunidad la circulación de cepas que presentan mínimas diferencias antigénicas: es el caso de las variaciones menores observadas en el genoma del virus influenza.

La intrigante observación de que la pandemia de influenza que emergió en 2009 afectaba en menor medida a los individuos de mayor edad (especialmente los mayores de 60 años), fue resuelta mediante la dilucidación de la estructura cristalográfica de la hemaglutinina de esta cepa, la que en el sitio Sa (vértice del dominio de unión al receptor celular) resultó similar a la del virus pandémico de 1918, lo cual justifica la inmunidad observada en dicho grupo poblacional como consecuencia de la exposición a este último. En la Figura 7.22 se observa el análisis cristalográfico de la interacción entre el fragmento Fab de un anticuerpo neutralizante anti-hemaglutinina de la cepa productora de la pandemia de 1918 con la hemaglutinina específica, así como la reactividad cruzada de dicha Ig con la hemaglutinina de la cepa pandémica 2009.

Ante una gastroenteritis por rotavirus se produce una respuesta inmune tanto homotípica como heterotípica. Esta última se atribuye a la presencia de epítopes comunes en las proteínas VP4 y VP7 de la cápside viral de diferentes serotipos o al efecto *booster* de un serotipo distinto del que produjo la primoinfección sobre la respuesta anamnésica hacia éste. Es decir, los anticuerpos dirigidos contra el agente de la primoinfección pueden atemperar la gravedad de subsiguientes infecciones por diversos serotipos de rotavirus; asimismo, el pasaje pasivo de anticuerpos IgA anti-rotavirus a través de la secreción láctea materna se asocia también a protección.

Sin embargo, la presencia de anticuerpos parecería no asegurar la protección a la reinfección con cepas homólogas o heterólogas del HCV. En la infección causada por este agente, se ha demostrado que simultáneamente coexiste en un mismo individuo una mezcla heterogénea de genomas virales viables con una secuencia nucleotídica predominante y un amplio espectro de mutantes relacionadas, una distribución genómica poblacional conocida como *cuasiespecies*. La actividad de la RNA polimerasa viral sin capacidad de corregir errores (carece de *proof reading* o lectura de prueba) conlleva el riesgo de acumular mutaciones, las que han

sido calculadas en $1,44 \times 10^{-3}$ por sitio y por año. Estas variaciones genómicas con traducción fenotípica -sobre todo en las regiones hipervariables, por ejemplo presentes en la envoltura viral- tienen relevancia también en la patogenia, ya que podrían constituir un mecanismo de escape a la vigilancia inmunológica. Más aún, estudios realizados en chimpancés demostraron la falta de protección cuando éstos son inoculados con cepas diferentes del mismo virus, aun en presencia de anticuerpos anti-HCV inducidos durante infecciones previas. Este concepto de evolución de especies implica un serio obstáculo hacia el desarrollo de vacunas para hepatitis C en un futuro próximo, que estén basadas en la inducción de una respuesta inmune dirigida hacia la envoltura del virus homónimo. Dado que un 10 - 25% de los individuos infectados con HCV que son sometidos a trasplante hepático evolucionan a la cirrosis del órgano re infectado dentro de los 5 años, en 2009 se propuso el empleo de anticuerpos monoclonales de origen humano y con amplia actividad neutralizante (*broadly neutralizing antibodies*) frente a cepas del HCV de diversos genotipos. Dichos anticuerpos neutralizantes están dirigidos contra un péptido de la glicoproteína E2 de la envoltura viral y constituyen una promisoriosa futura alternativa a explorar para la inmunización pasiva de estos pacientes.

Como se describe en el capítulo 8 (Evasión a la Respuesta inmune) la variación genómica del HIV constituye -entre muchos otros- también un impedimento para lograr un inmunógeno capaz de inducir una respuesta protectora contra los diferentes epítopes de los distintos subtipos y formas circulantes recombinantes hasta hoy identificados. La muy reciente identificación de epítopes localizados en las espículas de la envoltura viral (correspondientes -por ejemplo- al sitio de unión al receptor CD4, o al de unión a

correceptores del virus, así como a regiones variables de los bucles (*loops*) de la glicoproteína de envoltura gp120, a un nuevo epítipo superpuesto al sitio de unión a CD4 y a un dominio externo de gp120) que inducen (sólo en un mínimo porcentaje de la población infectada con HIV) la formación de anticuerpos neutralizantes de alta afinidad y "amplia" reactividad con adecuada potencia contra cepas del HIV filogenética y antigénicamente distantes, abre una nueva perspectiva para la elaboración de una próxima vacuna contra dicho virus, así como para el desarrollo de anticuerpos monoclonales, potencialmente útiles como profilaxis pasiva.

3.1.2. Mecanismos de neutralización

La neutralización se define como la pérdida de la infectividad causada por los anticuerpos.

El mecanismo de neutralización viral no se conoce con exactitud pero la interacción virus - anticuerpo puede actuar en uno o más de los siguientes pasos de la replicación: 1) inhibiendo la adsorción del virión a receptores o correceptores celulares, lo cual impide la penetración; 2) inhibiendo la decapsidación; 3) provocando la lisis inmune de los virus envueltos mediante anticuerpos y C, activado por la vía clásica; 4) promoviendo la agregación viral para favorecer la captación por células fagocíticas con receptores para Fc; y 5) inhibiendo la fusión entre la envoltura de los virus que la poseen y la membrana endosomal (lo que impide la ulterior liberación de las ribonucleoproteínas al citosol), la replicación viral (mediante el disparo de señales celulares) y posiblemente su liberación y propagación célula-célula mediante impedimentos estéricos. En los casos en que la célula fuere infectada, los anticuerpos también pueden participar en la citólisis inmune o en la eliminación viral por mecanismos mediados por Fc.

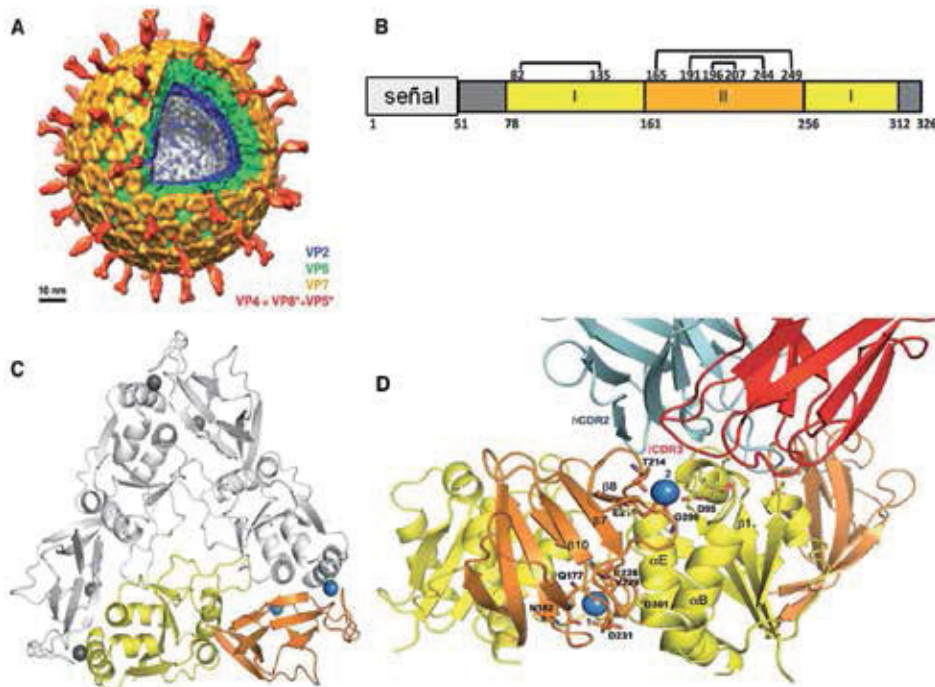


Figura 7.23. Interacción entre la proteína de superficie VP7 de rotavirus y el fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal neutralizante. **A.** Crioelectromicroscopía del serotipo G3 del rotavirus del mono Rhesus. Se observan las proteínas internas (VP2 y VP6) y las de superficie (VP4 -que genera por clivaje VP5 y VP8- y VP7). La barra indica 10 nm. **B.** Diagrama de la estructura primaria de VP7: incluye la secuencia señal (aa 1-50) y dos dominios (I y II) en el mismo color que en la figura C. Los extremos C- y N- terminal, desordenados en la estructura cristalográfica, se observan en gris oscuro. Se indican también las posiciones aminoácidas de los puentes disulfuro que ocurren entre residuos de cisteína en la misma cadena peptídica. **C.** Diagrama de la estructura trimérica de VP7, como si se observara sobre la superficie de la partícula viral. Sólo una molécula está coloreada en amarillo (dominio I) y en naranja (dominio II en lámina plegada). Dos bolillas coloreadas en azul indican los iones de Ca^{++} . **D.** Interacción entre VP7 y el fragmento Fab de una Ig con actividad neutralizante, mostrando la interfase entre ambos y los iones de Ca^{++} unidos a la proteína viral. En rojo se observa la cadena liviana (L) y en celeste la pesada (H). Se indican los aminoácidos vinculados con la interacción con los iones Ca^{++} . El anticuerpo atraviesa la interfase de la estructura trimérica estabilizándola, e impide el desnudamiento, fundamento de la neutralización de este virus. Fuente: Aoki ST *et al.*; *Science* 324:1444-1447, 2009. Reproducido con autorización.

El mecanismo de neutralización que impide la decapsidación del rotavirus fue recientemente dilucidado al conocerse la estructura cristalográfica de la interacción entre la glicoproteína de superficie VP7 del rotavirus y el anticuerpo específico. Se sabía que el virus requiere la pérdida de la estructura trimérica de dicha glicoproteína (probablemente como consecuencia de la remoción de iones Ca^{++}) para gatillar el anclaje de la otra proteína de superficie (VP4) en la superficie celular y promover cambios conformacionales en ésta que faciliten la subsiguiente unión a las membranas endosomales. El fragmento Fab monovalente de un anticuerpo monoclonal dirigido contra VP7 es suficiente para neutralizar al virus. Se une a la estructura trimérica de VP7 estabilizándola (aun ante bajas concentraciones de Ca^{++} que promoverían la disociación), e impidiendo el subsiguiente inicio de replicación (Figura 7.23).

El primer paso es la unión del anticuerpo a la superficie del virión, seguido de un cambio conformacional en ambos reactivos. La superficie viral posee estructuras indispensables para mantener la infectividad de las partículas, denominadas sitios críticos y otras, importantes para mantener la integridad estructural que se denominan sitios "no críticos". Algunos virus poseen un sólo sitio crítico (bacteriófago T), otros poseen múltiples sitios (influenza) y en otros toda la superficie se considera crítica para la infectividad (virus mosaico del tabaco).

Los sitios críticos son los blancos para los anticuerpos neutralizantes y su número, tamaño y localización en el virión tienen importancia en la reacción de neutralización. Si el anticuerpo está dirigido contra un sitio no crítico, cuando aquél se una al virión, éste retendrá su infectividad.

Actualmente, se están desarrollando numerosas vacunas compuestas por subunidades del virión. Para que estas vacunas sean efectivas deberán contener el sitio crítico para la inducción de anticuerpos neutralizantes. Para el virus influenza A se observó que es fundamental mantener la integridad antigénica de dos glicoproteínas de envoltura, la hemaglutinina y la neuraminidasa; en el virus causante de la fiebre aftosa (virus que afectan al ganado) sólo una de las cuatro proteínas de la cápside (VP1) es importante en la inducción de anticuerpos neutralizantes.

Cuando los anticuerpos neutralizantes se unen a las partículas virales se produce una agregación de las mismas y por lo tanto se disminuye

la infectividad. Por ello, la agregación es un mecanismo de neutralización, aunque esto es dependiente de muchos factores, tales como concentración viral, tamaño de la partícula, tipo de anticuerpos, etc.

En algunas ocasiones (por ejemplo, en el suero de etapas tempranas de la infección, conteniendo anticuerpos de baja afinidad) es posible disociar las partículas y recuperar la infectividad. En otros casos, puede persistir la infectividad: es la fracción persistente aún en presencia de exceso de anticuerpos (anticuerpos no neutralizantes), hecho que se atribuye a diversos factores como agregados de partículas, anticuerpos de baja afinidad o factores estéricos. Estas fracciones persistentes se observan en pacientes infectados con HBV o con EBV.

Existen **factores accesorios en la neutralización viral que ayudan a los anticuerpos en dicha función. Dentro de ellos, el más importante es el C, debiéndose mencionar también los denominados factores reumatoideos.**

El C al unirse a los anticuerpos, a su vez unidos a una partícula viral, puede producir una "virólisis inmune" (Figura 7.24) o bien puede provocar alteraciones en la superficie de las partículas y/o agregación de las mismas. Las partículas opsonizadas (del griego *opson*, condimento, adobo) y agregadas son más fácilmente fagocitadas por los macrófagos. De allí la denominación de opsoninas con que Sir Almroth Wright denominó en 1903 a los anticuerpos que *preparaban las bacterias como un alimento para las células fagocíticas*, las que incrementaban asombrosamente su actividad en presencia de aquéllos. Ese descubrimiento sentó nuevas bases para establecer la estrecha vinculación entre la respuesta innata y la adaptativa.

Los anticuerpos antivirales, unidos a las membranas de las células que expresan antígenos virales también pueden activar el C, y como consecuencia, lisar las células infectadas.

El sistema del C puede ser activado por la vía clásica: las células infectadas cubiertas con anticuerpos promueven la activación de C1 y subsiguientemente la cascada de fenómenos de clivaje enzimático que culminan con la formación de un gran complejo multimolecular (C5, C6, C7, C8 y C9). **Sin embargo, la lisis celular no se produce si la vía de activación alternativa del C está alterada, indicando la incapacidad de la vía clásica para lisar las mismas *per se*.** Los anticuerpos no son requeridos para la activación por la

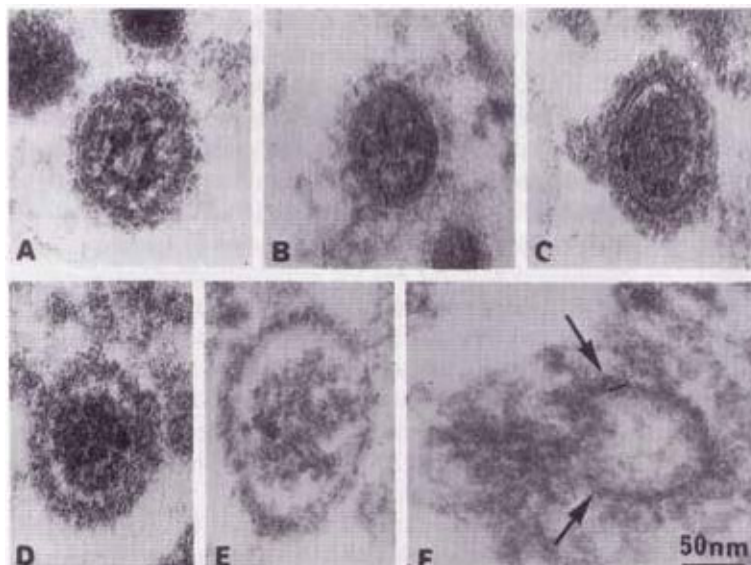


Figura 7.24. Disrupción de una partícula del virus de la corimeningitis linfocitaria (LCM) mediante anticuerpos y complemento. Imagen histórica de microscopía electrónica de una partícula tratada con: A. suero normal control; B. suero de cobayo conteniendo anticuerpos anti-LCM e inactivado por calentamiento a 56° C durante 30 min. (elimina la actividad del sistema complemento); C-F. suero de cobayo conteniendo anticuerpos anti-LCM. Nótese la hinchazón y ruptura de la estructura del virión tratado con anticuerpos específicos y complemento. Las flechas indican los sitios de disrupción de la envoltura viral, desde donde se libera material del Core. Fuente: Welsh, et al; *Virology*: 73: 59-71, 1976.

vía alternativa del C. Sin embargo, paradójicamente, la IgG podría participar en este sistema aumentando el depósito de C3b sobre la superficie celular, lo cual generaría más sitios para el clivaje de C5 y el posterior ensamble e inserción del complejo C5b-9, con la consiguiente lisis celular. A este fenómeno se suma la respuesta inflamatoria producida por diversos factores que se liberan en la activación del C (factores quimiotácticos, anafilotoxinas, etc.), el aumento de la fagocitosis, y la presencia de células NK, entre otros.

No existe relación definida entre subclases de Igs y protección contra la infección viral en el SNC. Mientras que en la infección experimental con el virus coriomeningitis linfocitaria (LCM) la protección se confiere mediante la IgG 2a, en la infección con virus rabia puede conferirse esa protección mediante IgG1, IgG 2a o IgG 2b.

Importancia de los anticuerpos pre-existentes

Espacialidad

La presencia previa de anticuerpos neutralizantes contra un determinado virus puede proteger contra los efectos de una reinfección (una nueva enfermedad) por dicho agente. Sin embargo, ello no es así, por ejemplo, si el virus es capaz de variar su estructura externa o de ingresar a un nuevo organismo vehiculizado en el interior de otras células (como ocurre –por ejemplo– en la transmisión del HIV luego de una relación sexual). Los anticuerpos preformados no necesariamente previenen la reinfección, y tal vez la diseminación, desde una mucosa epitelial, pero sí limitan la diseminación distal a órganos blanco claves en la patogénesis de la enfermedad.

La comprensión de este evento es crucial para entender las razones de la eficacia de ciertas vacunas utilizadas para prevenir infecciones sistémicas como las producidas por los virus polio y sarampión.

En contraposición, en aquellas patologías en las que la enfermedad es consecuencia de la afectación del epitelio de una mucosa al producirse exclusivamente allí la replicación viral, la protección conferida por los anticuerpos depende del nivel que tengan en dicha superficie. El mismo es potencialmente dependiente de los plasmocitos que secretan Igs en ella, de la eventual existencia de elevados niveles séricos de Igs que se "derraman" (extravasan) a través de la superficie mucosa, o del transporte activo de IgA específica a través de la misma.

Neutralización viral intracelular

Ya ha sido mencionado que la neutralización ocurre habitualmente cuando anticuerpos dirigidos contra sitios críticos de la superficie viral reaccionan contra ellos inhibiendo la infectividad viral.

Sin embargo, en años recientes, un nuevo capítulo ha sido abierto ante la posibilidad de que anticuerpos pudieran actuar no sólo en espacios extracelulares, sino también en el interior celular.

Este evento fue inicialmente documentado *in vitro* en células de neuroblastoma infectadas con virus rabia, y luego tratadas con un anticuerpo monoclonal específico –pero no con otros– lo que promovió la finalización de la producción de virus precedida por una inhibición de la síntesis proteica viral. Esta inhibición ocurre a nivel de la transcripción del RNA viral, lo cual sugiere un efecto de restricción de la expresión génica. Otros estudios *in vitro* realizados en la década de 1990 utilizando cultivos de células de glioblastoma persistentemente infectadas con virus sarampión que fueron tratados con anticuerpos específicos policlonales han demostrado una inhibición de la síntesis viral. El virus induce un aumento de la fosforilación proteica celular mediada por la proteína quinasa C (PKC), la que es necesaria para su replicación. Si dicha enzima es inhibida mediante fármacos, la producción de progenie viral liberada disminuye. En forma análoga, el tratamiento de los cultivos con anticuerpos policlonales anti-virus sarampión limita la replicación viral, mediante la inhibición de la PKC. No se ha establecido aún si este efecto antiviral es ejercido a través de la interacción entre las proteínas virales de superficie –que actuarían como receptor– y los anticuerpos específicos –que proveerían una señal externa–, o si la acción de estos últimos se produce recién después de su (eventual) internalización.

Este evento cobra especial relevancia *in vivo* cuando en una misma célula cohabitan proteínas virales e inmunoglobulinas. Ello ocurre por ejemplo, cuando en el interior de una célula epitelial de una mucosa se sintetizan proteínas virales, al tiempo que transitan

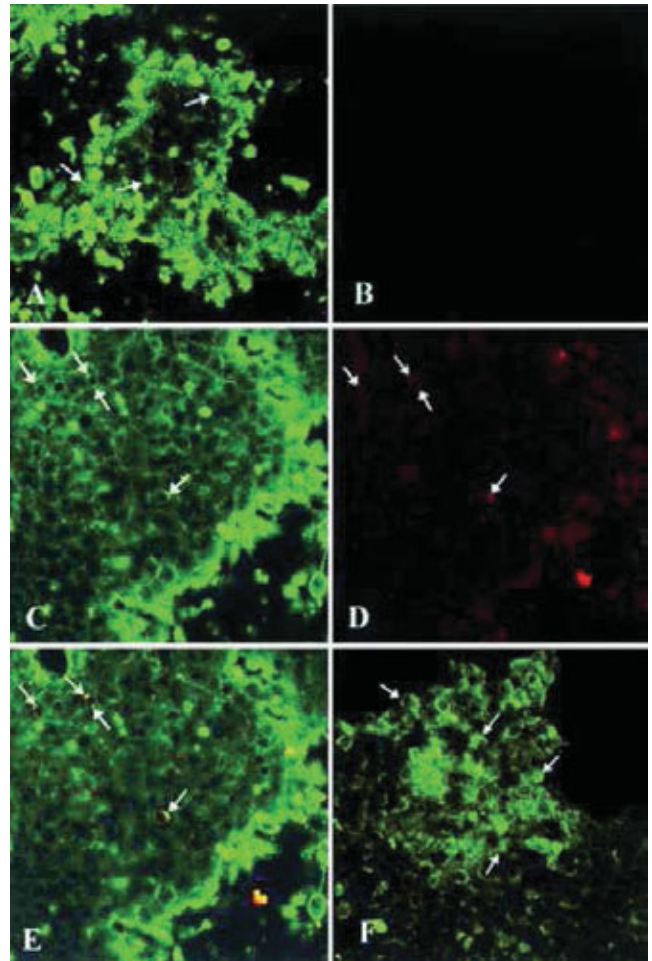


Figura 7.25. Localización de la gammaglobulina hiperinmune anti-hepatitis B (HBIG) y de proteínas del HBV en células HepAD38 transfectadas en forma estable e inducible con el genoma viral.

La síntesis de dichas proteínas virales sólo acontece al removerse el represor (tetraciclina) del medio de cultivo, ya que su presencia inhibe la actividad del promotor del cual depende la síntesis de RNA pregenómico viral. Al día 12, las células HepAD38 tratadas con HBIG se fijaron y procesaron mediante IF. Las células se incubaron con anticuerpos anti-Pre-S2 del HBV seguido del tratamiento con anticuerpos anti-IgG humanas conjugadas con fluoresceína y con anticuerpos monoclonales anti-IgG de ratón conjugados con Rojo de Texas. **A.** La captación de HBIG (flechas) en el citoplasma de las células tratadas con HBIG se detecta mediante tinción fluorescente. **B.** Las células no tratadas con HBIG no exhiben imágenes fluorescentes, ante idénticas condiciones de captura de imágenes a las del cuadro "A". **C y D.** El depósito de HBIG o la expresión de PreS-2 se observan –respectivamente– en cada cuadro, en el citoplasma de las mismas células (flechas). **E.** La superposición de imágenes obtenidas mediante las dos fluorosondas (flechas) confirma la colocalización de la proteína viral y el anticuerpo anti-HBs. **F.** Detección de la proteína del Core de HBV mediante anticuerpos policlonales. Las flechas indican las señales positivas en cada cuadro. Como resultado de esta interacción entre las proteínas virales y los anticuerpos específicos anti-HBs se produce una neutralización intracelular, que disminuye significativamente la liberación de HBsAg al medio extracelular. Fuente: Schilling *et al*; *Journal of Virology* 77: 8882-92, 2003. Reproducido con autorización.

hacia la superficie celular moléculas de Igs (por ejemplo, IgA). En este evento de transcitosis, estos anticuerpos pueden interactuar – aun con determinantes antigénicos de sitios no críticos, por ejemplo, de proteínas internas o bien no estructurales– lo que puede conducir a la perturbación de la replicación viral, impidiendo la síntesis de la progenie. Ello ha sido demostrado en infecciones tales como las producidas por rotavirus en el epitelio intestinal, la que es inhibida por anticuerpos IgA dirigidos contra proteínas de la cápside interna (VP2 y VP6) o la del virus sarampión donde la IgA puede participar tanto en la neutralización intracelular como en la exclusión inmune al ingreso viral a la célula y en la excreción viral, dependiendo de la proteína viral sobre la que actúa dicha IgA (proteínas H, N o F).

Asimismo, se ha demostrado *in vitro* que diversas líneas hepatocitarias humanas poseen receptores para IgG, la que luego de ser endocitada, colocaliza con antígenos de superficie del virus (HBsAg), promoviendo su neutralización intracelular. La interacción entre el HBsAg "salvaje" y la Ig hiperinmune específica a nivel intra-hepatocito está asociada a la emergencia de variantes de escape (HBsAg mutado) a dichos anticuerpos. Este hallazgo tiene especial relevancia en la emergencia de variantes mutadas ante situaciones médicas tales como la profilaxis contra la hepatitis B en individuos trasplantados (Figura 7.25).

Como consecuencia del interés por estudiar la replicación viral y consiguientemente, definir nuevas estrategias para su inhibición, se desarrollaron aproximaciones de **inmunización intracelular mediante el uso de fragmentos variables de cadena única de las Igs o scFv** (*Single-Chain Variable Fragment*). Estas son moléculas correspondientes al dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo, unido mediante un péptido corto al dominio variable de la cadena pesada, por lo cual pueden interactuar con antígenos específicos luego de expresarse (según la construcción genética utilizada) en el RE, la mitocondria, o el núcleo. Estos **anticuerpos intracelulares de cadena única (construidos en el laboratorio) que se expresan y funcionan dentro de una célula, se denominan intracuerpos**. Han sido evaluados en la inhibición *in vitro* de virus tales como HIV, HCV, HBV, HPV, influenza, herpesvirus, flavivirus, y rotavirus. En 2009, por vez primera se documentó la utilización de una **nueva generación de intracuerpos que reconocen dominios únicos** y son **denominados VHH**. Corresponden a la fracción variable de la cadena pesada de un anticuerpo convencional (carecen de cadena liviana) y son capaces de reconocer (a diferencia de los anticuerpos convencionales) los dominios más

pequeños de un antígeno determinado (por ejemplo, un bolsillo enzimático o "valles" hendidos entre extremos protruyentes de proteínas, etc.). Su estructura es más simple y más pequeña que la de los scFv (11-15 kDa), ya que son mucho más hidrofílicos, por lo que **son más solubles y su expresión aumentada y más estable** en sistemas heterólogos. **Estos intracuerpos VHH** son construcciones experimentales que utilizan llamas (camélidos) inmunizadas –en el caso arriba mencionado, lo fueron con HBsAg– para generar una biblioteca genética que codifica anticuerpos específicos a expresarse (exponerse) mediante ingeniería de proteínas en bacteriófagos filamentosos, metodología conocida como "*phage display*". **Los VHH han sido exitosamente probados *in vitro* e *in vivo* por primera vez en 2009, en mamíferos que experimentalmente expresan HBV**, habiéndose logrado una reducción de 10-100 veces de los niveles de viremia. Estos hallazgos constituyen una promisoriosa herramienta a evaluar entre los potenciales futuros ensayos terapéuticos en individuos infectados por HBV.

Temporalidad

La existencia de anticuerpos neutralizantes preformados tiene obvias implicancias en la prevención de la enfermedad, tal como se explicó anteriormente.

En una infección determinada los anticuerpos específicos están ausentes en la etapa previa a la seroconversión y pueden desaparecer con el devenir del tiempo (seroreversión).

La producción de anticuerpos por períodos prolongados puede ocurrir en presencia o ausencia de estímulos diversos. Entre los estímulos conocidos deben mencionarse: a) la reexposición al virus; b) la persistencia de la infección en células foliculares dendríticas; c) la reacción cruzada con antígenos propios o del medio ambiente; y d) las redes idiotípicas. Aun en ausencia de estímulos antigénicos, la duración de los plasmocitos en la médula ósea coadyuva a la producción de anticuerpos por períodos prolongados.

En la Tabla 7.9 se indica la duración de la inmunidad humoral conferida por algunos anticuerpos específicos dirigidos contra ciertos virus causantes de infecciones agudas.

Sin embargo, **debe tenerse en cuenta que si bien la presencia de anticuerpos específicos pre-existentes es muy importante para la prevención de los efectos de las reinfecciones (o subsiguientes infecciones si se tratara de la respuesta generada a través de la inmunización activa), más aún lo es la presencia de linfocitos B de memoria**. Valga mencionar como ejemplo de ello, los menores títulos de anticuerpos anti-polio generados por



Ejemplo	Familia viral	Duración en años	Duración en meses
INFECCIONES AGUDAS SISTÉMICAS INTRODUCIDAS POR VÍA PARENTERAL			
Dengue	<i>Flaviviridae</i>	32	
Fiebre amarilla	<i>Flaviviridae</i>	75	
INFECCIONES AGUDAS SISTÉMICAS INTRODUCIDAS POR VÍA MUCOSA			
Sarampión	<i>Paramyxoviridae</i>	65	
Parotiditis	<i>Paramyxoviridae</i>	12	
Polio	<i>Picornaviridae</i>	40	
Hepatitis A	<i>Picornaviridae</i>	25	
Rubéola	<i>Togaviridae</i>	14	
Vaccinia	<i>Poxviridae</i>	15	
Viruela	<i>Poxviridae</i>	40	
INFECCIONES AGUDAS DE LAS MUCOSAS ENTÉRICA O RESPIRATORIA			
Influenza	<i>Orthomyxoviridae</i>		30
Virus sincicial respiratorio	<i>Paramyxoviridae</i>		3
Rotavirus	<i>Reoviridae</i>		12

Tabla 7.9. Duración de la respuesta inmune humoral a infecciones agudas virales en el ser humano.

la vacuna inactivada Salk, respecto a los inducidos por la vacuna atenuada Sabin. Sin embargo, el efecto protector generado por la primera es absoluto, tal como se documentó en los países escandinavos, donde fue utilizada como única fuente vacunal para erradicar la circulación del virus polio salvaje con un éxito total.

En modo análogo, en nuestros días, la aplicación de la vacuna para prevenir la hepatitis B genera en individuos respondedores anticuerpos anti-antígeno de la superficie viral (anti-HBs). Si dicho título es igual o superior a 10 UI/l se considera protector. Sin embargo, en aquellos individuos que hubieran respondido a la vacuna con títulos superiores al mencionado valor, y que exhiben con el devenir del tiempo una disminución de los mismos por debajo de 10 UI/l, no necesitan la administración de una dosis de refuerzo, debido a la observación de que la memoria inmunológica es suficiente para promover una nueva respuesta secundaria protectora.

En la Tabla 7.8 se indican algunos ejemplos donde la administración de Igs específicas o plasma conteniéndolas permite proteger al hospedador frente a la infección viral.

3.2. INMUNIDAD CELULAR ADAPTATIVA

Diversos factores generales tales como el **número de LT** que participan de la respuesta inmune (**respuesta fuerte o débil**), el **número de epítopes reconocidos (respuesta multispecífica u oligo o monoespecífica)**, la **funcionalidad y la duración de dicha respuesta, así como la sensibilidad de los LT** (véase más adelante) **determinan el desenlace de una infección viral (Figura 7.26)**. La mayoría de los LT maduros expresan un TCR $\alpha\beta$ que reconoce péptidos presentados en la superficie de las CPA a LT CD8⁺ mediante el CMH de clase I o a LT CD4⁺ mediante el CMH de clase II. Esta última población comprende diversas células ayudadoras Th (*T helper*), regulatorias (Treg y relacionadas), células de memoria antígeno-específicas (CD4⁺ CD44^{bright} IL-2R β^+) que exhiben un lento recambio y requieren IL-15 para su proliferación y sobrevivencia, y células memoria-símil (CD4⁺ CD44^{hi} IL-2R β^{low}) cuya función aún no ha sido dilucidada. A continuación, sólo se describirán brevemente los LT ayudadores y reguladores más relevantes, y subsiguientemente, los LT CD8⁺ con actividad citotóxica (CTL).

3.2.1. Linajes de LT CD4⁺ de ayuda

Hasta el presente se reconocen diversos linajes dentro de esta población: son las células Th1, Th2, Th17 y Treg. Asimismo, otras subpoblaciones como las Tfh, Th9, Tr1 y Th3 han sido propuestas, aunque se investiga si son –en realidad– sublinajes de algunas de

las cuatro mencionadas precedentemente (Figura 7.27). Las células CD4⁺ participan en la colaboración que los LT brindan a los LB para la producción de anticuerpos, la maduración de la afinidad de los mismos y la realización del cambio isotípico IgM \rightarrow IgG; también reclutan y activan CTL CD8⁺, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y otras células efectoras.

En 1986 Coffman y Mosmann establecieron la existencia de dos poblaciones de LT de ayuda: los Th1 y los Th2. **Las células Th1 producen IFN- γ** , relevante para activar macrófagos y limitar las infecciones por patógenos intracelulares como los virus. Las células **Th2 se asocian a la producción de, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13**. Esta subpoblación colabora en la producción de IgE, el reclutamiento de eosinófilos y es importante para limitar las infecciones por patógenos extracelulares. Ante el descubrimiento de que la IL-23 consta de una subunidad común a la IL-12 (p40), se estableció que algunas enfermedades inicialmente atribuidas a la participación de la población Th1, eran en realidad mediadas **por células que respondían a la IL-23, constituyendo una nueva estirpe: la de los LTh17. Estas células producen IL-17a, IL-17f, IL-21 e IL-22**. Además del rol en enfermedades autoinmunes, estos LT participan en la respuesta inmune contra bacterias extracelulares y hongos.

Las células Treg tienen la capacidad de limitar la respuesta T, evitando fenómenos autoinmunitarios, promover la tolerancia a los antígenos propios y –en ciertas circunstancias– inducir la respuesta inmune. En esta población, se consideran 2 grupos: las Treg naturales que provienen del timo (células CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ que egresan de esta glándula con dicha capacidad) y las T regulatorias inducibles Th3 y Tr1 (que ante el contacto con el antígeno en los órganos linfáticos secundarios adquieren dicho potencial). Las células CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ ejercen su efecto mediante el contacto directo con las células T efectoras (Th1, Th2 y CD8⁺), mientras que las Th3 lo hacen mediante la secreción de TGF- β y las Tr1 mediante la liberación (fundamental) de IL-10 y también de TGF- β . Se ha documentado que estos 4 principales linajes de LT expresan factores de transcripción específicos (Figura 7.27). En contraposición, las estirpes Th3, Tr1, Th9 y Tfh carecen de un perfil propio de producción de citoquinas, al tiempo que también utilizan algunos de los factores transcripcionales de los linajes Th1, Th2, Th17 y Treg, por lo cual aún no se ha establecido si corresponden a subpoblaciones de éstas, o si son estirpes celulares disímiles.

LTh3. La tolerancia inmunológica oral se asocia a células productoras de TGF- β con fenotipo CD4⁺ LAP⁺ (*Latency Associated Peptide*; péptido asociado a la latencia, al cual se unen en la superfi-

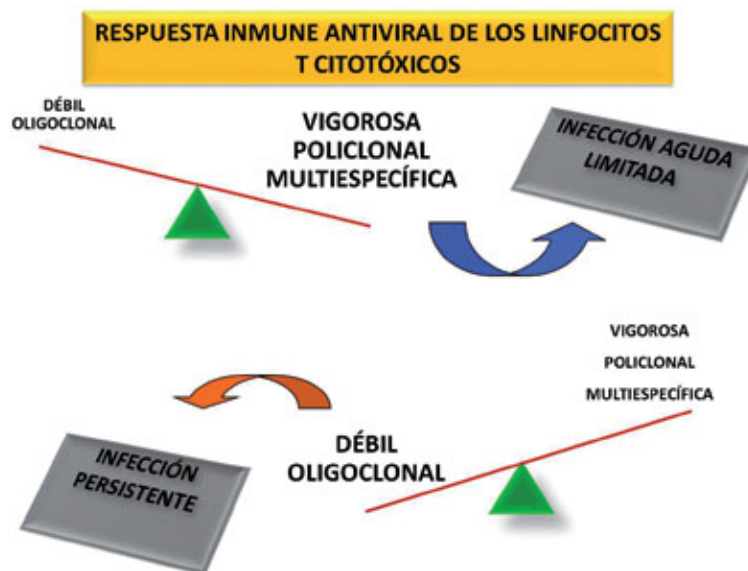


Figura 7.26. Evolución de una infección viral en función de la respuesta inmune antiviral mediada por LT citotóxicos específicos.

cie de la membrana plasmática moléculas de TGF-β) CD25⁺ designadas Th3. Sin embargo, la mayoría de las Tregs activadas produce dicha citoquina. Existen células productoras de TGF-β que también sintetizan IL-4 e IL-10, aunque aquellas que producen la máxima cuantía de TGF-β no lo hacen. Aproximadamente un 40% de las Th3 son FoxP3⁺, lo que implica que existe una subpoblación con función Treg y otra diferente que no lo es, cuya función se desconoce.

Células Tr1. Si bien se asoció inicialmente a la IL-10 con las células Th2, subsiguientemente se constató que también la producen células con función regulatoria CD4⁺ mayoritariamente FoxP3⁺ denominadas Tr1, aunque también lo hacen otras LT regulatorias convencionales (FoxP3⁺). La IL-10 es también producida por células Th1 y Th17, que regulan negativamente su propia función. Consiguientemente, es posible que las Tr1 en realidad sean representantes de un subconjunto de las Treg, Th1, Th2 y Th17 que limitan la respuesta inmune mediada por las mismas para evitar el daño hístico.

Células Th9. Aunque la producción de IL-9 se asoció inicialmente a la respuesta Th2, esta citoquina es también producida por las Tregs inducibles y las Th17, desconociéndose si lo hacen también las Th1. La producción de esta citoquina en células CD4⁺ *naïve* puede inducirse mediante la estimulación de TGF-β e IL-4, la que requiere del factor transcripcional GATA-3.

Células Tfh. Si bien inicialmente se las consideró un linaje separado, no está aún dilucidado si estas células corresponden a un estado particular de las células Th1, Th2 o Th17 o si se generan a partir de células CD4⁺ *naïve* que -ante determinados estímulos- pueden expresar IFN-γ, IL-4 ó IL-17a, al migrar a las zonas foliculares B-dependientes. Estas células expresan elevados niveles de Bcl-6, aunque se desconoce si existe participación de factores de transcripción tales como T-bet y GATA-3.

Heterogeneidad y plasticidad de los LT CD4⁺ y modulación de la respuesta inmune

La heterogeneidad está dada no sólo por los diversos linajes, sino también por los diferentes perfiles de citoquinas que cada uno de ellos puede adquirir en sus clones constituyentes en diversas etapas del desarrollo o en un momento determinado. La **plasticidad radica en que -dentro de ciertos límites- los diversos linajes no totalmente maduros pueden virar hacia otro o hacia un fenotipo mixto** (Figura 7.27). Esto es especialmente válido para los linajes Th1 y Th2. En contraposición, el linaje Th17 posee una capacidad plástica superior, ya que aun las células maduras pueden estimular la expresión de factores transcripcionales críticos como T-bet y

GATA-3, lo que les permite la síntesis simultánea tanto de IL-17 con IFN-γ, como de IL-17 con IL-4. A su vez, las células Tregs pueden expresar IFN-γ e IL-17 al promover la sobreexpresión de los factores transcripcionales específicos de los mencionados linajes (T-bet y RORγt). Se ha documentado que una célula determinada correspondiente a un linaje dado, no produce simultáneamente todas las citoquinas correspondientes al mismo. Por ejemplo, el linaje Th1 puede producir IFN-γ, linfotóxina α, TNF-α, e IL-2, aunque sólo raramente una célula produce la totalidad de las mismas en un momento dado. Sorprendentemente, algunas células Th1 pueden adquirir también la capacidad de producir IL-10 simultáneamente con IFN-γ. En modo análogo, las células Th2 pueden producir diferencialmente IL-4, IL-5, IL-13 y probablemente IL-25, y las Th17 producir diversas combinaciones de IL-17a, IL-17f, IL-21 e IL-22.

En síntesis, las células Th1 y Th2 son heterogéneas y exhiben cierto grado de plasticidad, siendo las Th17 las que ostentan el máximo grado de dicha plasticidad, lo que sugiere que no serían células terminalmente diferenciadas. Esta **reprogramación de la funcionalidad de los LT CD4⁺ de ayuda posee una extraordinaria importancia**, ya que su potencial manipulación conlleva la apasionante posibilidad de modular la respuesta inmune en situaciones tan disímiles como las infecciones, los eventos de autoinmunidad o los tumores.

3.2.2. Linfocitos T citotóxicos (CTL)

Estas células reconocen a través del receptor de linfocitos T -por ejemplo, expresado sobre la superficie de la membrana celular infectada- un producto del antígeno viral procesado, asociado a una molécula de clase I del CMH. También se ha demostrado en el ser humano que una minoría de CTL está también restringida por moléculas de clase II del CMH.

El significado operacional de este fenómeno de restricción ejercido por las moléculas del CMH es que los CTL migran hacia sitios donde reconocen células infectadas como "no propias", pero no pueden ser bloqueados o estimulados en su actividad por la presencia de virus libre en sangre u otro fluido. Como ya fuera expresado, los viriones libres, en cambio, son controlados por los anticuerpos neutralizantes, los que pueden producirse en exceso rápidamente. La velocidad de la respuesta de los CTL es dependiente del porcentaje de LT precursores y del tiempo de duplicación de los LT efectores.

¿Cómo actúan los CTL?

Al no ser totalmente maduros, los LT CD8⁺ vírgenes que migran desde el timo son capaces de reconocer células que expresan péptidos no

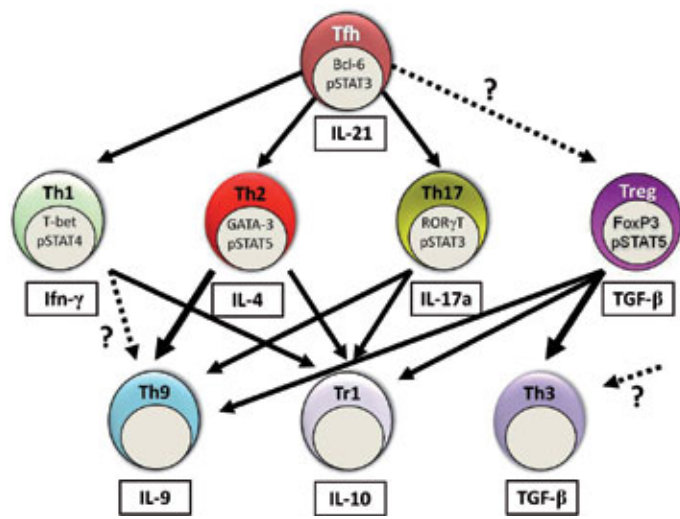


Figura 7.27. Linajes de linfocitos T CD4⁺. Las subpoblaciones Th1, Th2, Th17 y Treg exhiben características fenotípicas y funcionales definidas. Las poblaciones Tfh, Th9, Tr1 y Th3 están siendo aún evaluadas, para determinar si corresponden a entidades independientes o a alguna de las 4 estirpes mencionadas precedentemente. En el interior de cada célula se indican los factores de transcripción que son específicos a cada una. Las flechas indican la potencial evolución de una estirpe celular en presencia de determinadas citoquinas.

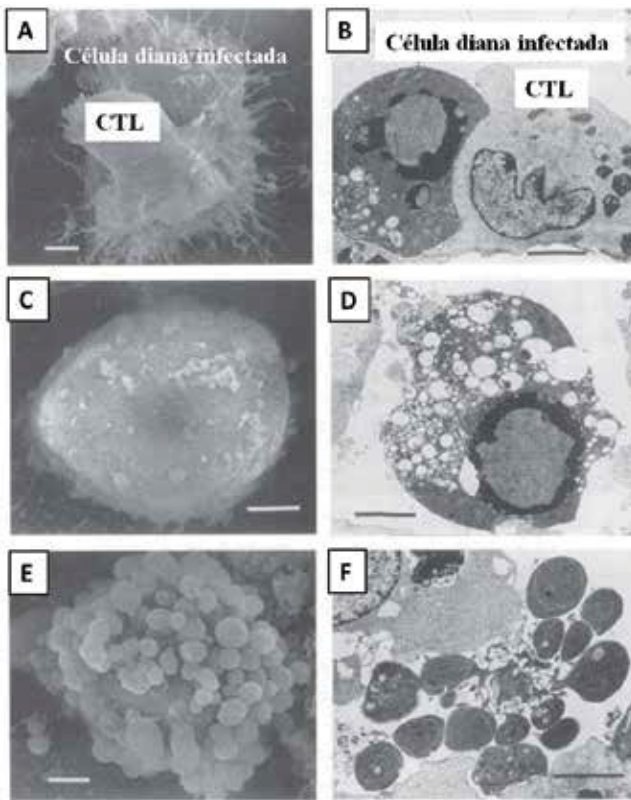


Figura 7.28. Inducción de apoptosis por CTL específicos de células diana infectadas con virus hepatitis del ratón (un coronavirus). La línea celular J774.1 (una estirpe macrofágica) fue infectada 5 horas antes de la co-incubación *in vitro* con CTL histocompatibles de ratón, sensibilizados con el virus (relación entre célula efectora y célula diana, igual a 2). **A.** Contacto entre la célula diana infectada y el CTL co-incubados. **C.** Desaparición de procesos citoplasmáticos en la célula diana infectada al cabo de 1 hora. **E.** Aparición de proyecciones bulosas de aproximadamente 2 μ en la superficie de la célula diana infectada. **B.** Condensación y marginación de la cromatina en la célula diana infectada al cabo de 1 h. **D.** Patente degeneración vacuolar del citoplasma al cabo de 2 horas. **F.** Degeneración de la célula diana infectada, formando masas celulares condensadas, no asociadas a la CTL. Las barras indican 3 μ . Fuente: Shibata S *et al.* *Journal of Virology* 68:7540-5, 1994. Reproducido con autorización.

propios en el contexto de moléculas CMH-I, aunque carecen de capacidad citotóxica. La misma se adquiere en los órganos secundarios linfoides cuando las células presentadoras profesionales y los linfocitos Th1 se encuentran con los LT CD8⁺ *naïve*. Sin embargo, para ser totalmente funcionales, los CTL requieren otras señales (Figura 7.6): el reconocimiento del péptido extraño presentado en el contexto de las CMH-I por parte del TCR (señal 1) y la interacción entre los correceptores de las células citotóxicas y los ligandos presentes en la superficie de la célula infectada (señal 2). La interacción entre el TCR y el péptido extraño presentado por las CMH-I también requiere la agregación de un número de receptores T, en una estructura particular y reorganizada del citoesqueleto del LT. Luego de la secreción de las citoquinas apropiadas por parte de las células presentadoras (señal 3), los LT CD8⁺ tienen la total capacidad para ejercer su función antiviral. La interacción entre el TCR y el péptido presentado por las CMH-I es de baja afinidad (1 μ M o menor), aunque –sorprendentemente– de alta "fidelidad". **Esta interacción entre el TCR y el complejo péptido/CMH se ensambla como una sinapsis inmunológica.**

Aunque los TCR pueden desplazarse individualmente sobre la superficie celular, la unión al complejo péptido/CMH debe ser considerada como una compleja interacción multimérica.

Los CTL ejercen su efecto antiviral mediante mecanismos citolíticos y no citolíticos. Recién en 2009 pudo establecerse que el segundo es aún más relevante que el primero en infecciones tales como la producida por HBV.

Los CTL promueven la muerte de las células infectadas mediante 2 vías: 1) la transferencia de gránulos citoplasmáticos de perforinas y granzima B (serina-proteasas) hacia la célula infectada que las capta mediante un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y que promoverá la apoptosis de ésta mediante la vía extrínseca de la apoptosis mediada por caspasas (Figura 7.28); y 2) la inducción de apoptosis mediante la expresión de FasL sobre su superficie, que contactará a la molécula Fas (CD95) en las células infectadas (véase el ítem 5 en este capítulo). La liberación de perforinas desde las CTL promueve la formación de poros en la membrana endosomal de la célula infectada, lo cual –a su vez– posibilitará la liberación de granzima B que inducirá –también– la apoptosis de esta última. Mientras el primer mecanismo es de acción rápida (se ejecuta en minutos), el segundo ocurre más lentamente (en horas). Muchos CTL secretan también IFN- γ , el que promueve un estado antiviral en células vecinas e incrementa los niveles de expresión de CMH-I y CMH-II. Los CTL activados también secretan IL-16 y quimioquinas como CCL5 (RANTES).

La secreción de IFN- γ y TNF- α es capaz de eliminar por un mecanismo no citolítico la infección viral de una célula. Este mecanismo es de especial relevancia ante virus no citopáticos. En localizaciones anatómicas tales como el hígado o el SNC este mecanismo es crucial para la limitación de las infecciones virales, dado que si la eliminación viral dependiese del efecto citotóxico de las CTL, podría producirse más daño que beneficio al hospedador. En estas localizaciones, habitualmente existe un exceso de varios órdenes de magnitud del número de células infectadas respecto al de las CTL presentes. En otros términos, **la limitación de la infección mediante efectos citolíticos es apropiada cuando el número de células infectadas es escaso. Por el contrario, cuando la infección acontece en cantidades masivas de células, el mecanismo no citolítico promovido por citoquinas es el más importante.** Este mecanismo requiere que las células infectadas retengan su capacidad de responder ante la señalización disparada por la interacción entre las citoquinas mencionadas (IFN- γ y TNF- α) y sus receptores, y que la replicación del virus en cuestión sea sensible al efecto promovido. Este mecanismo no citolítico ha sido observado en infecciones tales como las producidas por los virus HBV y HCV, arnavirus, adenovirus, picornavirus y otros. Otros péptidos secretados también por los CTL como las defensinas, son capaces de promover cierto grado de depuración celular no citolítica del HIV. Los LT CD4⁺ pueden también contribuir a la limitación viral no citolítica, aun con escasa participación de los CTL, como se documentó en infecciones producidas por virus vaccinia y otros.

La respuesta de expansión clonal de los precursores de las células CTL es variable según el virus. Así, experimentos realizados en ratones infectados con el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) documentaron que hasta el 50% de los CTL esplénicos eran específicos para un péptido viral determinado, siendo aún detectable un 10% al cabo de 1 año. En forma análoga, la infección por EBV se asocia a una masiva proliferación clonal de CTL específicos. En contraposición, el análisis de CTL de bazo de humanos infectados con HBV o HIV muestra que menos del 1% de los mismos es específico para un péptido determinado.

¿Cómo influye la sensibilidad funcional de los LT en el desenlace de la infección viral?

Entre los factores que condiciona el desenlace de una infección viral, debe mencionarse la diversa sensibilidad funcional (**para algunos autores denominada adividez funcional**) de los LT. Además de los factores generales mencionados al comienzo de esta Sección, el desenlace de la infección está también condicionado por la naturaleza de los péptidos reconocidos por los LT, así como por la capacidad viral de mutar dichos epítopes y escapar a la respuesta T y por la sensibilidad individual de dichas células. Esta sensibilidad



Figura 7.29. Balance entre Treg y CTL. Como lo explica el Ying-Yang de la filosofía oriental, existe una dualidad de todo lo existente. Una actividad exacerbada de los CTL limitará la infección viral, aun al costo del daño histico. Por el contrario, una actividad aumentada de las Treg limitará el daño tisular pero puede devenir en un defecto para limitar la infección viral.

para el reconocimiento de epítopes expresados en el contexto del CMH por parte de los LT puede variar en varios órdenes de magnitud. **A mayor sensibilidad** (capacidad de un LT de reconocer células que expresan un menor número de péptidos en el contexto de las CMH sobre la superficie celular) **mayor es la capacidad de eliminar la infección.** A esta funcionalidad contribuyen factores originados en el LT y en la célula presentadora. Entre los factores dependientes del LT merecen destacarse los siguientes: a) la afinidad del TCR por el péptido; b) el nivel de expresión de TCR, de CD8 y de moléculas coestimuladoras sobre la superficie celular; c) la valencia del TCR. A su vez, desde la célula infectada o presentadora, es crucial el nivel de procesamiento y unión a las CMH-I del péptido a ser reconocido. **Una mayor sensibilidad de los LT es crítica para el reconocimiento de las células infectadas en las etapas iniciales, así como ante la estrategia viral de inhibir la expresión de las CMH-I y consiguientemente, el reconocimiento peptídico por los CTL.** Para ser activados, los LT CD4⁺ requieren la mera expresión de un péptido antigénico dado en el CMH-II de la célula presentadora en apenas el 0,03% del total de dichas moléculas expuestas en la superficie celular. Asimismo, habitualmente, **basta con que una célula infectada exprese 1 – 50 epítopes T en el contexto del CMH-I, para que sea reconocida por un CTL.** La afinidad de la interacción entre el TCR y el complejo péptido/ CMH se correlaciona con la cualidad de la respuesta de los diferentes clones T, ya que determina el umbral del gatillado de la respuesta de las células CD8⁺. Esta sensibilidad de los LT puede ser mensurada mediante ensayos biológicos *ex vivo* como el ELISPOT (IFN- γ *Enzyme-Linked Immunospot Assay*) que determinan con alta sensibilidad la capacidad funcional de dichas células, lo cual depende de la afinidad de la interacción del TCR con el complejo CMH / péptido y del estado funcional de la célula. Otra tecnología ideada para medir exclusivamente la afinidad entre el TCR con el complejo CMH / péptido –independientemente de la función celular– es la denominada **tinción de células CD8⁺ antígeno-específicas mediante la unión de tetrámeros de complejos CMH-I / péptidos** marcados con fluoresceína, lo que es subsiguientemente medido mediante citometría de flujo.

La relevancia de la sensibilidad funcional de los CTL es ejemplificada en el curso diferente que puede ocurrir ante las infecciones producidas por HIV o por HCV. En el primer caso, los CTL restringidos por la molécula B27 del CMH-I reconocen el epítipo inmunodominante K10, con mayor sensibilidad funcional –y consiguientemente menor carga viral de HIV– que al ser restringidos por otras moléculas HLA-A y HLA-B. Este hallazgo se correlaciona con la progresión de la infección por HIV significativamente más lenta observada en pacientes que exhiben HLA-B27. En modo análogo, los CTL de individuos que limitan la infección por HCV exhiben mayor sensibilidad funcional –y consiguientemente mayor nivel de citotoxicidad y producción de IFN- γ y TNF- α – que los de pacientes que no eliminan el virus, progresando hacia la infección crónica.

La respuesta de mayor sensibilidad funcional tiene simultáneamente ventajas y desventajas: por un lado se potencia la eficacia de la respuesta inmune celular mediada por los CTL para controlar la infección, pero al mismo tiempo pueden inducirse mutaciones de escape en el genoma viral que intenten evadir dicha respuesta, pudiendo conducir al control de la infección si hubiese un elevado costo de la aptitud replicativa viral (*fitness*) o a la infección crónica si se produce un bajo compromiso de dicha aptitud viral. Esta persistente estimulación de los CTL de alta sensibilidad funcional con elevadas dosis de antígenos virales los puede tornar anérgicos, lo que promueve el agotamiento inmune. Este efecto está asociado a la inducción de la expresión de la molécula PD-1 en los LT. Este fenómeno ha sido observado en las infecciones crónicas por HIV, HBV y HCV.

¿De qué depende que el reconocimiento T de células infectadas con virus no se transforme en un mecanismo promotor de un daño inmunopatológico?

Si bien existen virus que son capaces de inhibir la respuesta T (véase el capítulo "Mecanismos de evasión a la respuesta inmune") como el HCMV, HIV y otros, normalmente existe un freno homeostático que es ejercido por la expresión de moléculas tales como CTLA-4 y FasL en los LT activados que permiten el control de la expansión clonal. En modo análogo, la interacción entre la proteína PD1 en la superficie de los LT (por ejemplo, en los CTL) con el ligando específico PDL-1 expresado en las células dendríticas, promueve la limitación de la respuesta de dichas células T. Asimismo, otro nivel de control es modulado por las células T regulatorias naturales y por las T regulatorias inducibles Th3 y Tr1 (Figura 7.29).

En términos generales, las proteínas solubles inducen una adecuada respuesta humoral, pero raramente desencadenan una respuesta citotóxica celular. La participación de esta última requiere habitualmente de la síntesis del material inmunogénico en el hospedador. La naturaleza de los virus permite la intervención de ambas respuestas. Como contrapartida, la utilización de vacunas virales inactivadas o de péptidos sintéticos no induce generalmente la participación de CTL.

4. INTERACCIONES PROTEÍNA-GLICANOS EN EL CONTROL DE LAS RESPUESTAS INNATA Y ADAPTATIVA: ROL DE LAS GALECTINAS

El rol de las lectinas en la regulación de la respuesta innata ha sido extensamente establecido, tal como lo ejemplifican las colectinas (véase el ítem 2.2.3), la dectina-1 o la molécula DC-SIGN (*DC-Specific Intercellular adhesion molecule (ICAM)3-Grabbing Non-integrin*). Estas lectinas de mamíferos son sintetizadas en la vía secretoria y presentadas en la superficie celular para interactuar con motivos (para algunos autores, "epítopes") hidrocarbonados no propios, presentes en agentes patógenos. En contraposición, otras moléculas, denominadas galectinas son sintetizadas y almacenadas en el citosol, pero ante ciertos estímulos producidos por el daño tisular iniciado por una infección y/o por una infección prolongada pueden ser pasivamente liberadas desde las células que están

muriendo o ser secretadas por una vía no clásica, independiente de (la ausencia de) secuencias peptídicas-señal en las mencionadas moléculas.

Una fascinante área del conocimiento está emergiendo: es la que vincula el rol de las galectinas con la regulación de las respuestas inflamatorias e inmunes agudas y crónicas. **Las galectinas son proteínas conservadas a través de la evolución que tienen la capacidad de descifrar el código específico de los glúcidos mediante la detección de β galactósidos a través de uno o más dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD, según su sigla en inglés), sin requerimiento de metales iónicos.** La mínima estructura reconocida por las galectinas es el disacárido *N*-acetil lactosamina (Gal β 1-4GlcNAc, donde Gal es galactosa y GlcNAc es *N*-acetilglucosamina), el cual puede observarse en los *N*-glicanos (unidos al aminoácido asparagina) y *O*-glicanos (ligados a serina), y ensamblarse como unidades múltiples. La diversidad de posibles glicanos a ser reconocidos por las galectinas estriba en el grado de ramificación de los *N*-glicanos, la multiplicidad de residuos de *N*-acetil lactosamina y la modificación terminal de los residuos sacarídicos (por ejemplo, con adición de fucosa, o ácido siálico). Estas cruciales diferencias podrían explicar las diversas y a veces opuestas funciones de las galectinas en los fenómenos inflamatorios. **Las galectinas participan en fenómenos de crecimiento y diferenciación celular, así como en su adhesión y migración, en la quimiotaxis y en la apoptosis o sobrevida celular. Su vasto espectro de acción se extiende al control de enfermedades infecciosas, autoinmunes, alérgicas y neoplásicas.** Además, las galectinas pueden reconocer ligandos (PAMP) presentes en la superficie de diversos patógenos, **funcionando así, también como receptores solubles de reconocimiento de patrones (RRP).** Como las galectinas aparecen especialmente en tejidos lesionados donde existen señales de daño iniciado por patógenos, su liberación pasiva es también considerada por varios autores como un potencial patrón molecular de daño (DAMP: *Damage-Associated Molecular Pattern*). **Diversos componentes de la respuesta innata reconocen PAMP y DAMP (incluyen por ejemplo, defensas, aneoxinas, proteínas de estrés térmico, IL-1 α , etc.). Al reconocer ambos patrones, la respuesta innata es capaz de discriminar entre un agente patógeno y otro que no lo es.** Dado que los PAMP corresponden a patrones moleculares de agentes exógenos al hospedador tanto patógenos como apatógenos, su mera presencia no indica al hospedero que la lesión es el resultado de dicho agente. Por el contrario, **la detección de los DAMP (moléculas habitualmente "escondidas" en el interior celular) provee dicha información, indicando que el daño es causado por un agente patógeno.**

Las galectinas decodifican las "improntas" de hidratos de carbono exhibidas en la superficie de las células como consecuencia de la actividad finamente controlada de glicosiltransferasas y glicosidasas que modulan la activación, diferenciación y homeostasis inmune. A diferencia de las citoquinas y quimioquinas, las galectinas secretadas no se unen a receptores específicos, sino que median la interacción con las células del sistema inmune a través del reconocimiento de glicoconjugados preferenciales expuestos en la superficie celular.

Las galectinas (antiguamente conocidas como lectinas tipo S) son moléculas proteicas caracterizadas por poseer al menos un dominio CRD de unos 130 aminoácidos para el reconocimiento de carbohidratos. Se conocen hasta el presente 15 galectinas, las que han sido clasificadas según sus características estructurales en 3 grandes grupos: a) las consideradas prototipo (contienen un único CRD y pueden formar homodímeros); b) las que exhiben repeticiones en tándem consistentes en dos CRD diferentes unidos por un péptido corto, y c) la galectina quimérica 3, que posee un único CRD con un extremo N-terminal extendido (Tabla 7.11). A diferencia de las selectinas, la unión de las galectinas a los carbohidratos es Ca⁺⁺ independiente. Muchas galectinas pueden unirse a dichos azúcares en un modo bivalente o aun multivalente, lo que induce la unión y redistribución de las glicoproteínas de la superficie celular,

formando una verdadera matriz o "entramado". Asimismo, la interacción a través de glucoconjugados en la superficie celular puede ocurrir mediante interacciones ligando-receptor.

El número de residuos *N*-glicanos –y por ende su grado de ramificación– **disponibles para interactuar con las lectinas es variable según se trate de receptores estimulatorios o inhibitorios,** lo cual puede regular específicamente el recambio de aquéllos y su endocitosis, constituyendo un delicado mecanismo modulador de la transición entre la proliferación y la detención del ciclo celular. Al respecto, se ha observado que la interacción galectinas–CTLA-4 impide su internalización desde la superficie celular, prolongando así su señal inhibitoria, lo que contribuye a la finalización de la respuesta T y por ende a la homeostasis de dicha población. Más aún, la interacción entre la galectina-3 y los LT CD8⁺ específicos de tumores favorece su anergia, al promover la disgregación de dicha molécula respecto al TCR. A su vez, la galectina-1 puede actuar en combinación con otros sistemas que también suprimen la respuesta T (tales como PD-1/PD-L1, CTLA-4, indolamina 2,3-dioxigenasa y FasL) para alcanzar su homeostasis.

Como ocurre por ejemplo con las galectinas 3 y 10, estas lectinas también pueden unirse a sus ligandos en un modo carbohidrato-independiente, especialmente a nivel intracelular donde pueden producirse interacciones proteína-proteína. Entre las galectinas se observa una diversidad funcional inherente a características estructurales privativas de cada subgrupo y consiguientemente, a su preferencia por la unión a ligandos diversos. Más aún, una misma galectina, puede poseer efectos opuestos según su concentración en el microambiente, su compartimentalización celular y/o el estado de diferenciación de la célula diana. A continuación sólo se mencionarán algunos aspectos relevantes de las galectinas 1, 3 y 9 sobre la regulación de la respuesta inmune, ya que éstas incrementan su expresión durante la inflamación. El lector observará en párrafos subsiguientes **que determinados virus pueden modular la respuesta inmune regulada por dichas galectinas para su propio beneficio, promoviendo, por ejemplo, una mayor infectividad y/o la persistencia viral.**

Localización de las galectinas. Están presentes prácticamente en todas las células de la respuesta inmune, ya sea en forma constitutiva o inducible, siendo sobre-expresadas en los LT y LB activados, en los macrófagos inflamatorios, las células NK de la decidua y en las células T regulatorias CD4⁺CD25⁺. Aunque estas proteínas carecen de una señal peptídica para la secreción celular, algunas pueden secretarse mediante su capacidad de unión a carbohidratos, por una vía no clásica. La localización intranuclear de las galectinas 1 y 3 a nivel nuclear fue postulada como posible consecuencia de su participación en el corte y empalme de los RNA pre-mensajeros, mientras que su ubicación en el extracelular refleja su vinculación con las interacciones célula-célula o célula-matriz. La galectina-1 está ubicada específicamente en los órganos linfoides, LT, macrófagos activados, y células endoteliales, lo cual puede ser regulado por diversos estímulos inflamatorios. La galectina-3 –a su vez– está expresada en prácticamente todas las células del sistema inmune, incluyendo las DC, monocitos, macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares. La expresión de dicha galectina se incrementa en estas últimas células en fenómenos inflamatorios, lo que es coincidente con su relocalización en la superficie de la membrana plasmática de las células endoteliales. Finalmente, la galectina-9 se expresa en macrófagos, LT, fibroblastos y células endoteliales.

4.1. FUNCIÓN DE LAS GALECTINAS

En términos generales, **la galectina-1 y la galectina-3 exhiben generalmente efectos antagonicos: galectina-1 es considerada una molécula que inhibe los fenómenos inflamatorios, mientras que galectina-3 los estimula** (Figura 7.30). La galectina-1 inhibe el tráfico leucocitario, induce la apoptosis y regula la liberación de mediadores químicos. En contraposición, **la galectina-3, promue-**

ve la activación leucocitaria. Finalmente, la galectina-9 ejecuta acciones que inducen la quimiotaxis de los eosinófilos e inhibe la actividad de los LTh1.

4.2. ESPECIFICIDAD Y AFINIDAD DE LA UNIÓN A GLICANOS

Existe una fina discriminación en el reconocimiento de los diferentes ligandos por parte de las galectinas. Así por ejemplo, la mera modificación de residuos de galactosa por α -N-acetilgalactosamina disminuye la sensibilidad de la galectina-1 hacia dicho residuo, pero incrementa la de la galectina-3. Alternativamente, la modificación con residuos de ácido siálico unidos mediante enlace α -2-6 (pero no α -2-3) reduce principalmente la afinidad por la galectina-1, pero también por la galectina-3. **Esta sialilación α -2-6 es crucial para el desvío de la respuesta T hacia el perfil Th2 promovido por la galectina-1 (que se une a los LTh1 pero no a los LTh2). Más aún, los glicanos de dos cadenas hidrocarbonadas son preferencialmente reconocidas por galectina-1, y no por galectina-3.** La unión entre el CRD de las galectinas y los ligandos β -galactósidos exhibe una afinidad menor (10^{-6} M) que la interacción proteína-proteína (10^{-8} M).

4.3. GALECTINA-1

El carácter inmunosupresor de esta molécula se asocia a múltiples mecanismos. Entre ellos, se destaca su **capacidad pro-apoptótica sobre los LT maduros y activados**, mediante reconocimiento específico de la isoforma diferencialmente glicosilada CD45RO de la tirosina-fosfatasa PTPRC (*Protein Tyrosine-Phosphatase, Receptor type C*) expresada por las células de memoria. Esta capacidad es crucial para el mantenimiento de la homeostasis T. Las células epiteliales tímicas sintetizan también esta galectina, lo cual la hace partícipe de los procesos de selección positiva y negativa de los linfocitos en el timo, mediante la disminución y el aumento respectivos del umbral de señalización disparado por el TCR. Además, esta galectina ejerce efectos anti-inflamatorios adicionales a los promovidos por su capacidad pro-apoptótica: **a bajas dosis es capaz de inhibir tanto la adhesión de los LT a las glicoproteínas de la matriz extracelular, como la secreción de TNF- α e IFN- γ por los LT activados. La galectina-1 interviene también sobre la respuesta innata, dado que es capaz de inhibir el infiltrado inflamatorio mediado por neutrófilos y la degranulación de los mastocitos.** A diferencia de la regulación de los LT activados mediante la inducción de apoptosis, la galectina-1 induce en los neutrófilos la expresión de fosfatidil serina en su superficie, como resultado de lo cual, son pasibles de ser fagocitados por los macrófagos. En estas células, esta galectina también inhibe la secreción de ácido araquidónico y prostaglandina E2.

Sin embargo, no todas los efectos promovidos por galectina-1 son anti-inflamatorios: a altas dosis, también es capaz de promover la activación plaquetaria y la inducción de la síntesis de NAD(P) H oxidasa –y consiguientemente de superóxido– en los neutrófilos extravasados. Esto último sugiere que los neutrófilos activados podrían exponer receptores para galectina-1.

Se postula también que la galectina-1 endógena constituye un freno para el tráfico leucocitario, aunque aún resta dilucidar si ello

obedece a un efecto directo sobre los leucocitos o sobre las células endoteliales. Finalmente, también se demostró que la **galectina-1 es capaz de promover la angiogénesis**. En conjunto, estos datos sugieren que dicha molécula podría ser un potencial blanco de terapéutica en tumores (para evitar su diseminación), mientras que podría utilizarse a la misma molécula para limitar la inflamación crónica, o prevenir respuestas inmunes hiperérgicas (Figura 7.31).

La galectina-1 es también responsable del efecto tolerogénico de las células dendríticas tempranamente durante el embarazo, lo cual promueve la expansión clonal de células T regulatorias que producen IL-10. En 2009, los grupos de Gabriel Rabinovich y Jorge Geffner dilucidaron las bases moleculares del circuito tolerogénico CD-LT. Dicho circuito regulatorio es iniciado por linfocitos T reguladores CD4⁺FoxP3⁺, los que en presencia de galectina-1 (ya sea experimentalmente adicionada por vía exógena o producida por las células dendríticas) y mediante el contacto con estas últimas, las inducen a secretar IL-27 (una interleuquina semejante a la IL-12, con paradójicas características pro- y anti-inflamatorias), que estimula a las Tr1 a secretar IL-10, la que –a su vez– inhibe las respuestas Th1 y Th17, promoviendo un perfil Th2. La potencial manipulación médica de este circuito abre extraordinarias perspectivas no sólo para áreas tan diversas como las inherentes a tumores, trasplantes, o enfermedades autoinmunes sino también a infecciones, incluidas las de origen viral.

La **infección de células endoteliales con virus Nipah** (un paramixovirus emergente asociado a encefalitis en humanos, con una mortalidad del 70%) **promueve su fusión *in vivo*** (formando sincicios) mediante la actividad de las proteínas F y G de su envoltura. Estudios *in vitro* demostraron que **dicha fusión es inhibida por la galectina-1**, la que –a su vez– promueve el incremento de la IL-6 por parte de las CD. Estos resultados demuestran un **rol relevante de dicha galectina en la respuesta inmune innata frente a la infección por virus Nipah**. En contraposición, se ha demostrado que la infección celular *in vitro* con herpes simplex-1 incrementa la expresión y secreción extracelular de galectina-1, lo cual se asocia a la apoptosis de LT activados en un modo carbohidrato-dependiente, evento postulado como un mecanismo de evasión a la respuesta inmune *in vivo*. Más aún, en pacientes con linfoma de Hodgkin clásico asociado a la infección con EBV, se observó un incremento de galectina-1 en las lesiones, con un defecto funcional de los LT CD8⁺ específicos para ciertas proteínas del virus. Estos dos últimos estudios, muestran un **rol central de la galectina-1 en la generación de un microambiente inmunosupresor en las infecciones producidas por el virus herpes simplex-1 y por EBV**.

La **galectina-1 está implicada en la adsorción viral de ciertos retrovirus a las células, tales como HTLV-1 y HIV**. En el caso de HTLV-1, la proteína viral Tax (transactivadora de la transcripción) promueve la expresión de galectina-1 en los LT, lo que estabiliza las interacciones intercelulares, así como entre el virus y la célula, habiéndose propuesto la formación de una estructura extracelular de partículas virales con un ensamblaje semejante a las biopelículas bacterinas (*biofilms*) para facilitar la infección de otras células. Finalmente, la galectina-1 dimerizada está también implicada en la promoción del ingreso del HIV a macrófagos y LT al obrar como puente a través de sus dos dominios CRD, que reconocen principalmente residuos de manosa sobre la glicoproteína de envoltura viral gp120. Más aún, estos residuos virales son semejantes a los exhibidos por las microvesículas celulares inmunomodulatorias (derivadas de endosomas) excitadas desde los LT, lo que implica un verdadero camuflaje viral al usurpar una vía biosintética celular.

4.4. GALECTINA-3

Su rol pro-inflamatorio se expresa en enfermedades autoinmunes o estados inflamatorios. Respecto a su influencia sobre los componentes de la respuesta innata, esta molécula promueve el reclutamiento de polimorfonucleares y macrófagos, a través de interacciones entre dichas células y las endoteliales. Durante la inflamación,



Figura 7.30. Efectos antagónicos promovidos por galectina-1 y galectina-3.



Figura 7.31. Interacción entre galectina-1 y "entramados" de glicanos. La participación de esta galectina en diversos fenómenos y actividades asociados a los LT permite postular la modulación de su interacción con sus ligandos específicos tanto para evitar fenómenos inmunitarios (mediante su inducción) como para inhibir la tolerancia de LT en el microambiente tumoral (mediante su inhibición), promoviendo una respuesta inmune específica. Metafóricamente, podría decirse que se trata de una misma "arma inmunológica" (la espada) que posee dos filos opuestos que pueden ser utilizados, según sea el requerimiento.

la galectina-3 es liberada al espacio extracelular donde induce una mayor interacción entre las células inflamatorias y las glicoproteínas de la matriz, lo cual promueve el reclutamiento y la activación celular. Ello se traduce –por ejemplo– en la degranulación de mastocitos, en la síntesis de IL-1 y de superóxidos por los monocitos, y en la de IL-8 y superóxidos por los neutrófilos.

En relación a los fenómenos apoptóticos, esta galectina funciona diferencialmente, según sea intra o extracelular. Dentro de la célula, su localización mitocondrial inhibe la liberación de citocromo c, lo cual podría favorecer la sobrevida celular en el lugar de la inflamación. En contraposición, su ubicación extracelular promueve –al igual que la galectina-1– la apoptosis de los linfocitos T. Esta galectina induce también la actividad fagocítica de los macrófagos y neutrófilos, imprescindible para la eliminación de patógenos, cuerpos extraños o detritos celulares. Más aún, la galectina-3 promueve la activación alternativa de los macrófagos, mediada por IL-4 e IL-13 (en lugar de la vía clásica mediada por IFN- γ). Aquellas dos citoquinas –a su vez– inducen la síntesis y liberación de la mencionada lectina, lo que constituye una retroalimentación positiva. **En contraposición con la galectina-1, la galectina-3 suprime la respuesta Th2** mediante la inhibición de la producción de IL-5 por los eosinófilos, lo que sugiere un potencial rol en los procesos inflamatorios alérgicos.

La galectina-3 está incrementada en LT infectados con HTLV-1, lo que favorece su sobrevida. Este mecanismo anti-apoptótico estaría mediado tanto por la secuencia aminoacídica "NWGR" (también presente entre los miembros supresores de apoptosis de la familia Bcl-2) como por una interacción directa entre la galectina-3 y la propia proteína Bcl-2. En modo análogo, la galectina-3 está también incrementada en hepatocitos de hígados cirróticos y tumorales asociados a la infección por HBV, lo que podría conferir mayor sobrevida a las células transformadas.

4.5. GALECTINA-9

Esta lectina –liberada por los LT activados– exhibe **propiedades quimiotácticas para los eosinófilos**, induciendo en ellos la producción de superóxidos, y prolongando su sobrevida. Esta galectina actúa en diferentes fases de la respuesta inmune T. **Inicialmente, es un potente activador de la maduración de las células dendríticas y de la iniciación de la respuesta inmune adaptativa**, lo que se asocia a la producción de IL-12 en forma dosis-dependiente y al viraje a la producción de citoquinas de linaje Th1. Esta galecti-

na también induce la apoptosis de los timocitos y de ciertas subpoblaciones de LT periféricos. **Su interacción con TIM-3 (*T cell Immunoglobulin domain and Mucin domain-containing protein-3*, una molécula de la superficie de los LTh1 CD4⁺ y CTL CD8⁺, [pero no de los LTh2]) selectivamente inhibe la respuesta Th1, promoviendo la apoptosis de los LT CD4⁺ Th1 y de los CD8⁺ alorreactivos. La galectina-9 también induce específicamente la formación de células T reguladoras**, al tiempo que simultáneamente suprime la generación de células Th17 pro-inflamatorias.

En pacientes con hepatitis C crónica se ha observado que las células de Kúpffer regulan la actividad citotóxica de los LT CD8⁺ (CTL) mediante la producción de galectina-9, la que es inducida por el IFN- γ producido por diversas células inmunes (LTh1, CTL y NK). Esta galectina promueve tanto la síntesis de citoquinas proinflamatorias a nivel hepático, como la actividad de los Tregs CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ en un modo TGF- β -dependiente, lo que a su vez favorece la persistencia viral (Figura 7.32).

5. APOPTOSIS

La palabra apoptosis proviene de dos vocablos griegos: el elemento preposicional "apó" que significa "a partir de" y el sustantivo "ptôsis" que indica "caída". La adición del elemento preposicional indica la duración de un proceso que es gradual y no abrupto, como lo sugeriría el uso del vocablo único "ptôsis".

Esta forma de muerte celular se contrapone a la necrosis. En los organismos multicelulares, la apoptosis –o muerte celular programada– es un proceso fisiológico que normalmente asegura un balance homeostático entre la proliferación y el recambio celular en casi todos los tejidos. La apoptosis es responsable de la remoción de células generadas en exceso, células que ya han completado sus funciones específicas o células que son dañinas para el organismo, siendo particularmente importante durante el desarrollo embrionario, la renovación tisular y la exposición a compuestos tóxicos. Por lo tanto, la apoptosis es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. Sin embargo, la apoptosis se encuentra también involucrada en diferentes condiciones patológicas donde una excesiva o insuficiente muerte celular puede contribuir al desarrollo de enfermedades humanas entre las que se encuentran enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, inmunológicas y tumorales.

La apoptosis fue descrita por primera vez por Kerr *et al.*,

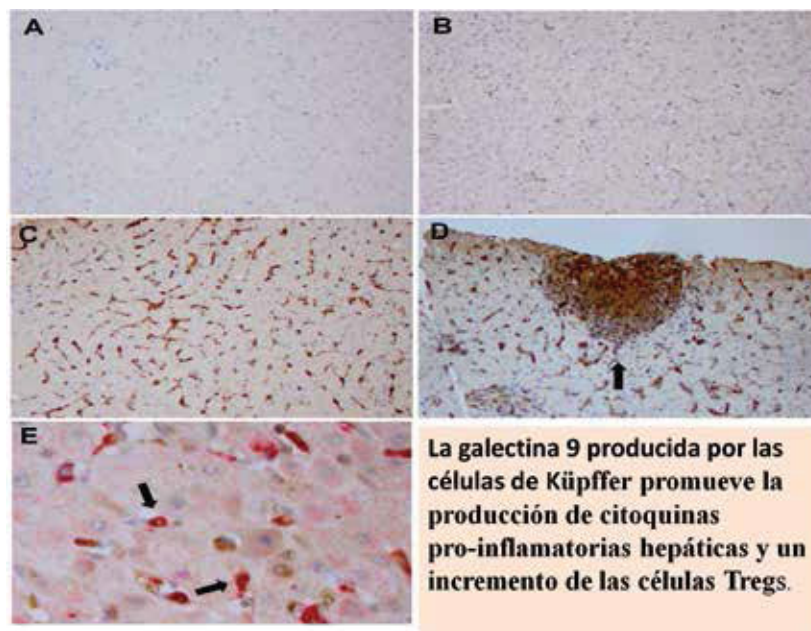


Figura 7.32. Expresi3n aumentada de galectina-9 en células de K upffer de pacientes infectados con HCV. Inmunohistoquímica a partir de material de biopsia parafinado. A. Control negativo teido únicamente con un anticuerpo secundario. Magnificaci3n: 20x. **B.** Tinci3n de galectina-9 (color marr3n) en un hígado humano normal (20x). **C.** Tinci3n de galectina-9 en un paciente infectado con HCV (20x). **D.** Expresi3n periportal de galectina-9 en un paciente infectado con HCV (20x). **E.** Colocalizaci3n de galectina-9 (marr3n) y CD68 (marcador de células de K upffer, en rojo); 600x. Fuente: Mengshol JA *et al.* *PLoS ONE* 2010; 5(3): e9504. doi:10.1371/journal.pone.0009504. Repro- ducido parcialmente, con autorizaci3n.

en 1972 y es definida por cambios morfol3gicos en la célula que consisten en una disminuci3n del volumen celular, cambios en la membrana plasmática (*membrane blebbing*) –que conllevan a la formaci3n de los cuerpos apopt3ticos–, condensaci3n de la cromatina nuclear y la fragmentaci3n del núcleo (Figuras 7.28 y 7.33). Las características bioquímicas asociadas con la apoptosis incluyen el clivaje internucleosomal del DNA (véase la figura 7.38, correspondiente a la vía extrínseca), externalizaci3n de la fosfatidilserina (que puede documentarse mediante la tinci3n celular con Anexina V) y el clivaje proteolítico de un número de sustratos celulares. La fosfatidilserina –normalmente localizada en la cara interna de la membrana plasmática– se expone sobre la superficie externa donde provee la señal de reconocimiento para las células fagocíticas. Como resultado de los cambios en la membrana plasmática, las células apopt3ticas son rápidamente fagocitadas en forma previa a la liberaci3n del contenido intracelular y sin inducci3n de una respuesta inflamatoria.

La apoptosis puede ser disparada como una respuesta celular a estímulos del medio externo o del interior celular. Por ello, múltiples cascadas apopt3ticas han sido descritas, las que tienen en consideraci3n a) las señales extrínsecas o intrínsecas; b) el estímulo de receptores de muerte o desde la mitocondria; c) la participaci3n o no de p53; y la participaci3n o no de las caspasas (cisteína proteasas que clivan proteínas con ácido aspártico). Sin embargo, la apoptosis no es el desenlace de una serie de vías claramente definidas, sino que por el contrario, es el resultado de una multitud de vías interconectadas y altamente reguladas. Por ende, el mencionar a las vías como perteneciente a una u otra naturaleza, obedece meramente a una simplificaci3n didáctica. A su vez, la apoptosis puede ser considerada un "destino final" que participa como resultado de diversos mecanismos de defensa, también como un proceso a ser regulado en el desarrollo de una determinada infecci3n viral. Diversos virus pueden inhibir o promover la apoptosis. Más aún, un mismo virus y –a veces aun– una misma proteína viral pueden inducir uno u otro efecto, dependiendo de condiciones del microambiente celular.

En la **vía de muerte celular intrínseca**, la iniciaci3n de la apoptosis ocurre como resultado de una alteraci3n en la homeos-

tasis intracelular. En esta vía la mitocondria desempeña un rol crítico. La inducci3n de la apoptosis por la **vía de muerte celular extrínseca** se realiza a través de la interacci3n de los receptores de muerte (DR [*Death Receptor*] como el receptor para Fas 3 el receptor para TNF [*Tumor Necrosis Factor*]- α) con sus respectivos ligandos de muerte (DRL [*Death Receptor Ligand*] como FasL [ligando de Fas] y TNF- α). También puede dispararse la apoptosis mediante la actividad del sistema secretorio de células citot3xicas (CTL con fenotipo CD8⁺ –o infrecuentemente CD4⁺– y NK), a través de dos proteínas que alteran las membranas –perforina y granzulina– y granzimas. La apoptosis inducida por granzulina acontece mediante mecanismos aún no totalmente dilucidados, mientras que la granzima B activa la vía extrínseca de las caspasas.

La apoptosis puede ser, a su vez, separada en al menos tres fases distintas: iniciaci3n, integraci3n/decisi3n y ejecuci3n/degradaci3n. La fase de iniciaci3n depende estrictamente de la naturaleza de la señal letal que, como se mencion3 anteriormente, puede provenir del medio intracelular o extracelular. En la fase de integraci3n/decisi3n están implicadas numerosas moléculas pro- y anti-apopt3ticas las cuales se oponen mutuamente decidiendo el destino final de la célula y el pasaje del "punto de no retorno". La fase final de ejecuci3n involucra un conjunto de fen3menos de degradaci3n *post-mortem* los que producen las manifestaciones fenotípicas de la apoptosis.

5.1. FAMILIA DE LAS CASPASAS

Las caspasas constituyen una familia de proteínas intracelulares involucradas en la apoptosis o en la inflamaci3n. Se han descrito 10 caspasas en células humanas, algunas de las cuales pertenecen a la subfamilia involucrada en la activaci3n de citoquinas (caspasas -1, -4 y -5) y otras a la subfamilia involucrada en la apoptosis (caspasas -2, -3, -6, -7, -8, -9 y -10). Dentro de estas últimas, algunas son "iniciadoras" (caspasas -2, -8, -9 y -10) y otras "efectoras" (-3, -6 y -7) del proceso apopt3tico. La activaci3n de las caspasas efectoras representa, dentro de la cascada de se alizaci3n, el punto de compromiso apopt3tico de la célula.

Las caspasas son sintetizadas como procaspasas, las cuales

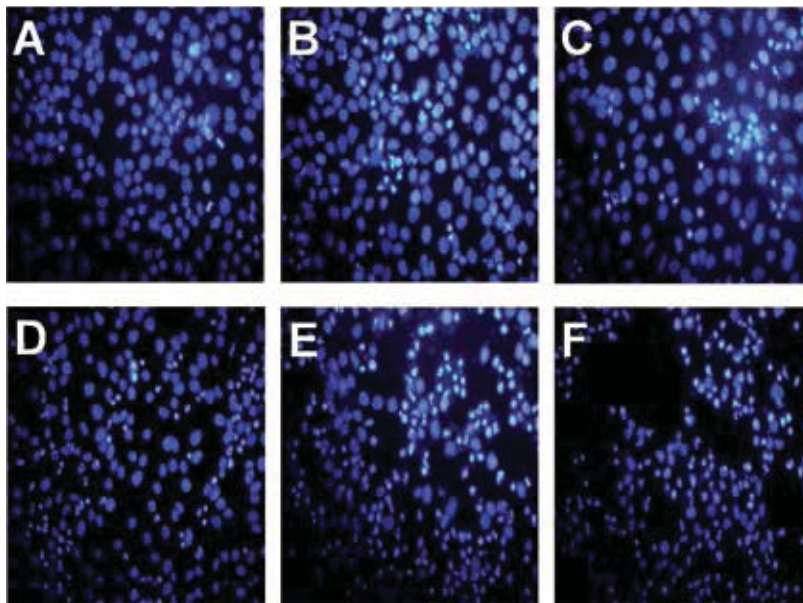


Figura 7.33. Determinación mediante tinción de Hoechst y microscopía de fluorescencia de la apoptosis tardía en células HeLa con y sin expresión transitoria de las proteínas Core de los genotipos 1b y 2c del virus hepatitis C (HCV) durante 24 h. y luego tratadas con staurosporina (STR). **A.** Células transfectadas con el plásmido control, sin el gen core. **B.** Células con expresión transitoria de Core 1b durante 42 h. **C.** Células con expresión transitoria de Core 2c durante 42 h. **D.** Células transfectadas con el plásmido control y luego de 24 h. tratadas con STR 0,75 μM durante 18 h. **E.** Células con expresión transitoria de Core 1b durante 42 h., tratadas con STR 0,75 μM (en las últimas 18 h. de expresión). **F.** Células con expresión transitoria de Core 2c durante 42 h., tratadas con STR 0,75 μM (en las últimas 18 h. de expresión). Fuente: Minassian ML: tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.2009.

son posteriormente procesadas mediante clivaje y subsiguiente oligomerización para constituir sus formas activas tetraméricas. El dominio NH_2 -terminal de las caspasas exhibe una longitud variable, dependiendo de la categoría funcional a la que pertenezca. Las caspasas iniciadoras de la apoptosis y las inflamatorias poseen prodominios largos (mayores a 100 aminoácidos) mientras que las caspasas efectoras de la apoptosis contienen prodominios cortos (menores a 30 aminoácidos). A su vez, los prodominios largos contienen motivos específicos esenciales para la actividad. Estos motivos pueden ser "dominios efectores de muerte" (*Death Effector Domains* [DEDs]) o "dominios de reclutamiento de caspasas" (*Caspase Recruitment Domains* [CARDs]). Los mismos median las interacciones entre las caspasas y una variedad de moléculas adaptadoras involucradas en la señalización celular. Las caspasas que contienen dominios DED son caspasas iniciadoras, mientras que las caspasas que contienen dominios CARD pueden ser caspasas iniciadoras o caspasas inflamatorias.

La inducción de la apoptosis a través de los mecanismos de muerte extrínsecos o intrínsecos resulta en la activación de las caspasas iniciadoras de la apoptosis. Los receptores de muerte (DRs o *Death Receptor*, en inglés), a través de moléculas adaptadoras, reclutan a las caspasas iniciadoras -2, -8 o -10; mientras que las señales de muerte intrínseca resultan en la activación de la caspasa-9. La activación de las caspasas iniciadoras constituye el primer paso de una vía proteolítica altamente regulada, irreversible y retroalimentada. Estas caspasas son capaces de clivar procaspasas y por lo tanto, capaces de activar a las caspasas efectoras (caspasas -3, -6 y -7) o de amplificar la cascada por un aumento en la activación de las caspasas iniciadoras. Las caspasas efectoras son comunes a ambas vías de muerte (extrínseca e intrínseca); por lo tanto, las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis son relativamente independientes del inductor apoptótico.

A través del procesamiento proteolítico, las caspasas pueden activar o inhibir diferentes proteínas que exhiben roles tales como la mantención de la morfología celular, la muerte celular, el metabolismo del DNA, la regulación del ciclo celular o la transducción de señales. La especificidad de las caspasas para dichos blancos resulta

en una controlada y eficiente remoción de células dañadas o prescindibles en un tejido. Así por ejemplo, la fragmentación oligonucleosomal del DNA es causada por la acción de la caspasa-3 sobre el complejo CAD/iCAD (*Caspase-Activated DNase / inactive CAD*); véase la figura 7.38. Durante la apoptosis, dicha caspasa cliva al inhibidor iCAD permitiendo que la nucleasa CAD corte la cromatina. Por otra parte, es conocido que las caspasas producen cambios en la morfología celular por clivaje y activación de las proteínas gelsolina y fodrina produciendo la disociación de la membrana plasmática del citoesqueleto. También pueden clivar a la proteína Rb desregulando el ciclo celular o clivar proteínas implicadas en la adhesión celular, entre otras.

5.2. FAMILIA DE PROTEÍNAS BCL-2

Como lo indica su nombre, el gen *bcl-2* fue descubierto en linfomas humanos de células B donde, por translocación cromosómica, se ubicó en yuxtaposición con los elementos potenciadores de la transcripción (*enhancers*) en el locus de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. El resultado fue la desregulación de la expresión del mismo y por lo tanto, la sobreexpresión de la proteína Bcl-2. De esta forma, *bcl-2* es considerado un proto-oncogén que prolonga la vida celular por inhibir la apoptosis.

Han sido identificadas varias proteínas homólogas a Bcl-2 en vertebrados, constituyendo la familia de proteínas Bcl-2. Esta familia incluye proteínas que pueden promover la supervivencia o la muerte celular. Las cantidades relativas o el equilibrio entre estas proteínas anti- y pro-apoptóticas influyen la susceptibilidad de las células a las señales de muerte.

Más allá de su rol en la apoptosis, la clasificación de los miembros de esta familia está basada en la presencia o ausencia de dominios con homología Bcl-2 (dominios BH). Han sido descritos cuatro dominios BH: BH1, BH2, BH3 y BH4, los cuales corresponden a segmentos α -helicoidales. Las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-W contienen los cuatro dominios, mientras que las proteínas pro-apoptóticas están caracterizadas por la pérdida del dominio BH4. Han sido identificadas dos subfamilias de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2: la familia bax (Bax, Bak,

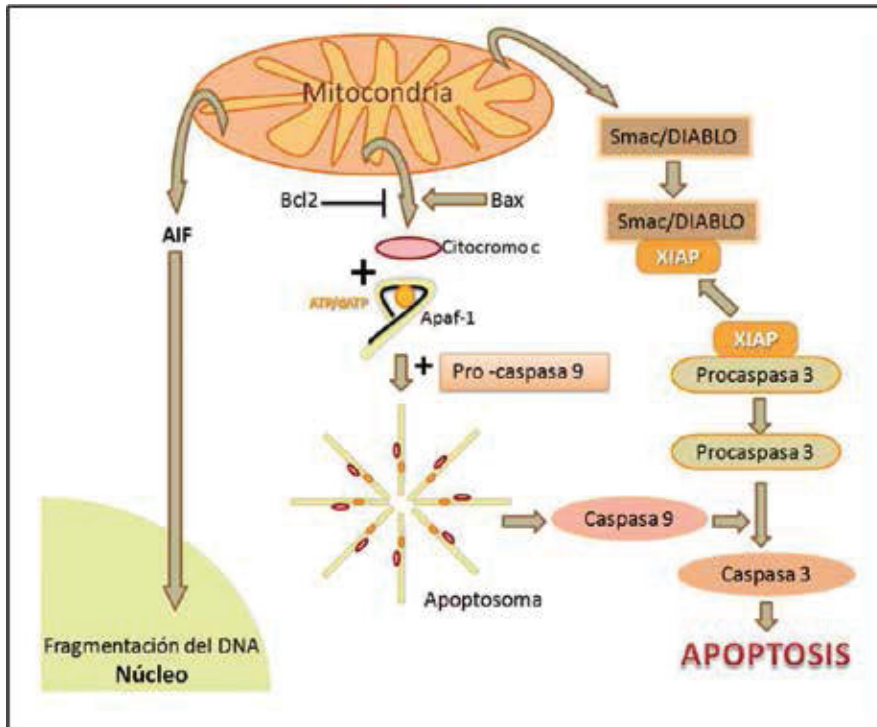


Figura 7.34. Vía intrínseca de la apoptosis. Véase el texto. Fuente: Minassian ML: tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2009.

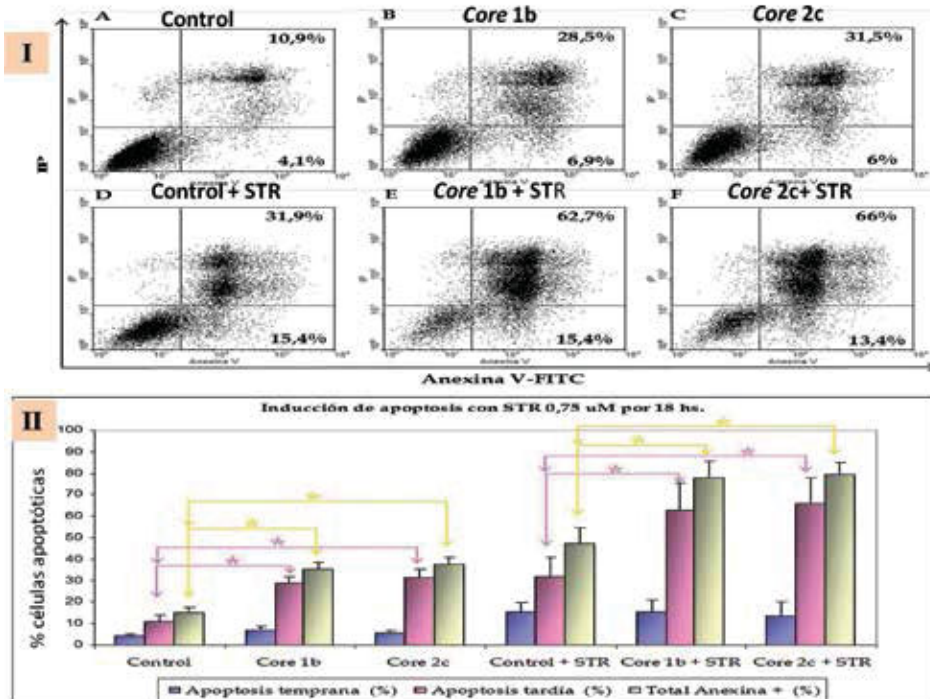


Figura 7.35. Vía intrínseca de la apoptosis. Determinación mediante marcación con Anexina V-FITC / Ioduro de propidio (IP) y citometría de flujo de la apoptosis temprana y tardía/necrosis en células HeLa con y sin expresión transitoria de las proteínas Core de los genotipos 1b y 2c del virus hepatitis C (HCV) durante 24 h. y luego tratadas con staurosporina (STR). I) **A.** Células transfectadas con el plásmido control, sin el gen core **B.** Células con expresión transitoria de Core 1b durante 42 h. **C.** Células con expresión transitoria de Core 2c durante 42 h. **D.** Células transfectadas con el plásmido control y luego de 24 h. tratadas con STR 0,75 μ M durante 18 h. **E.** Células con expresión transitoria de Core 1b durante 42 h., tratadas con STR 0,75 μ M (en las últimas 18 h. de expresión). **F.** Células con expresión transitoria de Core 2c durante 42 h., tratadas con STR 0,75 μ M (en las últimas 18 h. de expresión). Se muestran los porcentajes de células en apoptosis tardía/necrosis (cuadrante superior derecho) y en apoptosis temprana (cuadrante inferior derecho) en los gráficos de fluorescencia emitida por IP en función de la fluorescencia emitida por Anexina V-FITC. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. II) Comparación de porcentajes de células en apoptosis temprana, tardía/necrosis y apoptosis total determinada mediante marcación con Anexina V-FITC / IP y citometría de flujo correspondientes a las imágenes del cuadro superior (I). * $p < 0,05$.

Bok) que contienen los dominios BH1, BH2 y BH3; y la familia "BH3-only" (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa y PUMA) que -como su nombre lo indica- sólo contienen el dominio BH3. Se presume que este dominio es un dominio de muerte crítico en los miembros pro-apoptóticos. Muchos miembros de la familia Bcl-2 contienen un dominio hidrofóbico en el extremo COOH-terminal (dominio TM) que permite la inserción de la proteína en la cara citosólica de membranas intracelulares. No todas las proteínas de la familia Bcl-2 poseen dominios TM.

5.3. VÍA INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS

En la vía intrínseca de muerte celular las señales pro-apoptóticas resultan de una alteración en la homeostasis intracelular. La mitocondria es el principal sitio de iniciación intracelular aunque también ha sido implicado el retículo endoplásmico (RE). Un gran número de proteínas apoptóticas están compartimentalizadas dentro de la mitocondria, desde donde son liberadas ante una injuria apoptótica, colocándolas en proximidad con sus sitios de acción (Figura 7.34). El citocromo *c* (cyt *c*) -normalmente localizado en el espacio intermembrana de la mitocondria- es liberado al citosol donde interactúa con Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*, o Factor 1 activador de proteasas apoptóticas, ATP/dATP, y caspasa-9 para formar el "apoptosoma". Apaf-1 contiene un dominio CARD, a través del cual interactúa con la caspasa-9. En presencia de cyt *c* y ATP/dATP, Apaf-1 experimenta un cambio conformacional que permite su auto-agregación. Esto expone el dominio CARD induciendo el reclutamiento de la procaspasa-9 y su subsiguiente activación proteolítica. Luego, la caspasa-9 puede activar directamente a las caspasas -3 y -7, resultando en una muerte ordenada a través de controlados clivajes proteolíticos de varias dianas corriente abajo. Smac/DIABLO (*Second Mitochondrial Activator of Caspases /Direct IAP-Binding protein of LOw isoelectric point [pI]*) y Omi/HtrA2 (*Omi stress-regulated endoprotease/High Temperatura Requirement protein A2*) también son liberados desde la mitocondria al citosol en respuesta a un estímulo apoptótico. Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 se unen a los dominios BIR (*Baculovirus IAP Repeat*) presentes en las proteínas inhibidoras de la apoptosis IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) eliminando su efecto inhibitorio sobre la actividad de las caspasas.

Otro factor implicado en la apoptosis es el AIF (*Apoptosis Inducing Factor*). Este factor inductor de la apoptosis es una flavoproteína mitocondrial que se transloca al núcleo luego de un estímulo apoptótico, donde induce la fragmentación parcial del DNA y la condensación de la cromatina. De igual forma actúa la endonucleasa G (Endo G) luego de ser liberada al citosol. **AIF y Endo G promueven la apoptosis independientemente de la activación de caspasas.**

A modo de ejemplo, se incluyen imágenes de apoptosis celular inducida por la vía intrínseca, como consecuencia de la expresión *in vitro* del gen *core* del virus hepatitis C en células HeLa (Figura 7.35).

5.3.1. Rol de las proteínas de la familia Bcl-2 en la regulación de la apoptosis

La permeabilización de la membrana mitocondrial (PMM) es considerada como "el punto de no retorno" dentro de la cascada de eventos que llevan a la muerte celular programada. La PMM afecta tanto a la membrana mitocondrial interna como externa, culminando en la liberación de factores apoptogénicos que normalmente están confinados al espacio intermembrana de la mitocondria, incluyendo los activadores de caspasas (como cyt *c*) y los efectores de muerte independiente de caspasas (como AIF).

Las proteínas de la familia Bcl-2 (anti- y pro-apoptóticas) regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. Los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 pueden inducir la PMM, mientras que los miembros anti-apoptóticos preservan la integridad mitocondrial, bloqueando de esta manera la liberación de las proteínas solubles de intermembrana. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el aumento en la PMM asociada con la muerte celular: 1) la señal de muerte puede activar a las proteínas

pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, las cuales se pueden movilizar desde el citosol a la membrana mitocondrial externa (Bax, Bid) o experimentar cambios conformacionales (Bak) para promover la formación de grandes canales homo- o hetero-multiméricos a través de los cuales son liberados los factores apoptogénicos; 2) los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 activados pueden interactuar con componentes del complejo del poro de transición de la permeabilidad (PTPC, *Permeability Transition Pore Complex*) favoreciendo (o inhibiendo) la permeabilidad transitoria de la membrana mitocondrial interna, lo que conduce a la ruptura física de la membrana mitocondrial externa. Estos dos mecanismos no necesariamente son mutuamente excluyentes.

Luego de una variedad de señales de muerte, las proteínas que sólo exhiben un dominio BH3 (en inglés, "BH3-only") experimentan modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, desfosforilación, clivaje proteolítico), resultando en la activación y movilización de dichas proteínas a la membrana mitocondrial donde ejercen sus funciones biológicas. Las moléculas "BH3-only" (como Bid, Bim, Bad y Noxa) requieren de Bax y Bak para ejercer sus actividades pro-apoptóticas mitocondriales.

Bax y Bak difieren en su localización intracelular antes del estímulo de muerte celular. Mientras que Bak es una proteína integral de la membrana mitocondrial externa, Bax reside como monómero en el citosol de las células viables. La activación de Bax conduce a su reubicación e integración en la membrana mitocondrial externa (luego de experimentar un cambio conformacional que expone los extremos NH₂- y COOH-terminal) donde forma complejos homo-oligoméricos que resultan en poros por donde son liberados los factores apoptogénicos. La oligomerización de Bax luego de su inserción mitocondrial gatilla un cambio conformacional en Bak provocando su homo-oligomerización. La oligomerización y/o activación de Bax y Bak puede ser también inducida por la proteína pro-apoptótica "BH3-only" truncada Bid (tBid). Dicha proteína también puede insertarse en la membrana mitocondrial. La disrupción de la membrana mitocondrial por las proteínas Bax y tBid puede ocurrir también por un mecanismo independiente de caspasas.

La proteína anti-apoptótica Bcl-2 previene la translocación citosólica-mitocondrial de Bax, la oligomerización de Bax y Bak en la membrana mitocondrial y la inserción de tBid, al interactuar con ellas formando heterodímeros neutralizando sus actividades pro-apoptóticas. Por otro lado, el gen *bcl-x* puede generar dos proteínas por un mecanismo de "splicing" alternativo: Bcl-X_L (forma más larga [*longer*]) y Bcl-X_S (forma más corta [*shorter*]). Ambas proteínas tienen funciones antagónicas, mientras Bcl-X_L promueve la supervivencia celular, Bcl-X_S activa la apoptosis al unirse a Bcl-2 previniendo de esta manera la interacción de esta última con Bax, la cual puede ejercer de esta manera sus funciones pro-apoptóticas. En presencia de señales de supervivencia, Bad se encuentra fosforilada y secuestrada en el citosol al interactuar con la proteína 14-3-3-. Frente a un estímulo apoptótico, Bad es desfosforilada librándose de dicha interacción y pudiendo así ejercer sus actividades pro-apoptóticas. Bax también presenta una regulación negativa por la proteína 14-3-3- y su disociación puede ocurrir tanto por mecanismos dependientes o independientes de caspasas.

También se ha postulado que los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 como Bax y Bak causan la apertura del poro del PTPC mientras que los miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 y Bcl-X_L favorecen el cierre de estos canales. La apertura de los poros de transición de la permeabilidad causa la disipación del potencial de transmembrana mitocondrial provocando un influjo de fluidos dentro de la mitocondria. Se ha postulado que el resultado es la ruptura de la membrana mitocondrial externa y la liberación de las proteínas pro-apoptóticas. Sin embargo, se ha demostrado que la liberación de cyt *c* ocurre antes de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial.

5.3.2. Rol de las proteínas c-IAPs en la regulación de la apoptosis

En las células normales que no hubieran recibido estímulos apoptóti-



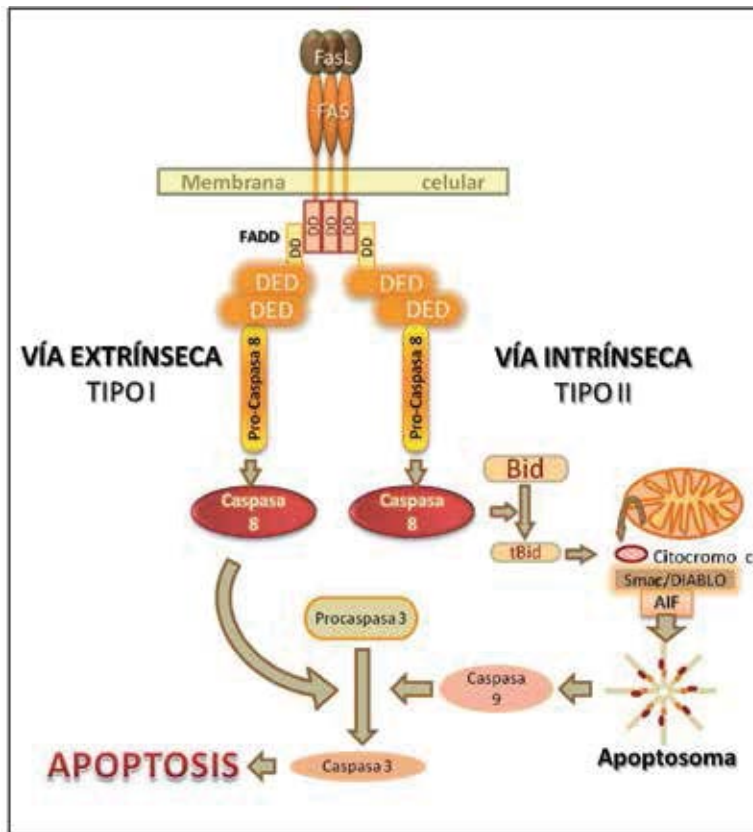


Figura 7.36. Vía extrínseca de la apoptosis mediada por Fas. Obsérvese la relación entre las vías extrínseca e intrínseca. Véase el texto. Fuente: Minassian ML: tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2009.

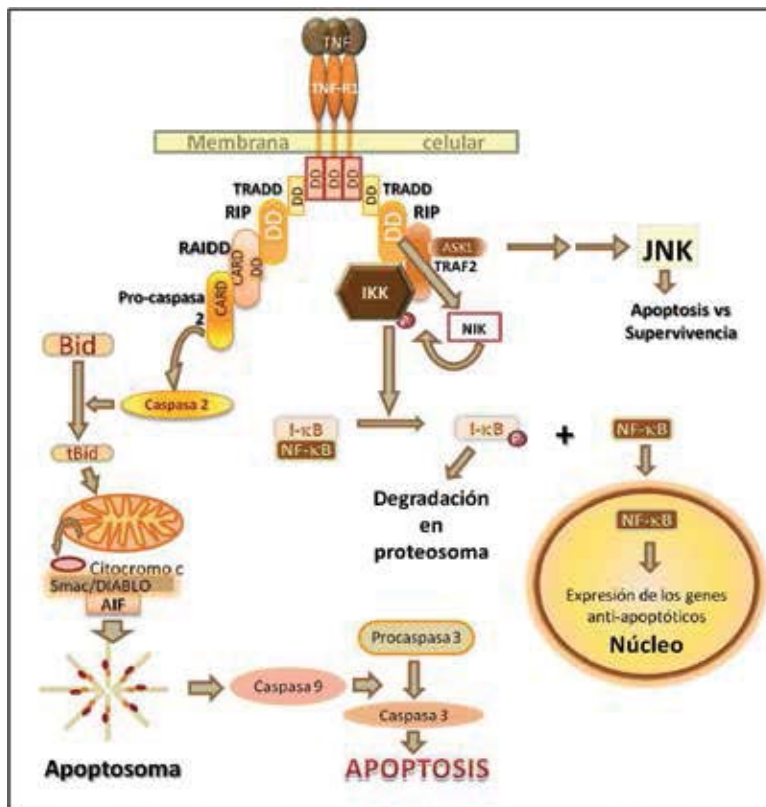


Figura 7.37. Vía extrínseca de la apoptosis mediada por TNF-α. Véase el texto. Fuente: Minassian ML: tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2009.

Granzima	A	B	H	K	M
Expresión					
CD8 ⁺ CTL	++	++	+	+	
CD4 ⁺ CTL	+	+			
CD4 ⁺ Tregs	-	+			
NK	+	+/-			+
Células mieloides	-	+			
Características comunes					
Rápida pérdida de la integridad de la membrana plasmática*	+	+	+	+	?
Traslocación de fosfatidil serina al lado externo de la membrana plasmática	+	+	+	+	?
Condensación de la cromatina	+	+	+	+	?
Daño del DNA nuclear	+	+	+	+	?
Despolarización mitocondrial	+	+	+	+	?
Activación de las caspasas	-	+	-	-	?
Tipo del daño del DNA					
Fragmentación oligonucleosómica del DNA	-	+	-	-	?
Cortes en el DNA de cadena única	+	-	+	+	-
Marcación con TdT (terminal d-transferasa)	+	+	+	+	?
Marcación con el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa	+	+	+	+	-?
Tipo de daño mitocondrial					
Inhibición mediante sobre-expresión de Bcl-2	-	+	?	?	?
Liberación del citocromo c	-	+	+	?	?
Hinchazón mitocondrial	+	+	++	+	+
Autofagia	-	-	-	-	+?

Tabla 7.10. Características de las diferentes vías de muerte celular inducida por las granzimas. *: Medida mediante captación de yoduro de propidio y citometría de flujo. **: Medida mediante tinción con anexina V y citometría de flujo. Fuente: Chowdhury D & Lieberman J.; *Annual Reviews in Immunology*, 26:389-420, 2008.

cos, la activación aberrante de las caspasas se encuentra inhibida por las IAP (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*). Las primeras IAP fueron identificadas en el genoma de los baculovirus (virus de insectos), al observarse su capacidad de suprimir la apoptosis en células de insectos infectadas. Las proteínas humanas c-IAP₁, c-IAP₂ y XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis*) homólogas a las IAP de los baculovirus, contienen en su extremo NH₂-terminal dominios BIRs (*Baculovirus IAP Repeats*) mediante los cuales se unen e inactivan las caspasas efectoras -3 y -7 y la caspasa-9. Las c-IAP poseen una forma dual de impedir la función de las caspasas, a través del bloqueo de sus sitios activos y mediante su ubiquitinación conduciendo a su degradación proteosomal. Este último sería un mecanismo de seguridad contra el escape de caspasas (activadas espontáneamente) a la inhibición directa de las c-IAP en células no apoptóticas. Las c-IAP contienen un dominio con actividad de ubiquitina-ligasa, que cataliza la ubiquitinación de las caspasas, así como de sí mismas y –por ende– su degradación por la vía del proteasoma ante estímulos inductores de apoptosis. Las c-IAP también podrían inhibir la apoptosis inducida por la interacción del TNF- α y su receptor (TNFR), debido a que interactúan mediante sus BIR con los factores asociados al TNFR: TRAF1 y TRAF2 (ver ítem 5.2.2).

La expresión de los genes codificantes para las c-IAP es directamente estimulada por el factor de transcripción NF- κ B. Los mecanismos centrales de supresión apoptótica de las c-IAP operan mediante inhibición de caspasas y mediante modulación del factor de transcripción NF- κ B. Las c-IAPs son inducidas por NF- κ B y a su vez –a través de su interacción con TRAF1 y TRAF2– pueden

potenciar la activación de NF- κ B, formando un bucle de retroalimentación positiva. Por otra parte, las proteínas pro-apoptóticas Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 –una vez liberadas desde la mitocondria tras un estímulo apoptótico– se unen a los dominios BIR presentes en las proteínas inhibidoras de la apoptosis c-IAP eliminando su efecto inhibitorio sobre la actividad de las caspasas.

5.4. VIA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS

En la vía extrínseca, la señal letal proviene del medio extracelular. Los receptores de muerte (DRs) pertenecen a la superfamilia de receptores del TNF (TNFR). Transmiten sus señales de muerte luego de la unión con sus respectivos ligandos de muerte. Los miembros de la familia mejor caracterizados son los receptores para Fas (o Apo1) y TNFR-1, aunque también se conocen los receptores DR3 (o Apo3), DR4, DR5 (o Apo2) y DR6. Estos receptores de membrana están caracterizados por poseer dominios extracelulares ricos en Cisteína (*Cysteine-Rich Domains* [CRD]) y dominios intracelulares de muerte (*Death Domains* [DDs]). Luego de la unión receptor-ligando, se produce la auto-asociación del receptor y su subsiguiente activación donde –mediante la interacción de los DDs– son reclutadas otras proteínas que contienen los mismos dominios y funcionan como moléculas adaptadoras dentro de la cascada de transducción de señales.

5.4.1. Señalización mediada por Fas/FasL

La interacción Fas-FasL promueve el reclutamiento de la proteína

citósica FADD (*Fas-Associated Death Domain protein*), la cual además de los dominios DDs contiene un dominio NH₂-terminal DED responsable de su asociación con otras proteínas que contienen el mismo dominio como las caspasas -8 y -10 (Figura 7.36). El complejo formado por Fas, FasL, FADD y la caspasa-8 ó -10 es llamado DISC (*Death-Inducing Signaling Complex, o complejo de señalización inductor de muerte*). La activación de estas caspasas iniciadoras lleva a la ejecución de la apoptosis por clivaje de sustratos corriente abajo. Se han identificado dos tipos de células según la vía de señalización de Fas utilizada. Las células tipo I requieren la activación de caspasa-8, la cual activa a la caspasa-3. En las células tipo II, la limitada activación de la caspasa-8 conduce a una vía de amplificación mediada por la activación mitocondrial. En esta última vía, la caspasa-8 media el clivaje y activación de la proteína Bid. Luego Bid induce la liberación de los factores apoptogénicos mitocondriales con la subsiguiente activación de la vía intrínseca de la apoptosis

5.4.2. Señalización por TNF- α /TNF-R1

La unión del ligando TNF- α con el receptor TNF-R1 (Figura 7.37) promueve la disociación de la proteína SODD (*Silencer Of Death Domains*) de la porción citoplasmática del receptor, permitiendo así el reclutamiento de la proteína adaptadora TRADD (*TNF Receptor-Associated DD*). Luego de su asociación, TRADD puede interactuar con FADD, TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor-2*) y RIP (*Receptor-Interacting Protein*). La interacción con FADD induce la apoptosis por una vía similar a la de Fas. El TNF también puede inducir la apoptosis mediante su interacción con los DDs de las proteínas RIP y RAIDD/CRADD (*RIP-Associated ICH-1/Ced-3 homologous protein with DD/Caspase and RIP Adaptor with DD*). RAIDD contiene un dominio CRAD a través del cual puede interactuar con la caspasa-2 para inducir la apoptosis. La caspasa-2 activada promueve el clivaje de Bid, el cual induce la liberación de los factores pro-apoptóticos mitocondriales como *cyt c*, Smac/DIABLO y AIF, activando consiguientemente la vía intrínseca de la apoptosis (aunque parecería existir una vía alternativa independiente de Bid).

El reclutamiento de TRAF2 por TRADD puede producir la activación de NF- κ B y JNK. La activación de JNK puede inducir la apoptosis o la supervivencia dependiendo del tipo celular y la presencia o ausencia de especies reactivas de oxígeno.

La activación de NF- κ B -que ocurre tras la degradación proteosómica de su inhibidor I- κ B (*Inhibitor of NF- κ B*)- protege a las células de la apoptosis inducida por TNF ya que al translocarse al núcleo controla la expresión de las proteínas c-IAP.

5.4.3. Señalización mediada por perforinas y granzimas

Esta vía es empleada tanto por la respuesta innata (por ejemplo, células NK), como la adaptativa (CTL CD8⁺, CTL CD4⁺ [usualmente del linaje Th1], y aun ciertas Treg). Para ello, el organismo humano dispone de un mecanismo de liberación exocítica de proteínas con capacidades proteolíticas diversas que culminan en la muerte celular programada.

Las perforinas son utilizadas habitualmente como vehículo para enviar los gránulos citotóxicos que también contienen granzimas (abreviado, Gzm: enzimas [serina-proteasas] contenidas en gránulos) y que son direccionados hacia la célula diana en la que promoverá la actividad pro-apoptótica, al menos mediante tres vías (véase más adelante). Para ello, inicialmente los gránulos se dirigen dentro de la célula citotóxica hacia el lugar donde se produce la sinapsis inmune entre ésta y la célula diana, fusionándose inicialmente la membrana conteniendo el gránulo citotóxico con la membrana plasmática de la célula donde se sintetizó. Posteriormente, se libera el contenido del gránulo en el "valle sináptico" para alcanzar la célula diana. Diversas moléculas como HSP70 y otras, pueden potencialmente ser también utilizadas como transporte y promover el efecto citolítico mediado por Gzm.

Las Gzm poseen una importante función en la respuesta

citotóxica frente a patógenos intracelulares y ante tumores. Recientemente, también se ha demostrado su relevancia en la regulación de la sobrevivencia de los LT, en la tolerancia inmunológica, así como en eventos inflamatorios, y a nivel del compartimiento extracelular, favoreciendo la migración linfocitaria, al producir la proteólisis de proteínas extracelulares o de receptores de superficie. Hasta el presente, se han descubierto 5 Gzm humanas: A, B, H, K y M las que exhiben elementos en común y diferenciales en la inducción de la apoptosis (Tabla 7.10). Las Gzm A y B son las más abundantes, y esta última la más estudiada. La Gzm B cliva proteínas -al igual que las caspasas- luego del reconocimiento de residuos de ácido aspártico (D), la Gzm A y la Gzm K actúan como triptasas, y la H como la quimi tripsina, clivando proteínas luego de aminoácidos aromáticos.

Sólo la Gzm B promueve la apoptosis mediante la actividad de las caspasas.

A continuación sólo se hará una breve referencia a algunos de los aspectos más salientes indicados en la Tabla 7.10.

Granzima A. Esta proteasa dimérica promueve la muerte celular, indistinguible de la apoptosis, aunque sin participación de las caspasas. Las células mueren rápidamente con afectación mitocondrial y disrupción de la membrana plasmática, seguidos de traslocación de fosfatidil serina al lado externo de la membrana plasmática (revelado mediante tinción con Anexina V) y daño del DNA (cortes en hebras de cadena simple, que producen fragmentos de megabases, en contraposición con los pequeños fragmentos internucleosómicos producidos por la granzima B). **El daño mitocondrial no se traduce en la permeabilización de su membrana externa (MOMP: Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization)**. Sin embargo, el daño mitocondrial es la principal causa de muerte celular. Esta granzima es transportada desde el citosol a la matriz mitocondrial posiblemente a través de chaperonas, donde cliva un componente del complejo I de la cadena de transporte de electrones, lo que afecta el potencial redox, la generación de ATP y la mantención del potencial de transmembrana $\Delta\psi_m$, a la vez que promueve la generación del ion superóxido. Éste conduce a un complejo de respuesta de estrés oxidativo asociado al RE (denominado complejo SET) al núcleo donde promueve el daño del DNA. El complejo SET consta de 3 nucleasas, 1 proteína de unión al DNA dañado y 2 proteínas modificadoras de la cromatina. Este complejo tiende a detectar daños en el DNA y repararlo. Sin embargo, la Gzm A al clivar a un inhibidor de la endonucleasa, permite generar el daño del DNA, que luego se extiende por acción de una exonucleasa contenida en el complejo SET. Asimismo, la Gzm A inactiva el complejo de reparación de bases escindidas del DNA (BER, *Base Excision Repair*) y otros sistemas de reparación del genoma. Finalmente, Gzm A es capaz de promover la apertura de la cromatina en el núcleo, al clivar la histona H-I y remover los extremos de otras histonas, lo que torna más susceptible al DNA celular a la acción de las nucleasas, al tiempo que disrumpe la laminina de la envoltura nuclear.

Granzima B. Esta proteasa promueve la apoptosis mediante la actividad de las caspasas, pero también en un modo independiente de ellas, ya que muchos de los sustratos de ambas se yuxtaponen por reconocerse en ambos casos residuos de ácido aspártico. **Gzm B cliva Bid y la DNAsa iCAD (inactive Caspase Activated DNase)**, lo cual genera bid truncado (tBid) y CAD, respectivamente, lo que -a su vez- producirá el daño mitocondrial e internucleosómico (Figura 7.38). Esta última acción se yuxtaponen con la de la caspasa-3. Entre las moléculas diana se encuentran la tubulina, PARP-1, laminina B, etc., adicionándose otros sustratos semejantes a los reconocidos por las caspasas -6, -8 y -9. La Gzm B (al igual que las caspasas) promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la afectación del potencial de transmembrana mitocondrial $\Delta\psi_m$ y MOMP lo cual libera *cyt c* y otras moléculas proapoptóticas tales como Smac/DIABLO desde el espacio intermembrana.

Granzima H. Esta proteasa promueve la muerte celular independiente de caspasas, asociada al daño mitocondrial (sin afectarse la liberación del *cyt c*) y la fragmentación nuclear (sin participa-

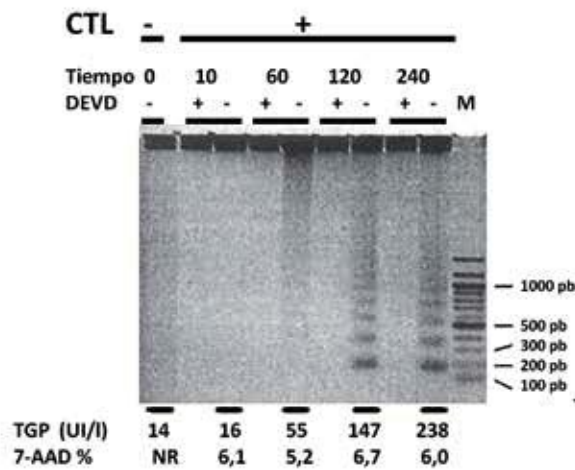


Figura 7.38. Evolución temporal de la apoptosis promovida por CTLs en células que expresan antígenos de HBV. El clivaje del DNA cromosómico a nivel internucleosómico de la célula diana reconocida por el CTL acaece por la actividad de una DNAsa activada por la caspasa 3, luego de ser activada por la vía extrínseca de la apoptosis, lo que promueve la formación de fragmentos "en escalera". Un clon de LT CD4⁺ específico para el HBs Ag induce apoptosis de hepatocitos de ratones transgénicos para HBV. El DNA cromosómico fue preparado a partir de mezclas de células adherentes y no adherentes y de detritus de cultivos de hepatocitos no tratados o de cultivos hepatocíticos durante períodos variables de tiempo con el clon de CTL con y sin un inhibidor irreversible de la caspasa 3, Z-DEVD -FMK (DEVD). El DNA fue fraccionado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. M: marcador de tamaño molecular en escalera de 100 pares de bases (pb) TGP: transaminasa glutámico-pirúvico, cuyo nivel en el sobrenadante se expresa en UI/I. El porcentaje de células CD8⁺ en la fracción de células no adherentes se indica al pie (7-AAD %). Fuente: Pasqueto V *et al.* *Journal of Virology*, 74: 9792-96, 2000. Reproducido con autorización.

ción de CAD). Gzm H parecería ejercer un efecto redundante con la Gzm B. Algunos virus como los adenovirus, han desarrollado mecanismos de inactivación de Gzm B, pero la infección puede ser limitada tempranamente por la actividad de Gzm H presente en las NK, antes de la participación de la respuesta adaptativa mediada por CTL que poseen Gzm B.

Granzima K. Esta proteasa monomérica, parecería duplicar la actividad proteolítica nuclear promovida por la Gzm A. Sin embargo, no se ha establecido si a nivel mitocondrial se comporta como la Gzm A (disfunción sin MOMP: ROS y diferencias en el potencial de membrana $\Delta\psi_m$ pero sin liberación de cyt c) o como la Gzm B (alteración mitocondrial con MOMP) o si es un mecanismo híbrido de ambas.

Granzima M. Esta proteasa que cliva luego de residuos de Leu o Met está principalmente asociada a la inmunidad innata, ya que está presente fundamentalmente en células NK y LT $\gamma\delta$. Aún no se ha establecido si esta granzima actúa como la Gzm B o si utiliza nuevas vías.

6. CONTROL DE LA INFECCIÓN VIRAL

En una sinfonía no todos los instrumentos son ejecutados simultáneamente. En modo análogo, ante una infección viral intervienen diversos componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa influidos por su específica distribución témporo-espacial. En este capítulo se ha descripto parceladamente la participación de algunos elementos solubles y figurados de la respuesta inmune. Sin embargo, el lector deberá imaginar la simultaneidad con que acontecen varios de los procesos hasta aquí expuestos.

Los virus han evolucionado para persistir en la naturaleza.

Como contrapartida, la respuesta inmune innata y adaptativa del ser humano debe poder sobreponerse a la infección viral. Para ello, ha desarrollado múltiples y eficaces sistemas que responden tempranamente a ella, y que pueden protegerlo por períodos prolongados. Dado que los virus pueden evadirse de la acción de algunos de ellos, los mecanismos de defensa antiviral son muchas veces redundantes, con el objeto de ofrecer un sistema de resguardo. Así, -a modo de ejemplos- ante la eventual inactivación de la vía clásica del sistema complemento, existe la vía alternativa o el sistema de colectinas; la secreción de IFN- γ puede estar producida por células NK, por LT $\gamma\delta$ o por LT $\alpha\beta$ de memoria; la fagocitosis puede ser llevada a cabo tanto por macrófagos como por polimorfonucleares, la secreción de citoquinas antivirales como IFN- γ , TNF- α , TNF- β o IL-6 puede provenir de múltiples estirpes celulares.

Una vez producida la implantación viral en la puerta de entrada al organismo (por ejemplo, la superficie del epitelio respiratorio o digestivo) y luego del reconocimiento por los RRP, se sintetizan elevados niveles de IFN- β . Éste se une al receptor y promueve la síntesis de múltiples moléculas efectoras antivirales. A su vez, sensibiliza células colindantes y distales para producir más IFN luego de producirse la infección viral. Simultáneamente, se inicia el mecanismo de transferencia de la actividad antiviral inducida por IFN a células contiguas cuya respuesta al mismo es más lenta, o está limitada por el grado de accesibilidad de aquél. La infección de leucocitos, a su vez, puede producir la liberación de IFN- α . Este interferón puede ser también liberado por dichas células en el sitio inicial de implantación viral, una vez que las mismas confluyen a esta zona. El IFN- α difunde hacia la circulación con mayor eficacia que los tipos β y γ . La interferonemia puede conferir protección a órganos ubicados a distancia donde podría replicar el virus. El IFN- γ es capaz de potenciar los efectos de los tipos α y β . La resultante de dichas interacciones es la amplificación general del sistema: se producen más moléculas efectoras con actividad antiviral y se potencian otros mecanismos defensivos mediados por la activación de células NK y macrófagos y de citotoxicidad mediada por anticuerpos. La actividad máxima de las células NK tiene lugar a los 3 días de iniciada la infección. En segundo término, el interferón induce la expresión de moléculas CMH-I. Ello implica para estas células dos efectos inmediatos: 1) disminución de la sensibilidad a las células NK; 2) conversión a diana para los CTL CD8⁺, que aparecen aproximadamente a los 7 días de iniciada la infección. **Existe sinergismo entre el sistema IFN y los anticuerpos séricos antivirales:** la coexistencia de ambos es capaz de potenciar más de mil veces el efecto que cada uno de ellos ejercería individualmente sobre la infección.

Todas estas interacciones funcionan en plenitud si el virus continúa su replicación y diseminación a distancia a órganos blanco. Debido a la respuesta innata y adaptativa del hospedero, esta situación existe en un número limitado de casos.

Es menester subrayar, sin embargo, que el IFN no es la única ni la más importante causa de recuperación de una infección viral. Si así fuera, la producción del mismo ante una primera infección sistémica, o bien ante la administración de una vacuna viral atenuada, debería conferir protección contra cualquier virus no relacionado, al menos durante un cierto lapso de tiempo. Sin embargo, este fenómeno no ocurre generalmente. Sólo parecería ser responsable de cierta protección temporal al ocurrir infecciones por un virus en el tracto respiratorio o digestivo frente a otros agentes que penetran por la misma puerta de entrada. Esto sugiere una limitación témporo-espacial del efecto del interferón: su principal mecanismo antiviral sería la protección de células vecinas a las del sitio inicial de implantación viral durante un período restringido de tiempo. A la interferencia ejercida sobre la replicación viral por el sistema Interferón, debe añadirse el silenciamiento transcripcional promovido por los RNAsi, utilizando el RISC para el subsiguiente clivaje de RNAs virales.

La respuesta inmune específica es una función de la actividad de linfocitos *específicamente comprometidos*, que son estimulados por las CD en los órganos linfoides secundarios desde don-



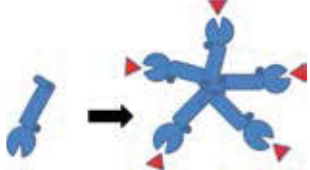
Grupo de galectinas	Ejemplos	Valencia	Estructura
Prototípicas	Galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, y -15	Divalentes al dimerizarse	
Con repetición en tándem	Galectina-4, -6, -8, -9 y -12	Intrínsecamente divalentes	
Quimérica	Galectina-3	Monovalente en solución; multivalente luego de unirse a sus glicoligandos	

Tabla 7.11. Clasificación de las galectinas según su estructura y valencia.

de pueden migrar hacia los diversos sitios del organismo donde son requeridos. **La eliminación viral durante la fase aguda de la infección acontece como función de la actividad de los CTL CD8⁺. El balance ajustado entre dicha eliminación y la (limitada) producción de daño tisular es regulado por las Tregs. La promoción de una efectiva respuesta de anticuerpos antivirales por parte de los LB es función de los LT CD4⁺ ayudadores (Th).** Existen principios en común en la expansión clonal de estas estirpes linfocíticas, con la excepción de que mientras los LT exhiben siempre el mismo TCR que presentan las células precursoras, los LB muestran un proceso de maduración de la afinidad de su receptor B y un cambio somático que genera diversidad. La memoria inmunológica refleja la continua y duradera presencia de un número

incrementado de LB y LT precursores. **Mientras los plasmocitos (etapa final de la diferenciación del linaje celular B) producen anticuerpos persistentemente, los LT precursores no secretan producto alguno en ausencia de un subsiguiente desafío.** Idealmente, las poblaciones T de memoria persisten con elevada frecuencia en un estado parcialmente activo, que permite una rápida respuesta de funciones efectoras. La ajustada y fina regulación de la respuesta innata y adaptativa por las galectinas ha permitido no sólo comprender las bases de su homeostasis, sino también proveer potenciales dianas, para futuros ensayos terapéuticos que permitan la erradicación de infecciones virales persistentes y eviten algunas de las complicaciones autoinmunitarias asociadas a la infección por determinados virus.

Bibliografía

- Aliyari R, Ding S-W. "RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors". *Immunol Rev* 2009; 227: 176-88.
- Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. "Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens". *N Engl J Med* 2007; 357:1903-15.
- Beard MR, Helbig KJ. "Control of HCV replication: when size does not matter". *Hepatology* 2008; 47: 1092-4.
- Broering TJ, Garrity KA, Boatright NK, Sloan SE, Sandor F, Thomas WD Jr, *et al*. "Identification and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies directed against the E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus". *J Virol* 2009; 83:12473-82.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. "Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs". *Cell* 2009; 136:642-655.
- Chable-Bessia C, Meziane O, Latreille D, Triboulet R, Zamborlini A, Wagschal A, *et al*. "Suppression of HIV-1 replication by microRNA effectors". *Retrovirology* 2009; 6: 26.
- Choudhury D, Lieberman J. "Death by a thousand cuts: ranzyme pathways of programmed cell death". *Ann Rev Immunol* 2008; 26:389-420.
- Cullen BR. "Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs". *Nature* 2009; 457, 421-7.
- Diana J, Lehuen A. "NKT cells: friend or foe during viral infections?" *Eur J Immunol* 2009; 39: 3283-91.
- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. "Principles of Virology". ASM Press. 3rd. Edition, 2009.
- Goldfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. "Raising the NKT cell family". *Nat Immunol Rev* 2010; 11:197-206.
- Ghosh Z, Mallick B, Chakrabarti J. "Cellular versus viral microRNAs in host-virus interaction". *Nucleic Acids Res* 2009; 37:1035-48.
- Ibarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, *et al*. "Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin10". *Nat Immunol* 2009; 10:981-91.
- Klein MI, Bergel E, Gibbons L, Coviello S, Bauer G, Benitez A, *et al*. "Differential gender response to respiratory infections and to the protective effect of breast milk in preterm infants". *Pediatrics* 2008; 121: e1510-e1516.
- Mahajan VS, Drake A, Chen J. "Virus-specific host miRNAs: antiviral defenses or promoters of persistent infection?" *Trends Immunol* 2009; 30:1-7.
- Nandi A, Lavine CL, Wang P, Lipchina I, Goepfert PA, Shaw GM, *et al*. "Epitopes for broad and potent neutralizing antibody responses during chronic infection with human immunodeficiency virus type 1". *Virology* 2010; 396:339-48.
- Norling LV, Perretti M, Cooper D. "Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response". *J Endocrinol* 2009; 201:169-184.
- Pasquetto V, Wieland S, Chisari FV. "Intracellular Hepatitis B virus nucleocapsids survive cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis". *J Virol* 2000; 74: 9792-6.
- Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, *et al*. "Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism". *Nature* 2007; 449:919-22.
- Poli A, Michel T, Thérésime M, André E, Hentges F, Zimmer J. "CD56 bright natural killer (NK) cells : an important NK subset". *Immunology* 2009; 126:458-465.
- Rabinovich GA, Toscano M. "Turning "sweet" on immunity: galectin- glycan interactions in immune tolerance and inflammation". *Nat Rev Immunol* 2009; 9:338-52.
- Rabinovich GA, Ibarregui JM. "Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments". *Immunol Rev* 2009; 230:144-159.
- Sato S, St-Pierre C, Bhaumik P, Nieminen J. "Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble β galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)". *Immunol Rev* 2009; 230:172-87.
- Segev Y, Rager-Zisman B, Isakov N, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V, Udem S, *et al*. "Reversal of the measles virus-mediated increase of phosphorylating activity in persistently infected mouse neuroblastoma cells by anti-measles virus antibodies". *J Gen Virol* 1994; 75: 819-27.
- Serruys B, Van Houtte F, Verbrugghe P, Leroux-Roels G, Vanlandschoot P. "Llama-derived single-domain intrabodies inhibit secretion of hepatitis B virions in mice". *Hepatology* 2009; 49:39-49.
- Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, *et al*. "Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals". *Nature* 2009; 458:636-40.
- van Kooyk Y, Rabinovich GA. "Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses". *Nat Rev Immunol* 2008; 9: 593-601.
- Wasowska BA, Lee CY, Baldwin WM 3rd. "New concepts of complement in allorecognition and graft rejection". *Cell Immunol* 2007; 248: 18-30.
- Zhu J, Paul WE. "Heterogeneity and plasticity of T helper cells". *Cell Res* 2010; 20:4-12.

Evación viral a la respuesta inmune del hospedador

Verónica Lidia Mathet - José Raúl Oubiña

Los diversos mecanismos de infección, propagación y eventualmente persistencia de los virus en las células permisivas del hospedador son los que permiten a estas entidades genéticas preservar su especificidad e identidad en la perpetuidad. Para lograr establecerse en el hospedador, los virus muchas veces requieren disminuir o alterar el tenor de la respuesta inmune. Como en una hipotética batalla, tras el inicial ataque viral, el hospedador inmunocompetente pone en funcionamiento diversos mecanismos de defensa (respuesta inmune innata y adquirida) ante los que la población viral propone estrategias de contraataque o subversión (Figura 8.1).

Los virus pueden evadir la respuesta inmune mediante dos estrategias generales: ya sea evitando el reconocimiento por parte del sistema inmune o alterando los mecanismos de defensa del hospedador (Tabla 8.1).

Los virus que producen infecciones persistentes emplean estrategias diversas para lograrlo. Ejemplos de éstas están dados por los virus HIV (virus de la inmunodeficiencia humana), HBV (virus hepatitis B), HCV (virus hepatitis C), EBV (virus Epstein-Barr), y HTLV (virus de la leucemia T humana). Se ha establecido que en general los virus a DNA (con excepción del HBV) no producen infecciones persistentes asociados a una significativa viremia. Por el contrario, suelen utilizar la estrategia del camuflaje o la subversión a la respuesta inmune para lograrlo. Por el contrario, los virus a RNA habitualmente utilizan con el mismo propósito la estrategia de exhibir una veloz replicación y de mutar significativamente su genoma, asociándose con frecuencia a elevados títulos de viremia. Para persistir, los virus a RNA modulan la respuesta inmune mediante la estrategia de evasión a la presión inmune (como hacen, por ejemplo, el HIV y el HCV) o la de promover el agotamiento de

las células del sistema inmune (como ocurre con HIV y HCV en el hombre y con el virus de la coriomeningitis linfocitaria [LCM] en el modelo murino).

A continuación se mencionarán algunos de los mecanismos utilizados con mayor frecuencia por los virus para evadir la respuesta inmune del hospedador.

1. ALTERACIÓN DEL RECONOCIMIENTO POR PARTE DEL SISTEMA INMUNE

1.1. VARIACIÓN ANTIGÉNICA

Uno de los mecanismos más importantes de evasión a la respuesta inmune del hospedador es la variación antigénica. Ésta se da como resultado de la aparición de variantes genómicas ya sea por reasociación genética (denominada también reordenamiento genético), recombinación o mutaciones puntuales (Tabla 8.2).

1.1.1. Reasociación genética

Este fenómeno se produce en genomas segmentados tales como el de influenza, dando lugar al evento de cambio mayor o *shift* antigénico. En este proceso, al llevarse a cabo la infección de una célula del hospedador con dos o más variantes virales –y luego de producirse un ciclo de replicación completo– la progenie resultante puede contener fragmentos genómicos procedentes de variantes parentales diferentes, originando variantes virales nuevas. Esta estrategia permite la emergencia de nuevos subtipos o la reemergencia de otros. Un ejemplo paradigmático del primero lo constituyen las pandemias de gripe de 1957 y 1968 que resultaron de la reasociación de genes de origen

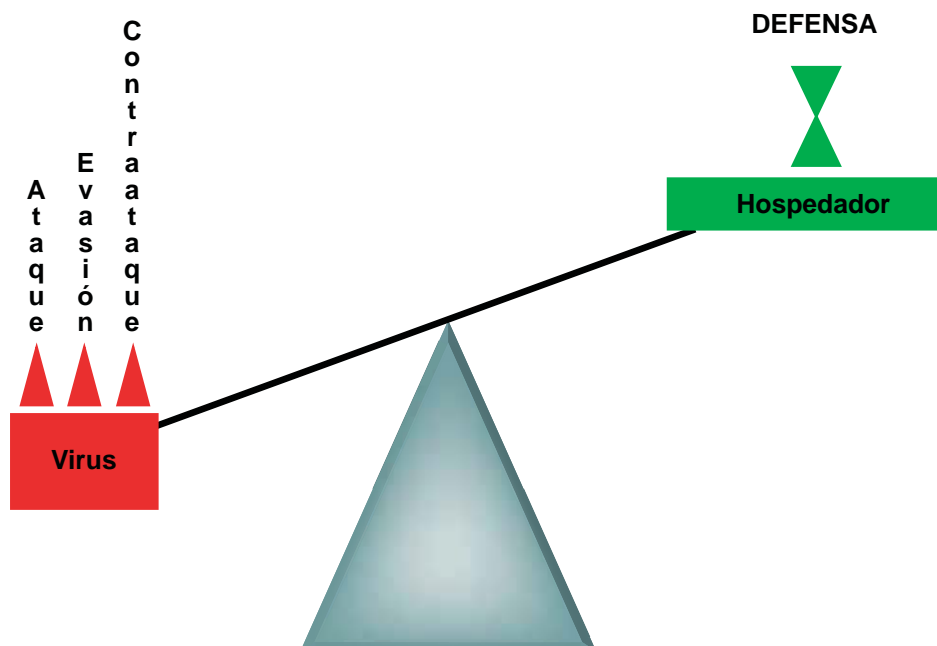


Figura 8.1. Relación entre el virus y el hospedador. En el ejemplo seleccionado, el virus logra imponerse al hospedador. Sin embargo, en múltiples infecciones, el individuo puede limitar las mismas y erradicar el agente.

Evitar el reconocimiento por el sistema inmune

1. Variación antigénica
2. Disminución de la expresión génica viral
3. Disociación temporal de la expresión génica viral

Alteración de los mecanismos de defensa del hospedador

1. Inhibición de la presentación antigénica
2. Inhibición o modificación de la actividad mediada por el sistema Interferón (IFN)
3. Modificación de la actividad mediada por otras citoquinas
4. Infección de células del sistema inmune y/o acción sobre las mismas
 - a. Agotamiento del sistema inmune
 - b. Actividad de superantígenos
5. Regulación de la apoptosis
6. Modificación de la actividad del sistema del complemento
7. Sobre-expresión de receptores para Fc y consiguiente unión de Igs
8. Interacción de proteínas virales con receptores/correceptores celulares

Tabla 8.1. Mecanismos de evasión viral: algunos ejemplos.

aviar en un contexto génico de virus influenza humano. En la primera pandemia se reasociaron los genes codificantes de proteínas de la envoltura viral hemaglutinina y neuraminidasa (H2N2) y la polimerasa básica 1 (PB1) en un contexto génico (los restantes 5 fragmentos de RNA) de virus influenza humano. En modo análogo, en 1968 dos genes de influenza de los patos (H3 y PB1) se reasociaron con genes de virus influenza humano. El actual brote de influenza aviar causado por el subtipo H5N1 del tipo A corresponde a un virus cuya totalidad de genes es de origen aviar (es decir, no exhibe segmentos genómicos reasociados). Sin embargo, la diseminación viral interhumana ha sido excepcional hasta el momento. Dado que este virus tiene una muy significativa tasa de fijación de mutaciones y que por la naturaleza segmentada de su genoma podría producirse un evento de reasociación genética con cepas de virus de influenza humano, el riesgo de una pandemia está latente (Figura 8.2).

1.1.2 Recombinación genética

El evento de recombinación genética se ha documentado en diversos virus, entre genotipos y/o subtipos diferentes del mismo agente, al producirse el salto de cadena de las respectivas polimerasas desde un templado determinado a otro de diferente genotipo o subtipo que coinfecta la misma célula. Este evento ha sido fehacientemente documentado, por ejemplo, en virus que poseen una transcriptasa inversa como HIV y HBV, y en múltiples virus

con RNA polimerasas RNA dependientes y genomas a RNA de polaridad positiva tales como algunos enterovirus, rinovirus, o HCV (muy infrecuentemente), o de polaridad negativa segmentados como influenza o –raramente– no segmentados como el virus sincicial respiratorio (RSV), etc. En Argentina se han detectado recombinantes entre los subtipos B y F de HIV (CRF12_BF), y entre los tipos A y D de HBV, cuya significación biológica aún se desconoce (Figuras 8.3A y 8.3B). También se han observado eventos de recombinación entre distintos virus de un mismo género, como por ejemplo entre virus polio derivado de la vacuna Sabin y otros miembros del género *Enterovirus* (HEV-C o especies del género *Enterovirus humano-C*). En este caso, dicho evento se asoció en 2000-2001 a la emergencia de un brote de poliomielitis en República Dominicana y Haití (derivada del serotipo 1 vacunal recombinante), a pesar de la erradicación previa del virus polio salvaje en las Américas, y también recientemente a parálisis flácida en Camboya (derivado del serotipo 3 vacunal recombinante).

1.1.3 Mutaciones

El proceso de variación genómica más frecuentemente observado es la aparición de mutaciones puntuales como resultado del proceso de replicación del genoma viral, ya sea éste a DNA o a RNA, siendo significativamente más frecuente en genomas de este último tipo. Estas mutaciones pueden o no traducirse en cambios aminoacídicos

**• Reasociación genética (reordenamiento) en genomas segmentados:**

- Influenza: *shift* antigénico (cambios mayores)

• Recombinación genética: HIV, HCV, HBV, enterovirus, rinovirus, RSV, etc.**• Mutaciones puntuales:****- Mutantes de escape a la respuesta inmune humoral:**

HIV: mutaciones en la región variable V3

HBV: mutaciones en el determinante antigénico *a* y en la región hidrofílica principal del HBs Ag

HCV: mutaciones en la región hipervariable de la envoltura E2

Influenza: *drift* antigénico (cambios menores)

- Mutantes de escape a la respuesta inmune celular:

HBV: mutaciones en epítopes del HBc Ag para LT asociadas al antagonismo para el receptor T (por ejemplo, sustituciones en el epítopo 18-27 presentado por HLA-A2) o mutaciones en epítopes de la polimerasa o de la proteína de envoltura (HBs Ag)

Tabla 8.2. Algunos ejemplos de variación antigénica viral.

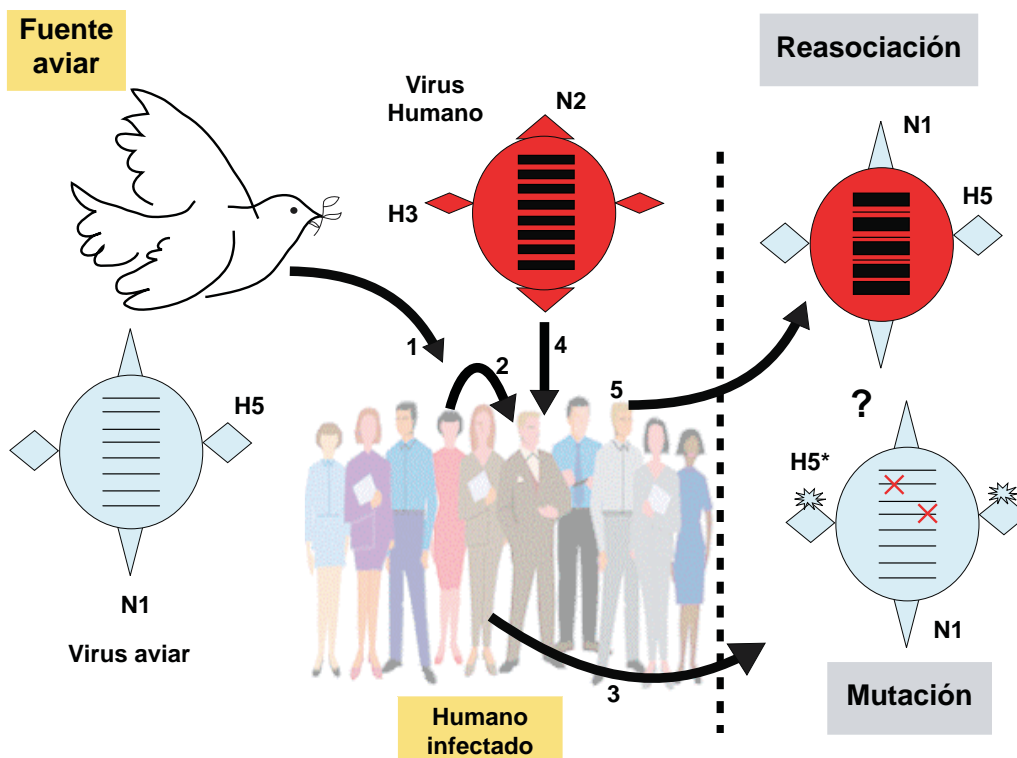


Figura 8.2. Influenza aviar y la posibilidad de una eventual futura pandemia de influenza. El brote de influenza aviar se originó por la emergencia en la población humana de un virus influenza del tipo A subtipo H5N1 (H: hemaglutinina; N: neuraminidasa) cuyo código genético es de origen totalmente aviar y que infectó a individuos en áreas inicialmente limitadas. (1) La transmisión entre humanos de este subtipo viral ha sido excepcional al comienzo del brote (2), debido a la dificultad viral para adaptarse a la nueva especie. Sin embargo, la posibilidad de que este virus alcance una mayor eficiencia de propagación interhumana está latente (línea vertical de puntos). Un escenario posible indica que el virus influenza aviar H5N1 podría adquirir esa mayor eficiencia debido a mutaciones de su genoma (por ejemplo, en el gen de la hemaglutinina H de envoltura o en los correspondientes a las proteínas de la polimerasa; [3]) o al producirse la co-infección de individuos con un virus influenza humano (por ejemplo, tipo A subtipo H3N2; [4]) y de influenza aviar, lo que puede generar un evento de reasociación genética. (5) Se desconoce (indicado con el símbolo ?) la evolución que tendrá en los próximos años esta virosis emergente. El evento de reasociación entre genes virales de origen aviar y humano ha dado origen a las pandemias de gripe que ocurrieron en 1957 (H2N2) y 1968 (H3N2). Debido a la ausencia de memoria inmunológica de la población en la que se diseminó, la reasociación genética con expresión de nuevos antígenos confirió a dichos subtipos una ventaja crucial para su propagación.

y éstos, a su vez, pueden o no afectar la funcionalidad de las diferentes proteínas virales (enzimas, epítopes antigénicos, etc.). Los antígenos virales afectados pueden ser cruciales para la respuesta inmune humoral o celular. El virus patognomónico por excelencia asociado a la generación de variabilidad es el HIV. Con su elevada tasa de fijación de mutaciones, este agente evade la respuesta inmune de un modo sorprendente. La actividad de su transcriptasa inversa carente de lectura de prueba es proclive a la introducción de errores en la polimerización del DNA a partir del templado a RNA, especialmente en regiones que se conocen como variables. Una de ellas, el así denominado V3 loop –que es blanco de la acción de los anticuerpos– exhibe una altísima tasa de fijación de mutaciones (en el orden de 1×10^{-3} nt/sitio/año), comparada con la de aproximadamente 1×10^{-4} para todo el genoma del HIV, o alrededor de 1×10^{-5} para HBV (valor que aumenta en las infecciones sin producción del antígeno soluble e [HBe Ag]; véase el capítulo 24.3: Hepatitis B), ó 1×10^{-9} de otros virus con genoma a DNA. Sin embargo, dicha tasa de fijación de mutaciones (donde predominan las no sinónimas sobre las sinónimas) es dependiente de cada hospedador, lo que sugiere que es dependiente de la presión de selección del sistema inmune de cada individuo.

Como otro ejemplo de virus asociado a infecciones que puede exhibir variabilidad antigénica, cabe destacar la emergencia de mutantes de escape a los anticuerpos neutralizantes en cepas de HBV. Estas mutaciones se registraron frecuentemente en el determinante antigénico *a* de la proteína de envoltura viral –principal

blanco de acción de los anticuerpos neutralizantes– en aminoácidos esenciales para el mantenimiento de la correcta estructura del antígeno de superficie (HBs Ag), así como en sitios críticos de la región hidrofílica principal, que –incluyendo al determinante *a* en su porción central– se extiende entre los aminoácidos 101-160 (véase el capítulo 24.3: Hepatitis B). En cepas del mismo virus también se detectaron mutaciones en epítopes necesarios para el reconocimiento por LT ubicados en el HBc Ag o la polimerasa. Estos cambios aminoacídicos impiden el correcto reconocimiento del antígeno viral por estos linfocitos y la consiguiente activación de los mismos. Un epítotope muy inmunogénico para la respuesta T citotóxica está representado por la región 18-27 del core de HBV. Mutaciones en los residuos 21 y 26 afectan al sitio de reconocimiento del receptor T (TCR) y la afinidad de la unión con la molécula HLA-2, respectivamente. Ello torna al péptido mutado ineficaz para promover una señal de activación adecuada, produciéndose en su lugar la inducción de anergia (del latín *an*: sin; *ergos*: estado) de clones T. Dado que la mayoría de los clones T no reconocen al péptido mutado, el efecto antagónico (antagonismo para el receptor T) constituye un mecanismo de evasión a la respuesta inmune. En modo análogo, la infección persistente por HCV se asocia a un permanente defecto de la respuesta inmune del hospedador por neutralizar la infectividad viral tanto a través de anticuerpos neutralizantes como mediante la cooperación entre linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. La continua presión de selección de la respuesta humoral y celular se asocia a la emergencia permanente

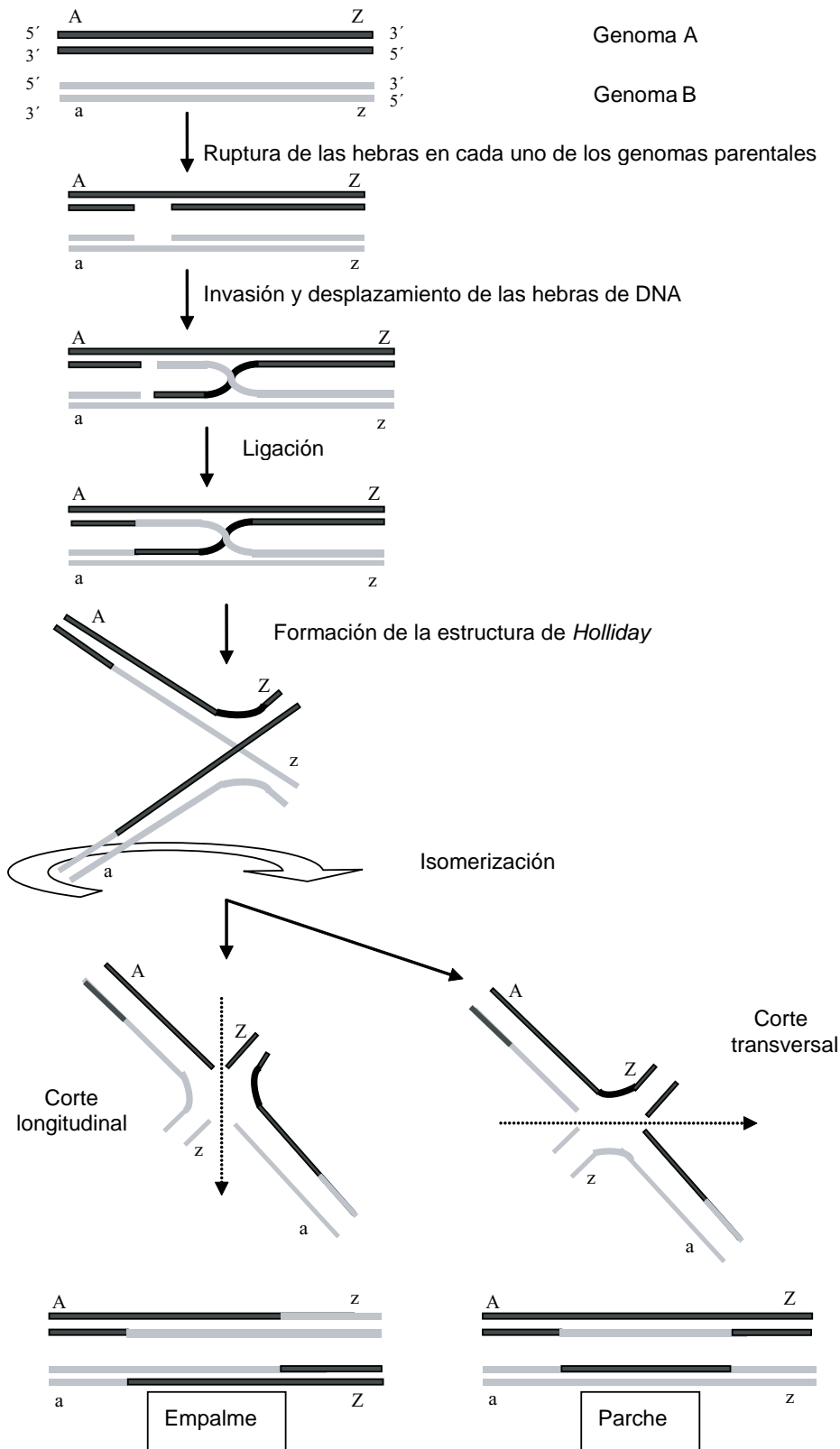


Figura 8.3A. Recombinación homóloga. La formación de la unión de Holliday (o intercambio cruzado de cadenas) se produce al alinearse dos doble hélices homólogas, en las que una de las cadenas de cada dúplex es clivada, y luego invade al otro dúplex. Estas reacciones y las subsiguientes migraciones de cadena son catalizadas por proteínas que funcionalmente actúan como recombinasas. Los sitios de corte de la unión de Holliday luego de su isomerización determinan si se produce el intercambio de pequeños fragmentos de DNA en una cadena (parche) o si se produce la recombinación de los dúplex (empalme).



Secuencia recombinante más probable:

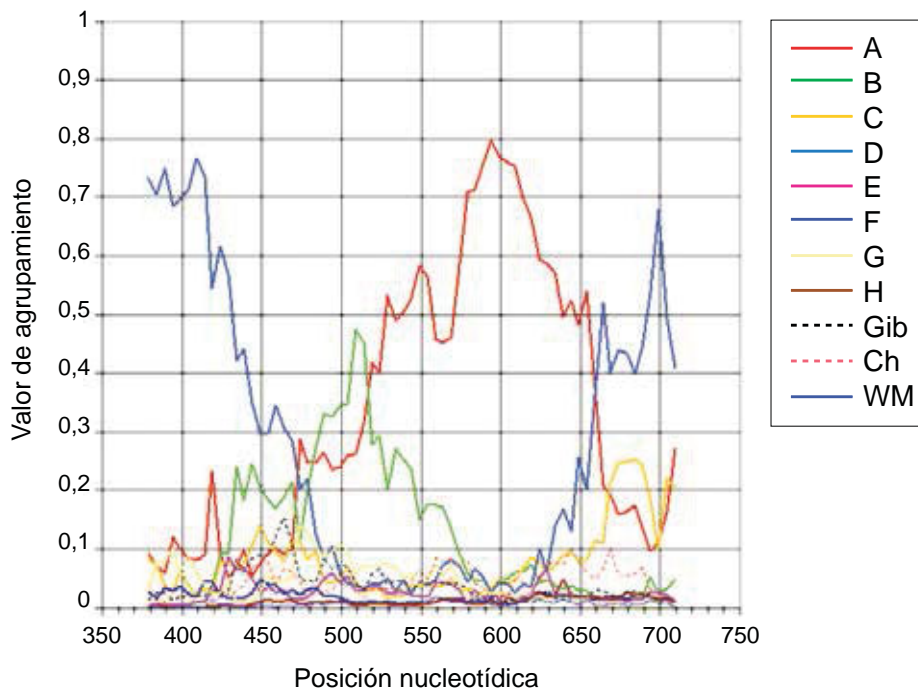


Figura 8.3B. Análisis de una secuencia parcial del gen S de un aislamiento de HBV (Rec.Arg-1) donde se evidencia un evento de recombinación entre secuencias consenso adscritas a los genotipos A y D, demostrado mediante los comandos *Similarity Plot* (arriba) y *Grouping Scan* (abajo) contenidos en los programas *Simplot* y *Simmonic Sequence Editor Package*, respectivamente. La muestra sérica fue obtenida de un paciente adulto argentino, con antecedentes de drogadicción endovenosa, con serología positiva para HBV, HCV y HIV. A-H: genotipos del HBC; Gib: HBV del gibón; Ch: HBV del chimpancé; WM: HBV del mono lanudo. El análisis en el programa *Simmonic Sequence Editor Package* fue gentilmente realizado por el Prof. Dr. Peter Simmonds (Universidad de Edimburgo, Reino Unido). Entre ambas imágenes se muestra un esquema de la secuencia recombinante más probable. Centro para el Estudio de las Hepatitis Virales. Depto. Microbiología, Fac. de Medicina, UBA.

Latencia
Flia. *Herpesviridae* (por ejemplo, HSV, EBV, etc.)
HPV
HBV en linfocitos
Adenovirus en linfocitos T
HIV en ciertos LT en reposo

Tabla 8.3. Algunos ejemplos de disminución de la expresión génica viral.

de mutantes de escape a ambas. La pregunta que aún no tiene respuesta definitiva es si la variabilidad promueve la persistencia del HCV o si es ésta la que contribuye a una mayor variabilidad.

Sorprendentemente, se ha demostrado que también el virus sincicial respiratorio (RSV) –importante causa de bronquiolitis agudas en lactantes menores de dos años– es capaz de exhibir un significativo grado de variabilidad genómica y antigénica, no sólo entre diversos aislamientos en localizaciones geográficas distantes, sino también en una misma ubicación geográfica en temporadas sucesivas. Los mecanismos que contribuyen a ello incluyen: a) la emergencia de mutantes en epítopes B; b) la generación de péptidos modificados a través de eventos de cambios de marco de lectura (*frame shifting*) mediante la inserción de un nucleótido que produce codones diferentes hasta ser subsiguientemente compensado por una delección nucleotídica; c) hipermutaciones asociadas a múltiples cambios A→G; y d) duplicaciones genómicas. Estos cambios, podrían contribuir a la escasa protección conferida por infecciones previas por RSV en sucesivas epidemias en un mismo paciente (habitualmente pediátrico).

1.2 DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA VIRAL

La disminución de la expresión génica en la fase de latencia de ciertos virus de la familia *Herpesviridae* es un mecanismo eficaz para evitar el reconocimiento por parte del sistema inmune de la célula hospedadora (Tabla 8.3). La inhibición de la producción de la progenie viral en esta fase latente implica la puesta en marcha de diferentes mecanismos por distintos virus, aun correspondientes a una misma familia viral. Ello puede abarcar desde la casi excluyente expresión de transcritos de RNA con polaridad de anti-mensajero (denominados LATs –del inglés *Latency Associated Transcripts*–) en neuronas latentemente infectadas por el virus herpes simplex (HSV), hasta la obligada síntesis de la proteína EBNA-1 para mantener el DNA en estado episomal durante la fase latente en la infección por EBV. En el primer caso, la expresión de los LATs inhibe la apoptosis neuronal, al tiempo que la ausencia de expresión significativa de péptidos virales en el contexto de moléculas del CMH-I en las neuronas (a su vez presentadoras deficientes de antígenos), garantiza la persistencia viral. La síntesis de la proteína EBNA-1 durante la fase latente de la infección por EBV en linfocitos B (y regularmente expresadas en tumores asociados a EBV) es de especial interés. Si bien su constitución rica en dominios repetidos de glicina-alanina, fue inicialmente postulada como la razón de una inadecuada degradación proteasómica, y por ende de la consiguiente evasión a la vigilancia inmune por los linfocitos T CD8⁺, el hallazgo reciente de péptidos de EBNA-1 provenientes de productos de neosíntesis ribosomal defectuosa presentados en el contexto del CMH-I, permitió revelar la existencia de linfocitos T CD8⁺ específicos. Dado que EBNA-1 debido a su dominio repetitivo glicina-alanina inhibe su propia síntesis, se ha postulado que la evasión a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ podría ocurrir debido a que no se alcanza un umbral necesario para la presentación.

La disminución de la expresión génica viral es una estrategia que puede producir efectos análogos a la inhibición de la presentación antigénica, dado que en ambos procesos se afecta el reconocimiento de péptidos virales por los linfocitos T citotóxicos (CTLs).

1.3 DISOCIACIÓN TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Otra estrategia poco convencional pero igualmente eficaz para promover infecciones persistentes en reservorios animales es la llevada a cabo por los miembros de la familia *Arenaviridae*, cuyo principal representante en nuestro país es el virus Junín, agente etiológico de la Fiebre hemorrágica argentina.

En conjunto, la disociación temporal de la expresión *in vitro* e *in vivo* de los genes N y G (codificados en el segmento S [*Small*, pequeño]) del RNA y de los genes L y Z (codificados en el segmento L [*Large*, grande]) del RNA de los arenavirus sugiere que éstos podrían permanecer temporalmente ocultos en el citoplasma celular y pasar –al menos parcialmente– desapercibidos para el sistema inmune.

Se ha demostrado que sólo cuando se sintetiza suficiente cantidad de proteína N (de la nucleocápside), la misma funciona como anti-terminadora de la transcripción y puede sintetizarse luego la glicoproteína G de envoltura. La transcripción y la replicación viral son a su vez reguladas por Z, una proteína de matriz implicada también en la brotación viral (véase la replicación de los arenavirus; capítulo 25.1). En la infección experimental murina con el virus LCM (el más estudiado de los arenavirus), esta expresión antigénica peculiar afecta la actividad de los CTLs y evita temporalmente la de los anticuerpos neutralizantes preformados.

Ratones infectados experimentalmente con LCM exhiben una expresión temporalmente diferenciada de las proteínas N (inicialmente producida) y G (subsiguientemente sintetizada). En consecuencia, N antecede en aproximadamente 8 hs. su presentación antigénica en el contexto de moléculas del CMH-I respecto a G. La diferente cinética inicial de expresión de N vs. G moldea la respuesta inmunodominante de los CTLs, ya que los linfocitos específicos para N (CTLs-N) son sensibilizados antes que los específicos para G, por lo que inician el control de la infección con cargas virales mayores que las que enfrentarán subsiguientemente los CTLs-G. Ante esta circunstancia, la sensibilización de estos últimos está afectada, ya que habrá menos células infectadas con las que podrían interactuar.

La respuesta T citotóxica temprana habitualmente elimina la mayor parte de la población viral presente en una infección determinada, pero si no logra dicho cometido y la carga viral inicial es alta, existe el riesgo de agotamiento de los CTLs, debido a la enérgica activación y subsiguiente pérdida funcional o física de los mismos (véase el ítem 4a en este capítulo). Ello ocurre con los CTLs-N generados al inicio de la infección experimental murina con LCM. Se ha observado que si bien G no es detectable más allá de los 15 días, N persiste aún después de los 80 días. Se ha postulado que la expresión diferencial de proteínas virales, debido al delicado mecanismo de autorregulación negativa del virus, favorece la persistencia viral en el ratón y que la ausencia de CTLs, observada en el modelo experimental murino contra epítopes virales específicos de LCM, es consecuencia de dicha persistencia viral y no su causa.

Asimismo, la ausencia temporal de síntesis de glicoproteínas de envoltura impide la consiguiente formación de viriones, cuya estructura externa es el blanco de acción de los anticuerpos neutralizantes formados con anterioridad. Estas estrategias, junto a la emergencia de mutantes en epítopes virales B y T y a la inhibición

de la síntesis de IFN- β , podrían contribuir en ciertas circunstancias a evadir la vigilancia inmunológica del reservorio animal natural (el ratón doméstico y el hámster para LCM) persistentemente infectado (Tabla 8.4).

El lector deberá tener presente que las conclusiones referidas en párrafos anteriores al agotamiento de los CTLs en la infección experimental persistente murina con LCM han sido extrapoladas a infecciones humanas de excepcional importancia como las producidas por HIV, HBV y HCV, aunque en ellas las causas virales asociadas a la persistencia son diferentes.

2. ALTERACIÓN DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR

2.1 INHIBICIÓN DE LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

Se ha demostrado que diversas familias de virus poseen esta estrategia de escape, que es llevada a cabo mediante la implementación de diversos mecanismos (Tabla 8.5) que –en general– podrían clasificarse en dos grandes grupos: a) la inhibición de la expresión de moléculas del CMH-I y/o CMH-II, y b) la inhibición del procesamiento antigénico (Figuras 8.4A y 8.4B).

Dentro del primer grupo, las estrategias más comúnmente utilizadas por los virus son la inhibición de la expresión de CMH-I y/o CMH-II en la superficie celular y la degradación de estas moléculas en el proteasoma; ambos mecanismos interfieren con el correcto funcionamiento de las moléculas presentadoras de antígenos.

La estrategia de inhibir la expresión de moléculas del CMH-I es habitualmente empleada en el inicio de las infecciones virales, lo que impide el reconocimiento por parte de los LT CD8⁺ citotóxicos, aunque permite la participación inicial de las NK. Subsiguientemente, la producción de IFN- γ por las NK incrementa la expresión de aquellas moléculas de superficie –y por ende la presentación de péptidos virales–, lo que significará el final de la actividad de dicha estirpe celular, con la subsiguiente participación de la población CD8⁺.

Diversas proteínas virales se unen a la molécula β 2-microglobulina, secuestrándola e impidiendo la presentación de péptidos por moléculas del CMH-I; ejemplos de las mismas son las proteínas E3 de adenovirus, Pol de HBV y la codificada por el gen UL18 del citomegalovirus humano (HCMV). En el mismo sentido –pero de manera indirecta– la proteína NS5B de HCV impide el transporte de las moléculas del CMH-I a la superficie celular al unirse a proteínas de membrana ubicadas en el sistema de vesículas de transporte. La inhibición de la expresión del CMH-I puede producirse de manera general –como en los ejemplos anteriormente mencionados– o diferencial como en el caso del HIV y herpesvirus humano 8 (HHV-8). Con relación a ello, mientras que la proteína Nef de HIV inhibe la expresión en la superficie celular de HLA-A y HLA-B y aumenta la de HLA-E, las proteínas K3 y K5 de HHV-8 regulan diferencialmente la expresión de HLA-A y HLA-B según la etapa del ciclo de replicación del virus. La estrategia magistral del HIV logra evadir tanto a los LT CD8⁺ (se inhiben moléculas funcionales de clase I como HLA-A o HLA-B), como a las NK (hay una molécula de histocompatibilidad no clásica, como HLA-E, pero que es útil para interactuar con el receptor lectínico tipo C CD94/NKG2A/B sobre las NK para enviar una señal inhibitoria sobre estas células).

Se ha reportado la inhibición de la expresión de moléculas del CMH-II inducida por IFN en la infección por el virus varicela-zóster (VZV). En este caso, dicho agente actúa sobre diversas proteínas de la cascada de transducción de señales inducidas por IFN- γ –como STAT-1 y JAK-2– inhibiendo su efecto inductor de la transcripción de los genes del CMH-II, impidiendo así la expresión de estas moléculas presentadoras de antígenos a LT CD4⁺. A su vez, la proteína BZLF2 de EBV se une y secuestra a las moléculas del CMH-II –tanto a aquellas que se encuentran en el citoplasma como a las localizadas en la membrana plasmática– impidiendo la expresión de estas moléculas en la superficie celular.

Otro mecanismo utilizado por ciertos virus para inhibir la expresión del CMH-I y/o II es la degradación de estas moléculas por el proteasoma, inducida por proteínas virales. Un ejemplo de ello es el efecto ejercido por el producto del gen US2 del HCMV.

La estrategia de evasión que implica la inhibición de la presentación antigénica puede llevarse a cabo impidiendo la correcta generación del péptido viral antigénico, o bien inhibiendo el adecuado transporte del mismo hacia la superficie celular. Un ejemplo del primer caso es el antígeno EBNA-1 de EBV, que –como se mencionó anteriormente– es procesado de manera subóptima por el proteasoma al no alcanzar un umbral cuantitativo adecuado, no permitiendo con ello su apropiada presentación en el contexto de moléculas de histocompatibilidad. En el segundo caso, se puede destacar la acción de ciertas proteínas virales en el R.E., ya sea uniéndose a las proteínas transportadoras TAPs (US6 de HCMV y ICP47 del HSV) o reteniendo al complejo péptido viral-CMH en el retículo (US3 de HCMV); mediante estas dos estrategias se impide el transporte de los péptidos antigénicos desde el R.E. a la superficie celular y, por consiguiente, su adecuada presentación. Observe el lector que un mismo virus (HCMV) propone múltiples estrategias (en consecutivos pasos de una misma vía) para evitar el reconocimiento por los linfocitos T CD8⁺.

2.2. INHIBICIÓN O MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA INTERFERÓN (IFN)

Luego de la infección de una célula por un virus determinado, éste debe multiplicarse y enfrentar la gran batería de mecanismos de defensa que monta el sistema inmune del hospedador. Una de estas primeras barreras de defensa es el sistema IFN. Los diferentes tipos de IFNs secretados circulan en el organismo del hospedador y promueven la expresión –en los distintos tipos celulares– de mecanismos antivirales, que podrán limitar la replicación y diseminación viral.

Los virus han desarrollado diversos mecanismos para evadir a los efectos antivirales e inmunomoduladores del sistema IFN. La mayoría de los virus, si no todos, poseen eficientes y variados mecanismos para inhibir –en diverso grado– la respuesta inmune del hospedador producida por IFN. Los mecanismos moleculares involucrados en este evento pueden abarcar desde un bloqueo general de los procesos de transcripción y traducción de la célula hospedadora hasta la inhibición selectiva de algún factor involucrado en el sistema IFN.

Para una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de evasión al sistema IFN, éstos se clasificarán según la interfe-

Genoma bisentido

Arenavirus: sólo cuando se expresa suficiente cuantía de la proteína de la nucleocápside (N) como anti-terminadora de la transcripción puede sintetizarse la glicoproteína G. La transcripción y la replicación viral están reguladas por Z.

Tabla 8.4. Disociación temporal de la expresión génica.

rencia viral se produzca sobre los siguientes eventos, procesos o moléculas:

- Expresión general de los genes de la célula hospedadora
- Componentes específicos de los mecanismos de inducción de IFN
- Cascadas de transducción de señales activadas por IFN
- Proteínas efectoras del sistema IFN

2.2.1 Interferencia viral sobre la expresión general de los genes de la célula hospedadora

La interferencia viral sobre el sistema IFN no necesariamente debe afectar a las vías específicas de inducción del mismo o a sus moléculas efectoras. Otro mecanismo de interferencia más general es la inhibición de la expresión de los genes de IFN, a través de la inhibición de la transcripción en la célula hospedadora. Este proceso es logrado por diferentes virus de diversas maneras, algunas de las cuales se detallan en la Tabla 8.6. En general, se ha documentado la acción directa de proteínas virales sobre diferentes etapas en los eventos de transcripción y traducción de los RNAm. Un ejemplo de ello es la proteína NS1 de influenza que inhibe el procesamiento de los pre-RNAm y su transporte desde el núcleo al citoplasma, y por ende interfiere en dichos eventos celulares.

La proteína vhs (*viral host shut off*) de HSV degrada los RNAm celulares y virales, pero como la velocidad de síntesis de estos últimos es tan significativamente mayor, el efecto neto es la inhibición de la síntesis de proteínas celulares pero no del HSV.

El éxito de la replicación viral depende de un entorno celular funcional, por lo que los virus no pueden abolir por completo el metabolismo de la célula hospedadora; en cambio pueden inhibir componentes específicos del sistema IFN.

2.2.2. Interferencia viral sobre componentes específicos de los mecanismos de inducción del IFN

Un blanco importante para inhibir el sistema IFN reside en una de las señales principales de la infección viral: el RNA a doble cadena (RNAdc), ya sea extracelular o intracelular. En este sentido, diversas proteínas virales (NS1 de influenza y E3L del virus vaccinia)

se unen y secuestran al RNAdc impidiendo su reconocimiento por parte del sistema IFN y, por ende, la inducción del mismo.

Un segundo blanco en la inhibición de las vías de inducción del IFN es el factor de transcripción IRF-3. Ciertas proteínas virales (VP35 del virus Ébola, NS3/4A del HCV y NS1/NS2 del RSV) impiden la fosforilación de este factor y su consiguiente activación, dimerización y traslocación al núcleo, inhibiendo así la transcripción de los diferentes genes regulados por éste (ISG). Por el contrario, otros virus como HSV-1 –a través de la proteína ICP0– y LCM –mediante su nucleoproteína N– impiden la acumulación en el núcleo de IRF-3 activa, sin intervenir en los pasos previos de fosforilación de dicho factor. A su vez, el virus HHV-8 –agente causal del sarcoma de Kaposi– posee proteínas homólogas a las IRFs, denominadas vIRFs, que reemplazan a las de origen celular (cIRFs) como antagonistas en las vías de inducción del IFN, inhibiendo así dicha vía (a excepción de vIRF-3 que la estimula).

Algunas de las proteínas virales que interfieren en los mecanismos de inducción del IFN, y sus blancos celulares se detallan en la Tabla 8.7 y las Figuras 8.5 y 8.6.

2.2.3. Interferencia viral sobre las cascadas de transducción de señales activadas por IFN

Diversos virus suprimen las diferentes cascadas de transducción de señales activadas por IFNs (Tabla 8.8 y Figura 8.6), no sólo para evitar la expresión de los genes estimulados por éstos (ISG), sino también para impedir la producción de los propios IFNs. Esto último es debido a que existe un proceso de retroalimentación positiva por el que estas cascadas de señalización –activadas por el IFN– producen un aumento en la expresión de los genes que codifican para este tipo de citoquinas.

El más importante blanco de la interferencia viral en este aspecto es la vía de las JAK/STAT. Diferentes virus causales de infecciones agudas (sarampión, RSV, parainfluenza, parotiditis, adenovirus, Nipah, dengue, etc.), o persistentes (HCV, HSV-1, HPV, etc.) interfieren con la adecuada actividad de estas proteínas celulares, inactivándolas, secuestrándolas o induciendo su degradación. Por su parte, adenovirus –a través de su proteína E1A– no sólo actúa



- **Inhibición de la expresión de moléculas del CMH-I y/o CMH-II**
 - **Inhibición de la expresión de moléculas del CMH-I en la superficie celular**
 - HIV:** Nef inhibe HLA-A y HLA-B y aumenta la expresión de HLA-E
 - HBV:** Pol inhibe $\beta 2$ microglobulina en la superficie de hepatocitos
 - Adenovirus:** E3 secuestra la $\beta 2$ microglobulina
 - HCMV:** UL18 secuestra la $\beta 2$ microglobulina
 - HHV-8:** K3 (con HLA-A) y K5 (con HLA-A y HLA-B) regulan diferencialmente la expresión por endocitosis del CMH-I
 - HCV:** NS5B inhibe la expresión de moléculas del CMH-I en la superficie celular
 - **Inhibición de la expresión de moléculas del CMH-II en la superficie celular**
 - VZV:** actúa sobre STAT-1 y JAK-2 inhibiendo la expresión de moléculas del CMH-II inducida por IFN- γ
 - EBV:** BZLF2 secuestra moléculas del CMH-II intracelular y de superficie
 - **Degradación de moléculas del CMH-I y CMH-II en el proteasoma**
 - HCMV:** US2 dirige a las moléculas del CMH al proteasoma
- **Inhibición del procesamiento antigénico**
 - **Inhibición de la generación del péptido antigénico**
 - EBV:** el antígeno EBNA-1 es procesado de manera subóptima por el proteasoma
 - **Inhibición del transporte intracelular de los antígenos virales**
 - HCMV (US6) y HSV (ICP47):** se unen a las TAPs e impiden el transporte de los antígenos en el R.E.
 - HCMV (US3):** retiene al complejo péptido-CMH en el R.E.

Tabla 8.5. Algunos ejemplos de inhibición de la presentación antigénica.

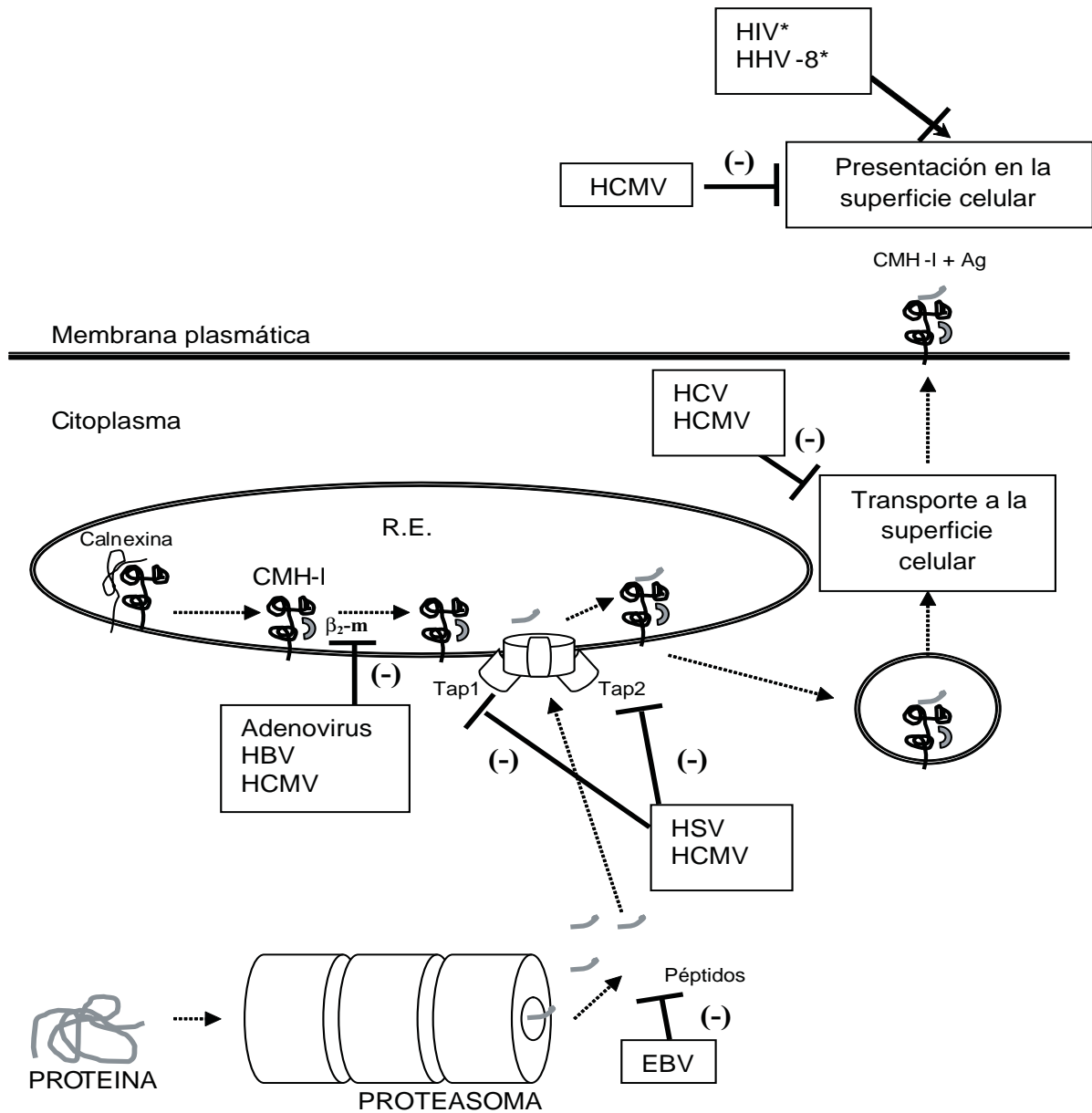


Figura 8.4A. Efecto de la acción viral sobre el procesamiento y presentación antigénica por la vía endógena. Nótese que en todos los ejemplos la infección viral ejerce una acción negativa sobre las distintas etapas del procesamiento y presentación antigénica globalmente consideradas, excepto en los casos (*) de HIV y HHV-8, donde el efecto sobre la expresión del CMH-I se produce de manera diferencial según la molécula de HLA implicada (véase el texto). R.E.: retículo endoplásmico.

sobre STAT-1, sino que también secuestra al factor IRF-9, impidiendo de esta manera la formación del complejo ISGF-3. Observe el lector que la inhibición de STAT-2 conduce a la inhibición de la expresión de los genes inducidos por IFN- α y - β (tipo I) mientras que la de STAT-1 promueve el déficit de la expresión de los genes inducidos por IFN- α , - β y también - γ (tipo II); véase la Figura 8.6. Otra proteína celular blanco de la acción viral es la proteín-quinasa TYK-2, a la que se une la proteína E6 de HPV impidiendo su activación, y por ende la cascada de las JAK/STAT. Los poxvirus utilizan una estrategia diferente para producir el mismo efecto. En este sentido, el virus vaccinia produce una proteína soluble que se une al IFN actuando de manera análoga al receptor celular (virorreceptor), pero sin producir el efecto activador de la cascada.

2.2.4 Interferencia viral sobre proteínas efectoras del sistema IFN

Una forma eficiente de evadir la acción de los IFNs es inhibir directamente las proteínas específicas que median la respuesta antiviral.

(Tabla 8.9 y Figura 8.7). Algunas de estas proteínas antivirales dependen de las moléculas de RNAdc para su activación enzimática. Es por ello que aquellos virus que poseen proteínas con capacidad de secuestrar al RNAdc son capaces de evitar la activación de los mecanismos mediados por la PKR y/o por la vía 2'-5' OAS/RNasa L. Dado que la molécula de RNAdc desempeña un rol central en la inducción del IFN, los virus que presentan la capacidad de unir a aquella molécula poseen la ventaja de bloquear tanto la producción como la acción del IFN. Virus tales como HCV, HIV, EBV y adenovirus, utilizan una estrategia diferente para producir el mismo efecto. Los genomas de éstos codifican para pequeños RNAs que compiten con el RNAdc para unir a la PKR, y así impedir la acción antiviral de esta proteína (véase el capítulo 7, Mecanismos de defensa).

Ciertos virus producen proteínas que inhiben la acción de la PKR directa o indirectamente. En el primer caso actuando como un pseudo-sustrato para esta proteína celular como ocurre con las proteínas E2 de HCV, Tat de HIV y K3L del virus vaccinia; o

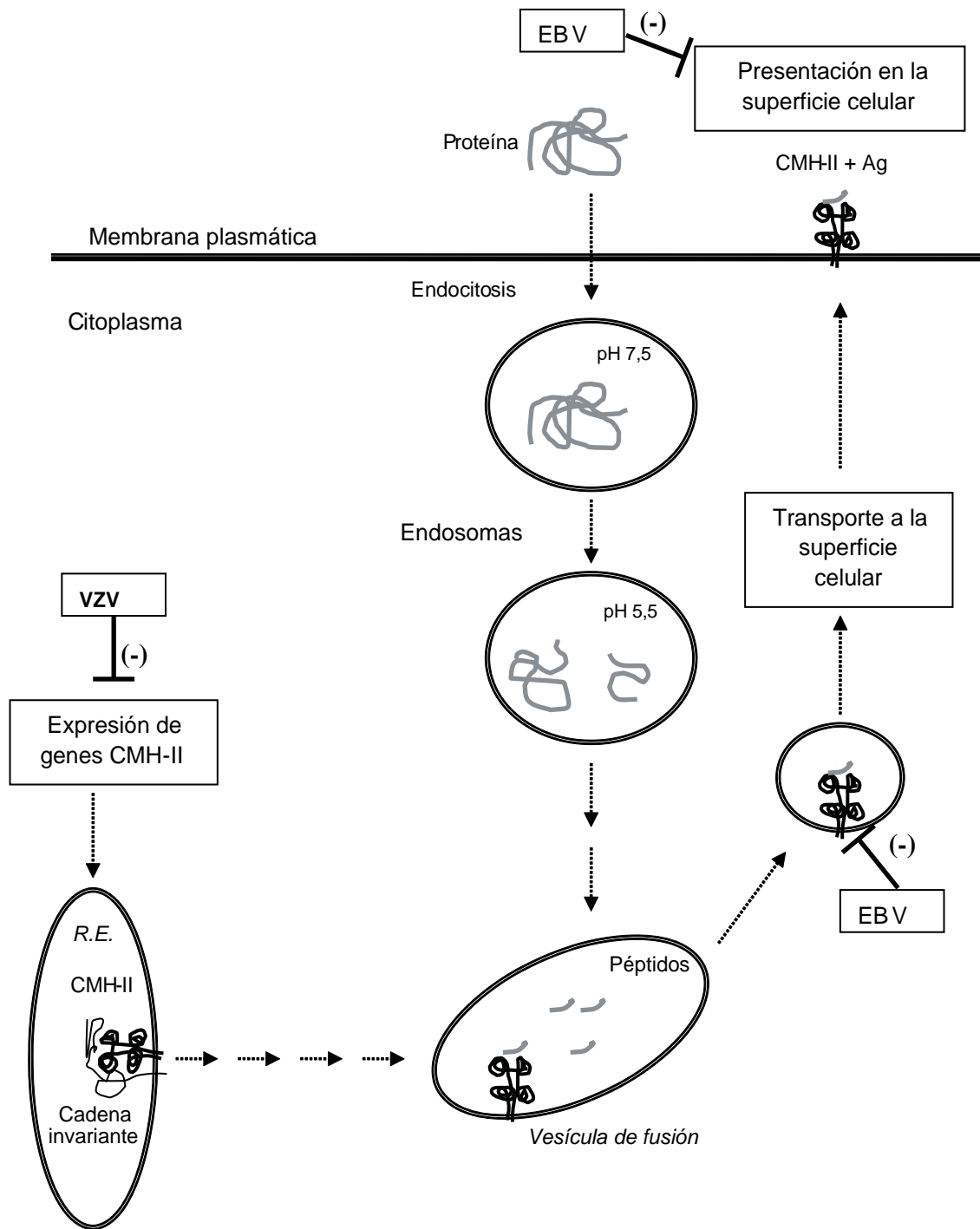


Figura 8.4B. Efecto de la acción viral sobre el procesamiento y presentación antigénica por la vía exógena. R.E.: Retículo endoplásmico.

inactivando a la PKR como lo hace la proteína $\gamma 34.5$ de HSV-1. A su vez, esta misma proteína de HSV-1 inhibe indirectamente la acción de la PKR al inducir la desfosforilación de eIF-2 α , revirtiendo de este modo el bloqueo de la traducción producida por esta proteína antiviral. Otra manera indirecta de inhibir la PKR es la que se produce en la infección por el virus influenza A. Este virus estimula la acción de un inhibidor natural de esta proteína denominado p58^{IPK}.

La vía de la 2'-5'OAS/RNasa L es bloqueada por diversos virus como HIV y HSV. El virus de la inmunodeficiencia humana induce la síntesis de un inhibidor celular natural de la RNasaL

denominado RLI; mientras que el virus herpes humano –tanto tipo 1 como 2– activa la síntesis de análogos funcionales de 2'-5' OA, que se unen a la RNasa L y la inactivan. Más aún, el HSV también inhibe la propia síntesis de la enzima 2'-5' OA sintetasa.

En conjunto, los mecanismos de evasión aquí descritos evitan los dos efectos principales inducidos por el IFN como antiviral: la inhibición de la transcripción/replicación viral y la inhibición de la síntesis de proteínas virales (Figura 8.7).

Considerando la biología de la interacción virus-hospedador, es entendible que los antagonistas del IFN sean moduladores más que inhibidores totales del mismo.

Virus	Proteína viral	Efecto sobre la célula
Poliovirus	3C ^{Pro}	Proteasa que inhibe al factor de transcripción basal TFIID
Influenza A	NS1	Impide el procesamiento y transporte de RNAm celulares
HSV	ICP27 <i>vhs</i>	Inhibe la síntesis y <i>splicing</i> de RNAm celulares Desestabiliza a los RNAm celulares y virales*
Familia <i>Bunyaviridae</i>	NSs	Inhibe al complejo transcripcional de la RNA Pol II

Tabla 8.6. Interferencia viral sobre la expresión general de los genes de la célula hospedadora. * Véase el texto.

Virus	Proteína viral	Efecto sobre la célula
Influenza	NS1	Secuestra RNAdc Inhibe la activación de IRF-3, AP-1 y NFκB
RSV	NS1 y NS2	Inhiben la activación de IRF-3
Ébola	VP35	Inhibe la activación de IRF-3
HCV	NS3/NS4	Inhibe la activación de IRF-3
HSV	ICP0	Impide la acumulación de IRF-3 activa en el núcleo
LCM	N	Impide la acumulación de IRF-3 activa en el núcleo
HHV-8	vIRF-1 y vIRF-2 vIRF-3	Impiden la correcta acción de IRF-1 e IRF-2 Estimula la acción de IRF-3 e IRF-7
HPV	E6	Se une e inactiva a IRF-3
Rotavirus	NSP1	Se une e inactiva a IRF-3
Adenovirus	E1A	Inhibe a CBP, un co-activador de IRF-3
Vaccinia	E3L	Secuestra RNAdc

Tabla 8.7. Interferencia viral sobre componentes específicos de los mecanismos de inducción de IFN.

Cabe destacar que ciertos virus en la naturaleza no sólo no bloquean el sistema IFN, sino que, por el contrario, son potentes inductores del mismo. Éste es el caso de la proteína vIRF-3 del HHV-8, la que -contrariamente a otras vIRFs expresadas por el mismo virus- produce inducción del sistema IFN más que su inhibición, al unirse a los factores celulares IRF-3 e IRF-7. La acción de vIRF-3 estimula la unión de IRF-3 e IRF-7 al DNA en las regiones promotoras de los genes que codifican para IFN α/β , estimulando la producción de los mismos. Como consecuencia, el efecto global de la infección promueve la vigilancia inmune ejercida en la fase de latencia.

El estudio de los mecanismos mediante los cuales los virus regulan -ya sea inhibiendo o induciendo- el sistema IFN es importante no sólo para alcanzar una mejor comprensión de la patogénesis viral, sino también para permitir el desarrollo de nuevas estrategias de profilaxis y herramientas terapéuticas.

2.3 MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD MEDIADA POR OTRAS CITOQUINAS

Teniendo en cuenta la vasta red de citoquinas elaboradas por las distintas estirpes celulares, existen al menos cuatro estrategias

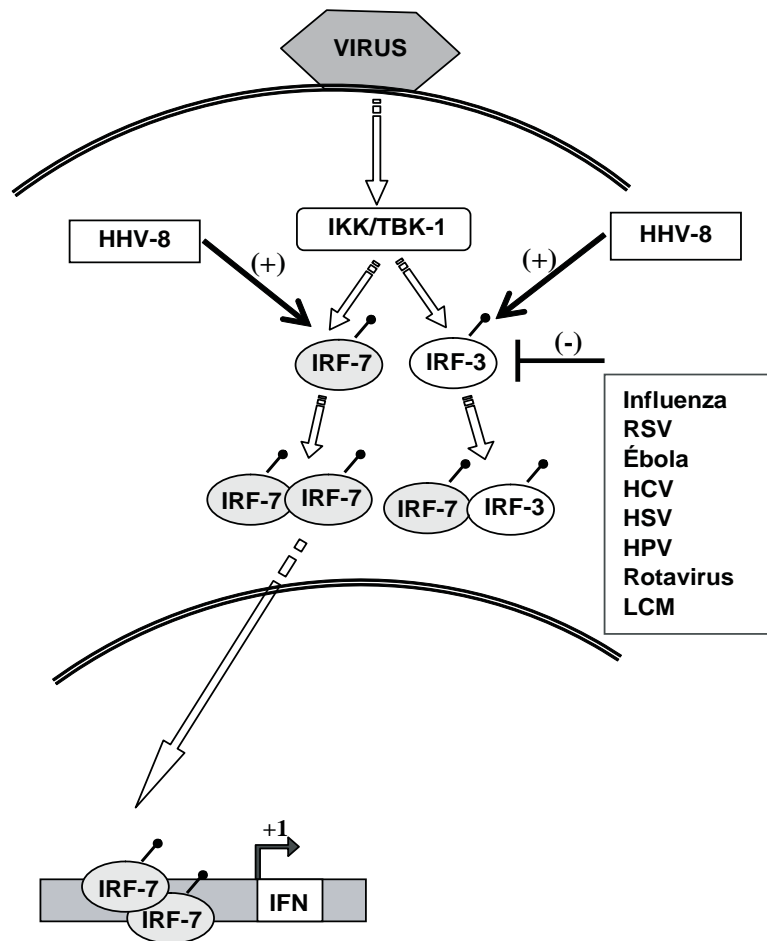


Figura 8.5. Virus que interfieren en la inducción de IFN de tipo I.

llevadas a cabo por los virus para modificar la actividad mediada por citoquinas y así evadir a la respuesta inmune del hospedador (Tabla 8.10).

Estas estrategias son: a) la síntesis de proteínas virales similares a citoquinas; b) de manera análoga, la síntesis de proteínas similares a receptores de citoquinas; c) la inhibición de la producción de éstas; o d) la acción directa de proteínas virales sobre las mismas.

En el primer caso, los ejemplos más estudiados son la proteína BCRF1 de EBV y la proteína cmvIL-10. Estas moléculas son homólogas a la IL-10 humana, por lo que son agrupadas dentro de las así llamadas viroquinas. Por ende, promueven una respuesta Th2 en el hospedador, lo que favorece el entorno en el que se establece la infección persistente. Asimismo, estas moléculas son, por ende, antagonistas del IFN- γ del hospedador (promotor de la respuesta Th1).

Diversos miembros de la familia *Herpesviridae* (HCMV, HHV-6, HHV-7 y HHV-8) y *Poxviridae* exhiben la capacidad de sintetizar análogos de receptores para citoquinas (como se mencionó anteriormente, también denominados virorreceptores). Imagine el lector que éste es un mecanismo análogo al que en una hipotética batalla, un ejército ejecuta el lanzamiento de un misil (una citoquina) contra un blanco determinado (la célula infectada). Sin embargo, el ejército enemigo (la población viral) produce y libera (secreta) blancos alternativos para dichos misiles (virrorreceptores solubles). Esta sutil estrategia puede desarrollarse cuando se cuenta con suficiente información (virus con genomas muy grandes que albergan un número muy elevado de genes, como algunos de los miembros de las familias virales aquí mencionadas).

Otras estrategias de inhibición de citoquinas pueden involucrar un impedimento para su secreción como la proteína CrmA de vaccinia, que mediante su actividad de serpina (molécula inhibidora de serina-proteasas) inhibe a la enzima celular ICE (*Interleukin-1 Converting Enzyme*), lo que impide la liberación de IL-1.

En modo más infrecuente, ciertas proteínas virales pueden unirse directamente a citoquinas, como ocurre con la proteína de envoltura pre-S2 del HBV al hacerlo con la IL-6.

2.4. INFECCIÓN DE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE O ACCIÓN SOBRE LAS MISMAS (TABLA 8.11)

Una muy eficaz estrategia viral de evasión al sistema inmune del hospedador es la infección de los componentes celulares de dicho sistema, como son los LT, LB, macrófagos, células dendríticas, etc. Esto puede en algunos casos producir la muerte de la célula infectada—con la consiguiente merma en la batería de células del sistema inmune—o simplemente ser utilizado como un vehículo para la diseminación del virus por el organismo.

Mientras que para algunos virus estas células son el blanco primario de infección (HIV), para otros (HBV, HCV, etc.) son un reservorio de la misma. Esto último—en algunos casos—permite al virus persistir en el organismo en forma latente, o inclusive alcanzar sitios restringidos dentro del hospedador (por ejemplo, el pasaje pasivo transendotelial del virus sarampión al SNC). En este último caso la célula infectada actuaría como el caballo de Troya que porta en su interior a los viriones—enemigos del hospedador—que verían favorecida su entrada al SNC al no ser detectados por el sistema inmune. Ciertos virus como HIV, no sólo utilizan esta estrategia para atravesar la barrera hematoencefálica sino que también pueden

Virus	Proteína viral	Efecto sobre la célula
Sarampión	C y V	Inhibe JAK-1
HCV	Core y NS5	Impide la formación del factor ISGF-3 Estimula la acción de los inhibidores celulares naturales de la vía de las JAK/STAT (SOCS-3: <i>Suppressor of Cytokine Signalling 3</i>)
HSV	Desconocida	Estimula la acción de los inhibidores celulares naturales de la vía de las JAK/STAT
Adenovirus	E1A	Impide la formación del factor ISGF-3 al unir a STAT-1 e IRF-9
HPV	E6	Impide la activación de TYK-2, y por ende la cascada de las JAK/STAT
Vaccinia	B18R y B8R	Secuestran IFN- α / β
Dengue	NS4B	Inactiva STAT-1
Influenza	NS1	Impide la unión de ISG-15 a proteínas y por ende la degradación de éstas por el proteasoma
RSV	Desconocida	Inhibe la expresión de STAT-2, promoviendo su degradación en el proteasoma
Parainfluenza 2 humano	V	Inhibe la expresión de STAT-1 y -2, promoviendo su degradación en el proteasoma
Parotiditis	V	Inhibe la expresión de STAT-1 y -2, promoviendo su degradación en el proteasoma

Tabla 8.8. Interferencia viral sobre las cascadas de transducción de señales activadas por IFN.

con este mecanismo diseminarse por vía transplacentaria y lograr así la infección del feto en la mujer embarazada infectada con dicho agente.

Diversos miembros de las familias *Herpesviridae* (HSV, HCMV, EBV y HHV-8), *Flaviviridae* (HCV), *Retroviridae* (HIV y HTLV); *Papillomaviridae* (HPV) y *Poxviridae* (virus vaccinia) han desarrollado estrategias para evadir la acción de las NK, las que pueden clasificarse en cinco grupos principales: a) síntesis de homólogos del CMH-I (HCMV); b) regulación de la expresión de moléculas del CMH-I (HCMV, HHV-8; HIV); c) interferencia en la interacción entre el receptor de activación y el ligando (HCMV; HHV-8; HIV); d) modulación de los niveles de citoquinas o quimioquinas relevantes para NK (HCMV, EBV; HHV-8, HPV); y e) efectos virales directos (HIV, HSV y HCV); véase la Tabla 8.12.

Múltiples virus, tales como HCV, HSV, EBV, dengue o sarampión afectan la función de las células dendríticas, alterando su maduración y/o su capacidad de estimular LT y de producir IFN- γ . De especial relevancia clínica es la interacción de cepas salvajes del virus sarampión (aisladas de cultivos de líneas linfoides B) con el receptor SLAM (*Signalling Lymphocyte Activation Molecule*). Esta molécula está presente en células dendríticas, macrófagos y linfocitos activados y timocitos inmaduros. Si bien SLAM regula la producción de IL-4 e IL-13 por los LT CD4⁺, así como la de IL-12, TNF- α y óxido nítrico por los macrófagos, promueve el estado de anergia principalmente a través de la supresión de la producción de IL-12 mediada por el TLR-4. Asimismo, diversos virus (como HCV o HCMV) afectan la actividad de las NK, inhibiendo la producción de IFN- γ y facilitando el viraje hacia una respuesta Th2. Esta alteración condiciona el diálogo mediado por

citoquinas con las células dendríticas, lo que a su vez restringe la respuesta de los LT. La afectación de la respuesta innata tempranamente, después de iniciada la infección, podría conferir al HCV una ventaja para su propagación que luego no puede ser controlada por la respuesta inmune adaptativa del hospedador. En la infección por HIV, la respuesta Th1 está disminuida, observándose un perfil predominante de la respuesta Th2. Las células dendríticas pueden secuestrar partículas de HIV a través de la formación de cuerpos multivesiculares (no lisosomales, que contienen DC-SIGN y las tetraspasminas CD9 y CD81, en ausencia de CMH-II) que son endocitados. Las partículas de HIV permanecen secuestradas hasta que a) los compartimientos son reciclados hacia la superficie y transmitidos a otra célula, o bien b) pueden ser degradados en el proteasoma. La interacción de HIV con células dendríticas a través del receptor DC-SIGN (como los receptores *Toll*, también un receptor de reconocimiento de patrones moleculares), promueve la inhibición de la señalización del TLR-4, al tiempo que se mantiene un estado inmaduro de dichas células, lo que favorece la evasión viral. Asimismo, la producción de MIP-1 α y RANTES, atrae a LT CD4⁺ de memoria permisivos –principal blanco de la acción del HIV– al sitio donde se encuentran las células dendríticas conteniendo las vesículas endocíticas con partículas de HIV, las que luego de su reciclado a la superficie celular pueden infectar LT CD4⁺ mediante una –así denominada– sinapsis viral (transinfección). La merma en la expresión de genes regulados por el sistema IFN y de otras citoquinas de la respuesta Th1, así como de las moléculas del CMH-II, CD86 y *Jagged-1* junto al aumento de la expresión de ATF3 (proteína inhibidora del TLR-4) promueven una respuesta incapaz de limitar la infección por HIV.

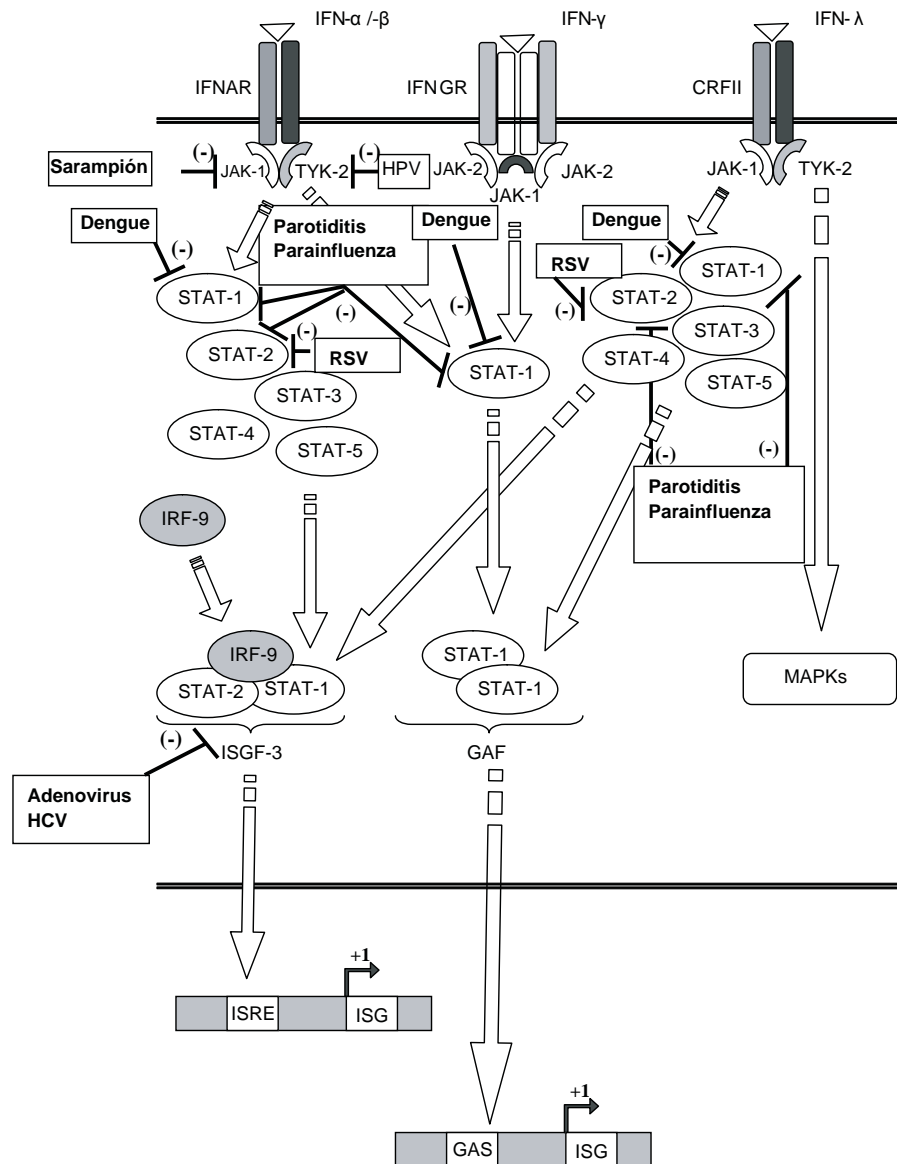


Figura 8.6. Virus que interfieren en las cascadas de transducción de señales activadas por los IFNs de tipo I, II y III.

Más del 90% de los neonatos que se infectan con el HBV a partir de una infección materna con el mismo virus (y en cuya sangre también circula una proteína viral soluble denominada antígeno e [HBe Ag]) evolucionan hacia la infección persistente. Estudios realizados en animales transgénicos permitieron comprender las bases moleculares de este fenómeno. El HBe Ag es capaz de alcanzar el timo e inducir tolerancia inmunológica mediante delección funcional de linfocitos T CD4⁺ HBe/HBc específicos, restringidos por moléculas de Clase II. Esa tolerancia se mantiene mientras persiste el HBe Ag. Transpolado al ser humano, ello implica que si en la vida intrauterina el HBe Ag traspasa la placenta, el feto estará expuesto al tolerógeno y desarrollará una infección persistente. Un efecto análogo se observa si la infección con una población viral de HBV productor de HBe Ag es connatal (al momento de atravesar el canal de parto).

2.4.1 Agotamiento del sistema inmune

En 1993 el grupo de Rolf M. Zinkernagel (premio Nobel en Medicina o Fisiología en 1996), definió como tal a la ausencia primaria o secundaria de respuesta de CTL en la infección murina persistente con LCM. Se postuló que este fenómeno era debido a una parálisis inmune asociada a la masiva infección viral, la que

promovería la estimulación clonotípica sobre receptores T que, a su vez, conduciría a la apoptosis de dichos linfocitos. En forma análoga, la población de CTL precursora podría exhibir un desenlace apoptótico, dado que por necesidad se sintetizarían más células efectoras que de memoria. El agotamiento del sistema inmune fue inicialmente postulado también para explicar la merma significativa de la respuesta citotóxica que se observa en la infección con HIV.

El advenimiento de poderosas herramientas de Biología molecular para la medición de las actividades de los CTLs permitió adquirir una nueva visión de este fenómeno de delección/alteración de dicha población celular. Se acepta en la actualidad que los CTLs pueden estar agotados como resultado de infecciones tales como las producidas por HIV y HCV en el humano. En dichas infecciones crónicas se ha observado que el agotamiento de los CTLs está inducido por la sobre-expresión de la molécula PD-1 (*Programmed Death*) en la superficie de dichos linfocitos. Este receptor inmune actúa como regulador negativo de los linfocitos T activados e interactúa alternativamente con los ligandos PD-L1 ó PD-L2 (expresados en células presentadoras). La interacción entre PD-1 y PDL promueve el reclutamiento de la tirosina fosfatasa SHP-2, que defosforila factores dependientes del TCR como Sik, ZAP-70 y



Virus	Proteína viral	Efecto sobre la célula
HIV	Tat TAR RNA (RNAp) Desconocida	Inactiva a la PKR al actuar como pseudo-sustrato Impide la activación de la PKR al competir con el RNAdc Induce la síntesis de un inhibidor celular natural de la RNAsa L (RLI)
HCV	NS5A E2 IRES	Inactiva a la PKR Inactiva a la PKR al actuar como pseudo-sustrato Impide la activación de la PKR al competir con el RNAdc
Influenza	NS1 Desconocida	Secuestra al RNAdc intracelular e inhibe a la PKR Estimula a un inhibidor celular natural de la PKR (p58 ^{IPK})
Rotavirus	NSP3	Secuestra al RNAdc intracelular e inhibe a la PKR
HSV	γ34.5 Desconocida US11	Defosforila al eIF2α e inactiva PKR Induce la síntesis de análogos de 2'-5'OA que se unen a la RNAsa L y la inactivan Secuestra al RNAdc intracelular e inhibe a la PKR y la síntesis de 2'-5'OA sintetasa
EBV	EBER RNA (RNAp)	Impide la activación de la PKR al competir con el RNAdc
Adenovirus	VA ₁ RNA (RNAp)	Impide la activación de la PKR al competir con el RNAdc
HHV-8	vIRF-2	Inactiva la PKR
Vaccinia	E3L K3L	Secuestra al RNAdc intracelular e inhibe a la PKR Inactiva a la PKR al actuar como pseudo-sustrato

Tabla 8.9. Interferencia viral sobre proteínas efectoras del sistema IFN. RNAp: Moléculas pequeñas de RNA. IRES: *Internal Ribosome Entry Site* (Sitio interno de entrada al ribosoma).

PI3K e impide la activación de los linfocitos T. Ello deviene en una afectación funcional (agotamiento) de dicha población (Figura 8.8).

PD-1 está expresado en poblaciones activadas tales como linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺), B y células mieloides, mientras que el ligando PDL-1 lo está en células dendríticas, macrófagos, linfocitos B y células parenquimáticas no linfoides, a la vez que PDL-2 se expresa en macrófagos activados y células dendríticas.

El nivel de exposición a antígenos de HIV condiciona la funcionalidad de los linfocitos T CD8⁺, observándose que es más limitada en pacientes que progresan al SIDA (alta carga viral), que en no progresores. En el primer grupo se ha observado una sobreexpresión de PD-1, asociada a un déficit de producción de granzima B y de IFN-γ.

Sorpresivamente, otros estudios recientes han documentado que en ratones infectados experimentalmente con LCM y en el limitado número de pacientes infectados con HIV analizado se produce una dicotomía entre la respuesta ejercida por los CTLs mediante el impacto letal (degranulación y citotoxicidad) y la producción de citoquinas. Se ha observado que en pacientes infectados persistentemente con HIV la respuesta de degranulación y citotoxicidad de los CTLs se mantiene conservada, en contraposición con la merma en la producción de IFN-γ y TNF-α. Dado que los eventos de cito-

toxicidad son dependientes del influjo de Ca⁺⁺ disparado por el TCR pero son independientes de la calcineurina, mientras que la liberación de citoquinas tales como las mencionadas es dependiente de esta última vía, se ha postulado un silenciamiento selectivo de ella, mediado por una falta de translocación específica del factor NFAT desde el citoplasma al núcleo. De lo expuesto se infiere que en las infecciones persistentes analizadas (LCM en el ratón, y al menos en algunos pacientes infectados con HIV), el agotamiento inmune es funcionalmente selectivo.

Pacientes infectados crónicamente con HCV exhiben sobreexpresión de PD-1 en linfocitos CD8⁺ intrahepáticos asociada a la ausencia del marcador de linfocitos de memoria CD167, lo que define también el estado de agotamiento de los CTLs.

2.4.2 Actividad de superantígenos

Un superantígeno (SAg) es una molécula capaz de estimular energicamente a linfocitos T o B en un modo no convencional. Los SAGs para los linfocitos T no requieren ser previamente procesados, ya que interactúan con porciones laterales de la molécula del CMH y del receptor T (porción variable de la cadena β del TCR). En modo análogo, los SAGs para linfocitos B se unen a Igs normales no inmunes independientemente del isotipo de cadena liviana, a través del contac-

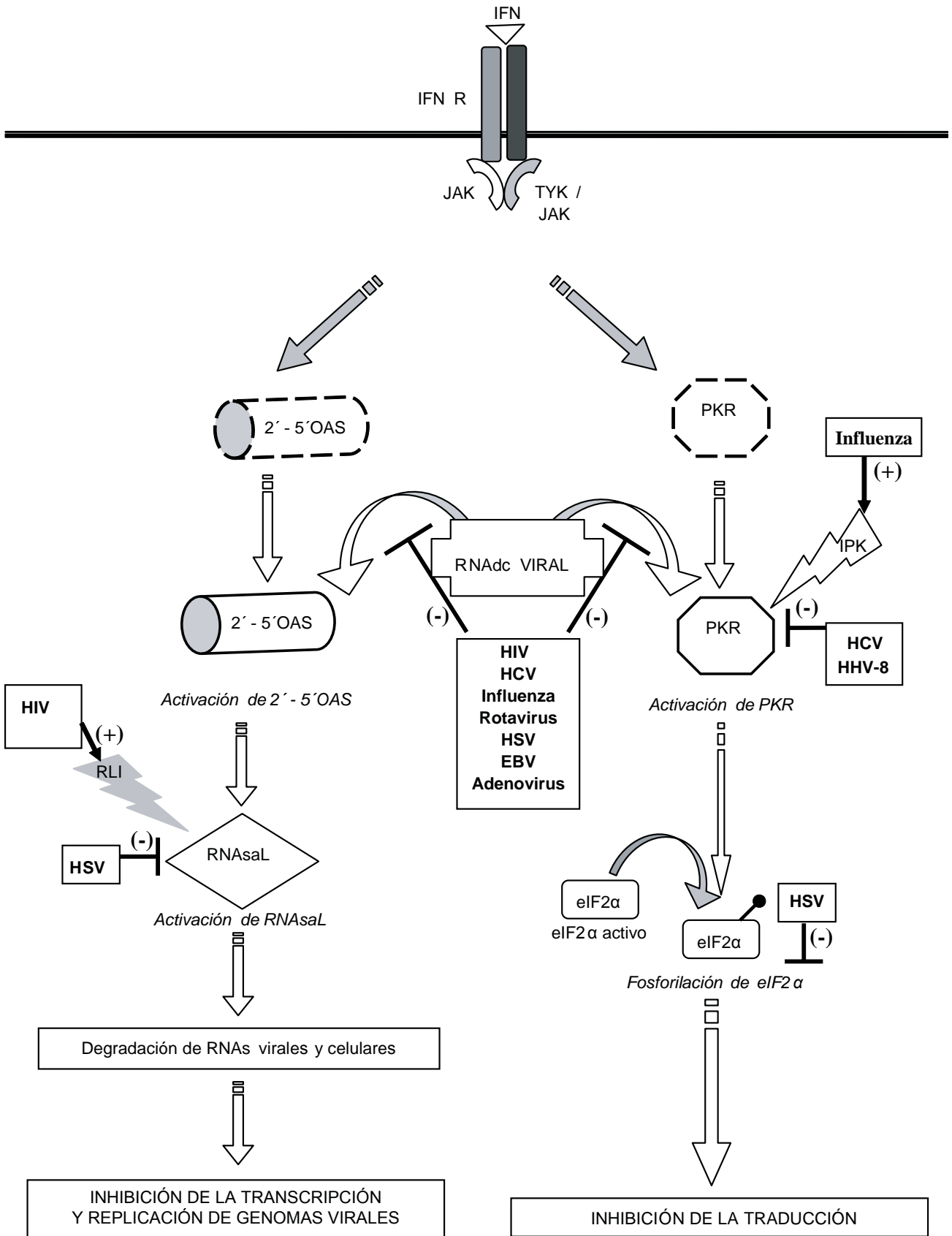


Figura 8.7. Virus que actúan inhibiendo las principales moléculas efectoras antivirales inducidas por Interferones: 2' -5' OAS y PKR. RLI: Inhibidor de la RNAsaL. IPK: Inhibidor de PKR.

<ul style="list-style-type: none"> • Proteína viral símil-citoquinas EBV (BCRF1) y HCMV (cmvIL-10): símil-IL-10 inhibe la expresión de CMH-I y II, la promoción de una respuesta Th2 y la proliferación de monocitos • Proteína viral símil-receptores para citoquinas HCMV (US27, US28, UL33 y UL78) HHV-6 (U12 y U51) y HHV-7 (U12): receptores símil-CCR HHV-8: ORF74 receptor símil-CXCR Vaccinia: véase aparte evasión al sistema IFN • Inhibición de la síntesis de citoquinas Vaccinia: CrmA (símil-<i>serpina</i>) inhibe a la enzima celular ICE e impide la secreción de IL-1 • Unión a citoquinas HBV: preS2 se une a IL-6 e inhibe su acción
--

Tabla 8.10. Algunos ejemplos de modificación de la actividad mediada por otras citoquinas.

<ul style="list-style-type: none"> • Infección de LT o LB HIV, HBV, HCV, sarampión, adenovirus, etc. • Infección de células dendríticas y macrófagos HIV, HBV, HCV, sarampión, etc.: destrucción/afectación de células presentadoras de antígeno • Infección de células tímicas LCM: inducción de tolerancia HBV: HBe Ag delección clonal de LT • Activación de linfocitos T mediante superantígenos HIV • Inducción de agotamiento inmune LCM, HIV, HCV • Inducción de apoptosis de LT HIV, HSV, etc.
--

Tabla 8.11. Algunos ejemplos de infección de y/o acción sobre células del sistema inmune.

to con la cadena pesada que expresa un producto determinado de la familia del gen VH, irrespectivamente de los fragmentos codificados por los genes DH y JH e inducen *in vitro* una señal de activación y diferenciación con secreción de Igs. Este modo de acción contrasta con la necesidad del contacto del antígeno con la estructura terciaria de las cadenas pesada y liviana de las Igs generadas en la respuesta inmune humoral.

El virus del tumor mamario murino (MMTV) constituye el mejor ejemplo conocido donde a través de la expresión de una glicoproteína de membrana se produce la unión a la porción variable de la cadena beta del receptor T, activando esta célula e induciendo su proliferación. Este efecto, a su vez, beneficia al virus que replica en los LB, ya que la colaboración de los LT CD4⁺ promueve su proliferación y por ende aumenta la eficiencia de la propagación viral. Dado que sólo existe la posibilidad de sintetizarse unas 20 porciones variables de la cadena beta murina, ello implica que la interacción con el superantígeno lleva a la activación de al menos un 5% (y a veces hasta un 30%) de los LT murinos.

Después de la transmisión viral a través de la leche, los LB del intestino son infectados, y presentan el SAg a los LT, los que se activan y a su vez estimulan a los linfocitos vecinos. Durante la pubertad y la preñez, las células epiteliales mamarias proliferan y la transmisión ocurre a través de los linfocitos que migran a la glándula homónima. En otros términos, el MMTV utiliza el sistema inmune para establecer la infección y simultáneamente evitar la respuesta inmune del hospedador.

HIV posee una glicoproteína de envoltura denominada gp120. Dicha proteína exhibe características de SAg para linfocitos T y B. Se ha demostrado que la misma es capaz de activar LT a través de la interacción con la molécula CD4 y a los LB que expresen productos derivados del gen VH 3⁺.

Se ha postulado que la proteína gp120 podría promover el disparo apoptótico de linfocitos T previamente activados (pero no infectados con HIV) mediante la promoción del entrecruzamiento de la molécula CD4. Luego de este evento se observa una disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la activación de la caspasa 3. También gp120 puede promover la muerte celular temprana no apoptótica a través de la interacción con CD4 y CXCR4 por una vía indepen-

Mecanismo	Virus	Proteína	Acción sobre las NK
Síntesis de homólogos del CMH-I	HCMV	UL18	Inhibe la citotoxicidad de subpoblaciones de NK
Regulación de la expresión de moléculas del CMH-I			
Degradación citosólica de CMH-I, excepto HLA-C, HLA-E o ambas	HCMV	US2, 11	Probablemente inhibe su funcionalidad
Degradación o retención intracelular de moléculas del CMH-I, pero no del homólogo viral UL18	HCMV	US2, 3, 6, 11	Inhibe la citotoxicidad de subpoblaciones de NK
Aumento de la expresión de HLA-E	HCMV	UL40	Inhibe la citotoxicidad
Endocitosis de moléculas del CMH-I, excepto HLA-C y HLA-E	HIV	Nef	Probablemente inhibe la citotoxicidad
Endocitosis de HLA-A y HLA-B pero no de HLA-E	HHV-8	K5	Probablemente inhibe la citotoxicidad
Interferencia con la interacción entre receptores de activación y su ligando	HCMV	?	Probablemente inhibe la citotoxicidad
Disminución de la expresión de LFA-3 (ligando para CD2 en las NK)			
Bloqueo de la interacción entre el receptor NKG2D-DAP 10 y ULBP (proteína de unión a UL16)	HCMV	UL16	Inhibe la citotoxicidad y la producción de IFN- γ
Ubiquitinación y expresión disminuida en la superficie celular de ICAM-1 y CD86	HHV-8	K5	Inhibe la citotoxicidad
Sialilación de receptores celulares en células infectadas	HIV y HTLV	?	Inhibe la citotoxicidad
Inhibición del ingreso de Ca ⁺⁺ mediado por LFA-1, a través del bloqueo del canal de Ca ⁺⁺ tipo L	HIV	Tat	Inhibe la citotoxicidad y la producción de citoquinas
Modulación de los niveles de citoquinas o quimioquinas			
Producción de agonistas virales IL-10-símil	EBV y HCMV	BCRF cmvIL-10	Efecto probablemente similar a IL-10
Producción de antagonistas de las quimioquinas CCR8 (vMIP I) y MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES (vMIP II)	HHV-8	v-MIP I y v-MIP II	Probablemente inhiben el tráfico de las NK
Inhibición de IL-18 y del receptor IL-18R α	HPV	E6 y E7	Inhiben la producción de IFN- γ
Efecto viral directo			
Infección de las NK	HIV	?	Reduce la viabilidad de las NK
Unión al receptor CD81	HCV	E2	Inhibe la citotoxicidad y la producción de IFN- γ
Infección de las NK	HSV	?	Inhibe la citotoxicidad



Tabla 8.12. Mecanismos virales de inhibición de la actividad de las células NK.

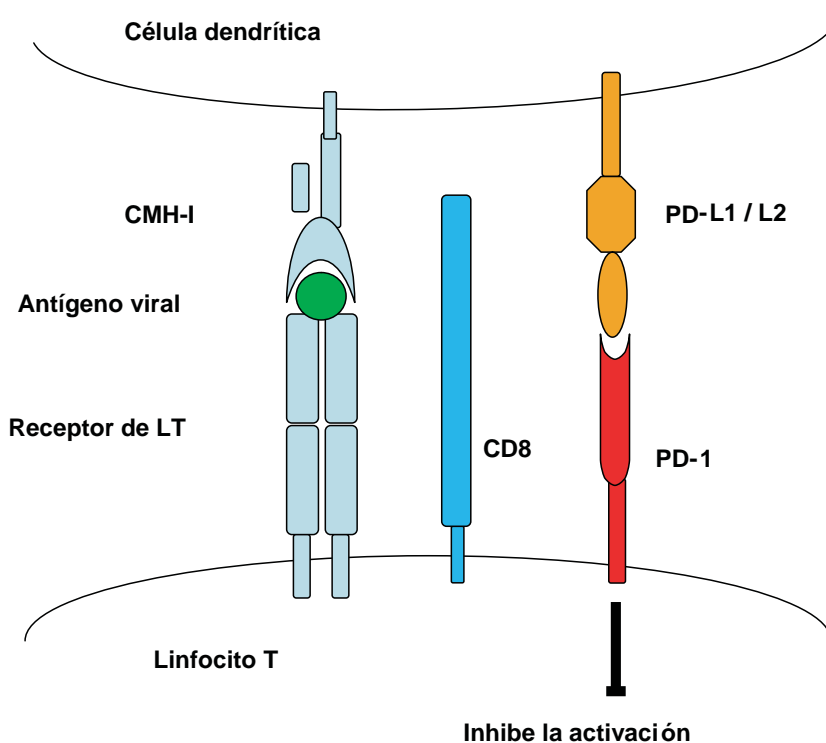


Figura 8.8. Agotamiento de los linfocitos T citotóxicos CD8+ mediado por la interacción de la proteína de muerte (Programmed Death) 1 y sus ligandos PDL-1 ó 2. El reclutamiento de la tirosina fosfatasa SHP-2 por PD-1 defosforila diversos factores dependientes del receptor de linfocitos T impidiendo su activación.

diente de las habitualmente involucradas (p56^{LCK}, señalización acoplada a proteínas G, o mediada por Fas o receptores para TNF). Estos mecanismos son de singular relevancia ya que son independientes de la infección de linfocitos por HIV, no requieren la presencia de virus infeccioso y pueden ser también promovidos por inmunocomplejos en los que gp120 está presente.

La inducción de la apoptosis de células del sistema inmune forma parte de los efectos promovidos por algunos virus. Dada su relevancia y teniendo en cuenta que la regulación de eventos apoptóticos también ocurre en otras células, este evento se analiza separadamente a continuación.

2.5. REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS

La apoptosis puede ser inducida a través de la vía extrínseca o intrínseca. Mientras que en el primer caso la muerte celular programada se produce como consecuencia de un estímulo extracelular que es detectado por algún tipo de receptor en la membrana citoplasmática, en el segundo, la apoptosis es disparada por una señal proveniente de la mitocondria.

A continuación se mencionarán algunos ejemplos en los que diversos virus están asociados a eventos de inhibición o de promoción de la apoptosis (figura 8.9). Más aún, una misma proteína viral puede exhibir efectos opuestos en la regulación apoptótica dependiendo de su concentración o de la estirpe celular sobre la que actúe.

Las infecciones virales producen habitualmente activación de los linfocitos T citotóxicos, que ejercen diferentes mecanismos de acción antiviral, uno de los cuales es la inducción de la apoptosis en la célula infectada. Es por ello que ciertos virus producen la inhibición de esta muerte celular programada –por diferentes vías– para seguir manteniendo viva a la célula que parasitan y así terminar su ciclo de replicación y generar progenie o –en otros casos– para persistir sin ser eliminados por el sistema inmune del hospedador. Para ello, los virus desarrollan una o más de las estrategias que se detallan en la Tabla 8.13.

El mecanismo más general es la inhibición de la vía extrínseca de activación de la apoptosis. En este sentido algunos virus impiden la correcta actividad de las caspasas (cisteín-proteasas que reconocen residuos de ácido aspártico), las que al activarse inducen una cascada de transducción de señales que culmina con la activación de los procesos apoptóticos. Ejemplos de esto son la proteína E1b de adenovirus que inhibe a la caspasa 8 y la proteína crmA de vacinia (no incluida en la Figura 8.8), la que no sólo inhibe a la caspasa antes mencionada, sino que también ejerce su efecto regulador negativo sobre la acción de la caspasa 1.

Otro virus que produce inhibición de la apoptosis –pero en este caso de la vía intrínseca– es el EBV a través de su proteína BHRF1 (codificada por el gen homónimo), que tiene un dominio homólogo a la proteína anti-apoptótica celular Bcl-2.

La proteína core del HCV se une al dominio intracitoplasmático –denominado DED [Death Effector Domain]– del receptor para TNF (TNFR-1) impidiendo la interacción de éste con las proteínas TRADD o TRAFF-2, las que –a su vez– activan una vía de transducción de señales que desencadena la apoptosis. De esta manera, la proteína viral inhibe la apoptosis inducida por TNF en ciertas estirpes celulares.

Varias proteínas virales tienen la capacidad de desregular el ciclo celular al interactuar con diferentes proteínas de la célula hospedadora. En tal sentido, las proteínas E6 y E7 del HPV interactúan con p53 y pRB, respectivamente. La primera se une a la proteína celular AP adquiriendo actividad ubiquitina-ligasa. La ubiquitinación de p53 involucra diferentes enzimas celulares y termina con el reconocimiento de aquella por el complejo E6-AP, el que luego se auto-ubiquitina para ser degradado en el proteasoma. Por otra parte, pRB actúa durante el ciclo celular como un regulador negativo, uniéndose su forma no fosforilada al factor de transcripción celular E2F. En la fase S, pRB es fosforilada por quinasas dependientes de ciclinas (cdk) liberando al mencionado factor transcripcional. Mediante el secuestro y la degradación de pRB, E7 lleva a la activación de los factores transcripcionales involucrados en la síntesis del DNA y en la progresión de la fase S del ciclo celular.

Inhibición de la apoptosis• **Inhibición de la vía de las caspasas**

Adenovirus: E1b inhibe la caspasa 8

Vaccinia: CrmA inhibe las caspasas 1 y 8

• **Dominio Bcl-2 homólogo**

EBV: BHRF1

• **Interacción con dominios DED**

HCV: core se une al dominio DED del TNFR-1 e inhibe la interacción de éste con TRADD o TRAF

• **Desregulación del ciclo celular**

HPV: E6 se une a p53 y la direcciona al proteasoma. E7 secuestra y degrada a pRB.

Ambos eventos favorecen la progresión del ciclo y la transformación celular.

HBV: X promueve el rápido pasaje por los puntos de chequeo

• **Alteración del sistema IFN o de sus moléculas regulatorias**

Véase la Tabla 9.

Inducción de la apoptosis*• **HIV: véase la Tabla 14**• **Alteración de la actividad mitocondrial****Influenza: PB1-F2 induce la apoptosis de monocitos**

Tabla 8.13. Algunos ejemplos de mecanismos de regulación de la apoptosis por parte de los virus. *: No se incluyen en esta Tabla otros mecanismos inductores de la apoptosis tales como por ejemplo: a) la potenciación de p53, b) la desregulación transcripcional, o c) la sobrecarga del retículo endoplásmico con proteínas virales, dado que los mismos ocurren en eventos o células no vinculados directamente con la evasión a la respuesta inmune. Véanse los Capítulos 5 y 7.



Un ejemplo muy especial de regulación de la apoptosis es el ejercido por HIV (Tabla 8.14). Dicha regulación puede ser analizada separadamente en células infectadas y en no infectadas, a la vez que la muerte de estas últimas puede producirse por mecanismos directos o indirectos. Dado que estimaciones previas documentaron que sólo una proporción de 1 en 400 a 1 en 80 000 de los linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica se encuentra infectada en pacientes con HIV, la disminución de esta población viral parecería no poderse justificar meramente por su infección.

La infección de LT CD4⁺ puede promover una alteración de la viabilidad celular por mecanismos apoptóticos y no apoptóticos (por ejemplo, mediante la formación de sincicios de células gigantes, o por aumento de la permeabilidad de la membrana celular asociada a la brotación de partículas virales o al efecto de la proteína viral Vpu). Asimismo, la acumulación tóxica de DNA viral no integrado, así como la actividad de proteasa viral que cliva inactivando la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y activando la procaspasa 8, torna a las células más sensibles a la disfunción mitocondrial ante estímulos internos o externos.

Por otra parte, los LT CD4⁺ y CD8⁺ son más propensos a la apoptosis dado que expresan en superficie una mayor concentración de Fas, la que aumenta con la progresión de la enfermedad. Las proteínas gp120, Tat y Nef aumentan los niveles de Fas y FasL, contribuyendo al evento apoptótico. Más aún, Tat activa la procaspasa 8 y conjuntamente con la proteasa viral, inhibe a la proteína celular anti-apoptótica Bcl-2. Este efecto se potencia al estimular los niveles de los miembros pro-apoptóticos de la familia homónima, Bax y Bim. Este efecto global es aumentado parcialmente por la proteína viral Vpu, la que mediante la inhibición del factor de transcripción celular NFκB, impide la síntesis de otra proteína celular anti-apoptótica como es Bcl-XL. La proteína viral Vpr promueve un efecto

citoprotector al comienzo de la infección en la que se encuentra con un bajo nivel de expresión, para luego colaborar en etapas más tardías en el disparo apoptótico, mediante la interacción con la proteína ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*), que promueve un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, liberando el citocromo C, y otras proteínas pro-apoptóticas, al tiempo que incrementa la transcripción del gen que codifica la caspasa 9.

Al menos tres proteínas de HIV (Nef, Vpu y gp120) inhiben la expresión en superficie de la molécula CD4, evitando así la sobreinfección y la promoción de la apoptosis a través de su interacción con gp120. La inhibición de la expresión de ciertas moléculas del CMH-I clásicas (HLA-A y B) y la expresión de moléculas no clásicas como HLA-E (presentan péptidos correspondientes a la secuencia líder de HLA-A, B, C o G) intenta evitar el reconocimiento por LT CD8⁺ y NK, respectivamente. En conjunto, se observa una estrategia magistral del HIV, retardando o impidiendo la apoptosis de la célula que lo alberga, y promoviéndola en células que pueden reconocer a dicha célula como infectada (LT CD8⁺) mediante la interacción Fas/FasL. A pesar de todo, la supervivencia de las células CD4⁺ infectadas con HIV está disminuida, por lo que su infección contribuye a la merma global de los CD4⁺, además de la que es atribuible a la muerte apoptótica de las células no infectadas.

La muerte de células no infectadas por HIV puede ocurrir por liberación de proteínas virales desde una célula infectada vecina, o por la inducción de su activación.

Entre las proteínas de HIV que pueden promover la muerte de LT vecinos, merecen indicarse a gp120, Tat, Nef y Vpu. La proteína de envoltura gp120 soluble o unida a membrana puede promover la apoptosis por mecanismos Fas-dependientes (sobre-expresión de Fas/FasL, inhibición de la proteína celular c-FLIP [*FLICE Inhibitory Protein*] inhibidora de la caspasa 8 [también denominada

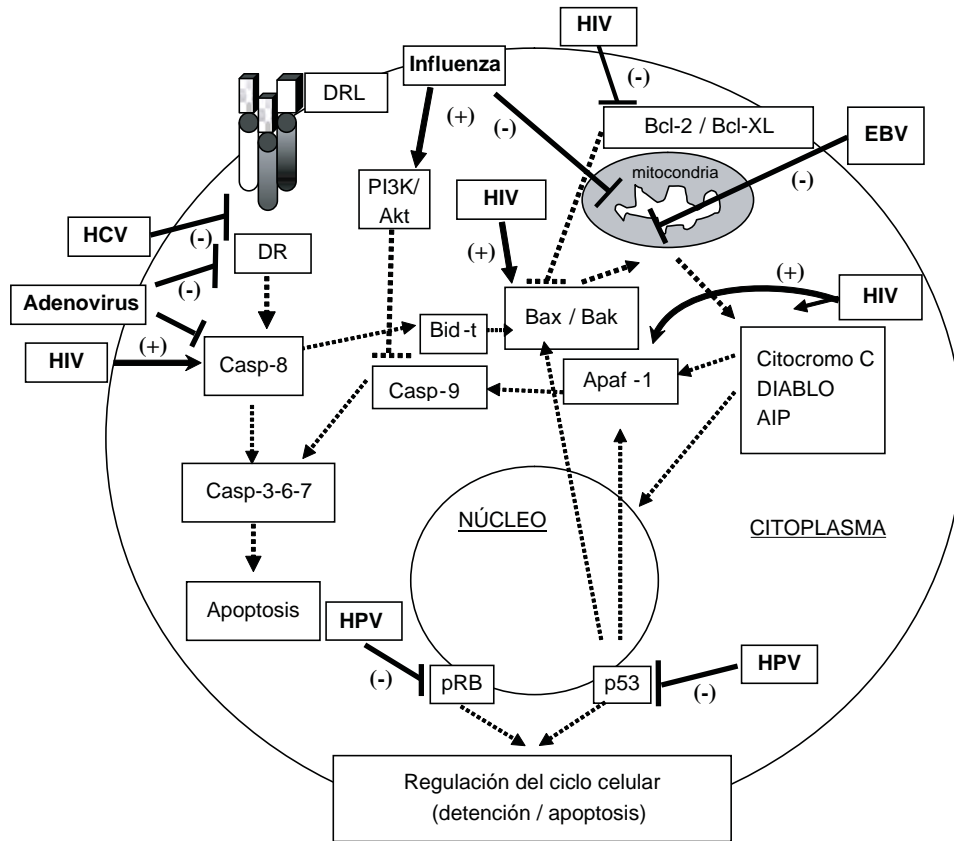


Figura 8.9. Efectos de la acción viral sobre las vías reguladoras de la apoptosis. La misma puede ocurrir como resultado del estímulo de dos vías: extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca es disparada a través de la interacción entre diversos DR (*Death Receptor* o receptor de muerte, tales como Fas, o el receptor para TNF (TNFR) o TRAIL (*TNF Receptor Apoptosis Inducing Ligand*) con sus ligandos DL (*Death Ligand* o ligando para receptores de muerte) específicos. La actividad de dichos receptores se asocia a la activación de la caspasa (Casp) iniciadora 8 y culmina con la de las efectoras 3, 6 y 7. La liberación de AIP (*Apoptosis Inducing Protein* o proteína inductora de apoptosis), DIABLO (*Direct IAP Binding protein with Low pI* [proteína de bajo punto isoeléctrico con unión directa a las IAP] también designada SMAC: (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*) o segundo activador de caspasa derivado de la mitocondria) y el citocromo C desde la mitocondria promueve —a través de Apaf-1 y la caspasa 9— el disparo de la vía apoptótica intrínseca. Apaf-1: *Apoptosis Protease Activating Factor-1* (Factor-1- activador de proteasa apoptótica). La caspasa 8 cliva Bid, produciendo una proteína truncada con actividad proapoptótica (Bid-t) que promueve las acciones homónimas de Bax/Bak en la mitocondria. PI3K/Akt: vía anti-apoptótica mediada por *Phosphatidy Inositol 3 Kinase* (Fosfatidil Inositol 3 quinasa) y Akt (también denominada Proteínquinasa B). pRB (proteína del retinoblastoma) y p53 regulan el ciclo celular promoviendo la detención del mismo o induciendo la apoptosis, respectivamente. Obsérvese que influenza inhibe la apoptosis en células epiteliales a través de la vía PI3K/Akt, al tiempo que puede promoverla en células monocíticas inhibiendo la adecuada función mitocondrial.

FLICE]) o Fas-independientes (aumento de Bax y disminución de Bcl-2) a través de su unión a moléculas CD4, CCR5 y CXCR4. La proteína Tat, al ser endocitada, puede promover la apoptosis mediante sobre-expresión de la caspasa 8, tal como se observa en LT CD4⁺ y en neuronas. Asimismo, promueve la apoptosis de LT CD4⁺ no infectados al aumentar la expresión de la molécula TRAIL (*TNF Receptor Apoptosis Inducing Ligand*) en la superficie de los monocitos. Finalmente, las proteínas Nef y Vpu promueven la muerte de LT CD4⁺ y CD4⁺ mediante la promoción de efectos tóxicos sobre la membrana celular. La miristilación de Nef le permite anclarse en la membrana plasmática, y promover la apoptosis por mecanismos Fas-independientes.

Dado que existen eventos moleculares en común entre los procesos de proliferación celular y apoptosis (condensación del núcleo, activación de caspasas), es comprensible que la activación de células inmunes, esté asociada al disparo de la muerte celular para limitar los efectos de una respuesta inmune activada.

La muerte apoptótica de células no infectadas ocurre también por inducción de su activación, por ejemplo, al interactuar gp120 con CD4, lo que la hace más susceptible a la muerte por Fas. Ello se debe a que si dicha unión precede a la correcta interacción entre un antígeno y el TCR, se inhibe la expresión de c-FLIP, un regulador de la vía apoptótica mediada por Fas/Caspasa 8 y aumenta la actividad de dicha caspasa, así como las de la 1 y la 3. Asimismo, la proteína Tat aumenta la expresión de la caspasa 8, la proteína Bax y FasL, al tiempo que inhibe la de Bcl-2. En conjunto, estos efectos promueven la muerte de células no infectadas activadas. Se ha postulado que en la apoptosis por activación, podrían participar las tres vías de su señalización: Fas (predominante), TNF y TRAIL. Se desconoce si la principal contribución a la muerte de células no infectadas es atribuible a la acción de las proteínas virales *per se* o a mecanismos apoptóticos asociados a la activación celular.

La expresión de moléculas CD4 en LT CD8⁺ activados, permite su infección por HIV. Asimismo, estos linfocitos pueden ser

Efactor	Mecanismo	Célula diana
gp120/160	Inapropiada activación después de unirse al CD4 Aumento de la sensibilidad a Fas Producción de FasL ¿Muerte no apoptótica por CXCR4 de LT CD8 ⁺ ?	No infectadas
Nef	Activación Producción aumentada de FasL	Infectadas y no infectadas
Tat	Aumento de la sensibilidad a Fas Producción aumentada de FasL	Infectadas y no infectadas
Vpr	Detención del ciclo celular Afectación de la permeabilidad mitocondrial	Infectadas y no infectadas
Proteasa	Clivaje de Bcl-2 y de proteínas estructurales	Infectadas
Apoptosis asociada a la activación	Activación asociada a HIV Aumento de la expresión de TRAIL, FasL o ambos	No infectadas
Muerte celular (autóloga) por macrófagos, monocitos y LT CD8 ⁺	Producción aumentada de ligandos para células citotóxicas inducida por células infectadas por HIV	No infectadas

Tabla 8.14. Mecanismos de acción propuestos para la apoptosis de linfocitos asociada a HIV.

pasibles del entrecruzamiento entre aquella molécula y la gp120, promoviendo la apoptosis. Este desenlace también puede ocurrir como resultado de la inducción de su activación por estímulos diversos, por la interacción con ligandos de muerte con células infectadas y por la estimulación antigénica crónica. Sin embargo, se ha observado que los niveles de LT CD8⁺ no están significativamente reducidos en pacientes infectados con HIV. Ello se atribuye a que esta población precede en su recuperación a la de los LT CD4⁺.

El entorno de citoquinas tales como IL-4 e IL-10 favorece la apoptosis de los linfocitos durante la infección por HIV. Por el contrario, la presencia de IL-15 promueve la producción de IFN- γ , la activación de los LT CD8⁺ y la inhibición de los eventos apoptóticos.

Otro ejemplo particular de virus que inhibe o promueve la apoptosis en un delicado balance es influenza. Su proteína no estructural NS1 inhibe la actividad (proapoptótica) de la PKR inducida por el IFN y activa mediante su propia unión a la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) la vía PI3K/Akt (anti-apoptótica), que inhibe a la caspasa 9, evitando la apoptosis temprana y permitiendo la replicación viral en células epiteliales. A su vez, la proteína PB1-F2 (codificada en la región de la Polimerasa Básica 1, pero en el marco de lectura [Frame] 2) promueve la apoptosis de monocitos infectados. En conjunto, se favorece la evasión a la respuesta inmune mediante efectos opuestos (anti-apoptosis/apoptosis) en células epiteliales y en aquellas que participan en la vigilancia inmunológica.

Recientes estudios pioneros determinaron *in vitro* que el HSV-1 es capaz de promover la apoptosis de linfocitos T activados a través de la sobre-expresión de galectina-1, una proteína (lectina) celular que se une a carbohidratos y que es crucial en la evasión inmune de ciertos procesos tumorales, así como en la regulación de la actividad de macrófagos y monocitos. La apoptosis de los linfocitos T

promovida por intermedio de galectina-1 contribuiría a la evasión viral a la respuesta inmune en la infección herpética.

2.6. MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO (TABLA 8.15)

Se ha demostrado que ciertas proteínas virales pueden exhibir secuencias aminoacídicas homólogas con las de proteínas de la cascada del complemento. Ello puede conducir a la inhibición de esa cascada a través de la unión proteína viral símil-complemento con factores regulatorios, o bien permitir la entrada viral a las células a través de receptores para complemento.

La proteína gpC de HSV-1 se expresa en la superficie de la célula infectada y se une a los componentes del complemento C3b y C3bi. La inhibición de la cascada del complemento promueve un mecanismo de escape a la neutralización viral y a la destrucción de la célula infectada. De manera análoga, el EBV ingresa al LB –donde podrá establecer una infección latente– a través de la homología aminoacídica entre su proteína de envoltura gp340 y C3b, aprovechando el mismo receptor CD21 que utiliza esta última molécula. La proteína core de HCV se une al receptor del complemento C1qR en linfocitos T; de esta manera, ocupa el lugar del ligando natural inhibiendo la respuesta de estas células a la acción del sistema de complemento.

2.7. SOBRE-EXPRESIÓN DE RECEPTORES PARA Fc Y CONSIGUIENTE UNIÓN DE IGS (TABLA 8.16)

Tanto el HCMV como el HSV-2 pueden escapar al reconocimiento inmune mediado por anticuerpos, ya que induciendo la expresión

<ul style="list-style-type: none"> • Proteína viral símil-componente del complemento <p>HSV: gpC se une a C3b e inhibe la cascada del complemento EBV: gp340 (símil-C3b) se une a CD21 e inhibe la cascada del complemento</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proteína viral que une a componentes del complemento <p>HCV: el core se une al receptor del complemento C1qR en LT inhibiendo la respuesta de estas células</p>

Tabla 8.15. Modificación de la actividad del sistema del complemento, algunos ejemplos.

<ul style="list-style-type: none"> • Escape a la lisis mediada por complemento y a la virólisis inmune <p>HCMV HSV</p>

Tabla 8.16. Sobre-expresión de receptores para Fc y consiguiente unión de Igs.

<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la expresión de CD4 en la superficie celular ♦ Aumento de la endocitosis de CD4 HIV: Nef interactúa con CD4 en la superficie celular y promueve su endocitosis ♦ Degradación de CD4 HIV: Vpu induce la degradación de CD4 neosintetizado • Unión de proteínas virales a CD81 ♦ En células NK HCV: E2 se une a CD81 promoviendo la inhibición de la citotoxicidad mediada por NK y la disminución en la producción de IFN-γ ♦ En LT citotóxicos HCV: E2 se une a CD81 promoviendo la activación de estas células –con un perfil preponderantemente Th2– y la inhibición de la expresión del TCR

Tabla 8.17. Interacción de proteínas virales con receptores celulares (moléculas CD), algunos ejemplos.

de los receptores para Fc permiten que las Igs se fijen a las células y tengan un impedimento estérico para realizar la lisis mediada por la formación del complejo antígeno/anticuerpo y complemento, o por un mecanismo de citotoxicidad a través del Fc de estas Igs. Este verdadero anclaje de los anticuerpos también facilita el escape a la virólisis inmune.

2.8. INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES CON RECEPTORES/ CORRECEPTORES CELULARES –MOLÉCULAS CD– (TABLA 8.17)

Se ha documentado la inhibición de la expresión de moléculas de CD4 en la superficie de las células infectadas con HIV. Esto es llevado a cabo por las proteínas virales Nef y Vpu por medio de diferentes mecanismos. El primero de ellos es la endocitosis de las moléculas de CD4 que se encuentran en la superficie celular. Para esto la proteína viral Nef interactúa con factores celulares de la maquinaria endocítica y promueve el transporte de CD4 al lisosoma, con su consiguiente degradación. Por otra parte, la proteína Vpu promueve la degradación de las moléculas de CD4 neosintetizadas logrando con esto también disminuir la expresión de las mismas en la superficie celular por una vía alternativa a la utilizada por Nef.

La interacción de la proteína E2 de HCV con las moléculas CD81 de la superficie de células NK puede inhibir la citotoxicidad de estas células, así como la producción de IFN- γ por parte de las mismas. Esto último puede alterar el desarrollo de la respuesta

Th1 –favoreciendo a la Th2– lo que explicaría el desbalance en la relación Th1/Th2 observada en los pacientes infectados con este virus. La inhibición de la respuesta inmune innata durante las etapas tempranas de la infección puede conferir una ventaja de inicio al HCV, el que con posterioridad probablemente no podrá ser controlado por la respuesta inmune adaptativa y, de este modo, persistirá en la célula hospedadora. A su vez, la misma proteína viral interactuando con la misma molécula CD, pero en una estirpe celular diferente produce efectos contrarios a los descritos anteriormente, es decir, de activación más que inhibición. La interacción antes mencionada (E2-CD81) en la superficie de LT produce activación de estas células, aumento en la producción de IFN- γ e IL-4, pero con una disminución en la expresión de moléculas del TCR en la superficie de los LT. Esto sugiere que durante la infección por HCV se produce una activación de LT que contribuye al daño de las células infectadas o a desórdenes autoinmunes asociados a la infección por este agente.

3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los virus han desarrollado un sinnúmero de estrategias para evadir las defensas inherentes a la respuesta innata y adaptativa del sistema inmune. Sólo algunas de ellas comienzan a ser dilucidadas, mientras otras aguardan su descubrimiento. En este capítulo se han descrito ejemplos fascinantes a través de los cuales los

virus logran su cometido, ya sea mediante el escape a las defensas evadiendo su reconocimiento (por ejemplo, mediante la variabilidad antigénica de virus como HIV, HCV, HBV, influenza o RSV, o a través de la promoción de la latencia viral con restringida, mínima o nula expresión de péptidos virales en el contexto de moléculas del CMH-I y/o II como lo hacen diversos miembros de la familia *Herpesviridae*), o mediante el contraataque o subversión viral afectando la funcionalidad de las células del sistema inmune (como por ejemplo lo realizan HIV, HCV, sarampión, EBV, etc.).

Sin embargo, el lector deberá tener presente que a pesar de la diversidad y sofisticación de las estrategias esgrimidas por los virus, el sistema inmune del hospedador es capaz de neutralizar la mayoría de ellas.

El conocimiento detallado de los mecanismos de evasión viral a la respuesta inmune contribuye a la mejor comprensión de la patogénesis molecular de las infecciones virales, a la vez que determina algunas de las moléculas diana que podrían ser potencialmente inhibidas en futuras intervenciones terapéuticas.

Bibliografía

- Agnellini P, Wolint P, Rehr M, Cahenzli J, Karrer U, Oxenius A. "Impaired NFAT nuclear translocation results in split exhaustion of virus-specific CD8+ T cell functions during chronic viral infection". *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:4565-70.
- Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection". *Nature* 2006;439:682-7.
- Boomker JM, de Leij LFMH, Hauw The T, Harmsen MC. "Viral chemokine-modulatory proteins: tools and targets". *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:91-103.
- Bonjardim, CA. "Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses-and viruses counteract IFN action". *Microbes Infec* 2005;7:569-78.
- Haller O, Kochs G, Weber F. "The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses". *Virology* 2006;344:119-30.
- Hilleman, MR. "Strategies and mechanisms for host pathogen survival in acute and persistent viral infections". *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:14560-6.
- Malmgaard, L. "Induction and regulation of IFNs during viral infections". *J Interf Cytok Res* 2004;24:439-54.
- Orange JS, Fassett MS, Koopman LA, Boyson JE, Strominger JL. "Viral evasion of natural killer cells". *Nat Immunol* 2002;3:1006-12.
- Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, et al. A. "Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression". *J Virol* 2007;81:2545-53.
- Schölz C, R Tampe. "The intracellular antigen transport machinery TAP in adaptive immunity and virus escape mechanisms". *J Bioenerg Biomembr* 2005;37:509-15.
- Schroder M, AG Bowie. "TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander?" *Trends Immunol* 2005;26:462-8.
- Vossen MT, Westerhout EM, Soderberg-Naucler C, Wiertz EJ. "Viral immune evasion: a masterpiece of evolution". *Immunogenetics* 2002;54:527-42.
- Weber F, Kochs G, Haller O. "Inverse interference: how viruses fight the interferon system". *Viral Immunol* 2004;17:498-515.

Diagnóstico virológico

Guadalupe Carballal, José Raúl Oubiña

1. CONCEPTOS INTRODUCTORIOS

1.1 IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

¿Para qué sirve un diagnóstico virológico? En la actualidad no se cuestiona la importancia del diagnóstico virológico en numerosas situaciones clínico-epidemiológicas. El diagnóstico de certeza es fundamental para decidir una intervención terapéutica, establecer el pronóstico en la evolución de un paciente, monitorear la respuesta a los tratamientos antivirales específicos, indicar la necesidad de una vacunación, y –desde un punto de vista epidemiológico– adoptar medidas de Salud Pública en una comunidad (Tabla 9.1).

Actualmente se dispone de numerosos procedimientos diagnósticos rápidos y eficaces; de técnicas moleculares de exquisita sensibilidad y de drogas antivirales específicas que deben ser administradas tempranamente en el curso de las infecciones virales. Por estas razones, la antigua creencia de que el diagnóstico virológico se obtiene tardíamente y resulta inútil para el paciente ha sido eliminada.

Numerosas publicaciones demuestran el costo-beneficio del diagnóstico virológico en múltiples situaciones, inclusive en aquellas para las que no existe un tratamiento específico.

En esos casos, el diagnóstico virológico permite disminuir costos innecesarios en antibióticos y en otros procedimientos diagnósticos, realizar el aislamiento en cohortes de pacientes con la misma infección para evitar la diseminación intrahospitalaria (por ejemplo, de virus respiratorios), determinar el estado inmune para indicar la vacunación sólo a los pacientes susceptibles, y adoptar medidas epidemiológicas para evitar la diseminación de ciertos virus.

Un dramático ejemplo de la importancia del diagnóstico virológico lo constituyen los brotes de influenza aviaria registrados en aves a fines del siglo XX y la aparición de los primeros casos en humanos

en estrecho contacto con esos animales. Además, en el año 2009, la emergencia de una cepa de influenza A (H1N1) produjo la primera pandemia del siglo XXI. En estos casos se debieron desarrollar rápidamente técnicas moleculares tanto para diagnóstico como para el estudio del genoma de estas cepas. Así, se pudo determinar que el virus pandémico de influenza A (H1N1) era un virus cuyo genoma exhibía una triple reasociación de sus segmentos de RNA constitutivos y que había adquirido la capacidad de transmisión interhumana.

1.2 FUNDAMENTOS DE LA UTILIZACIÓN DE MÉTODOS DIRECTOS E INDIRECTOS O SEROLÓGICOS

Para obtener las muestras adecuadas para el diagnóstico virológico es necesario conocer la patogenia de cada enfermedad (se observa un ejemplo en la Figura 9.1). Si bien existen variaciones, el período de incubación de la mayoría de las infecciones virales es de alrededor de 7 días (por el contrario, algunas diarreas ocurren al cabo de 24-48 h., mientras que la sintomatología de la rabia puede hacerse manifiesta aún luego de un año de período de incubación). Luego de un período prodromico, aparecen los síntomas (período de estado). En esta etapa, el virus está replicando activamente y por esta razón pueden emplearse para detectarlo métodos directos (aislamiento en cultivo, detección de antígenos virales, microscopía electrónica y métodos moleculares). Durante las últimas etapas del período de estado y en la convalecencia temprana aparecen los anticuerpos específicos antivirales, siendo la IgM la primera inmunoglobulina detectable y la que permitirá realizar el diagnóstico de infección reciente. Cuando los métodos de detección de IgM no existían, el diagnóstico serológico se realizaba por seroconversión (también denominada conversión serológica) en dos muestras: la primera obtenida en período de estado y la segunda a los 14-21 días. Esto permite un diagnóstico de certeza pero tardío (retrospectivo).

1) Al diagnóstico individual	Enfermedad o virus
Define una intervención terapéutica	Encefalitis o queratitis herpética, herpes genital Rabia Fiebre hemorrágica argentina Citomegalovirus humano en inmunodeprimidos HIV Hepatitis B, hepatitis C Influenza
Orienta un pronóstico	Infecciones congénitas (por rubéola o parvovirus humano B19), citomegalovirus humano
Monitorea la respuesta a la terapéutica	HIV, hepatitis B, hepatitis C, citomegalovirus humano
2) A la vigilancia epidemiológica	Incidencia de la infección por HIV Hepatitis virales Virosis emergentes y re-emergentes: Arbovirus Hantavirus Influenza Influenza pandémica A (H1N1) 2009 Influenza aviar Nuevos virus respiratorios

Tabla 9.1. Contribuciones del diagnóstico virológico.

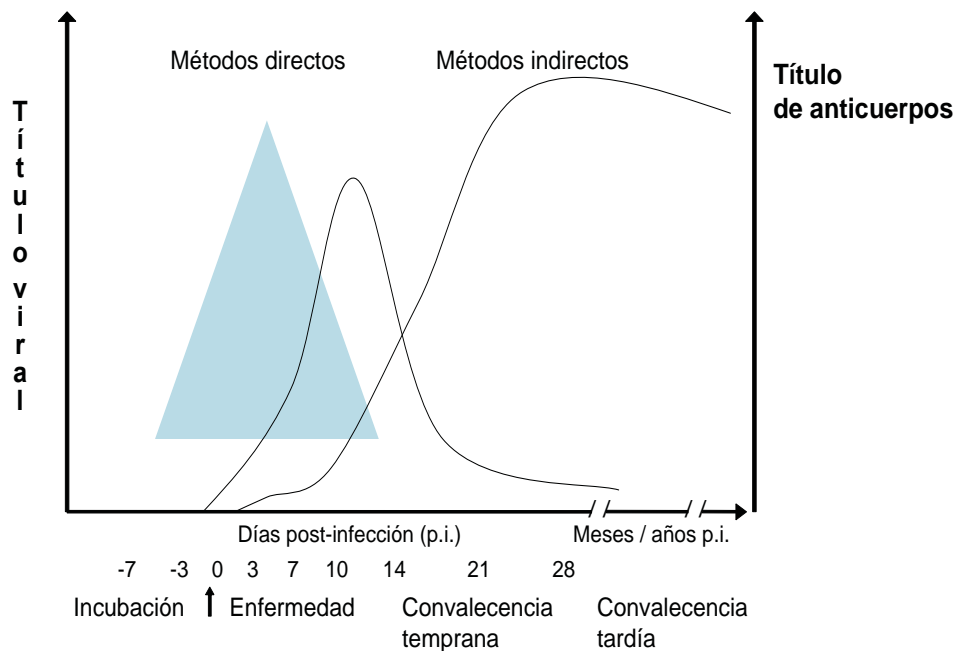


Figura 9.1. Infección viral aguda: métodos directos e indirectos de diagnóstico. El día 0 indica el comienzo de los síntomas.

Estas son orientaciones generales; las múltiples posibilidades de diagnóstico serán analizadas en los capítulos respectivos.

La elección de las muestras y el momento de su obtención dependerán de la patogenia de cada infección viral y de la cinética de la producción de anticuerpos. Por ejemplo, los virus respiratorios se eliminan en altos títulos en secreciones respiratorias por lo que se pueden detectar en muestras respiratorias obtenidas durante los primeros días de enfermedad, ya que subsiguientemente, el título de virus en dichas secreciones disminuye, dificultando así su diagnóstico. Por el contrario, en la hepatitis B crónica el antígeno de superficie (HBs Ag) será detectable en el suero por más de seis meses, y aún durante años.

Otros aspectos a considerar para un diagnóstico adecuado son los siguientes: las características del virus y del paciente (inmunocompetente o inmunocomprometido), la edad, el tipo y estadio de la infección, la factibilidad de realizar técnicas diagnósticas, y la complejidad del laboratorio disponible, incluyendo los recursos humanos y económicos. El diagnóstico de las infecciones virales se apoya en un trípode diagnóstico (Figura 9.2).

1.3. CONCEPTO DE MÉTODOS DIRECTOS E INDIRECTOS (TABLA 9.2)

En este texto se utilizará –con fines exclusivamente didácticos– el término "método" para referirse al objetivo diagnóstico: **el agente etiológico será detectado mediante métodos directos y la respuesta inmune humoral mediante metodología indirecta**. Se mencionarán diversas "técnicas" para alcanzar el objetivo diagnóstico. En contraposición con los procedimientos clásicos de diagnóstico virológico que requerían tiempos prolongados para establecerlo, desde la década de 1980 se ha afianzado el valor clínico de procedimientos rápidos para lograrlo. Sin embargo, el lector observará que muchas veces publicaciones diversas utilizan indistintamente los términos "método", "técnica" y "procedimiento". Así por ejemplo, en el lenguaje de este texto una misma técnica (por ejemplo un ELISA) puede ser utilizada para métodos directos o indirectos, y en el caso de la pesquisa de IgM corresponder también a un procedimiento rápido de diagnóstico.

1.3.1. Métodos directos

Se denominan **métodos directos de diagnóstico virológico** a aquellos que detectan la presencia del virus (o alguno de sus

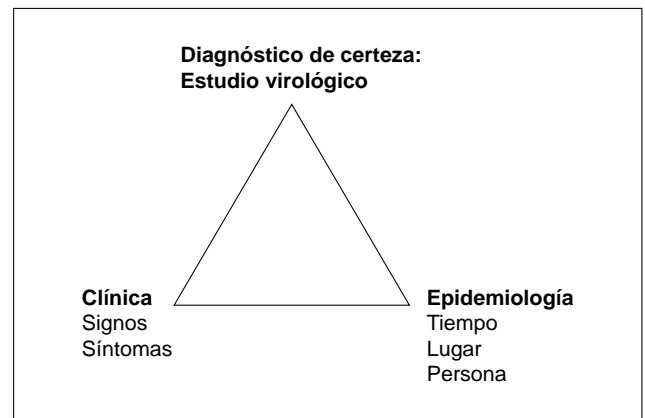


Figura 9.2. Trípode de diagnóstico en las infecciones virales.

componentes) en muestras clínicas, lo que puede realizarse a través de diversas técnicas que investigan la presencia de:

- 1) agentes infecciosos (mediante la observación de su replicación en cultivos celulares [aislamiento viral])
- 2) partículas virales (microscopía electrónica)
- 3) antígenos virales por técnicas de inmunomarcación (IF, ELISA, IP)
- 4) genomas virales por técnicas moleculares (hibridación, PCR, RT-PCR, etc.).

El aislamiento viral es la técnica clásica y fue una de las primeras utilizadas en Virología. Para muchos virus, el aislamiento es la técnica de referencia o estándar de oro (en inglés, *gold standard*) del diagnóstico, ya que permite la obtención de la cepa viral, lo que presenta gran importancia no sólo para el diagnóstico de un caso individual sino para estudios epidemiológicos. Sus desventajas son: el tiempo de espera de resultados (días o semanas), su alto costo y realización compleja, ya que requieren personal entrenado, infraestructura costosa para trabajo en condiciones de esterilidad y bioseguridad en cultivos celulares y/o para mantenimiento de animales (biotérios). Además, no todos los virus que causan patología en humanos son cultivables.

Actualmente, **se dispone de procedimientos rápidos de diagnóstico virológico que permiten obtener un resultado a pocas horas de obtenida la muestra**, lo que resulta de gran valor clínico.

Estos procedimientos son de más fácil ejecución y de menor costo, ya que no requieren infraestructura para aislamiento del virus en cultivos celulares (Tabla 9.3). Los procedimientos rápidos pueden corresponder a métodos *directos* o *indirectos*, por lo que pueden detectar:

- 1) partículas virales por microscopía electrónica;
- 2) antígenos virales por métodos de inmunomarcación;
- 3) genomas virales por procedimientos moleculares;
- 4) IgM específica en una única muestra de suero (*éste es un método indirecto*) mediante inmunoensayo.

1.3.2. Métodos indirectos

Se denominan **métodos indirectos o serológicos a aquellos que investigan la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos específicos antivirales en el suero o plasma del paciente**. Por ende, no detectan la presencia del agente etiológico. Para realizar un diagnóstico virológico sustentado en la serología es necesario determinar la conversión serológica (seroconversión) o bien la presencia de IgM específica antiviral.

Se define a la "conversión serológica" como la aparición o el aumento de 4 o más veces del título de anticuerpos entre dos muestras pareadas de suero, la primera obtenida en período agudo y la segunda en la convalecencia (14-21 días después del comienzo de los síntomas) y procesadas simultáneamente (Figura 9.1). La demostración de conversión serológica es un método clásico y eficaz de diagnóstico, pero es retrospectivo; es decir, el resultado se obtiene generalmente cuando el paciente se ha curado; por ello, sólo se la utiliza para confirmación de casos o para estudios epidemiológicos en los que resulta de extraordinario valor.

La detección de IgM específica antiviral en una única muestra de suero obtenida en el período agudo o en la convalecencia temprana, permite realizar un diagnóstico de certeza en muchas infecciones virales, con la enorme ventaja sobre el procedimiento anterior de que el resultado estará disponible en tiempos clínicamente relevantes (procedimiento rápido).

2. MUESTRAS

2.1. OBTENCIÓN (TABLA 9.4 Y 9.5)

Para obtener la muestra adecuada en el momento oportuno es necesario conocer la patogenia de cada infección viral, las caracterís-

ticas del virus y el estadio de la enfermedad. Las muestras pueden obtenerse mediante hisopados de secreciones conjuntivales, genitales, rectales, nasales, faríngeas o de lesiones cutáneas; por aspirados nasofaríngeos o traqueales o lavado bronquioalveolar. También pueden utilizarse muestras de sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido amniótico, materia fecal, y/u órganos obtenidos mediante biopsia o autopsia.

Para la obtención de las muestras deben usarse guantes y es necesario observar las normas de bioseguridad. Las muestras deben colocarse en recipientes estériles y con tapa hermética para evitar riesgos de derrame.

En todos los casos, junto con la muestra debidamente rotulada, es imprescindible remitir al laboratorio una orden médica que contenga: a) nombre del paciente; b) estudio solicitado; c) tipo de muestra enviada; d) breve resumen de historia clínica; e) fecha de comienzo de la enfermedad actual; f) fecha de extracción de la muestra; y g) datos del médico remitente.

2.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA AISLAMIENTO VIRAL

Estas muestras deben colocarse en tubos con un medio de transporte para virus. Uno de los más usados es el medio de Hank's con 0,2 % de albúmina bovina, o suero fetal bovino, antibióticos y antimicóticos. Las proteínas se añaden para preservar la infectividad viral y los antimicrobianos para inhibir la (potencial) flora contaminante. Para aislamiento, es fundamental la obtención temprana de las muestras, ya que las posibilidades de éxito son mayores en etapas iniciales de la enfermedad. Además, es muy importante la correcta conservación y el envío rápido de la muestra, debidamente refrigerada para evitar la inactivación térmica del virus.

Existen equipos comerciales para obtención y envío de muestras que contienen hisopos de materiales sintéticos y una ampolla con medio de transporte (*Culturet, Virocult*, etc.). Dado su alto costo, en nuestro medio son habitualmente reemplazados por los tubos con medio de transporte preparados en cada laboratorio, los que deben ser conservados a 4° C y utilizados antes de la fecha de vencimiento.

2.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA DIVERSOS PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS

Muestras para virus respiratorios

Las muestras deben obtenerse tempranamente (3-7 días del inicio de la enfermedad). Pueden ser: aspirados nasofaríngeos (ANF), hisopa-

Métodos	Procedimiento / Técnica	Detección de:
Directos	1) <i>Aislamiento en:</i> Huevos embrionados, animales o cultivos celulares	Lesiones y/o muerte Acción citopática (ACP)
	2) <i>Identificación del virus (aislado o no) mediante:</i> Inmunomarcación (IF, IP, ELISA), neutralización, FC, IHA, etc. Microscopía electrónica Hibridación, PCR, PCR en tiempo real, RFLP, secuenciación nucleotídica	Antígenos virales Partículas virales Genomas virales
Indirectos o serológicos	Neutralización ELISA, IFI, FC, IHA, etc. ELISA, IFI	Anticuerpos específicos - Conversión serológica en dos muestras pareadas - IgM específica: en muestra única de período agudo o convalecencia temprana

Tabla 9.2. Clasificación de los métodos de diagnóstico virológico de acuerdo a la forma en que detectan la infección. IF: inmunofluorescencia; IP: inmunoperoxidasa; ELISA: enzimoimmunoensayo; PCR: *Polymerase chain reaction* = Reacción en cadena de la polimerasa; FC: Fijación del complemento; RFLP: *Restriction fragment length polymorphism* = polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción; IFI: inmunofluorescencia indirecta; IHA: Inhibición de la hemaglutinación.



Detección del virus (o alguno de sus componentes) en muestras clínicas en la forma de:	Técnica
Partícula viral	Microscopía electrónica Inmunomicroscopía electrónica
Antígeno viral	Técnicas de inmunomarcación - Inmunofluorescencia directa (IF) - Inmunofluorescencia indirecta (IFI) - Inmunoperoxidasa (IP) - Enzimoimmunoensayo (ELISA) - Contraimmunoelectroforesis (CIE)
Genoma viral	Sin amplificación: hibridación <i>in situ</i> o en solución Con amplificación: PCR, RT-PCR, PCR en tiempo real, <i>branched</i> DNA (DNA ramificado), etc. NASBA / TMA (amplificación mediante transcripción)
Detección de anticuerpos específicos	IgM específica (IFI, ELISA, de captura)

Tabla 9.3. Procedimientos de diagnóstico virológico rápido.

dos nasales (HN) y faríngeos (HF) combinados (HN + HF), hisopados nasofaríngeos (HNF), lavados nasales, aspirados endotraqueales, lavados bronquioalveolares (LBA) o tejido pulmonar obtenido en biopsias (transtraqueales o transbronquiales, a cielo abierto) ó en autopsias.

Para diagnóstico de virus respiratorios en pacientes internados el ANF es la muestra de elección. Los hisopados nasal y faríngeo combinados (HN + HF) así como también los hisopados nasofaríngeos (HNF) obtenidos con hisopos flexibles, son de fácil realización y están indicados para pacientes ambulatorios. El esputo no es adecuado debido a su contaminación con agentes presentes en fauces. Las biopsias constituyen excelentes muestras, pero debido a su obtención cuantitativa, sólo se utilizan cuando la gravedad del caso lo justifica.

Los LBA son útiles para el diagnóstico de citomegalovirus humano (HCMV) y herpes simplex (HSV) –entre otros– en inmunocomprometidos, ya que pueden replicar en macrófagos alveolares.

Los procedimientos de obtención de las muestras respiratorias así como las medidas de bioseguridad que debe observar el operario se detallan en los Capítulos 13 y 59.

Si se solicita un diagnóstico mediante aislamiento viral, los hisopos con la muestra deben colocarse en un tubo con medio de transporte para virus. Si se solicita sólo detección de antígenos o métodos moleculares, los hisopos se colocan en solución fisiológica estéril. Cuando existe disponibilidad es recomendable emplear ambos procedimientos.

Lesiones cutáneas y mucosas

Las muestras de lesiones cutáneas o mucosas (herpes, varicela o zóster) o genitales (herpes) se obtienen por hisopado de la base de las vesículas ó por obtención del fluido de las vesículas con aguja y jeringa. La elección de las vesículas es importante; éstas deben ser frescas, no costrosas o contaminadas, debiéndose seleccionar varias. Es de destacar que si la obtención de la muestra no es adecuada, la recuperación de virus será difícil o imposible.

Si se solicita detección de antígenos, los hisopos con la muestra deben colocarse en solución fisiológica. Si también se solicita aislamiento en cultivo, otros hisopos deben colocarse en medio de transporte para virus. En algunos laboratorios se utilizan habitualmente ambas técnicas para detección de los virus herpes simplex y varicela-zóster ya que así se aumenta la sensibilidad, por lo cual se reciben dos tubos con muestras (en medio de transporte y en solución fisiológica).

Sangre y Suero

La sangre debe obtenerse mediante una venopuntura realizada en una superficie cutánea luego de efectuada la asepsia de la zona, utilizando aguja y jeringa esterilizadas. La muestra debe colocarse en tubos esterilizados con tapa hermética. Es importante el descarte de los elementos utilizados en recipientes rígidos para evitar posibles accidentes por punción percutánea.

La sangre se colocará en tubos con o sin anticoagulante, dependiendo del virus que se intente aislar y de que circule libre en el plasma o asociado a células.

En la sangre pueden detectarse: a) virus infeccioso (viremia) por aislamiento en cultivos celulares; b) antígenos virales, previa separación del suero (por ejemplo, HBs Ag del virus de hepatitis B); c) antígenos en el núcleo de polimorfonucleares (antigenemia pp 65 para citomegalovirus humano, o antigenemia para virus herpes humano-6); d) genomas virales por técnicas moleculares en sangre entera, en células ó en suero / plasma (PCR para citomegalovirus humano, virus Epstein-Barr, virus herpes humano-6, virus hepatitis B, virus hepatitis C, HIV, etc).

El aislamiento de un virus a partir de una muestra de sangre (viremia) evidencia con certeza una infección aguda, o bien una reactivación (citomegalovirus humano). La detección de viremia se emplea en las infecciones que producen viremias de alto título y prolongadas (fiebre hemorrágica argentina, fiebre amarilla, citomegalovirus humana en el inmunocomprometido, etc.).

La separación de células linfomononucleares (*buffy coat*) de sangre suele dar mejores resultados para aislamiento que la sangre entera en caso de citomegalovirus humano o varicela-zóster.

La detección del HBs Ag es utilizada de rutina en los bancos de sangre para el estudio de la sangre a transfundir y en el diagnóstico de infección por virus hepatitis B. Recientemente, se han desarrollado métodos para la detección del antígeno del *core* del virus hepatitis C. La antigenemia pp 65 para citomegalovirus humano es empleada habitualmente en el monitoreo de pacientes inmunosuprimidos luego del trasplante de órganos.

Las técnicas moleculares (PCR, RT-PCR y PCR en tiempo real) se usan en numerosas situaciones diagnósticas, pudiéndose emplear sangre entera o suero / plasma, de acuerdo a cada virus en particular.

Suero para serología

El suero puede emplearse para:

- Determinar el estado inmune (presencia de anticuerpos producto de una infección previa), para lo cual es suficiente con una única muestra de suero (por ejemplo, determinar el estado inmune antes de indicar una vacunación para rubéola o hepatitis B);
- Diagnóstico de infección reciente. Puede realizarse por:
 - detección de conversión serológica (seroconversión) en dos muestras pareadas de suero: la primera obtenida en período agudo, y la segunda en la convalecencia, a los 14 - 21 días.
 - detección de IgM específica en una muestra única de suero obtenida durante al período agudo o en la convalecencia temprana (véase *Diagnóstico serológico*).

Materia fecal e hisopados rectales

El diagnóstico de rotavirus y adenovirus entéricos se puede realizar en forma rápida por ELISA o inmunocromatografía en materia

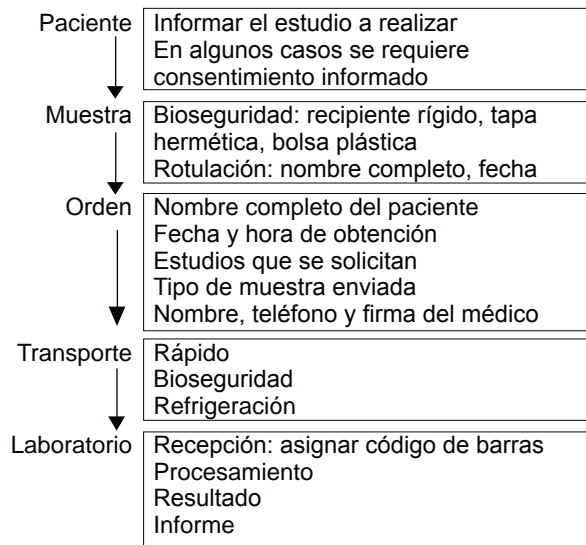


Tabla 9.4. Requisitos para el envío de muestras para diagnóstico.

fecal. También pueden aislarse en cultivo numerosos enterovirus (véase el Capítulo 20).

Es necesario tener en cuenta que muchos virus entéricos responsables de gastroenteritis no son cultivables (rotavirus, norovirus [agente Norwalk], algunos adenovirus, etc.), por lo que deben emplearse otras técnicas diagnósticas.

Orina

Muchos virus se excretan por orina durante el período de incubación y enfermedad por períodos prolongados. El diagnóstico puede realizarse por aislamiento en cultivo (citomegalovirus humano, adenovirus, rubéola) o por detección de antígenos virales en células descamadas (citomegalovirus humano) ó ácidos nucleicos mediante técnicas moleculares (citomegalovirus humano, adenovirus y virus BK).

Muestras genitales

Para papilomavirus se utilizan biopsias cutáneas o de endocervix (véase el Capítulo 29, Papilomavirus humano). A partir de hisopados de cervix puede recuperarse citomegalovirus humano y herpes simplex, especialmente en embarazadas.

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

El LCR debe obtenerse en forma estéril y en él pueden detectarse virus por: a) aislamiento; b) pesquisa de antígenos; y c) técnicas moleculares, siendo éstas últimas las más empleadas en la actualidad.

A partir de LCR pueden aislarse enterovirus no-polio y parotiditis. Los herpesvirus –causa importante de infección del SNC– rara vez se aíslan del LCR con la excepción de las meningitis debidas a herpes simplex tipo 2. En inmunosuprimidos, puede aislarse citomegalovirus humano, varicela-zóster y adenovirus. Los togavirus pueden estar también presentes en el LCR.

La aplicación de técnicas moleculares (por ejemplo la PCR o la RT-PCR) son de elección para el diagnóstico de las infecciones del SNC permite detectar rápida y certeramente numerosos virus, tales como herpes simplex, varicela-zóster, parotiditis, West Nile, alfavirus (encefalitis equinas), flavivirus (encefalitis de San Louis), etc. Por lo tanto, son los procedimientos de elección para esta muestra.

Muestras oculares

Los virus que se detectan con mayor frecuencia son los herpesvirus (66%) y los adenovirus (34%). También se detectan enterovirus productores de conjuntivitis hemorrágica (enterovirus 70) y, muy raramente, virus vaccinia, como consecuencia de infección ocular luego de una vacunación (actualmente, no utilizada en la población general).

Las muestras se obtienen por hisopado conjuntival o corneal y las técnicas utilizadas propugnan la detección de antígenos, el aislamiento viral o la detección del genoma viral. En el humor acuoso de pacientes infectados con HIV y con retinitis por citomegalovirus humano puede detectarse este virus por PCR.

Tejidos

Los tejidos (obtenidos en biopsias o autopsias) son excelentes muestras para aislamiento, detección de antígenos o de genomas virales, además de su utilidad para estudios histopatológicos. Por ejemplo, en pulmón pueden aislarse citomegalovirus humano, herpesvirus, adenovirus, virus respiratorios, etc. Ocasionamente, a partir de hígado o bazo pueden aislarse citomegalovirus humano o herpes. El virus Junín (agente de la fiebre hemorrágica argentina) puede aislarse de sangre, y órganos (bazo, pulmón e hígado, obtenidos en necropsias).

Para la detección de antígenos por procedimientos rápidos, se realizan improntas de tejidos o bien cortes por criostato, los que luego de la fijación en acetona u otros fijadores se procesan mediante técnicas inmunohistoquímicas (IF, IP), ó moleculares (hibridación *in situ*, ó PCR). También puede emplearse la microscopia electrónica sobre cortes ultrafinos de los tejidos.

2.4 CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE AL LABORATORIO

Es importante considerar que si la muestra ha sido obtenida adecuadamente pero es conservada y/o transportada en condiciones inadecuadas, la posibilidad de obtener el diagnóstico etiológico puede perderse.

El envío al laboratorio debe realizarse siempre en condiciones de bioseguridad. Esto implica el uso de tubos tapados herméticamente y el transporte en gradillas o recipientes rígidos. Cada muestra debe enviarse debidamente rotulada con los datos del paciente dentro de una bolsa plástica herméticamente cerrada. Por fuera, debe adjuntarse una orden que indique el estudio que se solicita, el tipo de muestra enviada, un breve resumen de historia clínica, la fecha de comienzo de la enfermedad y los datos del médico remitente. Esto es importante dado que en muchas situaciones es necesaria una comunicación directa con el médico (Tabla 9.4).

Muestras para aislamiento

La mayoría de los virus se inactivan rápidamente una vez separados de los tejidos del hospedador; por esta razón, las muestras para aislamiento deben ser enviadas inmediatamente al laboratorio en medio de transporte para virus y refrigeradas a 4° C. Si la muestra debe esperar algunas horas antes del envío, su conservación debe realizarse en heladera a 4° C. Las muestras de sangre, materia fecal, LCR y órganos se colocan en recipientes estériles y herméticos sin agregado alguno. Las muestras de secreciones cutáneo-mucosas se conservan en medio de transporte para virus.

El envío debe realizarse en recipientes herméticos de "telgopor" o plástico, con enfriadores de uso doméstico o hielo. En este último caso el agregado de sal otorga una mayor duración al hielo, debido al descenso del punto crioscópico. En muchos laboratorios, las muestras para aislamiento con un tiempo de transporte mayor a 1-2 h. son rechazadas, excepto en casos de virus muy estables (adenovirus) o en aquellas situaciones en que la repetición de la muestra sea dificultosa o imposible. Las muestras para aislamiento no deben congelarse, excepto en el caso que el traslado implique grandes distancias (por ejemplo, a laboratorios de referencia). En estos casos se usará hielo seco.

Es imprescindible enviar un breve resumen de historia clínica, la fecha de comienzo de la enfermedad, así como la fecha y hora de extracción de la muestra para poder calcular así el tiempo de transporte. Para algunos virus muy lábiles (sincial respiratorio, citomegalovirus humano), se recomienda enviar las muestras inmediatamente para su inoculación en cultivos en cuanto llegan al laboratorio para evitar la inactivación viral y el resultado falsamente negativo. Existen excepciones, que deberán consultarse con el virólogo.



Síndrome / enfermedad	Virus	Muestras	Técnica o procedimiento
Meningitis	<i>Usuales</i> Enterovirus ECHO, Coxsackie	LCR	RT-PCR, cultivo
	<i>Inusuales</i> Herpes simplex HIV Epstein-Barr Varicela-zóster Parotiditis Coriomeningitis linfocitaria <i>West Nile</i> (Virus del Nilo Occidental)	LCR Plasma Suero, LCR LCR LCR Suero, LCR Sangre, suero, LCR	PCR RT-PCR Serología, PCR PCR Cultivo, RT-PCR Serología: IgM, cultivo, RT-PCR Serología: IgM, RT-PCR
Encefalitis	<i>Usuales</i> (no asociados a HIV) Herpes simplex Enterovirus humano Arbovirus	LCR LCR LCR, suero	PCR RT-PCR Serología: IgM
	<i>Usuales</i> (asociados a HIV) Citomegalovirus humano Epstein-Barr, varicela-zóster, JC	LCR	PCR
	<i>Inusuales</i> Varicela-zóster Epstein-Barr Herpesvirus humano-6 Parotiditis Rabia <i>West Nile</i>	LCR LCR LCR LCR, saliva LCR, saliva, piel Sangre, suero, LCR	PCR PCR PCR Cultivo, RT-PCR Cultivo, RT-PCR Serología: IgM, RT-PCR
Infección respiratoria	<i>En inmunocompetentes</i> Influenza Sincicial respiratorio Parainfluenza Adenovirus Metapneumovirus humano Rhinovirus humano Bocavirus humano	Aplicable a todos los virus Aspirado nasofaríngeo, Hisopado nasal / faríngeo, Hisopado Nasofaríngeo Lavado nasal, Aspirado traqueal, Lavado bronquioalveolar (LBA)	IF, ELISA, Cultivo, RT-PCR / PCR IF, ELISA, Cultivo, RT-PCR / PCR IF, ELISA, Cultivo, RT-PCR / PCR IF, ELISA, Cultivo, PCR RT-PCR, Cultivo, IF RT-PCR, cultivo PCR
	<i>En inmunocomprometidos</i> Citomegalovirus humano Herpes simplex, adenovirus Varicela-zóster	Respiratoria, sangre	PCR, Cultivo
Gastroenteritis	Rotavirus, adenovirus Astrovirus, calicivirus Norovirus, sapovirus Torovirus	Heces	ELISA, microscopia electrónica
Lesiones cutáneo-mucosas	Herpes simplex Varicela-zóster Poxvirus (varias especies) Papilomavirus humano	Hisopado Hisopado Hisopado, biopsia Hisopado de cérvix, biopsia	IF, Cultivo IF, Cultivo Microscopia electrónica, PCR PCR, captura de híbridos
Hepatitis	Hepatitis A	Suero	Serología (ELISA): IgM
	Hepatitis B	Suero	Serología (ELISA): HBs Ag, IgM anti-core, PCR, Carga viral
	Hepatitis C	Suero	Serología: anticuerpos anti-HCV (ELISA, LIA / RIBA); antígeno core (HCc Ag) RT-PCR, Carga viral
	Hepatitis D	Suero	Serología (ELISA)
	Hepatitis E	Suero	Serología (ELISA)

Miocarditis / pericarditis	Enterovirus humanos (ej. Coxsackie B) Adenovirus Parvovirus humano B19	Biopsia Líquido pericárdico Heces Hisopado de fauces Sangre	Cultivo, RT-PCR / PCR Cultivo, RT-PCR / PCR Cultivo, RT-PCR / PCR Cultivo, RT-PCR / PCR Cultivo, RT-PCR / PCR
Conjuntivitis / queratitis	Adenovirus, herpes simplex varicela-zóster	Hisopado conjuntival	Cultivo, IF, PCR
Retinitis	Citomegalovirus humano Herpes simplex	Humor vítreo Humor vítreo	PCR PCR
Cistitis hemorrágica	Adenovirus BK	Orina Orina	Cultivo, PCR PCR
Síndrome mononucleósico	Epstein-Barr Citomegalovirus humano HIV Herpesvirus humano-6	Suero Suero Plasma Suero	Serología: anticuerpos heterófilos (aglutinación) IgM anti-VCA (IF, ELISA) Serología: IgM, cultivo, PCR RT-PCR IgM, (IF, ELISA), cultivo, PCR
Exantema	Enterovirus humano Parvovirus humano B19 Herpesvirus humano-6 Sarampión Rubéola post-natal	Hisopado faríngeo Heces Suero Suero Suero Muestras respiratorias Suero	Cultivo, RT-PCR Serología: IgM, PCR IgM (IF, ELISA), cultivo, PCR Serología: IgM Antígenos por IF Serología: IgM
Infecciones congénitas	<i>Diagnóstico in útero</i> Rubéola Citomegalovirus humano Parvovirus humano B19	Sangre fetal Líquido amniótico Líquido amniótico Líquido amniótico Sangre fetal	Serología: IgM Cultivo, RT-PCR Cultivo, PCR PCR Serología: IgM
	<i>Diagnóstico post-parto</i> Citomegalovirus humano Herpes simplex Rubéola Parvovirus humano B19	Orina Fauces Suero Hisopado de lesiones Suero Orina Suero Suero	Cultivo, PCR, IF Cultivo, PCR Serología: IgM Cultivo, IF Serología: IgM Cultivo, IF, RT-PCR Serología: IgM Serología: IgM, PCR

Tabla 9.5. Muestras para diagnóstico virológico de acuerdo al síndrome clínico.

Muestras para diagnóstico rápido

Para la detección de antígenos virales las condiciones del transporte no son tan estrictas, ya que no se requiere la presencia de virus viable, aunque siempre es recomendable la conservación y el transporte a 4°C. Existen excepciones, por ejemplo, el diagnóstico de virus respiratorios pueden realizarse en muestras remitidas por correo y a temperatura ambiente en recipientes que contienen medios de transporte (*Culturette o Virocult*) sin perder su valor diagnóstico. Esto se emplea en estudios epidemiológicos en los cuales hospitales periféricos envían muestras a centros de referencia. (véanse los capítulos 13, 14 y 17).

Muestras para estudios de Biología molecular

En muestras para estudios con RNA debe tener en cuenta la significativa labilidad del mismo en condiciones ambientales, así como su fácil degradación por ribonucleasas (por ejemplo, presentes en las manos del operador). Por ello se recomienda el empleo de guantes nuevos, sin talco (este material inhibe la amplificación del DNA por la *Taq* DNA polimerasa), y si es posible humedecidos con alcohol 70°.

Dado que muchas de las técnicas de Biología molecular utilizan eventos de amplificación de la secuencia blanco o de la señal

de detección, es menester emplear recipientes, tubos e instrumental (por ejemplo, bisturíes, pinzas, cuchillas, etc.) nuevos y estériles, con el objeto de evitar falsos positivos atribuibles a los potenciales restos genómicos de patógenos que pudieren estar presentes aún en el material esterilizado (previamente usado).

Los estudios para determinar la carga viral se realizan habitualmente utilizando plasma (HIV, HCV, HBV) o suero (HBV, HCV). Es aconsejable el empleo de tubos de vidrio al vacío con un tapón de plástico blando (por ejemplo, *Vacutainer™*). La utilización de anticoagulantes como EDTA o citrato de sodio (concentración final 0,38%), es recomendable para ensayos de PCR o RT-PCR. La heparina puede inhibir la actividad de la *Taq* DNA polimerasa, produciendo resultados equívocos. Sin embargo, este anticoagulante puede utilizarse en ensayos de amplificación isotérmica como el NASBA/TMA. Es también deseable que las muestras de sangre no estén hemolizadas, debido a que la presencia de hemoglobina en suero o plasma puede producir falsos resultados negativos en estudios de PCR o RT-PCR.

En el caso de obtenerse muestras correspondientes a pequeños volúmenes de diversos fluidos, éstos pueden introducirse en tubos Eppendorf de 1,5 ml con tapa hermética (nuevos y estériles). En el caso de tratarse de muestras sólidas (biopsia, raspados, torundas, etc.) es recomendable su inmersión en dichos tubos con 100 µl de

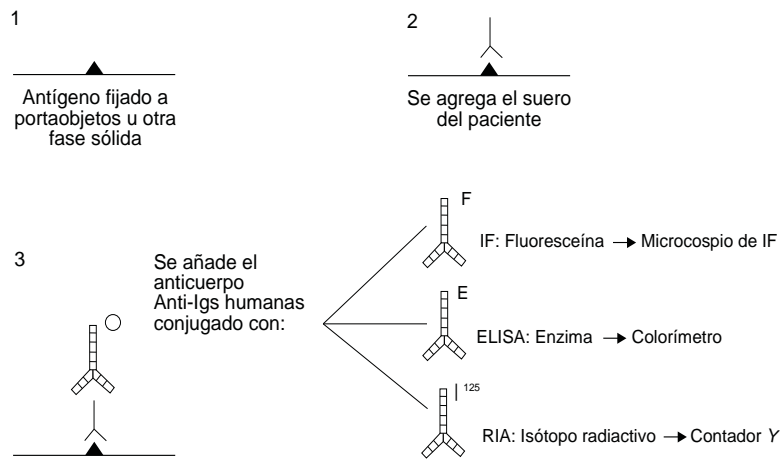


Figura 9.3. Representación esquemática de algunas técnicas de inmunomarcación para detección de anticuerpos.

PBS estéril o solución salina estéril. En el caso de las torundas, estas deben dejarse dentro del tubo, cortándolo si fuere necesario.

Si bien el DNA es bastante estable en condiciones ambientales, se recomienda el transporte de toda muestra clínica para estudios de Biología molecular al laboratorio inmediatamente después de ser obtenida. Con el objeto de reducir la pérdida por degradación del RNA viral en las muestras de sangre, es deseable que el suero o plasma sean separados dentro de las 3 horas y no más allá de las 6 horas de realizada la extracción.

El envío de material dentro de una misma institución puede realizarse en tubos debidamente identificados de vidrio o plástico herméticos y a prueba de fugas de líquido. Toda indicación con el nombre, número y resumen de historia clínica, análisis solicitado deben acompañar el material preferentemente en una bolsa plástica anexa. Los recipientes con muestras se colocan en una caja resistente a prueba de pérdida de líquidos con una cubierta segura y en la que se indica la naturaleza del material transportado. Cuando el transporte de muestras clínicas ocurre entre instituciones, debe utilizarse el sistema de triple envase: a) envase primario (resistente al agua con tapa hermética que contiene la muestra), b) envase secundario (resistente e impermeable al agua con tapa hermética que contiene y protege al recipiente primario), y c) envoltorio externo (que protege al envase secundario de potenciales daños físicos y del agua).

Existen agentes caotrópicos como el GTC (tiocianato de guanidinio) que pueden utilizarse no sólo para inhibir la actividad de RNAsas potencialmente presentes en una muestra optimizando el subsiguiente rendimiento de la extracción del RNA, sino también para eliminar la infectividad de la misma, ya que desnaturalizan las proteínas. Ello permite el transporte seguro de muestras con significativo riesgo biológico inherente (por ejemplo, para detectar RNA del virus Junín, un peligroso virus patógeno de categoría 4, a partir de muestras de sangre).

En el laboratorio, las muestras clínicas que no son procesadas inmediatamente para estudios de Biología molecular, son habitualmente guardadas en congeladoras que mantienen el frío entre -70°C y -86°C.

Muestras para estudios serológicos

Las muestras de sangre o suero, obtenidas en forma estéril, pueden enviarse a temperatura ambiente si el tiempo de transporte no supera algunas horas. El suero, una vez separado de la sangre, puede conservarse en heladera a 4°C durante 1-2 días. Si el transporte demorara más tiempo es recomendable la congelación ya que los anticuerpos presentes en el suero se conservan adecuadamente a -20°C durante meses, ó a -70°C / - 86°C durante años.

Muestras de alta patogenicidad

Si bien toda muestra debe enviarse en condiciones de bioseguridad, el envío de virus "de alta patogenicidad" (viruela, Lassa, Junín,

Marburg, Ébola, coronavirus asociado al SARS y otros) deberá realizarse en recipientes dobles, absolutamente herméticos y rotulados como *Peligro biológico*. Existen estrictas regulaciones internacionales para el transporte de todos los virus por vía aérea o terrestre.

Tiempo de espera de resultados

Los procedimientos rápidos permiten un diagnóstico de certeza al cabo de pocas horas de obtenida la muestra, lo que representa una enorme ventaja para la adopción de medidas terapéuticas o profilácticas. Por el contrario, el aislamiento viral demora días o semanas, dependiendo del virus, ya que es necesario esperar la aparición de la acción citopatogénica (ACP) en los cultivos, y luego de lo cual se debe identificar el virus aislado mediante técnicas inmunohistoquímicas, las que demandan varias horas más, o bien por neutralización, la que requiere varios días.

La detección de conversión serológica tiene la demora inherente a la espera de la segunda muestra pareada (suero de convalecencia), ya que es necesario procesar ésta simultáneamente con la muestra del período agudo. Por el contrario, la determinación del estado inmune (IgG) o de una infección reciente por medio de IgM específica tiene el tiempo de demora inherente a la realización de la técnica (horas). Además, debe considerarse la frecuencia con la cual el laboratorio realiza las técnicas solicitadas. Finalmente, existe un tiempo adicional para la preparación, impresión y validación del informe respectivo.

3. MÉTODOS INDIRECTOS O SEROLÓGICOS

3.1 FUNDAMENTO Y APLICACIONES

El fundamento del método consiste en demostrar en el suero del paciente, la presencia de anticuerpos específicos antivirales inducidos por la infección. En la respuesta inmune a un virus determinado se producen anticuerpos dirigidos contra diversos constituyentes del virión, tanto internos como superficiales, los que persisten distintos tiempos en la circulación del paciente (Figura 9.1).

Las técnicas serológicas fueron empleadas desde los comienzos de la Virología y, a pesar de los extraordinarios avances en el diagnóstico directo incluyendo las técnicas moleculares, el valor intrínseco de las primeras continúa siendo muy importante en la actualidad para numerosas infecciones virales.

Aplicaciones: la detección de anticuerpos específicos puede emplearse para un diagnóstico del estado inmune (infección pasada) o bien de una infección reciente. Para esto último existen dos procedimientos: a) determinación de la *conversión serológica (seroconversión)*; o b) detección de *IgM específica* en una muestra única de suero.

3.2 DETERMINACIÓN DEL ESTADO INMUNE

En una muestra única de suero se podrá determinar el estado inmune mediante la detección de IgG específica antiviral. Esto se realiza antes de indicar una vacunación anti-rubeólica, o anti-hepatitis B o para determinar la presencia de anticuerpos anti-citomegalovirus humano o anti-HIV en bancos de sangre. Las muestras de sangre serológicamente positivas para HIV o con marcadores de infección por virus causantes de hepatitis B o C no deben ser transfundidas debido al riesgo de transmitir virus infeccioso. Asimismo, la sangre con anticuerpos para citomegalovirus humano no debe ser transfundida a recién nacidos o a pacientes inmunosuprimidos. También se emplea la determinación del estado inmune en estudios de seroprevalencia de anticuerpos contra un virus determinado en una población, lo que permite conocer la exposición al mismo. Por ejemplo, estudios serológicos para virus Junín (fiebre hemorrágica argentina), hantavirus, arbovirus, etc.

3.3 DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN RECIENTE

3.3.1 Conversión serológica

La conversión serológica se define como la aparición de anticuerpos específicos contra un virus, o el aumento de su título en cuatro o más veces en dos muestras pareadas de suero, la primera obtenida durante el período agudo (suero de fase aguda) y la segunda en la convalecencia a los 14-21 días de la primera (suero de fase de convalecencia; Figura 9.1). La conversión serológica permite realizar un diagnóstico de infección reciente con certeza. Por el contrario, cuando los títulos de anticuerpos en ambas muestras son bajos, o no se observa un aumento significativo (cuatro o más veces en su título) no puede atribuirse la presencia de esos anticuerpos a la infección actual sino a una infección previa. En general, ese paciente será inmune al virus en cuestión. La ausencia de detección de anticuerpos en las dos muestras indica que el paciente es no-inmune, es decir es susceptible a la infección. Es de fundamental importancia la obtención precoz del suero inicial debido a que los anticuerpos pueden aumentar tempranamente en algunas infecciones y el aumento de 4 o más veces en el título, que es necesario demostrar para determinar la seroconversión, puede no llegar a ser detectado si el suero de período agudo se obtiene tardíamente. Por ello es importante conocer la fecha de comienzo de la enfermedad. El diagnóstico mediante conversión serológica tiene el inconveniente de requerir el tiempo necesario para obtener la muestra del período de convalecencia, por lo cual sólo permite un diagnóstico retrospectivo, aunque su valor no es despreciable.

3.3.2 IgM específica

La detección de IgM específica permite realizar con certeza un diagnóstico de infección reciente, con una sola muestra de suero obtenida en el período agudo de enfermedad o en la convalecencia temprana. En la mayoría de las infecciones víricas, la IgM específica aparece desde el 3er. día de iniciada la enfermedad (en títulos muy bajos); su título asciende luego rápidamente entre los 10-20 días y suele persistir elevado hasta bien entrada la convalecencia (Figura 9.1). Por ello, la presencia de IgM específica es diagnóstica de infección en curso. Su duración en circulación fluctúa generalmente entre 1 y 2 meses, aunque es variable para cada infección viral. La búsqueda de IgM específica se emplea para diagnóstico de numerosas enfermedades virales (rubéola, hepatitis A, B, mononucleosis infecciosa, citomegalovirus, megaloeritema por parvovirus humano B19, etc.) y es también el método de elección para el diagnóstico de infecciones congénitas (rubéola, citomegalovirus humano, B19, etc.). **Dado que la IgM no atraviesa la placenta, su detección en la sangre del cordón indica fehacientemente una infección adquirida in útero.** El recién nacido normal posee bajos niveles de IgM en suero (11 ± 5 mg / ml). Cuando supera estos niveles se sospecha una infección congénita, la cual se certifica mediante la búsqueda de IgM específica antiviral. Por el contrario, la IgG del recién nacido refleja la

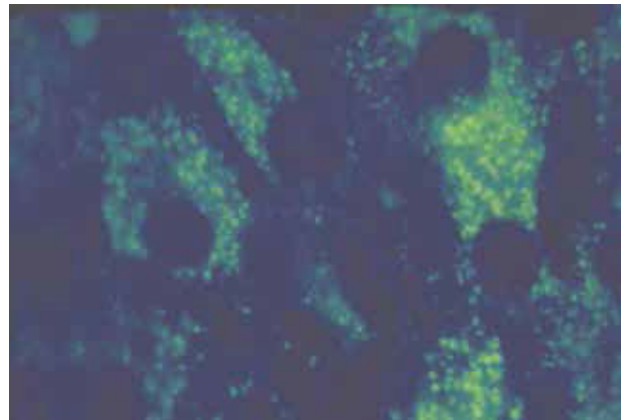


Figura 9.4. Inmunofluorescencia indirecta para detección de anticuerpos anti-virus Junín en el suero de un paciente. Células BHK persistentemente infectadas con virus Junín, reaccionaron con anticuerpos específicos del paciente, lo que es evidenciado mediante la adición de un suero (conteniendo anti-Igs humanas marcadas con fluoresceína).

experiencia inmunológica de la madre, ya que la IgG atraviesa la placenta y permanece en la circulación del neonato durante varios meses, lo cual excluye la posibilidad de detectar una infección congénita por este procedimiento.

3.4 TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Las técnicas clásicas de diagnóstico serológico usadas en los comienzos de la Virología incluían las siguientes: neutralización, fijación de complemento e inhibición de la hemaglutinación; sin embargo, ya no son de uso habitual para diagnóstico. Los procedimientos utilizados en la actualidad incluyen técnicas de inmunomarcación tales como la IFI y ELISAs de diferente configuración (Figura 9.3). El Radioinmunoensayo, si bien es muy sensible, no se emplea en la actualidad para diagnóstico debido al riesgo del uso de isótopos radiactivos.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detección de anticuerpos

La IFI es uno de los principales procedimientos de diagnóstico serológico de muchas infecciones virales. El fundamento es la detección de anticuerpos específicos antivirales (IgG o IgM o bien Igs totales) en el suero del paciente. Para detección de anticuerpos, la IFI siempre es indirecta, ya que el fundamento del procedimiento consiste en hacer reaccionar los anticuerpos presentes en el suero con antígenos virales expresados en células infectadas, fijadas sobre portaobjetos, y luego revelar esa unión anticuerpo-antígeno mediante un anticuerpo anti-Fc de las Igs humanas, conjugado con un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína, u otros). Para la realización de la IFI se incuban diluciones del suero del paciente con células infectadas conteniendo los antígenos virales. Luego de ½ hora de incubación a 37° C la preparación es lavada con solución salina isotónica para eliminar los anticuerpos que no reaccionaron con los antígenos. En un segundo paso, se añade un anticuerpo anti-Igs humanas conjugado con un fluorocromo. Si los anticuerpos presentes en el suero reaccionan con los antígenos expresados en las células, serán detectados por anticuerpos anti-Igs humanas marcadas con el fluorocromo. Mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluoresceína y específicos para cada clase de Igs es posible identificar individualmente cada una de ellas (IgM, IgG, IgA) o bien Igs totales. La reacción se lee al microscopio de luz ultravioleta y el operador debe ser experimentado. Las células infectadas y fijadas con acetona que se emplean como sustrato pueden conservarse en el laboratorio durante meses a -20°C y durante años a -70°C / -86°C (Figura 9.4).

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detección de IgM

Cuando se emplea la metodología mencionada en el párrafo anterior pero se utiliza un anticuerpo anti-IgM humana, marcado con fluoresceína, se podrá detectar dicho isotipo de Ig específica antiviral.

Un inconveniente con este método es la necesidad de descartar la presencia en el suero del paciente de factores reumatoideos (FR) o de altos títulos de IgG específica, ya que ambos contribuyen a obtener resultados falsos.

Los FR son anticuerpos IgM anti-IgG humana (que pueden estar presentes en el suero de pacientes con enfermedades reumáticas) e interfieren con la detección de IgM específica antiviral dando un *falso resultado positivo* (Figura 9.5). Por ello, cuando en la búsqueda de IgM específica se obtiene un resultado positivo, es necesario repetir la reacción, previo tratamiento del suero para eliminar los FR. Este tratamiento se puede realizar con Igs agregadas o con proteína A del *Staphylococcus aureus*, que posee capacidad de adsorber IgG. Si el resultado se reitera como positivo luego del tratamiento, se puede afirmar con certeza que se está en presencia de IgM específica contra el virus en estudio. Los altos títulos de IgG antiviral pueden dar un *falso resultado negativo* al competir con la IgM presente en el suero, por el antígeno viral ofrecido en la reacción.

Para solucionar este problema, los sueros deben tratarse para separar la IgG de la IgM por ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa, cromatografía o la fijación de la IgG a látex o a la proteína A del *Staphylococcus aureus*, cepa Cowan tipo A. Después de haberse tratado los sueros para eliminar la IgG, puede detectarse la IgM por cualquiera de las técnicas habituales. Antiguamente, se empleaba el tratamiento de los sueros con 2-mercapto-etanol (que degrada la IgM) para demostrar variaciones en el título de anticuerpos antes y después del tratamiento. Este procedimiento fue reemplazado por otros más eficaces descritos más arriba.

Enzimoimmunoensayos (ELISA)

El fundamento la técnica es similar al de la IFI pero en este caso los anticuerpos se encuentran marcados con una enzima (Figura 9.3). Los ensayos de ELISA pueden emplearse para detectar IgG, IgM o Igs totales. Pueden ser realizados mediante procedimientos manuales o automatizados. En la actualidad existen numerosos equipos comerciales totalmente automatizados que permiten la realización

de la mayoría de las pruebas serológicas para virus (véase el Capítulo 10).

Para detección de anticuerpos antivirales (IgG o Igs totales) el antígeno viral se encuentra pegado a una fase sólida; luego se añade el suero problema y posteriormente anticuerpos anti-Igs humanas marcados con una enzima (peroxidasa, o fosfatasa alcalina). A continuación se añade el sustrato de la enzima y se desarrollará color, el que podrá observarse visualmente o preferentemente con un colorímetro.

Para detección de IgM específica se emplea un ELISA de captura en fase sólida en el cual se adsorben sobre ésta (policubeta, tubo o perla) los anticuerpos específicos anti-cadena μ ; luego, se añade el suero en estudio y toda la IgM presente será adsorbida. Posteriormente, se agrega el antígeno viral, que se unirá a la IgM específica. La presencia o ausencia del antígeno unido se revela mediante la marcación enzimática del mismo o de un anticuerpo anti-antígeno.

La detección de IgM específica se usa habitualmente para diagnóstico de infección reciente por rubéola, citomegalovirus humano, virus hepatitis A, virus Epstein-Barr, etc.

Aglutinación de partículas

Es una técnica manual que consiste en enfrentar partículas (de látex, gelatina o glóbulos rojos) que contienen el antígeno viral adsorbido, con el suero del paciente (suero problema). Si existen anticuerpos específicos para el antígeno se producirá una reacción de aglutinación visible a la observación ocular. Esta técnica se emplea para diagnóstico serológico de las infecciones producidas por HIV, HTLV, etc.

También puede utilizarse para la detección de antígenos virales (método directo), mediante la adsorción de anticuerpos específicos a la superficie de la partícula. Un ejemplo de esta última aplicación, es la detección de rotavirus a partir de muestras provenientes de heces para el diagnóstico etiológico de gastroenteritis.

Fijación del complemento (FC)

La FC fue la técnica más antigua empleada en serología, no requería equipamiento especial y la lectura era visual. La FC permitía detectar anticuerpos contra antígenos internos del virus (grupo-específicos). Dado que detectaba solamente anticuerpos contra antígenos de grupo o familia (grupo-específicos) no permitía discriminar entre diferentes serotipos.

Los anticuerpos fijadores de complemento se detectaban tardamente luego de la infección, sus títulos eran en general bajos, y solían desaparecer entre los 4-6 meses post-infección.

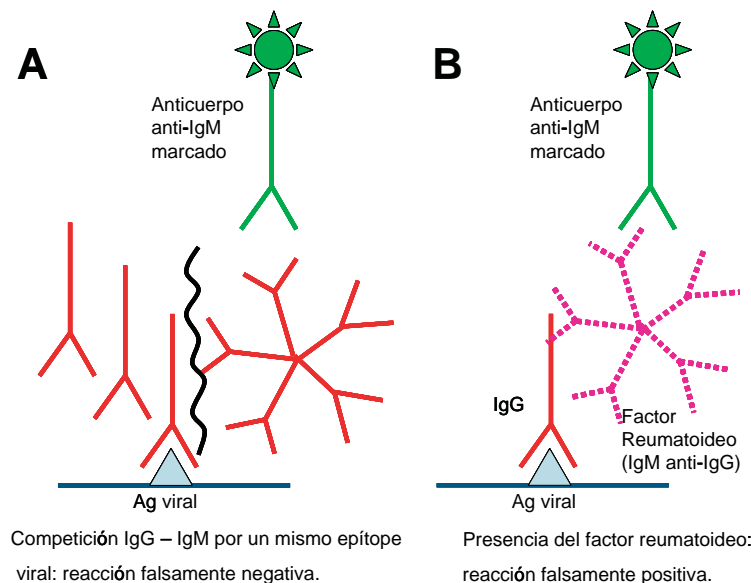


Figura 9.5. Esquema de la interferencia en la detección de IgM específica antiviral por exceso de IgG (A) o por presencia del factor reumatoideo (B).

Título de Anticuerpos		Resultado	Paciente
Suero de fase aguda	Suero de fase de convalecencia		
[+] 32	[+] 32	Infección previa	Inmune
[-] < 8	[-] < 8	Ausencia de infección	Susceptible
[-] < 8	[+] ≥ 32	Conversión serológica	Infección reciente

Tabla 9.6. Diagnóstico etiológico basado en la conversión serológica. El suero de la fase aguda debe obtenerse al comienzo de los síntomas y el de convalecencia a los 14-21 días del inicio de los mismos. Las muestras deberán procesarse simultáneamente.

Dada la baja sensibilidad del método, su realización compleja y la restringida duración de los anticuerpos fijadores de complemento, esta técnica no se utiliza en la actualidad, habiendo sido reemplazada por otras como la IFI o diversos ELISAs.

Neutralización (Tabla 9.9)

El fundamento de esta técnica se basa en poner en evidencia la capacidad neutralizante de los anticuerpos presentes en el suero del paciente sobre cepas virales patrón (prototipo). Los anticuerpos neutralizantes están dirigidos contra antígenos de superficie de los virus (glicoproteínas de envoltura, o antígenos de la cápside) y son protectores. Estos anticuerpos son tipo-específicos (a diferencia de los detectados por FC), por lo que permiten determinar el serotipo viral causante de la enfermedad. Los anticuerpos neutralizantes persisten muchos años en circulación y, frecuentemente son detectables de por vida.

Los inconvenientes de esta técnica son: su complejidad, el requerimiento de virus que puedan propagarse en cultivos celulares o animales; paneles de antisueros específicos y condiciones de bioseguridad. **Sin embargo, esta técnica es de gran valor en estudios epidemiológicos, y resulta indispensable para determinar la presencia de anticuerpos protectores inducidos mediante vacunas.**

Para detectar anticuerpos por neutralización se mezcla una cantidad conocida (100 DICT₅₀) de virus (cepa patrón) con diferentes diluciones del suero del paciente y, luego de 1 hora de incubación a 37° C para facilitar la neutralización, se inocula la mezcla en cultivos celulares o en animales de experimentación. Los cultivos se emplean para la mayoría de los virus, mientras que la inoculación en ratones se emplea para Coxsackie A, arbovirus y virus Junfín. Los cultivos y los animales infectados deberán conservarse varios días o semanas hasta la aparición de la ACP en cultivos o de enfermedad y/o muerte en los ratones. El resultado se registra y se evalúa por métodos matemáticos, siendo el más usado el de Reed y Muench (véase el Capítulo 3).

Inhibición de la hemaglutinación (IHA)

Los anticuerpos IHA se producen como respuesta a la infección con virus que presentan en su envoltura hemaglutininas (orthomyxovirus, paramyxovirus, togavirus). Los anticuerpos IHA son tipo-específicos, aparecen tempranamente luego de la infección y persisten por varios años. Son de fácil detección ya que no son necesarios cultivos celulares. Los anticuerpos IHA se utilizaban en el pasado para diagnóstico de rubéola y de sarampión. También se utilizan para influenza, parainfluenza, parotiditis, adenovirus y algunos enterovirus.

Para realizar esta técnica se efectúan diluciones del suero del paciente, las que se mezclan con una cantidad conocida de virus. Luego de la incubación, se añaden glóbulos rojos (de cobayo, pollo, etc.) y se observa la IHA, la que se producirá solamente si en el suero del paciente hay anticuerpos específicos para el virus que se está ensayando. La observación es visual, requiere un equipo mínimo, y es de fácil realización. Dado que en el suero suelen existir inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación, estos deben ser removidos antes de realizar la reacción (véase el Capítulo 3).

3.5 TÉCNICAS CONFIRMATORIAS O SUPLEMENTARIAS: WESTERN BLOT E INMUNOBLOT

Western Blot (Figura 9.6)

Esta técnica se emplea habitualmente como prueba confirmatoria o suplementaria para documentar la presencia de anticuerpos para HIV en el suero de pacientes con serología positiva determinada por técnicas de tamizaje (ELISA u otras).

La técnica se inicia con la obtención de un título elevado de virus en cultivo celular, luego se disrumen las partículas con detergentes y se realiza el fraccionamiento electroforético de las proteínas virales en geles de poliacrilamida. Las bandas así formadas se transfieren a filtros de nitrocelulosa o de nylon mediante la aplicación de corriente eléctrica. Las bandas de proteínas virales transferidas

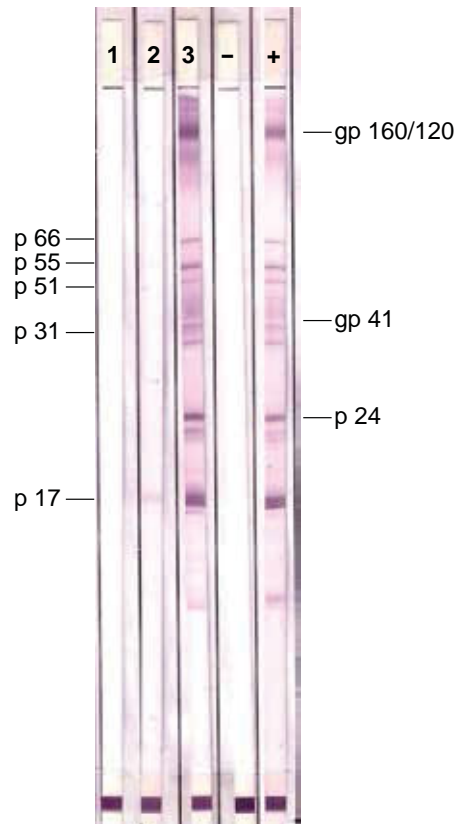


Figura 9.6. Western blot para detección de anticuerpos anti-HIV en el suero de pacientes (calles Nº 1-3). Calle 1: resultado negativo; calle 2: resultado indeterminado (se observa una única banda que reacciona contra la proteína p17 viral); calle 3: resultado positivo; calle (-): control negativo; calle (+): control positivo. Se requiere la presencia de al menos dos de las bandas correspondientes a los antígenos p24, gp41 y/o gp120 / gp160 reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero del paciente, para que un Western blot se informe como positivo. Otras bandas (indicadas del lado izquierdo de la figura) no son utilizadas.

Tipo de Cultivo	Virus
Primario Riñón de mono Riñón de conejo Riñón de embrión humano Fibroblastos de prepucio de recién nacido	- Influenza, parainfluenza, enterovirus - Herpes simplex - Adenovirus, enterovirus - Citomegalovirus humano
Diploide Pulmón humano fetal: MRC-5 (Fibroblastos)	- Citomegalovirus humano, varicela-zóster, herpes simplex, rinovirus, enterovirus, adenovirus, sincicial respiratorio
Continuo Carcinoma de laringe: Hep-2 Riñón de perro: MDCK Carcinoma de pulmón: A-549 Riñón de primate LLC-MK2	- Sincicial respiratorio, adenovirus, herpes simplex; enterovirus - Influenza - Adenovirus, herpes simplex, enterovirus - Parainfluenza

Tabla 9.7. Algunos cultivos celulares de uso frecuente y ejemplos de virus que pueden detectarse en ellos.

al filtro conservan la misma posición que tenían en los geles. Para realizar la reacción se incuban estos filtros con el suero del paciente (que podrá o no contener anticuerpos específicos). Si en el suero del paciente existen dichos anticuerpos específicos para epítopes de las proteínas virales fijadas en el filtro, aquéllos se fijarán a las mismas. Luego, con un antisuero dirigido contra las Igs humanas (conjugado con peroxidasa) podrá evidenciarse la reacción en forma de bandas coloreadas mediante un sistema detector-sustrato de la enzima, por ejemplo diaminobenzidina (véase el Capítulo 22.4, *Diagnóstico de HIV*).

Inmunoblot: LIA y RIBA (Figura 9.7)

Estas técnicas se emplean para confirmación del diagnóstico serológico de hepatitis C obtenido previamente por pruebas de tamizaje como la de ELISA. Ambas técnicas (LIA y RIBA) emplean proteínas virales fijadas sobre tiras de nitrocelulosa. A diferencia del *Western blot*, las mismas no son fraccionadas mediante electroforesis, sino que son individualmente dispensadas en la

tira de nitrocelulosa. Lo que varía es el origen de estas proteínas: mientras que en el RIBA (*recombinant immuno blotting assay*) las proteínas virales corresponden a un origen recombinante y a péptidos sintéticos, en el LIA (*linear immune assay*) son mayoritariamente péptidos de origen sintético, e incluye además una proteína recombinante. Las tiras de nitrocelulosa conteniendo los antígenos virales se incuban con el suero del paciente (suero problema). Si los anticuerpos están presentes se fijarán a los antígenos. Esta unión se revelará con un suero anti-Igs humanas marcado con una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina para RIBA y LIA, respectivamente). Luego se añade el sustrato para las respectivas enzimas y la reacción se observa visualmente como bandas coloreadas. La utilización e interpretación de las técnicas de RIBA y LIA (criterios de positividad) se describen en los capítulos 24.5 y 41.



4. MÉTODOS DIRECTOS CLÁSICOS: AISLAMIENTO VIRAL

4.1 FUNDAMENTO Y APLICACIONES

Los virus son parásitos genéticos intracelulares obligados y por ello requieren células vivas para su replicación, las que pueden obtenerse de huevos embrionados, animales o de cultivos celulares *in vitro*. Los huevos y los animales (ratones y cobayos) fueron empleados en los comienzos de la Virología, cuando los cultivos celulares no habían sido aún descubiertos. **En 1940, Enders, Weller y Robins lograron la replicación de poliovirus en cultivos celulares de primates, derivados de tejidos extraneurales. Este hallazgo revolucionó los procedimientos para aislamiento de virus e inició la era moderna en Virología.**

Actualmente, existen numerosos cultivos celulares aptos para el diagnóstico, investigación, producción de reactivos y de vacunas virales. La obtención y multiplicación de los cultivos celulares se detallan en el Capítulo 3. En este capítulo analizaremos su aplicación al diagnóstico.

Aplicaciones: el aislamiento en cultivo es, para muchos virus, el estándar de oro (*Gold standard*) o técnica de referencia del diagnóstico. Si bien el aislamiento ha sido gradualmente reemplazado por técnicas inmunohistoquímicas y moleculares que permiten un diagnóstico rápido, el aislamiento en cultivo presenta las siguientes ventajas:

- Es una técnica muy sensible dado que un solo virus viable puede ser suficiente para iniciar la infección de un cultivo.
- Permite recuperar múltiples virus diferentes, aunque su presencia no se sospeche en la muestra remitida. Por el contrario, las técnicas inmunohistoquímicas o moleculares detectan sólo el virus reconocido por los reactivos utilizados en el ensayo.

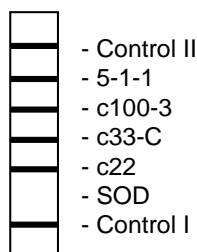


Figura 9.7. RIBA (de segunda generación) para detectar anticuerpos anti-virus hepatitis C en el suero de un paciente. En este *inmunoblot* las bandas corresponden al reconocimiento de los antígenos correspondientes a proteínas no estructurales (5-1-1, c100-3 y c33c) y estructurales (c22) del virus hepatitis C por los anticuerpos del paciente. En el RIBA de tercera generación se incluye además el antígeno viral no estructural (NS) 5. La inclusión del antígeno de la superóxido dismutasa (SOD) en la tira permite discernir si la reactividad observable en las pruebas de tamizaje que emplean dicha molécula en las proteínas de fusión (recombinantes) es atribuible a la respuesta inmune contra la proteína viral recombinante o al componente SOD de la misma. La reactividad de la reacción se determina mediante la comparación con una banda tenue y con otra de mayor intensidad que contienen IgG (controles positivos I y II, respectivamente) y la ausencia de banda con la SOD. Los sueros que reaccionan frente a dos o más antígenos virales se informan como reactivos (positivos).

c) Permite obtener la cepa viral, la cual podrá ser estudiada en profundidad si fuera necesario mediante técnicas de tipificación, moleculares, sensibilidad a antivirales, etc.

d) El aislamiento de un virus en cultivo provee evidencia irrefutable de que el paciente está infectado con ese virus.

Tiempo requerido para el aislamiento: El tiempo requerido para un resultado varía ampliamente dependiendo del tiempo de replicación y de la producción de la acción citopatogénica (ACP). Por ejemplo, la correspondiente al herpes simplex requiere 1-3 días; mientras que la del citomegalovirus humano puede necesitar 3-4 semanas en cultivos convencionales.

4.2. AISLAMIENTO EN CULTIVOS CELULARES

4.2.1 Tipos de cultivos (Tabla 9.7)

Existen tres tipos básicos de cultivos celulares: cultivos primarios, que se obtienen de tejidos animales o humanos y pueden ser subcultivados sólo durante un bajo número de pasajes; cultivos diploides, que derivan de tejidos humanos (fetales o de recién nacido) y que pueden ser subcultivados 20 a 50 veces, muriendo posteriormente; y líneas continuas, que se establecen a partir de tejidos tumorales o normales de humanos o animales, luego de sufrir una transformación espontánea. Estas líneas celulares continuas tienen un cariotipo heteroploide y pueden ser subcultivadas un número infinito de veces, por lo cual se las considera inmortalizadas.

Los diversos cultivos poseen diferente susceptibilidad a los virus. Si un virus es inoculado en un cultivo no susceptible (células sin receptores para dicho virus, y –por ende– no permisivas) no podrá replicar y se obtendrá un resultado falsamente negativo. Por lo tanto, es indispensable que el médico informe al equipo del laboratorio acerca del virus que sospecha. Esto permite seleccionar los cultivos más adecuados al virus que se postula como causante de la patología y los procedimientos de detección más apropiados.

4.2.2 Inoculación en cultivo para aislamiento viral

Es necesario recordar que las muestras para aislamiento deben obtenerse en los primeros días de enfermedad y enviarse inmediatamente, refrigeradas en hielo para evitar la inactivación térmica del virus. En el laboratorio, se seleccionarán los cultivos permisivos al virus a detectar y el primer paso consiste en la descontaminación de la muestra. Este paso es fundamental ya que la flora bacteriana y fúngica presente en algunas muestras (orina, materia fecal o secreciones) contaminaría los cultivos haciendo imposible la visualización de la acción citopatogénica (ACP) viral. La descontaminación se realiza por tratamiento con antibióticos en alta concentración, o por filtración o centrifugación a alta velocidad, colectando el sobrenadante. Luego, la muestra se inoculará en tubos conteniendo monocapas de células permisivas para el virus que se intenta aislar. El proceso comienza con el descarte del medio de cultivo que nutre a las células; subsiguientemente, se inoculan 0,2-0,3 ml de muestra descontaminada y diluida en medio de cultivo con antibióticos y antimicóticos y los tubos se incuban 37° C 1 hora para permitir la adsorción del virus a las células; a continuación se añade medio de cultivo fresco y los tubos inoculados se incuban en estufa, a 37° C (en caso de virus respiratorios a 33° C) durante días o semanas. Siempre deben incluirse controles de células inoculadas sólo con medio de cultivo, las que servirán como control negativo en la observación de la ACP.

Para mantener la viabilidad de las células, el medio de cultivo debe cambiarse cada 2-3 días. Todos estos procesos se realizan en flujos laminares de seguridad biológica y por personal entrenado. Los cultivos se observan cada 2-3 días al microscopio invertido para la visualización de la ACP.

4.3 AISLAMIENTO EN ANIMALES Y HUEVOS EMBRIONADOS

Los animales de experimentación fueron empleados en los comienzos de la Virología, antes del desarrollo de los cultivos celulares, para aislamiento de virus y para estudios de patología. La

inoculación de virus en animales puede producir enfermedad y/o muerte. Los animales más utilizados fueron ratas, ratones, conejos y primates. Sin embargo, debido al alto costo del mantenimiento de los animales, a la complejidad de las instalaciones necesarias (bioteros), al riesgo de manipulación de animales infectados y a la probable presencia de infecciones virales latentes en los mismos, el uso de animales para aislamiento viral ha sido reemplazado por los cultivos celulares. Actualmente, sólo se emplean ratones para aislamiento de algunos Cocksackie A, arbovirus y virus Junín, y mosquitos para aislamiento de algunos arbovirus (dengue).

Sin embargo, los animales continúan siendo indispensables para investigación sobre patogenia e inmunidad de las enfermedades virales, para ensayos de vacunas, así como para la preparación de antisueros con fines diagnósticos.

Los virus pueden inocularse en distintas estructuras de huevos embrionados de pato o gallina (véase el Capítulo 3), los que presentan ventajas como su fácil manipulación. Actualmente su uso está restringido al aislamiento de influenza y a la producción de vacunas para mixovirus y algunos paramixovirus (véanse los capítulos 14 y 15).

4.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS VIRUS AISLADOS

Los efectos de la replicación de los virus en los cultivos pueden detectarse mediante visualización de la ACP, por hemaglutinación, hemadsorción, interferencia, neutralización, y por detección de antígenos virales.

Las características de la ACP, la hemadsorción o la hemaglutinación permiten obtener un diagnóstico presuntivo. Para lograr un diagnóstico de certeza del virus aislado es imprescindible realizar la identificación, la cual puede hacerse por diversas técnicas (Tabla 9.8). Las de elección consisten en la detección de antígenos virales en los cultivos infectados mediante inmunomarcación (IF, IP, etc.) (Figs. 9.8 y 9.10) debido a su simplicidad y rapidez, ya que en dos horas a partir de la detección de la ACP puede lograrse un diagnóstico definitivo.

La identificación del serotipo se suele realizar por neutralización o IHA, ya que estos procedimientos son tipo-específicos. Así por ejemplo, en el caso de poliovirus, la identificación del serotipo se realiza mediante neutralización, utilizándose tres antisueros, siendo ésta una técnica más compleja y lenta (Tabla 9.9).

Acción citopatogénica (ACP)

Muchos virus producen cambios característicos visibles en los cultivos a la observación con el microscopio óptico que se denominan genérica e indistintamente como efecto o acción citopatogénica (ECP o ACP, respectivamente), sin tinción previa alguna. Un ejemplo de ACP se observa en la Figura 9.8. La aparición de ACP se registra en planillas y su grado se evalúa de acuerdo a la magnitud del daño a la monocapa celular. Por convención, se registra una + cuando la ACP afecta al 25% de la monocapa; ++ cuando afecta al 50%; +++ al 75% y ++++ al 100%.

Es importante determinar el tiempo en que la ACP aparece y progresa, ya que esto permite ayudar a discriminar entre algunos virus. Por ejemplo, el virus herpes simplex replica rápidamente y produce ACP ++++ en pocos días. Por el contrario, el citomegalovirus humano y varicela-zóster replican más lentamente y su ACP es evidente luego de varios días y aun semanas. El tipo de cultivo celular en que los virus replican es importante para orientar al diagnóstico. Aunque la ACP puede ser similar para un grupo determinado de virus, la susceptibilidad de los cultivos a diferentes virus dentro de un grupo puede variar.

Además, es necesario diferenciar la ACP del efecto tóxico de algunas muestras o de la contaminación con bacterias u hongos. En estos casos, deberá realizarse ya sea un subcultivo viral en nuevas células, lo que permitirá amplificar la población viral y diluir el efecto tóxico, o un tratamiento con antibióticos.

La interpretación de la ACP es compleja y debe ser realizada por un observador experimentado, quien teniendo en cuenta el tipo de muestra, el cuadro clínico, el tiempo de aparición de la

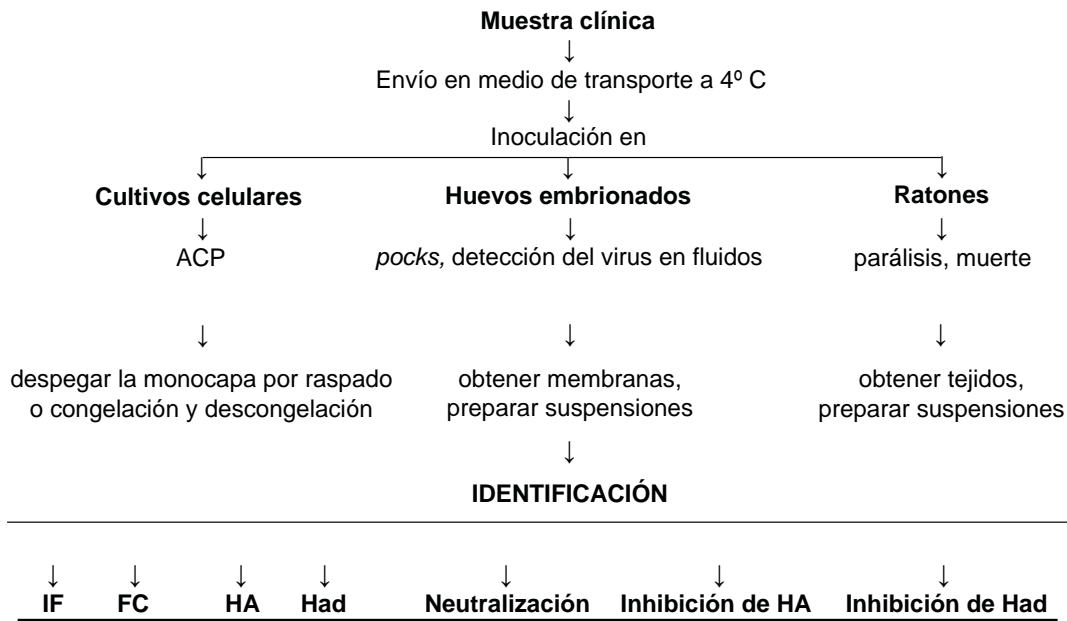


Tabla 9.8. Aislamiento e identificación viral: Diferentes técnicas que pueden emplearse. IF: inmunofluorescencia; FC: fijación del complemento; HA: hemaglutinación; Had: hemadsorción.

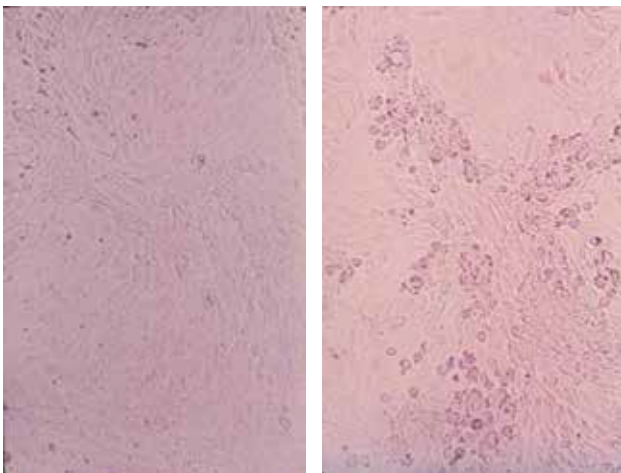


Figura 9.8. Acción citopática (ACP) de virus Junín en células Vero. Izq.: células no infectadas. Der.: foco inicial de ACP.

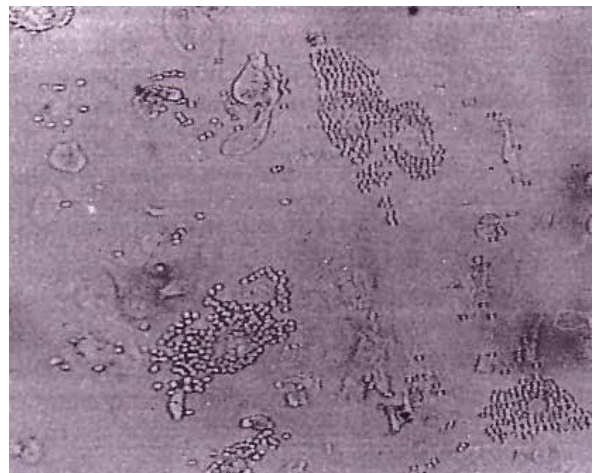


Figura 9.9. Reacción de hemadsorción. Células LLC-MK2 infectadas con virus parainfluenza 3. En la observación directa al microscopio invertido se visualiza la adsorción de los glóbulos rojos de cobayo a las células infectadas que expresan hemaglutininas virales en su membrana.

ACP, su morfología y las células en las cuales replicó el virus podrá realizar un diagnóstico presuntivo.

Hemadsorción (Had)

Algunos virus (influenza, parainfluenza) no siempre producen una clara ACP en los cultivos infectados, pero debido a que tienen hemaglutininas en las espículas de su envoltura, pueden aglutinar eritrocitos de diversas especies *in vitro*. Las hemaglutininas virales también se expresan en la membrana de los glóbulos rojos de cobayo a una monocapa infectada por un mixovirus o paramixovirus (con excepción del virus sincicial respiratorio) se producirá la adsorción de los glóbulos a las células. Este fenómeno se denomina *hemadsorción* (Figura 9.9) y fue explicado en el Capítulo 3. Cuando un cultivo exhibe Had positiva se deberá subcultivar en otros tubos con nuevas células para confirmar el aislamiento y se identificará el virus aislado mediante IF u otras técnicas.

Hemaglutinación (HA)

El líquido sobrenadante de los cultivos o el líquido amniótico o alantoideo de huevos embrionados infectados con mixovirus y paramixovirus contiene hemaglutininas virales que pueden demostrarse por reacción de HA con glóbulos rojos (en general, de cobayo). El principio de la reacción es el mismo que el de la Had, pero aquí se demuestra la presencia de hemaglutininas en el sobrenadante de los cultivos.

Neutralización

Para identificar un virus por neutralización, se realizan diluciones del virus a neutralizar, las que se mezclan con anticuerpos específicos para el virus que se sospecha. Las mezclas se incuban (37°C durante 60 a 90 min.) para permitir la neutralización del virus por los anticuerpos y, luego, se inoculan en cultivos

Ejemplo: A partir de una muestra de materia fecal se aisló en cultivo un virus que produjo una ACP rápida. Se establece el diagnóstico presuntivo de infección por enterovirus.

Pasos para la IDENTIFICACIÓN por neutralización del virus aislado:

- 1- Recuperar el virus del medio de cultivo y/o de las células.
- 2- Mezclar alícuotas del virus con anticuerpos específicos anti-virus polio (1, 2 y 3), anti-virus ECHO y anti-virus Coxsackie; e incubar 1 hora a 37 °C
- 3- Inocular en nuevos cultivos celulares.
- 4- Si el virus aislado es polio, será neutralizado por el suero anti-polio polivalente y los cultivos infectados con esa mezcla no desarrollarán ACP.
Por el contrario, los cultivos inoculados con las mezclas: virus + suero anti-ECHO, y con virus + suero anti-Coxsackie desarrollarán ACP.

RESULTADO: EL VIRUS AISLADO ES POLIOVIRUS

Pasos para la IDENTIFICACIÓN SEROTÍPICA DE LA CEPA DE POLIOVIRUS

- 5- Incubar alícuotas del virus con sueros anti-polio 1, anti-polio 2 o anti-polio 3 e incubar 1 hora a 37° C.
- 6- Inocular nuevos cultivos con cada una de las tres mezclas
- 7- Observar la aparición de ACP.

Cultivos Inoculados con	ACP	Resultado Final
Virus + suero anti-polio 1	No	El virus aislado es polio 1
Virus + suero anti-polio 2	Sí	
Virus + suero anti-polio 3	Sí	
Virus sin anticuerpos anti-polio	Sí	
Controles no infectados	No	

Tabla 9.9. Neutralización para identificación de un virus aislado de una muestra clínica.

celulares (o en animales de experimentación) y se espera la aparición de ACP (en los cultivos) o de enfermedad y/o muerte (en los animales). Si el virus presente fue neutralizado por los anticuerpos utilizados, los cultivos inoculados no desarrollarán ACP y los animales no enfermarán ni morirán. Por el contrario, si los cultivos exhiben ACP o los animales enferman y/o mueren ello indica que los antisueros empleados no corresponden al virus en cuestión, ya que no fueron capaces de neutralizarlo. En este caso, deberán ensayarse nuevas neutralizaciones con otros antisueros diferentes (Tabla 9.9).

Interferencia

Algunos virus no producen una ACP clara pero puede detectarse su presencia por su capacidad de inhibir la propagación de un segundo virus inoculado en el cultivo. Este procedimiento se utilizó durante mucho tiempo para la detección de virus rubéola y se conoce como "método de interferencia".

Para realizarlo, se inocula el virus rubéola en cultivos de riñón de primate y luego de 10 días se inocula un segundo virus (ECHO 11) en los mismos tubos y en tubos controles. Luego de 48 horas en los cultivos infectados con rubéola, debido al fenómeno de interferencia, no habrá desarrollo de ACP por el virus ECHO, mientras que en los tubos controles se observará la ACP típica de éste.

4.5 AISLAMIENTO POR CULTIVO RÁPIDO (SHELL VIAL)

Una de las desventajas del aislamiento en cultivos convencionales es el tiempo de espera del resultado, ya que éste depende de la aparición de la ACP, que puede demorar semanas o días, dependiendo del virus. **Para solucionar este inconveniente se desarrolló un método de cultivo rápido en viales (shell vial). El fundamento del procedimiento es combinar el aislamiento en cultivo con la detección de antígenos.** Su aplicación al diagnóstico significó un avance sin precedentes en el aislamiento viral ya que permite un resultado de certeza a las 24 o 48 horas de inoculada la muestra. Inicialmente desarrollado para citomegalovirus humano, actualmente se utiliza también para herpes simplex, varicela-zóster y virus respiratorios.

El método consiste en inocular la muestra decontaminada sobre dos monocapas celulares crecidas en cubreobjetos que se ubican en el fondo de dos tubos de cultivo. La muestra se centrifuga a baja velocidad (700 x g) durante 45 min. para acelerar la adsorción del virus a las células. Luego, se añade medio de cultivo y se incuba a 37° C. A las 24 y a las 48 h. se retiran los cubreobjetos y se realiza una tinción por IF con anticuerpos monoclonales contra el / los antígenos virales que se quieren detectar. Para citomegalovirus humano, se usan monoclonales contra un antígeno temprano marcados con un colorante fluorescente y la presencia de inclusiones en el núcleo celular se observa al microscopio de luz ultravioleta. La sensibilidad es similar a la del cultivo convencional, pero la ventaja es la obtención del resultado en forma rápida.

4.6 MEZCLAS DE LÍNEAS CELULARES

En la búsqueda de nuevos procedimientos de aislamiento más rápidos, eficientes y que permitan la replicación de numerosos virus, se han desarrollado recientemente mezclas de líneas celulares. A título de ejemplo podemos mencionar a las *E Mix A* y *E Mix B (Diagnostic Hybrids, EE. UU.)*. Las *E Mix A* (RD + NCI-H292), contienen células de rhabdomyosarcoma humano más células de carcinoma epidermoide de pulmón. Las *E Mix B* (BGMK + A 549) contienen células de riñón de mono más células de carcinoma de pulmón humano. Estas mezclas de células se emplean para diagnóstico de enterovirus. Asimismo, las denominadas *R Mix*, que contienen A 459 más células de pulmón de visón se utilizan para diagnóstico de virus respiratorios, en especial para virus sincicial respiratorio e influenza.

4.7 LÍNEAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

El desarrollo reciente de líneas modificadas genéticamente permite detectar virus en forma rápida. Un ejemplo lo constituyen las líneas desarrolladas para detección de herpes simplex, denominadas *ELVIS (Diagnostic Hybrids, EE. UU.)*. La línea deriva de riñón de hámster en la cual se ha insertado el gen de la beta galactosidasa de

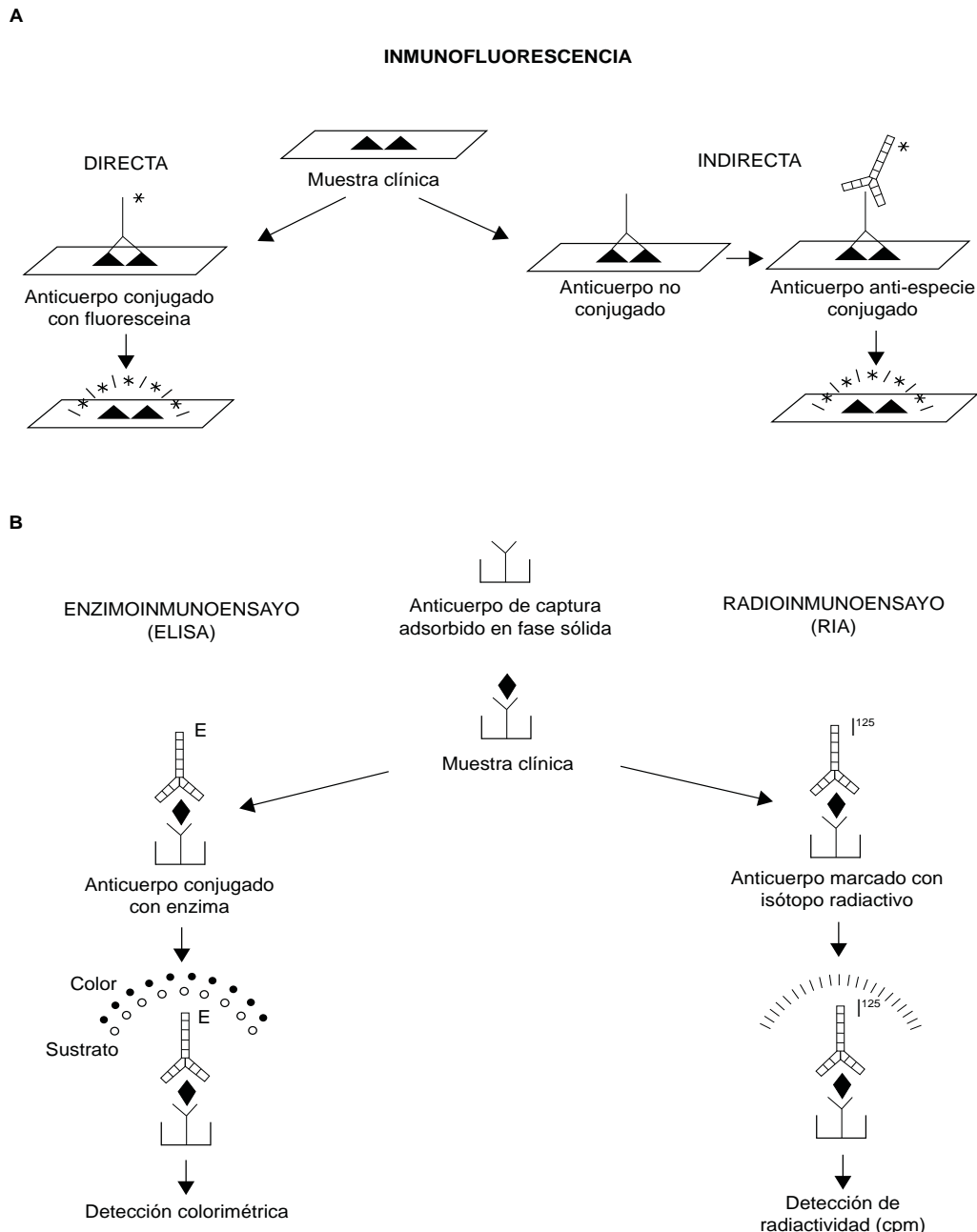


Figura 9.10. A) Inmunofluorescencia directa e indirecta. B) Técnicas de inmunomarcación para detección de antígenos virales.

Escherichia coli, bajo el control de un promotor del gen UL 39 de herpes. Este promotor se activará sólo si interactúa con las proteínas ICP0 y VP16 del herpes simplex. Si la muestra inoculada contiene virus herpes, esas proteínas activarán el promotor y producirán beta galactosidasa, que puede ser detectada fácilmente con una tinción histoquímica a las 18-24 hrs de cultivo. La sensibilidad de este procedimiento es similar a la del aislamiento en cultivo convencional con la ventaja de su rapidez y la facilidad de su detección.

Otras células modificadas genéticamente están siendo desarrolladas para detección de otros virus, aunque su elevado costo y la ausencia de proveedores de células frescas en Argentina hacen que su uso sea difícil en nuestro medio.

4.8 CUANTIFICACIÓN DE VIRUS

Cuando es necesario cuantificar la cantidad de virus infeccioso presente en una muestra se utilizan métodos de titulación como la

determinación de la $DICT_{50}$ (dosis que infecta el 50% de los cultivos celulares o titulación "de punto final") o el recuento de viriones mediante plaqueo bajo agarosa o metilcelulosa. Estos procedimientos se emplean en investigación y no son de uso habitual para el diagnóstico, pero sí son necesarios para la titulación de las semillas virales que se emplean, por ejemplo en las reacciones de neutralización (véase el Capítulo 3). Sin embargo, resultan indispensables en los estudios de patogenicidad viral y para cuantificar los virus presentes en las vacunas.

5. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES

5.1 FUNDAMENTOS Y APLICACIONES

Estas técnicas se basan en la detección de antígenos virales presentes en las muestras clínicas y son muy empleadas debido a su elevada sensibilidad, especificidad y rapidez. Comparadas con

Immunofluorescencia (IF)	Sincicial respiratorio Influenza pandémica A (H1N1) Parainfluenza Adenovirus Sarampión Metapneumovirus Herpes simplex Varicela-zóster Citomegalovirus humano Rabia
Enzimoimmunoensayos (ELISA)	HBs Ag, rotavirus, adenovirus, virus respiratorios

Tabla 9.10. Ejemplos de algunas aplicaciones de procedimientos rápidos para detección de antígenos virales.

otras técnicas utilizadas por la metodología directa de diagnóstico, presentan la enorme ventaja de proveer resultados al cabo de pocas horas de obtenida la muestra y, como no requieren de virus viable, cuando el transporte de la muestra se demora, su sensibilidad se afecta en menor medida que para el aislamiento en cultivo. Las técnicas más utilizadas son la inmunofluorescencia (IF), inmunoperoxidasa (IP) y los enzimoimmunoensayos (EIE o su designación habitual en inglés EIA ó ELISA (Figura 9.10).

La IF es la técnica de elección para diagnóstico rápido y directo en muestras que contengan gran cantidad de células infectadas. Por ejemplo, para diagnóstico de virus respiratorios en muestras respiratorias; para rabia en improntas de cerebro del perro sospechoso ó sobre células obtenidas por raspado de mucosa bucal en el hombre; para adenovirus o herpes simplex en muestras oculares; para citomegalovirus humano (antigenemia pp 65) en leucocitos de sangre periférica, entre muchas otras aplicaciones (Tabla 9.10).

Cuando el número de muestras a procesar en el laboratorio es elevado, las técnicas de elección son los EIAs ó ELISAs, dado que se dispone de equipos automatizados que facilitan su realización. Por ejemplo, la detección del antígeno de superficie del virus hepatitis B (HBs Ag) se realiza por EIE automatizados.

5.2 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD) E INDIRECTA (IFI) PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES

La IF es una de las principales técnicas para el diagnóstico rápido durante el período agudo. Puede usarse en muchas muestras clínicas con la condición que contengan células infectadas, ya que el fundamento de la técnica es la observación de los antígenos virales presentes en el citoplasma, núcleo o en la membrana celular, al microscopio de luz ultravioleta. Estos antígenos virales se detectan por medio de tinción con anticuerpos específicos conjugados con un colorante fluorescente (isotiocianato de fluoresceína). Este colorante, al ser excitado por luz de corta longitud de onda (luz ultravioleta) emite luz de onda más larga (color verde manzana). Por ello, los antígenos a los cuales se unen los anticuerpos conjugados se observarán con un color verde manzana sobre un fondo negro (Figuras 9.11 y 9.12).

Existen distintos tipos de microscopios de inmunofluorescencia; el más empleado es el que utiliza luz incidente (epi-iluminación). La luz ultravioleta puede provenir de una fuente de halógeno o de mercurio.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los monoclonales son los más empleados en la actualidad, ya que su uso permitió mejorar significativamente la técnica al disminuir la fluorescencia inespecífica, lográndose una exquisita sensibilidad de detección de antígenos víricos.

En la IFD, las células de las muestras (respiratorias, mucocutáneas, orina, improntas o cortes de órganos) se colocan en portaobjetos, se fijan con acetona fría durante 10 minutos y se incuban (30 minutos a 37° C) con antisueros específicos para el o los virus, que se sospechan como agentes causales. Luego, se lavan los portaobjetos con solución salina para eliminar los anticuerpos no fijados a la muestra, y se observan al microscopio de luz ultravioleta (Figura 9.12).

En la técnica indirecta (IFI) el procedimiento es similar, pero el anticuerpo específico antiviral no está conjugado, por lo cual la técnica tiene un segundo paso que consiste en el agregado, luego del lavado, de un segundo anticuerpo conjugado con fluoresceína. Este anticuerpo está dirigido contra las Igs de la especie animal en la cual se preparó el antisuero antiviral (ratón, bovino, conejo, etc.). En general, la IFI es algo más sensible y más específica que la IFD debido a que tiene un paso más de amplificación y por ello presenta menor fluorescencia inespecífica, lo que facilita su lectura (Figura 9.11).

Ventajas e inconvenientes

La principal ventaja de estas técnicas es permitir un diagnóstico de certeza en pocas horas. La IFD se puede realizar de media a 1 hora, mientras que la IFI, que tiene un paso más, requiere al menos 2 horas, luego de la preparación de la muestra.

Otras ventajas son: a) elevada sensibilidad (70%) con respecto al aislamiento en cultivo; b) necesidad de pocas células en la muestra para poder realizar un diagnóstico (las muestras son bastante estables, luego de su fijación en acetona y pueden conservarse en el laboratorio o enviarse a grandes distancia sin pérdida importante de su antigenicidad); y c) la facilidad de su realización.

Los inconvenientes son: a) el alto costo del microscopio de IF y las lámparas, cuya duración debe registrarse; b) el costo de los reactivos; c) la necesidad de observadores experimentados capaces de diferenciar las imágenes específicas de las inespecíficas (producidas por detritus celulares, exceso de moco o defectos de la conservación de la muestra) y d) el tiempo necesario para la observación microscópica y el requerimiento de la lectura inmediatamente después de finalizada la técnica.

5.3 RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

El RIA es una técnica analítica analítica de alta sensibilidad. En los RIA de fase sólida el fundamento es similar al ELISA con la diferencia de que en aquél el anticuerpo está marcado con un isótopo radiactivo (Figura 9.10) en vez de estar conjugado con una enzima como en el ELISA. La lectura del RIA se realiza con un contador de radiación gamma. Los mayores inconvenientes son el alto costo de los equipos y el riesgo de la manipulación de sustancias radiactivas. Por estas razones, y dado que su sensibilidad para diagnóstico virológico es similar al ELISA, el RIA no es de uso habitual en la actualidad para diagnóstico.

5.4 ENZIMOINMUNOENSAYOS (EIA Y ELISA)

Las técnicas de enzimoimmunoensayo se pueden emplear tanto para detección de antígenos virales como de anticuerpos específicos (IgM, IgG o Igs totales). Son procedimientos de alta sensibilidad, similar a la del radioinmunoensayo (RIA) y para algunos virus (virus respiratorios), similar a la de la IF.

El término enzimoimmunoensayo (EIE) corresponde al inglés *enzyme immunoassay* (EIA); cuando la reacción antígeno-anticuerpo se realiza sobre una fase sólida se la denomina ELISA (del inglés *enzyme linked immunosorbent assay*).

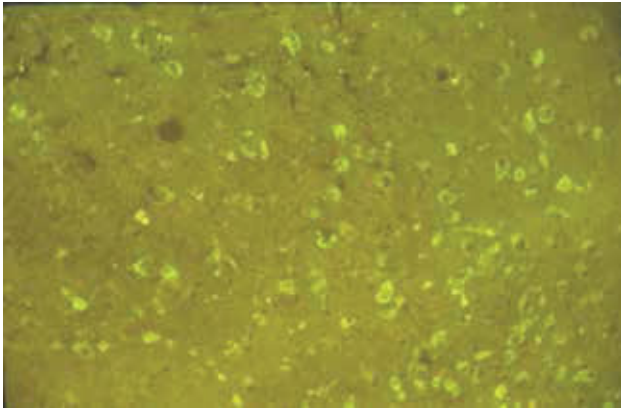


Figura 9.11. Inmunofluorescencia para detección de antígenos virales. Inmunofluorescencia indirecta para detección de antígenos del virus Junín en el encéfalo del primate *Cebus apella* infectado experimentalmente con la cepa atenuada para el hombre XJ-Clon 3. De: Carballal G, et al. *J Med Virol* 21:257-68, 1987.

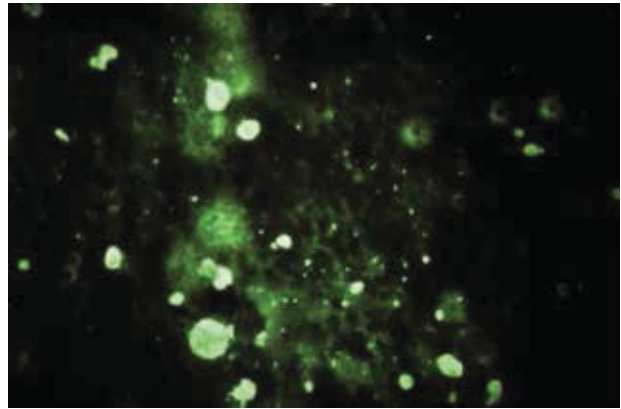


Figura 9.12. Inmunofluorescencia directa para detección de antígenos del virus rabia. (Imagen obtenida del dominio público en la web de los "Centros para el control y la prevención de enfermedades" (*Centers for Disease Control and Prevention*; CDC; EE. UU.). Cortesía del Dr. Tierkel.

Existen diferentes formatos de EIA y ELISA (de unión competitiva, de fase sólida directa, de fase sólida con anticuerpos de captura, etc.). En los ELISAs para detección de antígeno, los procedimientos más usados consisten en una fase sólida (celdilla de poliestireno, tubo o perla) sobre cuya superficie se adsorbe un anticuerpo específico anti-virus ("anticuerpo de captura"). Luego se añade la muestra y, si ésta contiene antígeno viral, se unirá al anticuerpo de captura. La detección se realiza mediante otro anticuerpo marcado con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina, o biotina-avidina). Luego del lavado cuidadoso para eliminar el anticuerpo marcado no combinado con el antígeno, se añade el sustrato de la enzima. El desarrollo de color puede observarse visualmente o, de preferencia, con un colorímetro o un espectrofotómetro. A mayor cantidad de antígeno presente en la muestra, más intenso será el color observado.

Los ELISAs indirectos tienen la ventaja de ser más sensibles y además, de no necesitar un anticuerpo conjugado para cada virus, ya que se emplean antiseros no conjugados y luego un antisuero anti-especie, éste sí marcado con una enzima (Figura 9.10). Existen actualmente numerosos equipos comerciales de ELISA que se emplean para detección de marcadores de hepatitis B (antígenos y/o anticuerpos), para antígenos de rotavirus, adenovirus, virus respiratorios y herpes simplex; para IgM específica (virus hepatitis A, citomegalovirus humano, herpes simplex, varicela-zóster, parotiditis y sarampión); y para Igs totales (HIV y HTLV, virus hepatitis C, entre muchos otros).

La ventaja de los EIAs y de los ELISAs con respecto a la IF consiste en que para los dos primeros no es necesario un observador experimentado y en que es posible procesar un gran número de muestras simultáneamente en forma rápida y automatizada. Los inconvenientes son: a) su relativa complejidad; b) algunos sustratos (ortho-fenilendiamina) pueden ser cancerígenos; y c) el alto costo de los equipos automatizados (véase el Capítulo 10, *Automatización en el diagnóstico virológico*).

Con el objetivo de simplificar el aprendizaje de los alumnos, y teniendo en cuenta el uso masivo del término "ELISA" en el ámbito médico, en esta obra, se utilizará el mismo, aun cuando pudiere corresponder a una reacción antígeno-anticuerpo no absorbida sobre una fase sólida (verdadero EIA).

ELISAs ópticos o de membrana

En la última década se han desarrollado ELISAs de membrana para detección de antígenos virales. Los antígenos son capturados directamente sobre membranas y todos los reactivos están incluidos en un recipiente cerrado. El operador debe añadir solamente la muestra, por lo cual son útiles para emplear en los consultorios médicos. Permiten un diagnóstico rápido, pero su sensibilidad es menor que

la de la IF o ELISA clásicos. Por ello, no se aconseja su empleo fuera de los períodos epidémicos y los resultados negativos deben ser confirmados con otra técnica. Otra desventaja es su alto costo en nuestro medio.

Como ejemplos de estos equipos que se pueden emplear para el diagnóstico de infecciones por virus respiratorios se pueden mencionar al *Directigen Flu A*, *Directigen RSV* (Becton Dickinson), *Test pack* (Abbott), *Quick Vue Influenza Test* (Quidel), *Flu OIA* (Biostar), etc., (ver Capítulo 13).

5.5 ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA

La electroquimioluminiscencia (conocida como ECL por su acrónimo en inglés, o también denominada quimioluminiscencia electrogenerada) es esencialmente un medio para convertir energía eléctrica en luz. Este tipo de ensayo emplea un quelato de rutenio y tripropilamina como marcadores de biomoléculas (proteínas, haptenos, péptidos y ácidos nucleicos), para su aplicación a técnicas de inmunoensayo y de análisis de DNA.

Esta técnica de detección está basada en la interacción entre un quelato de rutenio [el tris(2,2'-bipiridil)-rutenio o TBR] y tripropilamina sobre la superficie de un electrodo de platino. Tras la aplicación de una diferencia de potencial (voltaje) el rutenio excitado es capaz de emitir fotones al pasar de un estado energéticamente superior a uno de energía inferior. Subsiguientemente, la emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Como consecuencia de la emisión de fotones, la detección de rutenio es posible a muy bajas concentraciones ($\leq 10^{-11}$ mol / L).

Es menester distinguir la EQL de la quimioluminiscencia (CL). Aunque ambos procesos involucran la producción de luz por especies que exhiben reacciones de transferencia de carga altamente energéticas, en la CL la luminiscencia es iniciada y controlada por la mezcla de reactivos y cuidadosa manipulación del flujo. En la ECL, la luminiscencia es iniciada y controlada por la aplicación de una diferencia de potencial (voltaje) en un electrodo.

Una característica esencial del proceso electroquimioluminiscente, es su capacidad para generar una amplificación indefinida de la señal, la cual no es exclusivamente dependiente de la cantidad de moléculas de rutenio presentes. Los sistemas quimioluminiscentes convencionales apenas alcanzan intervalos de medida de 5 órdenes de magnitud. En contraposición, el método de emisión/detección electroquimioluminiscente exhibe una respuesta lineal para intervalos superiores a 6 órdenes de magnitud. Estas propiedades, junto con el bajo peso molecular del quelato de rutenio, permiten la obtención de anticuerpos con marcaje múltiple o de otros conjugados que presentan una ele-

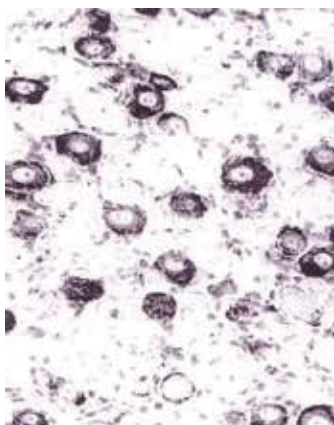


Figura 9.13. Tinción con peroxidasa-antiperoxidasa para la detección de antígenos de virus Junín en tejido nervioso de rata infectada. (x 250). Cortesía del Dr. Eduardo Lascano†.

vada actividad específica. Los conjugados marcados con rutenio son extremadamente estables y conservan su inmunoreactividad y afinidad inherentes.

La fase sólida universal de estreptavidina forma la base de los inmunoensayos de ECL. Ésta puede acoplarse a toda clase de moléculas inmunológicas biotiniladas. El sistema de estreptavidina-biotina es muy eficaz para la obtención de una inmunoreactividad elevada y constante de los anticuerpos, antígenos o haptenos fijados, sin que se produzcan problemas inherentes a la desorción o impedimento estérico debido a la fijación indirecta a la fase sólida.

Las mayores ventajas de la ECL estriban en la gran capacidad de amplificación de la señal a partir de una molécula marcadora que puede ser excitada repetidas veces; lo cual permite obtener umbrales de detección muy bajos y amplios intervalos de medición (dentro del rango dinámico) en rápidos procesos con cortos tiempos de reacción. Es por ello que determinaciones tales como la detección del HBs Ag (un antígeno de superficie del virus hepatitis B) en concentraciones muy inferiores al ng / ml puede ser realizada mediante esta técnica de elevada sensibilidad.

5.6 INMUNOPEROXIDASA (IP Y PAP)

Es una técnica inmunohistoquímica que permite detectar antígenos virales. En la técnica directa, el anticuerpo específico está marcado



Figura 9.14. Histopatología. Corpúsculos de Negri en el interior de una neurona infectada por virus rabia. Habitualmente estos corpúsculos se observan en las células piramidales del asta de Ammon y en las células de Purkinje del cerebelo. También pueden detectarse en células neurales de la médula espinal y ganglios neurales. H-E. (Imagen obtenida del dominio público en la web de los "Centros para el control y la prevención de enfermedades". (Centers for Disease Control and Prevention; CDC; EE. UU.)

con una enzima (peroxidasa). Luego de hacerlo reaccionar con la muestra, se añade el sustrato de la enzima y se observará el desarrollo de gránulos de color en las zonas que contienen el antígeno. La ventaja de esta técnica sobre la IF es que los preparados son permanentes y se observan al microscopio óptico. Uno de los mayores inconvenientes es que la peroxidasa endógena que contienen algunas células puede dar falsos resultados positivos, por lo que debe eliminarse previamente. La sensibilidad del método puede aumentarse mediante el uso de un sistema indirecto de peroxidasa-antiperoxidasa (Figura 9.13).

6. HISTOPATOLOGÍA Y CITOLOGÍA EXFOLIATIVA

Si bien el procedimiento más rápido para detectar el efecto promovido por la infección viral en la muestra clínica es la observación al microscopio óptico del material teñido para examen citológico o histológico, la sensibilidad y especificidad de esta técnica son bajas al compararse con otras más sofisticadas como la inmunomarcación o la detección genómica *in situ*.

Entre los ejemplos de observación directa al microscopio óptico deben mencionarse el extendido de Tzanck para observar células infectadas por herpesvirus, el de Papanicolaou para las infectadas por papilomavirus humano (HPV), y la tinción de Seller (azul de metileno y fucsina) para las que lo están con virus rabia. En el primer caso, después de desprender las células desde la base de una vesícula, se prepara un extendido que se tiñe con colorante de Wright o con Giemsa. La presencia de células gigantes multinucleares confirma que las mismas pueden ser causadas por herpes simplex 1 ó 2, o por virus varicela-zóster. En modo análogo, la detección de coilocitos (del griego *koilos*, cueva) en extendidos de células cervicales es altamente sugerente de la infección por HPV. Estas células consisten en queratinocitos agrandados, que exhiben un halo claro que rodea un núcleo central también agrandado. El extendido de Papanicolaou posee un 80% de sensibilidad y un 99,4% de especificidad, por lo que –junto a la facilidad para su obtención y a su bajo costo– constituye un excelente test de tamizaje para el diagnóstico. A su vez, la acumulación de ribonucleoproteínas del virus rabia en el citoplasma de las neuronas permite la visualización al microscopio óptico de corpúsculos patognomónicos (denominados de Negri) que con la tinción de Seller se observan con un color magenta conteniendo inclusiones basófilas y con H-E con un color rosado-rojizo intenso (eosinofílico), que sustentan el diagnóstico de la infección por rabia. Este es un procedimiento rápido de diagnóstico de rabia, aunque su sensibilidad es baja (Figura 9.14).

La observación de imágenes intranucleares características en "ojo de búho" se asocian al diagnóstico de infección por citomegalovirus humano clínicamente significativa (Figura 9.15).

En modo análogo, la observación de células con núcleos agrandados conteniendo inclusiones nucleares basófilas o anfófilas al

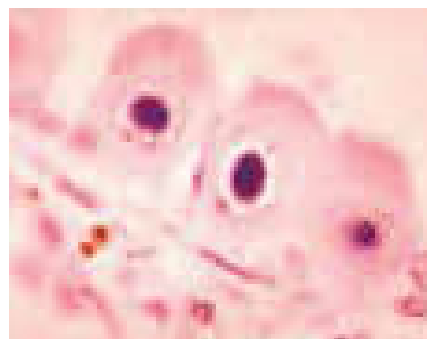


Figura 9.15. Histopatología. Imagen "en ojo de búho" correspondiente a células de riñón humano infectadas por citomegalovirus humano. H-E. (Imagen obtenida del dominio público en la web de los "Centros para el control y la prevención de enfermedades". (Centers for Disease Control and Prevention; CDC; EE. UU.)

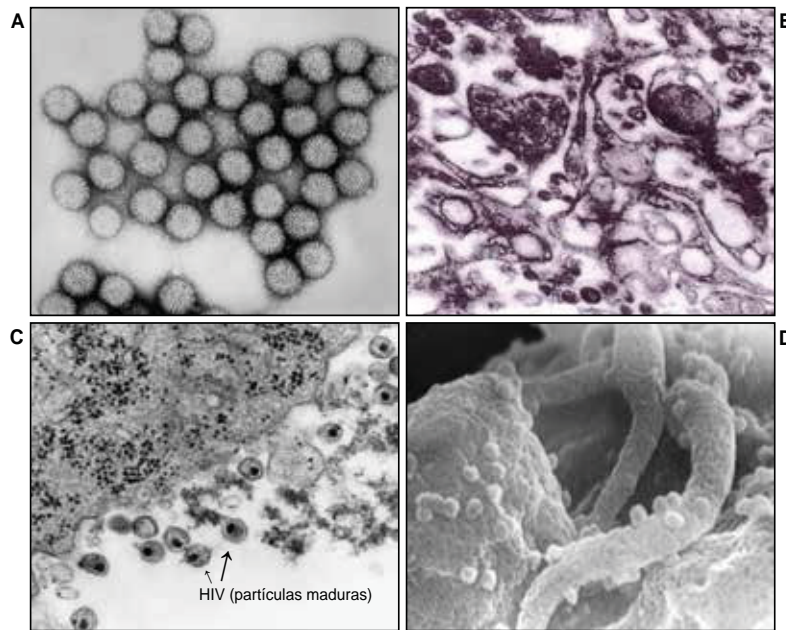


Figura 9.16. Microscopia electrónica (ME). **A.** ME de transmisión: tinción negativa de partículas purificadas de rotavirus. **B:** ME de transmisión: corte ultrafino de médula ósea de cobayo infectado experimentalmente con virus Junín. Se observan partículas virales en un megacariocito ($\times 50.000$) (Dra. Guadalupe Carballal; Tesis Doctoral, UBA). **C.** ME de transmisión: corte ultrafino de células infectadas con HIV. **D.** ME de barrido: brotación de partículas de HIV desde la membrana plasmática de linfocitos y de sus prolongaciones (pseudópodos). (Las imágenes A, C y D fueron obtenidas del dominio público en la web de los "Centros para el control y la prevención de enfermedades" (Centers for Disease Control and Prevention; CDC; EE. UU.).

teñirse con hematoxilina-eosina, rodeadas de un delgado halo perinuclear citoplasmático con bordes imprecisos (*smudge cells*) es característica de la infección por adenovirus.

Otra imagen histológica característica se observa a partir de extendidos de lesiones cutáneas por virus molusco contagioso. Las lesiones para este agente se caracterizan por la presencia de cuerpos de inclusión acidófilos intracitoplasmáticos (cuerpos de Henderson-Paterson).

7. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)

Mediante el microscopio electrónico es posible observar la morfología de las partículas virales presentes en muestras clínicas (Figuras 9.16 A y B). La limitación de esta técnica, además del costo del microscopio, es que necesita de una alta concentración de virus en la muestra, por lo cual es poco sensible. Sin embargo, ciertas muestras con alto título de virus permiten obtener resultados rápidos mediante ME, con tinción negativa y se pueden emplear en diagnóstico. Estas son: a) muestras de líquido vesicular (herpes simplex, varicela-zóster, viruela, vaccinia); de verrugas (papilomavirus humano, molusco contagioso); b) materia fecal (rotavirus, norovirus, adenovirus, etc.). Otras aplicaciones, y los diferentes procedimientos de ME se describen en el Capítulo 3.

La inmunomicroscopía electrónica, utilizando antisueros o anticuerpos monoclonales, incrementa la sensibilidad de la ME.

8. DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

8.1 FUNDAMENTO Y APLICACIONES

La moderna tecnología desarrollada para la detección de genomas virales ha experimentado un significativo impulso en los últimos años. La muy alta especificidad, elevada sensibilidad y la disponibilidad de reactivos estandarizados hacen de las técnicas moleculares una herramienta muy valiosa para la detección de infecciones virales.

La detección de genomas virales puede proveer crucial información que no podría ser obtenida por otras técnicas. Por ejemplo, cuando: a) no es posible detectar virus infeccioso mediante aislamiento por defectos en la conservación de la muestra; b) existe más de un virus en la muestra a analizar; c) se carece de sistemas *in vitro* de aislamiento, o bien la propagación sea lenta; d) se carece de reactivos para detectar antígenos; e) se desea determinar niveles de replicación viral en portadores crónicos; f) se propone estudiar la patogenia de una determinada infección viral.

Sin embargo, a pesar de la elevada sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares, los genomas virales sólo podrán ser detectados cuando están presentes en la muestra clínica obtenida. Por ello, es necesario recordar la figura 9.1, exhibida al comienzo de este capítulo.

El concepto antedicho cobra especial relevancia dado que el empleo de estas técnicas no sustituye sino que frecuentemente complementa otras de uso habitual en el diagnóstico virológico. Por ejemplo, la ausencia de detección del genoma de HCV en una muestra de sangre durante el período crónico de la infección no significa necesariamente la eliminación del agente en una etapa anterior. El médico deberá tener presente que dicho virus puede asociarse a una viremia recurrente, indetectable en determinados momentos. El resultado negativo de una RT-Nested PCR puede corresponderse a uno positivo para la detección de anticuerpos anti-HCV. En otros términos, una serología positiva con una RT-Nested negativa, no descarta la posibilidad de una infección crónica aún en curso. Más aún, dicho resultado no debe interpretarse como un falso resultado positivo de la serología.

La detección genómica viral es muy útil en situaciones donde se carece de equipos comerciales para la detección de IgM viral para establecer el diagnóstico de infección aguda.

Otro caso particular lo constituye la detección del genoma viral en las infecciones latentes. Así por ejemplo, la mera pesquisa del genoma a DNA de un agente como el virus Epstein-Barr en una muestra de sangre no implica que sea la causa de una infección aguda (por ejemplo, la mononucleosis infecciosa), dado que dicho genoma persiste como episoma en el interior

de los linfocitos B durante toda la vida del individuo, aun en ausencia de enfermedad. Por ello, será menester la detección de transcritos virales específicos en las células o bien la determinación de la carga de DNA viral para diferenciar una infección aguda de otra latente.

Con menor frecuencia, puede haber instancias donde la pesquisa del genoma de un virus puede ocurrir en ausencia de respuesta serológica específica detectable, tal como se observa en individuos con agammaglobulinemia o en otros que –infrecuentemente– experimentan serorreversión.

8.2 HIBRIDACIÓN CON SONDAS

8.2.1 Fundamento

El uso de sondas para detección de genomas virales tiene dos aplicaciones: 1) como herramienta diagnóstica; y 2) en estudios de patogénesis.

El empleo de sondas de DNA o RNA para detección de secuencias de genomas virales se fundamenta en la tendencia de dos cadenas de ácido nucleico a aparearse y re-arrollarse por sus secuencias nucleotídicas complementarias formando una doble hélice. Por ello, en las reacciones de hibridación, es necesario separar previamente las dos cadenas de la doble hélice a hibridar, lo que se logra mediante desnaturalización por elevación térmica por encima de su punto de fusión (T_m) o tratamiento con álcalis. Una vez producida la hibridación, una mayor longitud de regiones apareadas corresponde a una mayor extensión de secuencias complementarias. La estabilidad de estos *dúplex* depende de las interacciones hidrofóbicas entre las bases apiladas y los puentes de H^+ entre bases púricas y pirimidínicas complementarias de las dos cadenas (3 enlaces entre C:G, y 2 puentes entre A:T y A:U). La longitud mínima de secuencias de DNA perfectamente complementarias que puede reconocerse y formar híbridos estables es del orden de los 12 nucleótidos. La formación de este híbrido puede ser detectada si una de las cadenas está marcada con material radiactivo u otras marcas (Figura 9.17).

8.2.2 Aplicación del uso de sondas

Como ejemplos de la contribución de la hibridación en estudios de patogenia se pueden mencionar: la detección del genoma del virus hepatitis B en el carcinoma hepatocelular; la participación del HPV en el cáncer invasivo de cuello uterino o el rol del virus HTLV-1 en cierto tipo de leucemias humanas, etc.

8.2.3 Dot Blot, Slot blot, Southern Blot, Northern Blot y captura de híbridos DNA-RNA

Aunque la cinética de las hibridaciones en fase líquida puede determinar mejor la concentración, complejidad y homología de preparaciones de ácidos nucleicos, su fijación a soportes sólidos es menos complicada y permite análisis semi-cuantitativos en múltiples muestras simultáneamente.

En la técnica de *Dot Blot* (*dot*: punto; *blot*: mancha) el DNA o RNA parcialmente purificado de la muestra problema es sembrado sobre un filtro de nitrocelulosa o nylon y fijado mediante calor o radiación ultravioleta. En general se aplican menos de 10 μ g o el contenido de 10⁶ células en un área de 5 mm². Existen dispositivos que permiten la aplicación del ácido nucleico a estudiar en el filtro a través de pequeñas ranuras (en inglés *slot*) produciendo manchas con dicha forma luego de la hibridación con la sonda marcada y posterior revelado (*Slot Blot*).

Estas técnicas también permiten un análisis semi-cuantitativo o cuantitativo (por ejemplo: pg/ml) de la muestra. El DNA de una muestra puede también ser tratado con endonucleasas de restricción y fraccionado mediante electroforesis en gel. Estos fragmentos de DNA pueden ser transferidos a filtros por difusión capilar, y luego fijados como se describió más arriba para su posterior hibridación con sondas marcadas. Esta técnica, descrita en 1975 por Sir E. M. Southern, se conoce como *Southern Blot* o manchas de Southern. Por analogía, el fraccionamiento electroforético de RNA y su transferencia a filtros se conoce como *Northern Blot*. Estas técnicas

combinan la alta resolución de la electroforesis en gel con la alta sensibilidad y especificidad de la hibridación de ácidos nucleicos, eliminando prácticamente las posibles reacciones inespecíficas.

Las sondas se construían inicialmente en forma artesanal mediante técnicas de clonado de genes (o de fragmentos de ellos) en vectores adecuados (por ejemplo, plásmidos recombinantes producidos en bacterias como *E. coli* luego de su transformación, y purificados a partir de las colonias desarrolladas). Más recientemente, la amplificación de regiones genómicas virales de interés a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitió la construcción artesanal de sondas en forma eficiente y rápida. En ambos casos –luego de la desnaturalización– cada hebra de DNA sirve como templado o molde para que una DNA polimerasa en presencia de cebadores (como por ejemplo, hexámeros nucleotídicos) y dNTPs (uno de ellos marcado radiactiva [sondas "calientes"] o no radiactivamente ["sondas frías"]) produzca fragmentos de DNA que serán utilizados como sondas marcadas en la hibridación a realizar.

Actualmente también se utilizan oligonucleótidos sintéticos (habitualmente 20 a 30 nucleótidos) para la detección de genomas virales. Estas sondas pueden ser "calientes" o "frías" según la marcación utilizada.

Para poner en evidencia la existencia de hibridación entre la sonda y el genoma que se desea detectar, es necesario que la sonda se encuentre marcada. Entre las sondas marcadas con radiactividad, el nucleído más frecuentemente utilizado es el ³²P. La sonda se marca mediante un dNTP conteniendo ³²P en posición alfa como radionucleído, el que es incorporado a la sonda mediante una DNA polimerasa. Teniendo en cuenta la corta vida media del ³²P (14 días), se han ensayado otros isótopos como el ³⁵S (vida media 87 días) y el ³H (vida media 11 años). Sin embargo, el prolongado período de exposición necesario para producir una señal en autorradiografías hace que su uso, en diagnóstico de rutina, sea prácticamente nulo. Los inconvenientes para el uso de sondas marcadas con ³²P son: elevado costo, riesgo biológico de su manipulación y desecho; corta vida media; y tiempo prolongado de exposición en autorradiografías (1-2 días). Por ello, se han desarrollado otros sistemas de marcado no radiactivo. Ellos incluyen el uso de 11- dUTP conjugado con biotina o digoxigenina. La detección de sondas biotiniladas, después de la hibridación, se logra mediante el agregado de avidina (sustancia de gran afinidad con la biotina, cuya constante de disociación es 10⁻¹⁵ M), conjugada a enzimas (peroxidasa, fosfatasa alcalina), fluorocromos o iones metálicos. Alternativamente, la detección puede amplificarse mediante el uso de avidina (o estreptavidina) seguida de anticuerpos anti-avidina conjugados. El fundamento de la reacción con digoxigenina (esteroide derivado de *Digitalis purpúrea*) es similar: uso de anticuerpos anti-digoxigenina marcados con fosfatasa alcalina y detección final mediante adición de un sistema de colorante y sustrato.

La **captura de híbridos DNA-RNA** es una técnica cualitativa utilizada –por ejemplo– para el diagnóstico de infección por HPV en muestras de cepillado exo-endocervical o de vagina - vulva. Posee una adecuada especificidad, pero –en contraste– una sensibilidad disminuida, comparada con otras técnicas que amplifican el DNA o la señal de detección. Existen dos versiones comercializadas, la primera en tubos y la segunda –con mejor sensibilidad– en microplacas.

En ambas, la muestra clínica que potencialmente puede contener el DNA viral es sometida a desnaturalización y la cadena liberada de DNA es hibridada en una solución conteniendo una mezcla de moléculas de RNA, correspondientes a 14 tipos virales de HPV (véase el capítulo 29): 5 de los así denominados de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44) y 9 de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 y 56). Los híbridos de RNA-DNA son capturados en la superficie de un tubo que contiene anticuerpos inmovilizados que reconocen específicamente a dichos híbridos. Al ser capturados, los mismos reaccionan con un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina y éste con un sustrato quimioluminiscente; la luz emitida es registrada por un luminómetro. El resultado se expresa en unidades relativas de luz (*relative light units* o RLU).

Grupo de Técnicas	Característica	Ejemplos
Sin amplificación de la secuencia diana	Hibridación de ácidos nucleicos en fase sólida (sin fraccionamiento electroforético de la secuencia diana) con una sonda marcada	<i>Dot blot</i> (DNA o RNA) <i>Slot blot</i> (DNA o RNA)
	Fraccionamiento electroforético de la secuencia diana e hibridación de ácidos nucleicos en fase sólida con una sonda marcada	<i>Southern blot</i> (DNA) <i>Northern blot</i> (RNA)
	Hibridación de DNA con sonda a RNA y reconocimiento del híbrido DNA/RNA con un anticuerpo monoclonal marcado	Captura de híbridos
Con amplificación de la secuencia diana	Con amplificación termocíclica	PCR (DNA) RT-PCR (RNA) PCR + hibridación en fase sólida o líquida RT-PCR + hibridación en fase sólida o líquida <i>Nested PCR</i> (PCR anidada) RT- <i>Nested PCR</i> PCR y RT-PCR en tiempo real
	Con amplificación isotérmica	NASBA / TMA
Con amplificación de la señal de detección	Hibridación repetida de sondas, marcadas en la amplificación final	<i>Branched DNA</i> (DNA ramificado)

Tabla 9.11. Clasificación de diversas técnicas para detección de ácidos nucleicos.

La sensibilidad de esta técnica permite la detección de 10 pg / ml de DNA de HPV, lo cual equivale a una copia del virus por célula. Se considera al test como "Positivo" cuando las relaciones relativas de luz RLU respecto a los controles positivos son iguales o mayores que uno.

La segunda versión de esta técnica (en microplacas) ha elevado la sensibilidad analítica alrededor de 50 veces respecto a la captura híbrida en tubos, habiendo agregado la detección de otros 4 tipos virales de alto riesgo (39, 58, 59 y 68), con lo cual prácticamente están representados todos los tipos virales oncogénicos.

La tecnología de segunda generación ha reemplazado a la técnica en tubos, la cual –sin embargo– aún continúa siendo válida. La captura de híbridos tiene la posibilidad de semicuantificar la carga viral; lamentablemente, ello carece de significación, dado que sólo evalúa la cantidad de copias genómicas virales sin tener en consideración el número de células con las que dicho valor es obtenido. Tiene también la limitación de no poder establecer con precisión el tipo viral involucrado ni la presencia de infecciones mixtas; más aún, se han reportado algunas reacciones inespecíficas, debido a la hibridación "cruzada" de sondas diseñadas para tipos de alto riesgo con genomas de HPV de bajo riesgo.

8.3 AMPLIFICACIÓN SELECTIVA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Actualmente, la detección de ácidos nucleicos virales es ampliamente utilizada debido al advenimiento de diversas técnicas que mediante diferentes estrategias de amplificación (de la secuencia diana o de la señal de detección) incrementan sustancialmente su sensibilidad respecto a las técnicas empleadas inicialmente y mencionadas en el ítem 8.2.3. Entre las principales técnicas de amplificación para detectar ácidos nucleicos se describirán las conocidas con las abreviaturas PCR, NASBA/TMA y bDNA, entre otras.

8.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

8.3.1.1 Fundamento

La PCR (*polymerase chain reaction*) permite amplificar selectivamente secuencias de DNA o RNA (luego de una etapa previa de transcripción inversa, obteniéndose un DNA comple-

mentario al RNA), produciendo grandes cantidades de DNA de longitud y secuencia definida, a partir de (aun ínfimas) cantidades de ácido nucleico (secuencia blanco) presente en la muestra clínica.

El fundamento es la amplificación enzimática de un fragmento de DNA flanqueado por 2 oligonucleótidos cebadores (*primers*) que hibridan con las cadenas opuestas de la secuencia nucleotídica blanco. Luego se producen ciclos repetidos de desnaturalización del templado (a 95° C), hibridación de los cebadores a las secuencias complementarias (por ejemplo: a 55-60° C) y, extensión de la secuencia nucleotídica de dichos cebadores mediante la acción de una DNA polimerasa termo-resistente (proveniente –por ejemplo– de la bacteria *Thermus aquaticus* (a 72° C). Los oligonucleótidos cebadores hibridan a cadenas opuestas de la secuencia blanco y su orientación permite que la síntesis de DNA por la polimerasa tenga lugar entre la ubicación de los mismos, duplicando la cuantía de DNA del segmento en cuestión. Más aún, dado que los productos de extensión son también complementarios y capaces de unirse con los cebadores, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad de DNA sintetizado en el ciclo previo. Por ello, ocurre la acumulación exponencial de la secuencia blanco, en el orden de aproximadamente 2ⁿ, donde n es el número de ciclos. Por ende, esta técnica es capaz de producir un enriquecimiento selectivo de una secuencia nucleotídica de DNA del orden de 10⁶ (Figura 9.18).

El DNA así amplificado puede detectarse mediante fraccionamiento electroforético y posterior observación del gel teñido con bromuro de etidio mediante transiluminación con luz ultravioleta o bien con sales de plata. Además, la especificidad de los productos puede ser confirmada y la sensibilidad aumentada (50-200 veces) mediante fijación sobre membranas de nitrocelulosa o nylon y subsiguiente hibridación con sondas apropiadas para el fragmento a investigar. Dicha hibridación también puede ser cuantitativa, al analizarse el fenómeno en una fase acuosa en placas con múltiples fositas, que permiten el análisis simultáneo colorimétrico de varias muestras, en función de estándares previamente cuantificados.

En ciertos casos en los que la carga viral puede ser de baja cuantía, se realiza una doble amplificación por PCR, denominada PCR anidada o *Nested PCR* (Figura 9.19).

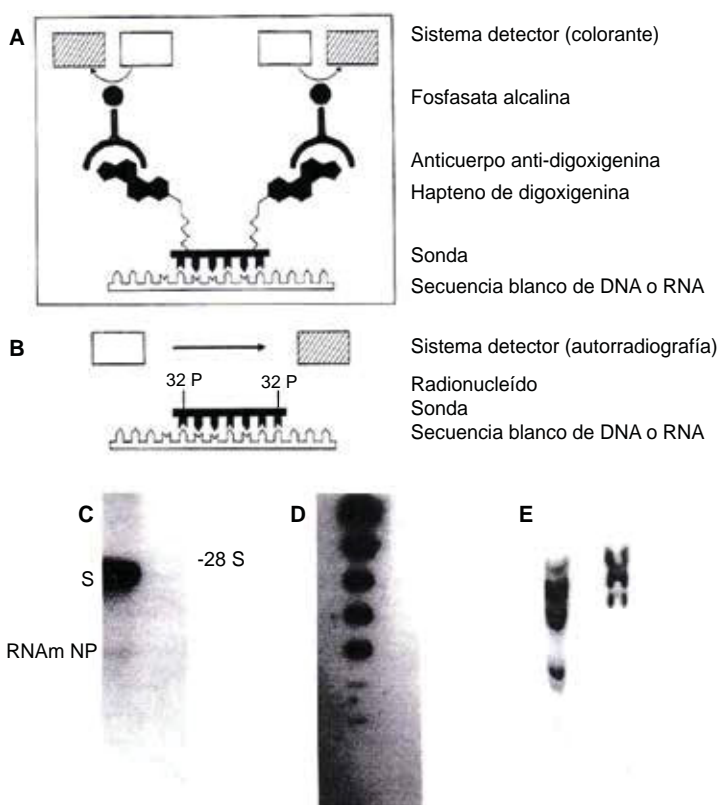


Figura 9.17. Hibridación con sondas. **A.** Esquema del uso de una sonda no radiactiva marcada con digoxigenina. Detecta las secuencias genómicas mediante una reacción inmunológica con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina. El sistema detector se torna coloreado en casos de hibridación. **B.** Esquema del uso de una sonda radiactiva marcada con ^{32}P . El sistema detector de la señal radiactiva (emisión beta) es una placa radiográfica expuesta en condiciones apropiadas. En caso de hibridación se observa una imagen radioopaca. **C. Northern blot.** Detección del fragmento S y del RNAm para la nucleoproteína (NP) del virus Pichinde mediante una sonda radiactiva en extractos infectados de células BHK. **D. Slot blot.** Detección del genoma del virus hepatitis B en células Alexander. Múltiples diluciones del DNA conteniendo la secuencia diana. **E. Southern blot.** A la izquierda, detección del genoma del virus hepatitis B luego del tratamiento con la enzima de restricción *Pst* I. A la derecha, fragmentos genómicos del bacteriófago lambda utilizados como marcador.

Mediante la misma, una alícuota del producto de la reacción de la primera PCR, es utilizada como templado para la segunda amplificación. Dado que en la *Nested PCR* se utilizan cebadores internos a los productos de la primera PCR, sólo se amplificarán en la segunda ronda aquellos productos que hubieran sido específicos en la primera. En síntesis, la *Nested PCR* exhibe mayor sensibilidad y especificidad que la PCR. A esta *Nested PCR* –al igual que a la PCR– se le puede aumentar la sensibilidad mediante una subsiguiente hibridación con sondas internas al producto obtenido (Figura 9.20).

Otra variante de la PCR o de la RT-PCR (véase a continuación) es la competitiva. Es utilizada para determinar el número de copias genómicas presentes en una determinada muestra clínica. Para ello, se agrega a las mezclas de la reacción cantidades conocidas de un templado sintético de secuencia nucleotídica idéntica a la que hibridan los cebadores con el templado problema a cuantificar. Dado que éste y el sintético añadido a la reacción compiten por los cebadores, la cuantía del templado de la muestra problema corresponde a aquella banda de amplificación que es equimolar a la de la amplificación del templado sintético. Mediante una curva de calibración se calcula con exactitud el valor correspondiente al punto de equivalencia obtenido (Figura 9.21).

8.3.1.2. RT-PCR o reacción de transcripción inversa acoplada a PCR

La RT-PCR consiste simplemente en la anteposición de una etapa de transcripción inversa a la amplificación por PCR. La

abreviatura RT (del inglés *reverse transcriptase*) es ampliamente utilizada y hace referencia a la utilización de la enzima transcriptasa inversa (o por extensión, también traducida como reversa) que promueve la síntesis del DNA complementario al RNA que sirve como templado. Las enzimas utilizadas pueden ser termolábiles (AMV [*avian myeloblastosis virus*], o MMLV [*Moloney murine leukemia virus*]) o con diferentes grados de termoestabilidad (la *Tth* realiza la síntesis de DNAc a 70° C). Diferentes modificaciones en las transcriptasas inversas (con o sin actividad de RNasa H, actividad enzimática a 37, 42 o aun 50° C), o la utilización de cebadores específicos o de hexámeros con función de cebadores aleatorios (*random primers*) permiten sintetizar con diferente eficiencia (y a veces disímil especificidad) el DNAc de distintos templados. Esto tiene crucial implicancia en la subsiguiente etapa de amplificación por PCR. Así por ejemplo, una RT realizada con *Tth* DNA polimerasa probablemente exhibirá una excelente especificidad pero podrá tener una menor sensibilidad que la desarrollada con transcriptasas termolábiles. En otros términos, el resultado final de una RT-PCR con fines diagnósticos será dependiente de esta etapa previa.

8.3.1.3. Aplicaciones de la PCR

Si bien la amplificación de ácidos nucleicos virales mediante PCR o RT-PCR puede emplearse para la mayoría de los virus, su aplicación al diagnóstico tiene indicaciones precisas. A pesar de la elevada sensibilidad de la técnica, si el genoma viral no está presente en el momento en que se obtuvo la muestra, será imposible detectarlo.

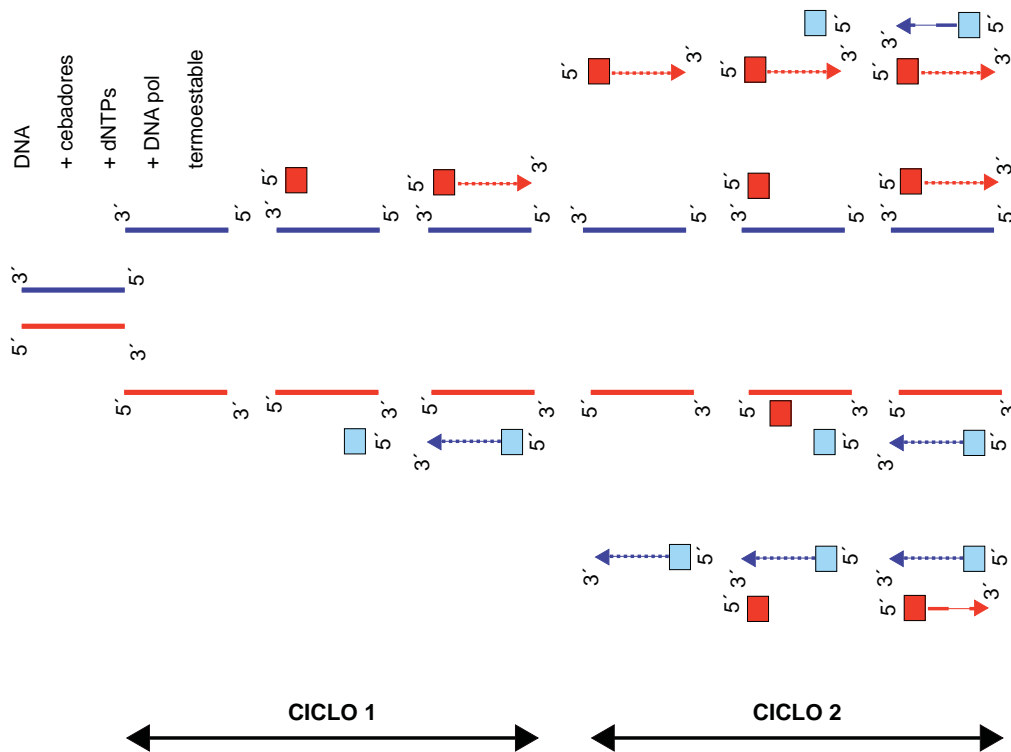


Figura 9.18. Reacción de PCR. Amplificación cíclica de DNA mediante una DNA polimerasa termoestable. Se esquematizan los dos primeros ciclos, mostrando las fases de desnaturalización (aproximadamente a 95° C), hibridación de los cebadores al templado (alrededor de los 55 - 60° C), y extensión nucleotídica (72° C). Obsérvese la formación de fragmentos largos en los dos ciclos (líneas punteadas con flecha) y el comienzo de la síntesis exponencial de fragmentos cortos (delimitados por el extremo 5' de los cebadores; líneas fragmentadas) a partir del segundo ciclo. Sólo los fragmentos cortos son detectados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y transiluminados con luz UV. Típicamente una reacción de PCR consiste en unos 30-40 ciclos.

Por ello, en éste como en todos los demás procedimientos diagnósticos es necesario conocer la patogenia de la enfermedad.

Algunas de las indicaciones habituales de la PCR (o RT-PCR) para diagnóstico son: encefalitis por herpes simplex, varicela-zóster, o diversos enterovirus; HIV en el neonato; hantavirus; algunos arbovirus; parvovirus humano B19; metapneumovirus humano (dado que es de difícil aislamiento en cultivo); adenovirus, citomegalovirus humano y virus Epstein-Barr en pacientes inmunosuprimidos; algunas situaciones diagnósticas en hepatitis B y C (Tabla 9.12); monitoreo de la respuesta a tratamientos antivirales para HIV, virus hepatitis B, virus hepatitis C, citomegalovirus humano, adenovirus, etc.

8.3.1.4. PCR en tiempo real

Esta es una variante de la PCR con extrema importancia en el diagnóstico virológico.

Su utilidad radica en la amplificación, detección y cuantificación simultáneas del DNA mediante fluorescencia durante el evento de la amplificación. Es decir, es posible con esta técnica observar la cinética de la amplificación del DNA por PCR (Figura 9.22).

Básicamente, consiste en una PCR acoplada a un lector de fluorescencia. Utiliza uno de los dos sistemas siguientes: i) compuestos intercalantes; ii) sondas de hibridación específicas.

Uso de agentes intercalantes: SYBR green. Mediante el empleo de un compuesto fluorescente (SYBR green) que se intercala entre las hebras de DNA (en modo análogo a lo que ocurre con el bromuro de etidio para observar ácidos nucleicos en geles transiluminados con luz UV) se detecta el DNA sintetizado. El incremento de DNA se traduce en un aumento de la fluorescencia. Tiene

menor especificidad que la PCR que utiliza sondas para la detección (ya que el SYBR green detecta multímeros de cebadores que producen también una señal fluorescente), y no se pueden detectar polimorfismos nucleotídicos.

Uso de sondas de hibridación específicas. Se utilizan sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donante y un aceptor. Su uso se fundamenta en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (en inglés conocida con el acrónimo FRET). La detección del producto de amplificación por PCR puede realizarse mediante tres tipos de sondas: las sondas de hidrólisis, las sondas denominadas faros moleculares (*molecular beacons*) y las llamadas sondas FRET.

- **Las sondas de hidrólisis** –también denominadas *Taqman*– consisten en oligonucleótidos marcados en el 5' (donante) y el 3' (receptor) que son hidrolizados por la actividad 5'→3' exonucleasa de la enzima *Taq* DNA polimerasa, seguida de la captura de la fluorescencia por un lector (Figura 9.23).

- **Las sondas denominadas faros moleculares (*molecular beacons*)** son parecidas a las de hidrólisis (ya que poseen los extremos 5' y 3' marcados) pero exhiben una estructura secundaria con forma de asa donde está la zona de hibridación a la secuencia diana. Al hibridarse el asa al DNA diana a detectar, el donador y el aceptor quedan distantes, por lo cual la fluorescencia del primero es captada por el lector y no por el aceptor (Figura 9.24).

- **Las sondas FRET** consisten en 2 sondas que se unen a secuencias adyacentes del DNA diana. Una de dichas sondas está marcada con el fluorocromo donador en el extremo 5' y la otra con el aceptor en el 3'. Al estar próximas, la emisión del donador no es captada por el lector de fluorescencia, sino por el aceptor, que a su vez emite fluorescencia en otra longitud de onda (Figura 9.25).

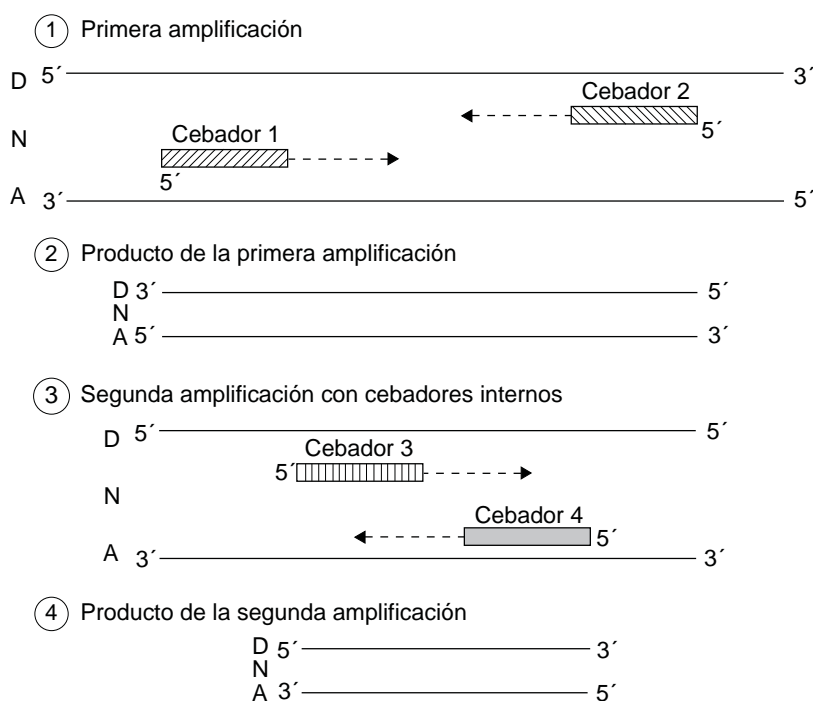


Figura 9.19. Nested PCR. Esquema.

Existen diversos modelos de equipos de PCR en tiempo real tales como *GeneAmpSerie ABIPrism*, *ICycler IQ*, *Light Cycler*, *Smart Cycler*, *MX4000* y *Rotor Gene* (fabricados respectivamente por *Applied Biosystem*, *BioRad*, *Roche Diagnostics*, *Cepheid*, *Stratagene* y *Corbet Research*). Sus principales diferencias consisten en los diversos sistemas térmicos utilizados, el tiempo necesario para ejecutar las reacciones de amplificación por PCR (entre 20 minutos y 2 horas) y el número de muestras analizadas en cada reacción.

Prestaciones de la PCR en tiempo real. Esta técnica permite al menos 4 prestaciones: 1) la amplificación y detección de DNA o RNA; 2) la amplificación simultánea de distintas secuencias diana (PCR múltiple); 3) la cuantificación del DNA o RNA; y 4) el análisis de curvas de disociación. La cuantificación del producto amplificado se realiza utilizando un material de referencia conocido y en concentraciones crecientes, lo que permite la construcción de una curva patrón en la que se observa el aumento de la fluorescencia en función del número de ciclos desarrollados. Se establece el punto de cruce o *Cp* (*crossing point*) que determina el número de ciclos correspondiente al aumento de la fluorescencia (y su correspondencia con los genomas presentes en la muestra). Cuanto menor es la cuantía del material a detectar, mayor es el número de ciclos requerido para observar el aumento de la fluorescencia (Figura 9.22).

La presencia de mutaciones respecto a una secuencia "salvaje" se evidencia al observar la mayor estabilidad del híbrido formado por una sonda dirigida hacia secuencias (totalmente) complementarias versus la observada frente a una secuencia mutada. Ello se refleja en que la temperatura de *melting* (T_m = temperatura de fusión a la cual la mitad de los genomas están disociados) es mayor para la secuencia salvaje dado que el número de enlaces de H^+ entre ambas cadenas del DNA (diana y sonda) es el máximo posible (Figura 9.26).

Principales usos. Se está utilizando la PCR en tiempo real para el monitoreo de diversas infecciones tales como las producidas por HIV, HBV, HCV, HCMV, adenovirus, virus BK, JC, etc. En aquellos casos donde la carga viral es empleada para monitorear la respuesta de los pacientes frente a la terapéutica antiviral, esta técnica es de especial utilidad. Asimismo, la presencia de mutaciones de relevan-

cia clínica (por ejemplo, las asociadas a la resistencia) pueden ser evidenciadas a partir del análisis de la temperatura de *melting*.

Ventajas. La PCR en tiempo real exhibe al menos 4 ventajas: 1) menor tiempo requerido para la amplificación; 2) utilización de un sistema cerrado, con menor chance de contaminación; 3) cuantificación con mayor precisión y mayor rango dinámico (10-10⁵ copias genómicas); y 4) simultaneidad de ensayos cuali-cuantitativos, múltiples y de detección de mutaciones.

Potencial desventaja. Debido a la ausencia de controles internos a amplificar, es posible la existencia de errores en la cuantificación debido a eventos de interferencia inherentes a muestras en particular.

8.3.2 NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) / TMA (Transcription Mediated Amplification)

Ambas designaciones corresponden a dos versiones comercializadas de una técnica de amplificación isotérmica de la secuencia blanco (DNA o RNA), lo cual deviene en la síntesis de amplicones de RNA. El fundamento de la técnica es el empleo consecutivo de tres actividades enzimáticas: 1) transcriptasa inversa; 2) RNasa H; y 3) T7 RNA polimerasa. Estas técnicas pueden ser utilizadas para obtener resultados cuali o cuantitativos (Figura 9.27).

En la técnica de TMA se utilizan dos enzimas (la transcriptasa inversa de un retrovirus denominado MMLV [*Moloney murine leukemia virus*] que posee también actividad de RNasa H, y la T7 RNA polimerasa) y dos cebadores. En cambio, el NASBA emplea otra transcriptasa inversa (AMV [*Avian myeloblastosis virus*]), y una RNasa H, además de la T7 RNA polimerasa. La secuencia cíclica de esas actividades enzimáticas remeda la replicación de los retrovirus. Para una determinada molécula de RNA o DNA viral potencialmente presente en la muestra, un oligonucleótido antisentido contiene en una parte de su secuencia (extremo 5') un sitio de reconocimiento (promotor) para la enzima T7 RNA polimerasa, y en la porción remanente de la misma molécula, las bases complementarias a la secuencia blanco del ácido nucleico a detectar. En los virus a DNA, a partir del extremo 3' de este oligonucleótido —que actúa como iniciador o cebador— la T7 RNA polimerasa transcribe el templado. Un segundo cebador se une al transcripto de RNA, a partir del cual la transcriptasa inversa

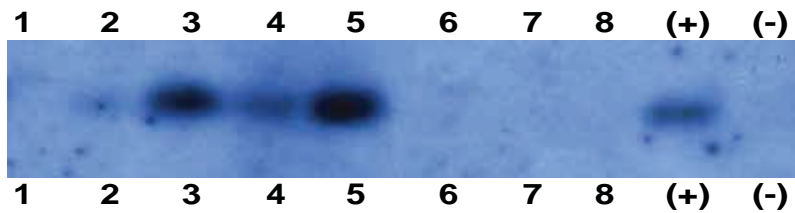


Figura 9.20. Demostración del tropismo viral mediante transcripción inversa (RT) - Nested PCR seguida de hibridación con una sonda (Southern blot). Detección del RNA de polaridad negativa (intermediario replicativo) del virus GB tipo C en la médula ósea de ocho pacientes (calles 1 a 8) con enfermedades onco-hematológicas que habían recibido transfusiones. Se amplificó el RNA mediante RT - Nested PCR con la enzima *Tth* DNA polimerasa (termoestable) y un cebador con polaridad de mensajero (sentido) durante la RT; luego se realizó un *Southern Blot* con una sonda interna marcada radiativamente con γ^{32} -P dATP. Las muestras 3, 4 y 5 exhiben bandas específicas de amplificación comigrantes con el control positivo (+), al igual que la 2 (extremadamente tenue). Las muestras 1, 6, 7 y 8 son negativas. Este estudio demostró que el GBV-C replica en la médula ósea del ser humano. Cortesía de la Dra. Vanesa Ruiz. Tesis doctoral. UBA, 2007.

Aplicación	Patología, situación clínica o evento	Ejemplos	Muestra
Diagnóstica	Encefalitis	HSV, varicela-zóster	LCR
	Meningitis	HSV, enterovirus	LCR
	Infección intrauterina	Rubéola, HCMV, Varicela-zóster, HSV-2	Líquido amniótico
	Infecciones respiratorias	Influenza, parainfluenza, adenovirus, virus sincicial respiratorio, metapneumovirus humano, coronavirus-SARS	Aspirado nasofaríngeo o hisopado
	Úlceras genitales	HSV-2	Fluido vesicular
	Gastroenteritis	Rotavirus, adenovirus entéricos, norovirus, astrovirus	Heces
	Infección por HIV/SIDA (período ventana, transmisión vertical)	HIV	Sangre
	Hepatitis C activa, período de ventana, transmisión vertical	HCV	Sangre
Tamizaje de muestras en Bancos de sangre (no diagnóstico)	Infección por HIV, HCV, HBV	HIV, HBV, HCV	Sangre
	Virus del Nilo Occidental (<i>West Nile</i>)	Virus del Nilo Occidental	
Monitoreo del tratamiento ¹ y/o pronóstico ² mediante valoración de la carga viral	Infección por HIV/SIDA ^{1,2}	HIV	Sangre
	Hepatitis B ^{1,2} o C ¹	HBV HCV	Sangre
	Citomegalovirus en pacientes inmunosuprimidos ¹	HCMV	Sangre
Genotipificación	Resistencia a antivirales	HIV, HBV	Sangre
	Pronóstico	HBV, HCV, Papilomavirus humano	Sangre Tejido

Tabla 9.12. Algunas aplicaciones de técnicas de biología molecular basadas en el análisis de ácidos nucleicos virales para un manejo integral de situaciones clínicas.

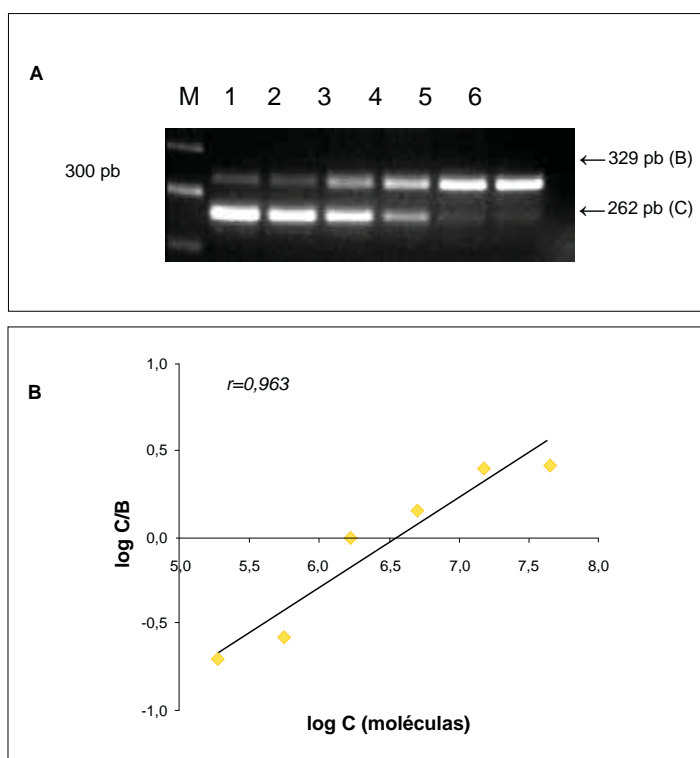


Figura 9.21. RT-PCR competitiva. Determinación de la carga viral del virus GB-C en un paciente infectado. **(A)** Cantidades constantes de RNA del suero del paciente (equivalentes a 20 µl de suero), se enfrentaron a cantidades conocidas de moléculas de un transcrito competitivo (TC) de RNA: calles 1 a 6: $4,56 \times 10^7$, $1,52 \times 10^7$, $5,06 \times 10^6$, $1,69 \times 10^6$, $5,6 \times 10^5$ y $1,87 \times 10^5$, moléculas respectivamente. Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 1,5%. B: blanco; C: templado competitivo; M: marcador de 100 pb. **(B)** El log de la relación entre las intensidades de las dos especies amplificadas (evaluadas por densitometría) se graficaron contra el log del número de moléculas TC y los datos se ajustaron a una recta ($y=0,5251x - 3,4517$). El punto de equivalencia [$\log(C/B)=0$] corresponde al número de moléculas de RNA inicialmente presente en el tubo de reacción. Cortesía de la Dra. Vanesa Ruiz. Tesis doctoral, UBA, 2007.

sintetiza un DNA complementario (DNAc). El RNA del dúplex RNA/DNA es degradado por la actividad de RNasa H de la misma transcriptasa inversa. A continuación, una nueva molécula del cebador conteniendo la secuencia promotora para la T7 RNA polimerasa se une al DNAc y una nueva hebra de DNA es sintetizada por la transcriptasa inversa. Este DNA bicatenario posee la secuencia promotora para la T7 RNA polimerasa, por lo que es subsiguientemente reconocida por dicha enzima para sintetizar múltiples transcritos a partir de cada templado. Cada uno de los transcritos reingresa como templado a un nuevo ciclo de amplificación. En el caso de genomas virales a RNA, el híbrido RNA/DNA se forma inicialmente luego de la actividad de la transcriptasa inversa. Los siguientes pasos son análogos a los descriptos para con los templados virales a DNA.

El NASBA utiliza actualmente como sistema de cuantificación sondas marcadas (faros moleculares o *molecular beacons*) que emiten fluorescencia sólo cuando están hibridadas a los amplicones, en modo análogo a las utilizadas en la PCR a tiempo real. Esta técnica se denomina NASBA en tiempo real. Con anterioridad, el sistema de detección cuantitativa estaba basado en eventos de electroquimioluminiscencia (ECL), como se describió en el ítem 5.5. El TMA utiliza como sistema de detección un ensayo de protección de híbridos (HPA, *Hybrid protection assay*). En una fase líquida se emplean sondas (oligonucleótidos de DNA marcados con ésteres de acridina) para detectar las secuencias blanco. Los híbridos se embeben en una solución de hidrólisis, la que a pH alcalino destruye las sondas no hibridadas, aunque no afecta a los híbridos (sonda a DNA / RNA transcrito). Por ende, la señal quimioluminiscente se retiene y es registrada en un luminómetro.

El sistema NASBA / TMA cuenta con controles internos que permiten controlar la reacción desde la etapa de extracción genómica. Difiere de la PCR en los siguientes aspectos: a) produce amplicones de RNA en lugar de DNA; b) la amplificación es isotérmica, por lo que no requiere de un termociclador; y c) la producción de copias de RNA por ciclo se incrementa exponencialmente, en lugar de la duplicación lograda mediante PCR, por lo que se producen aproximadamente 10 000 000 000 de copias en 15 a 30 minutos.

Los equipos de NASBA / TMA han demostrado muy buena correlación tanto con el b-DNA como con el de amplificación por PCR. Se utiliza esta técnica para el monitoreo de infecciones por HIV, HBV, HCV y HCMV. En 2006, la FDA aprobó en EE.UU. el uso del sistema TMA en Bancos de sangre, para la detección simultánea de HIV y HCV. Los equipos disponibles permiten la realización manual o totalmente automatizada de los ensayos.

8.3.3 Branched DNA (DNA ramificado)

Se basa en la amplificación lineal de la señal obtenida al hibridar con sondas de captura la secuencia blanco, la que posteriormente será también hibridada con otras sondas (amplificadoras) en diferentes regiones del genoma investigado. Finalmente, esas zonas amplificadoras a su vez también serán hibridadas con sondas marcadas con enzima, lo cual permitirá su detección por quimioluminiscencia (Figura 9.28).

Esta metodología actualmente se comercializa para el monitoreo de HIV, HCV y HBV. Los resultados se expresaban inicialmente como el número de equivalentes copia genómica / ml. Se define como un Meq (megaequivalente) para HCV o HIV a la cantidad de RNA que genera la emisión de luz que equivale a la emitida por

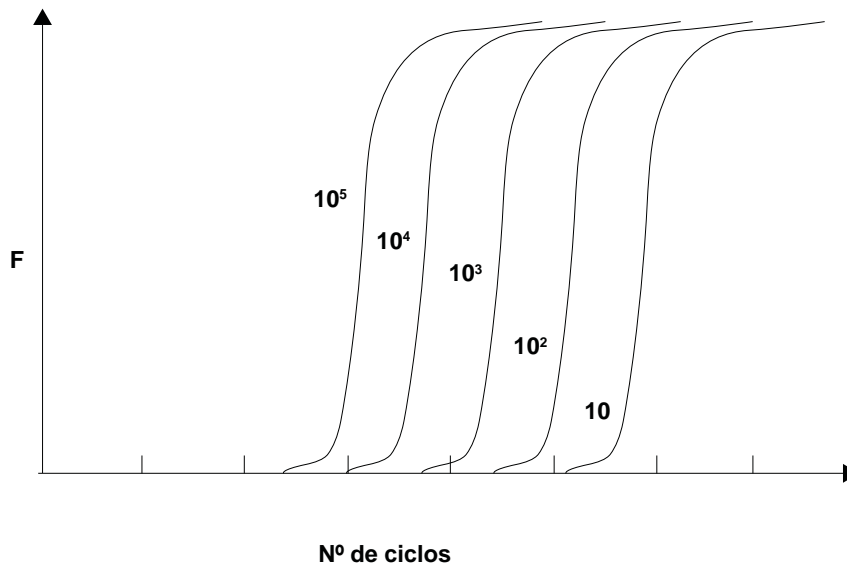


Figura 9.22. PCR en tiempo real. Correlación entre la intensidad de la fluorescencia (F) en función del número de ciclos de amplificación por PCR en tiempo real requeridos para la detección genómica según el número de copias del templado.

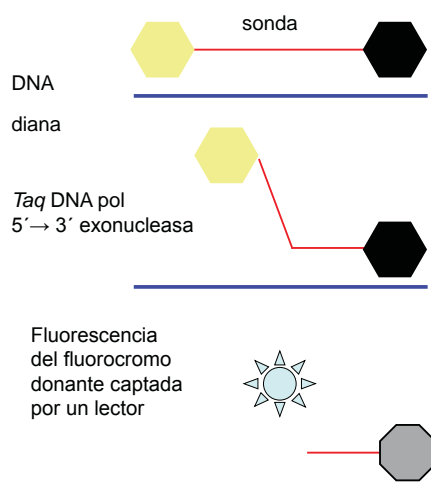


Figura 9.23. Sondas de hidrólisis.

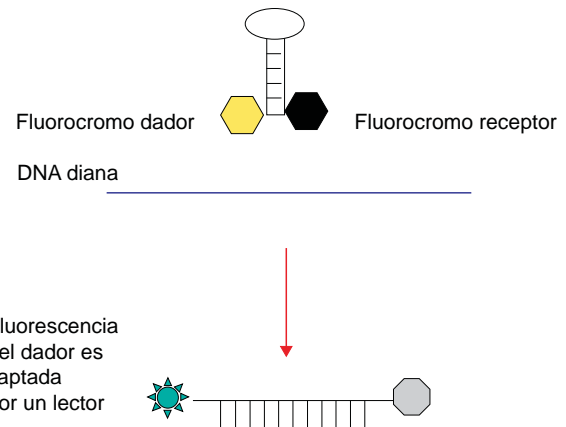


Figura 9.24. Sonda tipo *faro molecular* (*molecular beacon*).

10^6 copias de RNA de un estándar de nivel 1 (>80 % del total de la longitud del RNA, >99% de secuencias nucleotídicas correctas y <10% de diferencias en la concentración obtenida según diversas metodologías). Este estándar no era universalmente utilizado en otras metodologías, por lo cual los resultados obtenidos no eran comparables con los logrados por PCR o NASBA.

El advenimiento de estándares internacionales, permite la expresión de la cantidad de copias o equivalentes genómicos en UI (unidades internacionales), aplicando diversos factores de conversión según la técnica utilizada (PCR, b-DNA, NASBA, etc.). Sin embargo, se recomienda que el monitoreo de terapéuticas iniciado por una determinada técnica no sea luego continuado con otra.

En el b-DNA de 1ª generación, la secuencia blanco se fijaba a un soporte sólido mediante oligonucleótidos de captura, para luego hibridarse en otra región con otros (más de 30) oligonucleótidos denominados de extensión, los que finalmente se unían a un DNA amplificador ramificado (*branched DNA*), que luego lo hacían a sondas marcadas con fosfatasa alcalina. Diferencialmente, en el b-DNA de 2ª y 3ª generación las sondas de extensión se unen a pre-amplificadores, los que a su vez hibridan a múltiples amplifi-

cadore. Ello resulta en la producción de una señal más intensa y con menor fondo.

Para HIV se han desarrollado sucesivas mejoras, lo cual condujo a fines de 1997 a un equipo de 3ª generación, cuyo umbral de sensibilidad es de 50 moléculas de RNA viral (en lugar de las 500 del equipo de 2ª generación). Esta metodología incluye la incorporación de nuevos nucleótidos, Iso C e Iso G, lo cual evita hibridaciones inespecíficas, dado que sólo se aparean entre sí, pero no lo hacen con base nucleotídica natural alguna.

Este sistema se conoce como Sistema 8 de amplificación, y ha permitido determinar, por ejemplo, que la triple terapia anti-viral contra HIV, utilizando inhibidores de proteasas, es 8 veces más efectiva (la carga viral cae a valores <60 moléculas/ml) que la inicialmente determinada con la metodología de b-DNA2 (cuyo límite de sensibilidad era de 500 moléculas).

Se ha logrado también mejorar la sensibilidad del b-DNA 2 para HCV (Quantiplex HCV 2.0) aplicando el Sistema 8 para cuantificar el RNA plasmático de este virus. Esta metodología logra detectar hasta 200 moléculas, lo cual implica una mejora de

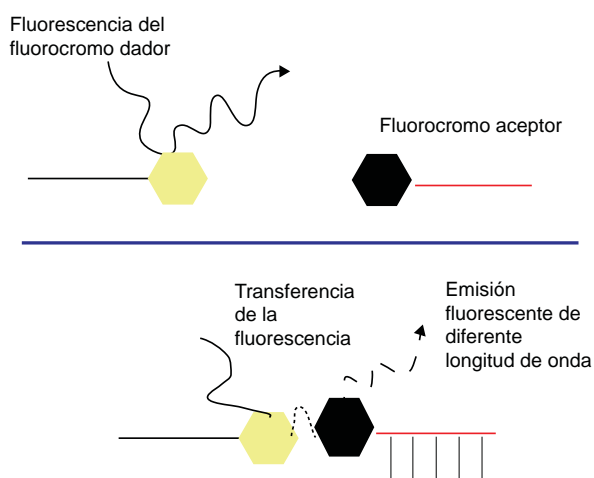


Figura 9.25. Sondas FRET.

aproximadamente 50 veces en relación con el ensayo *Quantiplex* HCV 2.0.

8.4 ANÁLISIS MEDIANTE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN: POLIMORFISMO DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS (RFLP)

Las endonucleasas de restricción de tipo II son las utilizadas en Biología molecular por su característica capacidad de reconocer secuencias específicas (4 - 8 nucleótidos), clivando las mismas en un sitio predeterminado. El polimorfismo de los genomas virales en determinadas posiciones nucleotídicas y el reconocimiento de los mismos por diversas enzimas de restricción posibilita la obtención de distintos patrones o perfiles de restricción (Figura 9.29).

Esta metodología es de particular interés para estudios de genotipificación viral así como –bajo determinadas condiciones– en la caracterización de cepas resistentes a la terapéutica.

Habitualmente, el procedimiento consiste en la previa amplificación por PCR o RT-PCR de fragmentos de genomas virales a DNA o RNA, respectivamente, seguidos del clivaje con un número variable de endonucleasas (habitualmente 3 - 6). Finalmente, los distintos perfiles o patrones de restricción se obtienen luego del fraccionamiento electroforético de los productos de restricción en geles de agarosa o poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio o

sales de plata, respectivamente. Tiene la ventaja de poder detectar la cocirculación de genotipos en una muestra clínica así como la presencia de variantes sensibles y resistentes a un antiviral determinado con exquisita sensibilidad.

Es menester comprender que los estudios de genotipificación que se realizan en laboratorios de Virología de mediana complejidad que utilizan la RFLP por su rapidez, sencillez y relativo bajo costo, no necesariamente se corresponden con exactitud con los que analizan la totalidad del genoma. Los estudios de genotipificación realizados mediante RFLP se sustentan en la correspondencia observada entre perfiles de restricción (de una región parcial del genoma amplificado por PCR) y análisis filogenéticos. Sin embargo, dichas inferencias no siempre son absolutas (puede haber cepas que exhiban mutaciones en los sitios de corte característicos de un genotipo dado). Más aún, la realización de esta técnica (ampliamente utilizada) puede omitir el reconocimiento de nuevos genotipos o eventuales genomas recombinantes, que sólo pueden ser reconocidos mediante el análisis filogenético de la totalidad del genoma.

8.5 SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA

Es una técnica que requiere laboratorios altamente especializados para su implementación. Por ello, su empleo estuvo hasta hace pocos años restringido a estudios de epidemiología molecular o de patogénesis molecular. Mediante ellos, fue posible conocer la prevalencia genotípica de diversas infecciones virales, la circulación de mutantes de escape (al diagnóstico o a la presencia de anticuerpos neutralizantes), la emergencia de virus recombinantes, la complejidad de las poblaciones virales que infectan a un individuo (cuasiespecies), etc. Sin embargo, más recientemente su utilización comprende también la determinación genotípica de la resistencia a diversos antivirales. Esto es de particular importancia para una eficaz terapéutica en infecciones como las producidas por HIV. La determinación de la resistencia de otros virus a la terapéutica antiviral ha ganado terreno en infecciones tales como la hepatitis B (frente a la lamivudina o al adefovir) o la producida por citomegalovirus humano (frente al ganciclovir). La determinación de la resistencia antiviral requiere el conocimiento previo del comportamiento de determinadas mutantes frente a antivirales específicos. Es por ello que frente a infecciones virales como las producidas por el virus hepatitis C, aún no se ha logrado una opinión unánime acerca de qué región o regiones genómicas debe(n) ser analizada(s) para determinar la resistencia al interferón, las que aparentan ser disímiles entre pacientes estudiados en Japón o en occidente.

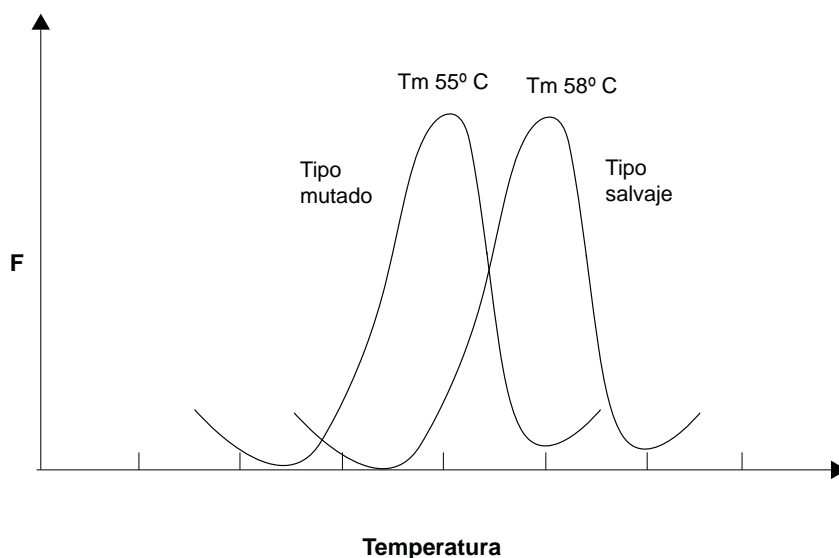


Figura 9.26. Detección de mutaciones respecto a una secuencia nucleotídica *salvaje* mediante el análisis de la temperatura de *melting* (T_m).

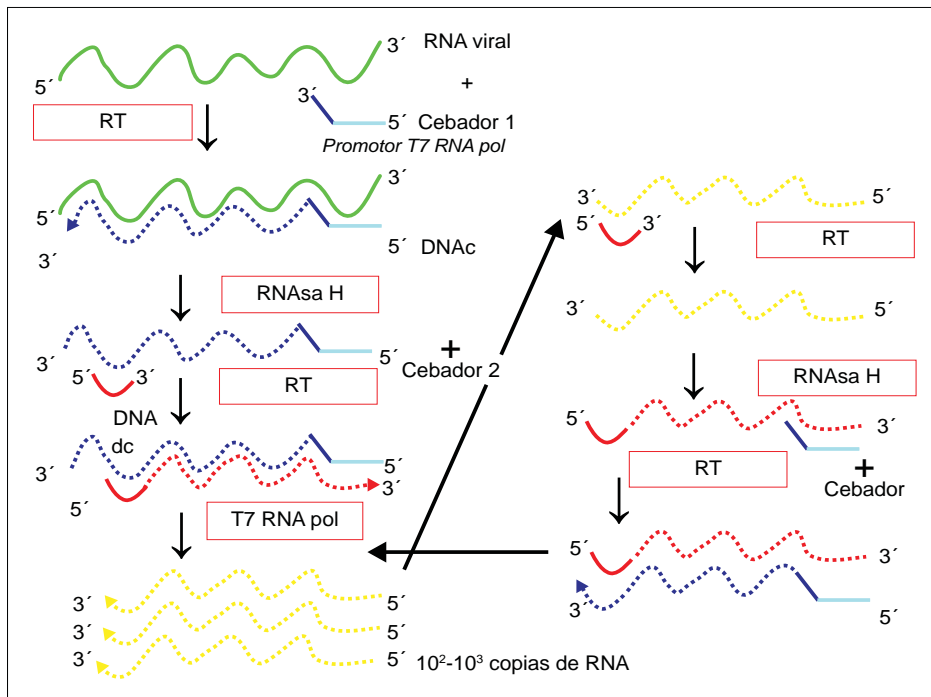


Figura 9.27. Esquema de la reacción de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos mediante NASBA o TMA: se ejemplifica la amplificación del genoma de un virus a RNA.

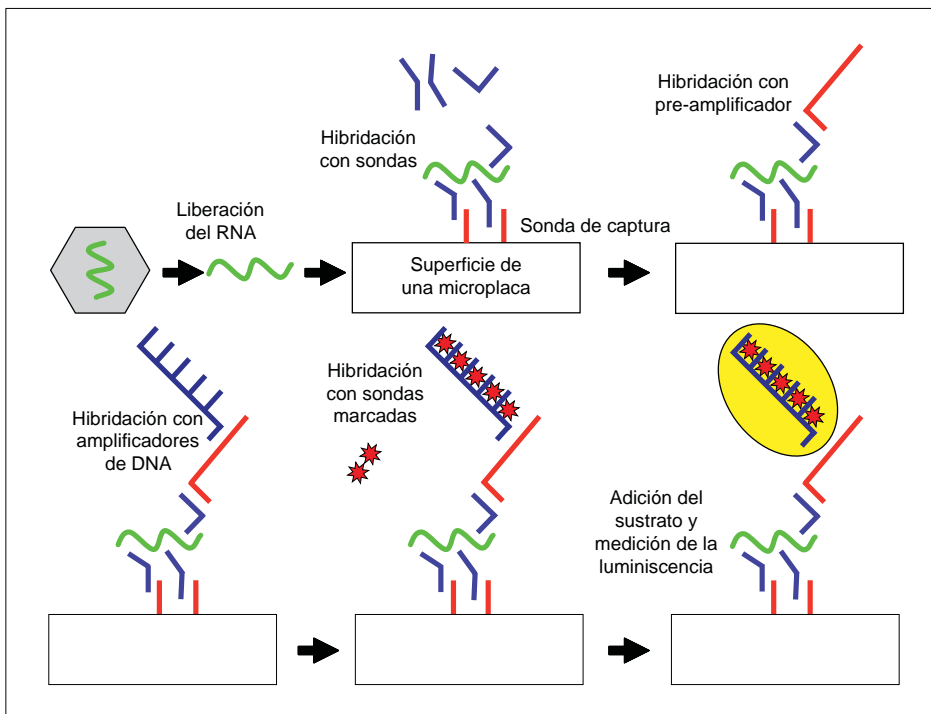


Figura 9.28. Esquema de la reacción de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos mediante b-DNA (*branched DNA* o DNA ramificado): se ejemplifica la amplificación del genoma de un virus a RNA.

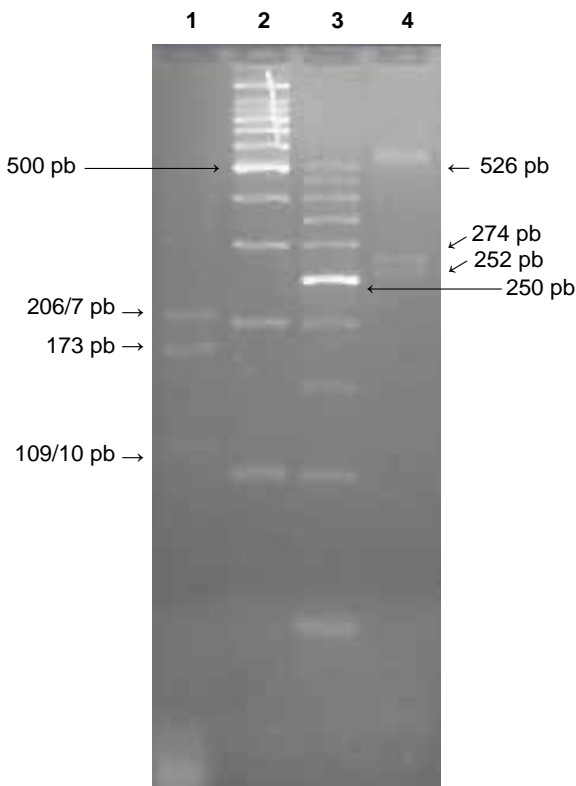


Figura 9.29. Caracterización genómica mediante el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) sobre productos de amplificación de PCR. Se observa una infección mixta causada por los genotipos A y F del virus hepatitis B en un paciente. Calle 1: Productos de PCR digeridos durante 16 hs. con la endonucleasa de restricción *Tsp509I*; calle 2: marcador molecular en escalera de 100 pares de bases (pb) de DNA; calle 3: marcador en escalera de 50 pb de DNA; y calle 4: Productos de PCR digeridos durante 16 hs. con la endonucleasa de restricción *HinfI*. (Técnica basada en la publicación de Lindh et al., *J Infect Dis*; 175:1285-93, 1997).

La secuenciación nucleotídica se realizó inicialmente gracias a la utilización de dos técnicas, la propuesta por Frederick Sanger (denominada de terminación de cadena o de didesoxinucleótidos) o por Maxam y Gilbert (o de terminación química). Los tres investigadores recibieron el Premio Nobel de Química por su desarrollo (Sanger en realidad recibió su segundo Premio Nobel, ya que el anterior lo había obtenido al descubrir un método para secuenciar proteínas).

La técnica desarrollada por Sanger fue la utilizada masivamente para descifrar el código genético de los virus hasta ahora conocidos, así como el de otros microorganismos o el del genoma humano.

La idea central de esta técnica consiste en la utilización de un templado de DNA monocatenario, para ser copiado por una DNA polimerasa en presencia de dNTPs, luego de que un cebador específico se hibride al templado, para permitir a partir de su extremo 3' la elongación de esta cadena de DNA por dicha enzima mediante enlaces fosfodiéster. Dado que uno de los dNTPs está marcado radiactivamente (por ejemplo, $\alpha^{32}P$ - dCTP) las cadenas sintetizadas también lo están. La adición a esta mezcla de un ddNTP diferente (ddATP, ddTTP, ddCTP o ddGTP) a cuatro tubos de reacción implica que en cada uno de ellos se sintetizarán fragmentos radiactivamente marcados, que en cada caso finalizarán con la incorporación del ddNTP utilizado en dicho tubo. Mediante el fraccionamiento electroforético en un gel vertical de poliacrilamida, los distintos fragmentos son resueltos, procediéndose a la lectura en sentido 5' - 3' desde el borde inferior del gel.

Más recientemente, se ha reemplazado la síntesis de DNA en un solo ciclo, por la adición de DNA polimerasas termoestables, lo que permite desnaturalizar el DNA bicatenario, y dejar nuevamente libre el templado para la síntesis de nuevas cadenas, lo cual podrá reproducirse en sucesivos ciclos.

Asimismo, la técnica de Sanger efectuada manualmente con material radiactivo, fue luego sustituida por procedimientos automatizados que emplean fluorocromos para cada ddNTP y la incidencia de un haz de rayo láser para su lectura (Figura 9.30).

Pirosecuenciación de DNA, secuenciación basada en la formación de pirofosfatos o secuenciación de alto rendimiento. Muy recientemente se ha incorporado este procedimiento experimental que combina en una única técnica la exactitud de la secuenciación nucleotídica (aunque empleando una estrategia diferente a la terminación de cadena de Sanger) con la sensibilidad de la PCR. Con-

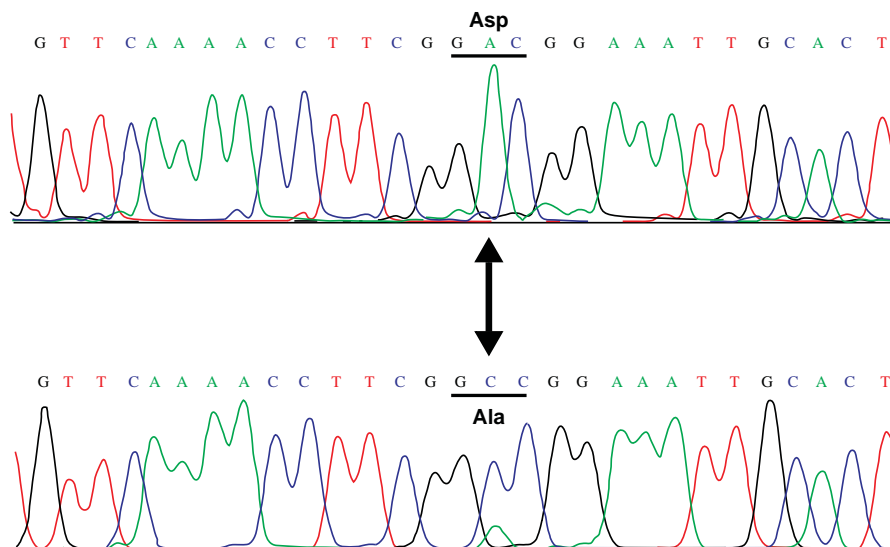


Figura 9.30. Caracterización genómica de dos cepas del virus hepatitis B, correspondientes a dos hermanas infectadas con el genotipo E. Obsérvese la secuencia aminoacídica deducida correspondiente al codón 144 del antígeno de superficie del virus (HBs Ag). Una de las hermanas, porta una cepa salvaje con un residuo de ácido aspártico (Asp), mientras que la restante exhibe una población viral mixta en la que predomina la mutación de escape a anticuerpos anti-HBs Asp144Ala, sobre la salvaje (Asp).

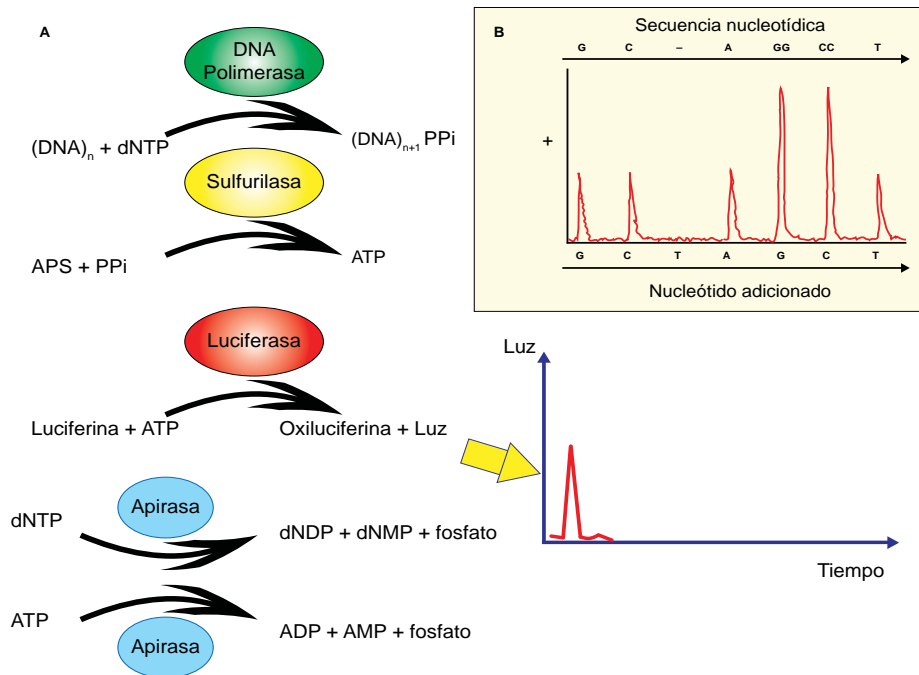


Figura 9.31. Pirosecuenciación de DNA. A. Reacciones enzimáticas que permiten la secuenciación nucleotídica mediante la emisión lumínica resultante de la utilización de moléculas de pirofosfato inorgánico (PPI) liberadas al incorporarse un dNTP al DNA neosintetizado por la DNA polimerasa. La actividad de la luciferasa es proporcional al ATP sintetizado y éste al PPI liberado. La emisión de fotones es captada por una cámara, y registrada como un pico en el "pirograma". B. Secuencia nucleotídica obtenida luego de la adición individual sucesiva de los 4 dNTPs. Picos más altos corresponden a la repetición de un mismo dNTP.

siste en la utilización combinada de un cebador para secuenciar un templado (desnaturalizado) de DNA obtenido por PCR y de 4 actividades enzimáticas que permiten la secuenciación: a) una DNA polimerasa; b) una ATP- sulfurilasa, que convierte (en presencia de Adenosina 5' fosfosulfato [APS]) los residuos de pirofosfato -liberados al incorporarse un dNTP a la cadena de DNA neosintetizada por la DNA polimerasa- en ATP; c) una luciferasa que convierte dicho ATP en energía lumínica; y d) una apirasa, que elimina los dNTPs no incorporados a la cadena de DNA neosintetizada (por no ser complementarios a la base correspondiente del templado) para permitir la introducción de un nuevo dNTP a la reacción (se adicionan los 4 dNTPs sucesivamente), y los sustratos APS y luciferina.

La pirosecuenciación de DNA es un fruto de los avances de la nanotecnología. Desde el punto de vista biotecnológico consiste en utilizar microesferas en una placa (plataforma de fibra óptica) que contiene 1 600 000 microceldas de 44 μm de diámetro (480 / mm^2). Dichas microceldas albergan una microesfera cubierta de DNA en cada una de ellas. Esto permite realizar en cada microcelda una reacción de secuenciación individual (en el orden de los 75 picolitros), basada en la síntesis de de una cadena complementaria de DNA al de una de las hebras de DNA amplificado previamente por PCR, y adsorbida a cada microesfera. La incorporación de cada dNTP durante la polimerización del DNA, libera una cantidad equimolar de PPI (pirofosfato inorgánico), que es convertido por enzimas presentes en el medio (luciferasa entre otras) en una señal quimioluminiscente, que es capturada por una cámara de detección de fotones. Mediante un adecuado software, dicha señal es traducida como la incorporación de un nucleótido determinado (los 4 dNTPs fluyen en un orden pre-establecido a través de una microcámara de flujo en cada microcelda). El ATP generado a partir del PPI, permite que la luciferasa convierta a la luciferina en oxiluciferina, cuya cuantía es proporcional al ATP, y éste al PPI liberado al incorporarse un nuevo dNTP al DNA neopolimerizado. El dATP-S generado por la sulfurilasa, no es reconocido por la luciferasa, pero sí por la DNA polimerasa para incorporarlo al DNA neosintetizado. Dado que se introduce sólo un

dNTP por vez a la reacción (dATP-S, dCTP, dGTP o dTTP) y que el excedente respectivo luego de la incorporación (o no) al DNA neosintetizado es degradado por la apirasa, el software documenta cuál es el dNTP polimerizado (Figura 9.31).

El procedimiento continúa hasta completarse la síntesis de la cadena complementaria al DNA templado, lo que se representa en el "pirograma" como una sucesión de picos y valles, que corresponden a cada uno de los dNTPs sucesivamente adicionados a la reacción, que fueron incorporados o no (respectivamente) al DNA neosintetizado. Una mayor intensidad lumínica –visible como un pico más alto en un *pirograma*– implica la repetición del mismo dNTP en cuestión (se libera más pirofosfato a partir de la incorporación repetida de un mismo dNTP al DNA neosintetizado).

La pirosecuenciación es más rápida, menos laboriosa y menos costosa que las tecnologías existentes de amplificación y secuenciación, pero sus lecturas son significativamente más cortas y proclives a error, que las obtenidas mediante la reacción de Sanger (100 – 350 pb, y 5-10 errores / kb, en contraste con las 1 000 pb y 0,01 errores / kb, respectivamente). El rendimiento de la pirosecuenciación es 100 veces superior al de la reacción de Sanger, lográndose una precisión superior al 99% (una corrida puede extenderse por 4 horas)

Esta colosal tecnología experimental ha permitido la genotipificación de diversos virus (HPV; HCV, hantavirus, etc.), la detección de mutantes resistentes a antivirales, presentes –aún minoritariamente, contribuyendo con apenas un 5% de la población viral– en el universo de cuasiespecies circulantes en pacientes (por ejemplo, para HIV, HBV o influenza). Esta tecnología parecería ser ideal para aplicaciones en las que patógenos aún desconocidos pueden estar involucrados en la etiología de una enfermedad. El futuro dilucidará su utilidad en el descubrimiento de agentes asociados a encefalitis de etiología desconocida, a infecciones respiratorias agudas, en las que sólo –en los laboratorios de mejor calidad– se arriba al diagnóstico en un 30 - 60% de los casos, o a infecciones intestinales de etiología no identificada aún. **La identificación de nuevos agentes, pro-**

Carga Viral de HIV

Nombre	<i>Quantiplex 3.0</i>	<i>Nuclisens HIV QT</i>	<i>Nuclisens Easy Q HIV 2.0</i>	<i>Cobas Amplicor HIV Monitor</i>	<i>Cobas Taqman HIV Monitor</i>
Empresa	Bayer, Siemens	Biomerieux	Biomerieux	Roche	Roche
Volumen de Muestra (µl)	500	200-2 000	100-1 000	200-500	500
Muestra	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Rango dinámico	25-500 000 copias / ml	51-5 390 000 copias / ml	25 - 7 900 000 copias / ml	400-750 000 copias / ml	10-10 000 000 copias / ml
Umbral de detección	25-50 copias / ml (1,39 - 1,69 log)	40 copias / ml (1,60 log)	15 copias / ml (1,17 log)	50 copias / ml (1,69 log)	47 copias / ml (1,67 log)
Técnica	Amplificación de señal	NASBA	NASBA en tiempo real	PCR cuantitativa	PCR en tiempo real

Carga Viral de HCV

Nombre	<i>NASBA HCV QT ECL</i>	<i>Amplicor HCV Monitor 2.0</i>	<i>Cobas Taqman HCV</i>	<i>Versant HCV 3.0</i>
Empresa	Biomerieux	Roche	Roche	Bayer Health Care
Volumen de muestra (µl)	200-1 000	-	500	50
Muestra	Suero-Plasma	Suero-Plasma	Suero-Plasma	Suero-Plasma
Rango dinámico	161-5 500 000 UI / ml	600-850 000 UI / ml	20-1 000 000 UI / ml	615-7 692 310 UI / ml
Umbral de detección	278 UI / ml (2,44 log)	600 UI / ml (2,77 log)	28 UI / ml (1,44 log)	610 UI / ml (2,78 log)
Técnica	NASBA	PCR cuantitativa	PCR en tiempo real	Amplificación de señal

Carga Viral de HBV

Nombre	<i>Cobas Amplicor HBV Monitor</i>	<i>Cobas Taqman HBV Monitor</i>
Empresa	Roche	Roche
Volumen de muestra (µl)	100	500
Muestra	Suero-Plasma	Suero-Plasma
Rango dinámico	200-200 000 copias / ml	6-100 000 000 UI / ml
Umbral de detección	200 copias/ml (2,29 log)	29 UI/ml (1,46 log)
Técnica	PCR cuantitativa	PCR en tiempo real

Tabla 9.13. Características de diversas técnicas para detección de carga viral de HIV, HCV y HBV.

bablemente devendrá en el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y adecuadas intervenciones profilácticas y terapéuticas.

8.6 MICRODISPOSICIONES DE DNA O MICROARRAYS

Esta tecnología que hoy revoluciona múltiples áreas de la Medicina y la Biología, tiene su antecedente remoto en la hibridación pro-

puesta por Sir E. M. Southern más de 20 años atrás. Desde los 13 artículos (incluyendo 5 revisiones) registrados en PubMed en 1995 hasta los más de 52 000 publicados hasta principios de 2013, esta tecnología ofrece la posibilidad de acceder a un grado superlativo de información relacionada con la expresión de genes.

Consiste en una colección de spots microscópicos conteniendo sondas dispuestos en un arreglo o formato grilla similar sobre una superficie sólida o en una membrana. Dichas sondas están diseña-

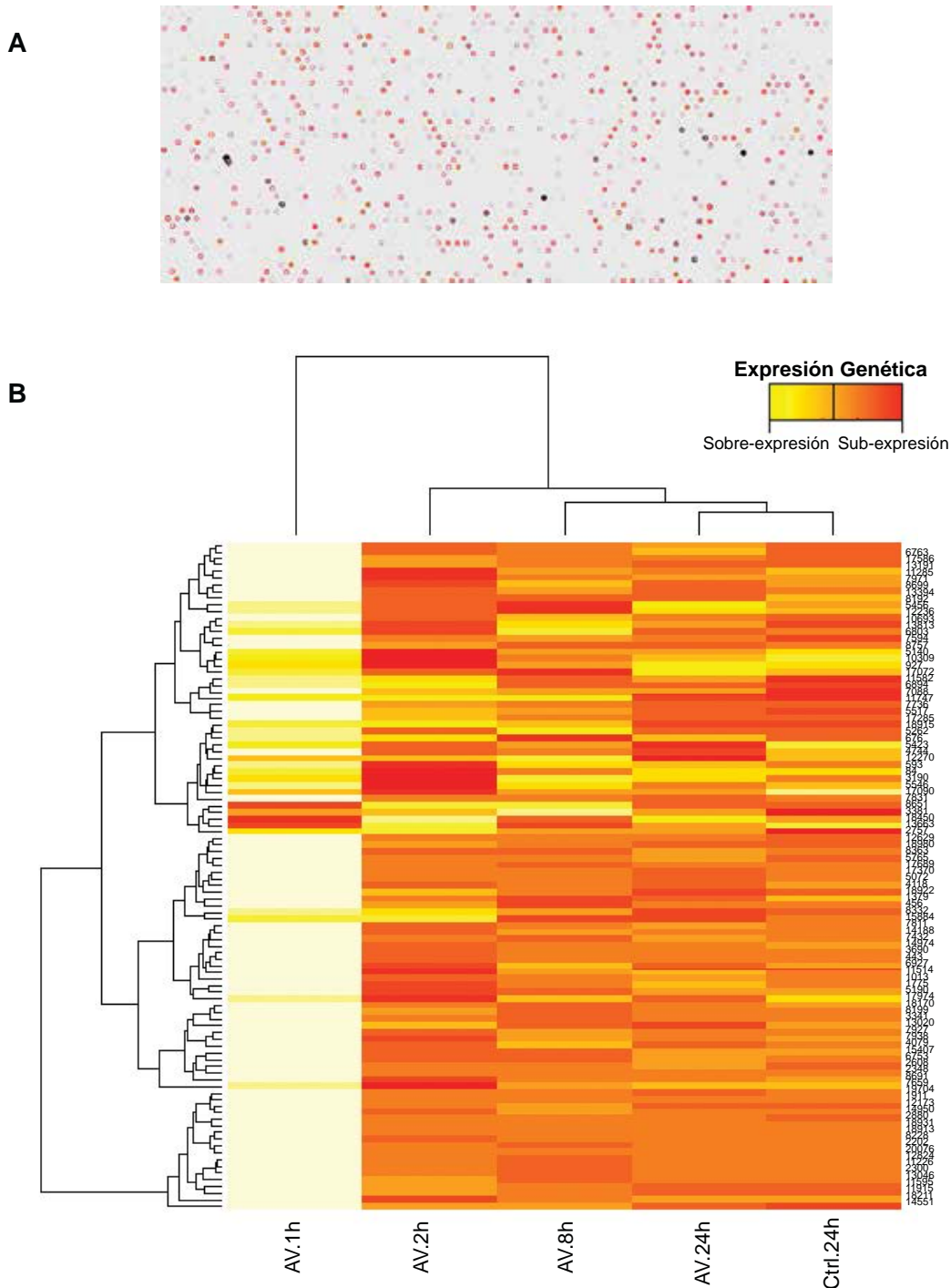


Figura 9.32. Análisis mediante *bioarrays* de la expresión diferencial de genes celulares luego de la infección por adenovirus 7h. A. Detalle de una imagen obtenida para análisis de *bioarrays*. En los estudios de *microarrays* se combinan las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y detección por fluorescencia. De esta manera, sólo en los puntos del portaobjeto donde haya ocurrido hibridación se detectará la fluorescencia, siendo la intensidad de la misma proporcional al nivel de expresión del gen en estudio. **B.** Genes diferencialmente expresados para la serie de tiempo 1, 2, 8 y 24 horas post-infección de adenovirus 7h analizado *in vitro* en células Hep-2. El gráfico presenta un *heatmap* con dendogramas, calculado por ANOVA (análisis de varianza). Se muestran los 100 primeros genes que surgen del análisis sobre los *bioarrays* CodeLink TM UniSet Human 20K I (GE Healthcare). El 50% de los genes celulares afectados por la infección de Av7h está relacionado con la entrada de la célula en fase S del ciclo celular, dando así un entorno ideal para la replicación viral y genes relacionados con mecanismos de defensa antiviral, en particular de la vía del interferón. Este trabajo contribuye con la exploración de los mecanismos implicados en la patogénesis del adenovirus 7h.

Cortesía de los Dres. P.R. Barrero, P. Yankilevich, R.A. Diez y A.S. Mistchenko. Laboratorio de Virología. Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina.

Parámetro	Recomendación
Nivel de RNA plasmático que sugiere iniciar el tratamiento	> a 5 000-10 000 copias / ml y un nivel de CD4 y estado clínico sugerente de progresión; > a 30 000-50 000 copias / ml, independientemente de otros valores de laboratorio y del estado clínico
Nivel por alcanzar después de iniciado al tratamiento	No detectable; < de 5 000 copias es aceptable
Mínimo deseado del RNA plasmático indicativo de actividad antiviral	Descenso > 0,5 log ₁₀
Cambio del nivel del RNA plasmático que sugiere falla de la terapéutica	Retorno a los valores pretratamiento (o dentro del rango de 0,3 - 0,5 log ₁₀)
Frecuencia sugerida para medir carga viral	Pre-tratamiento: dos mediciones separadas temporalmente por 2-3 semanas Cada 3 - 4 meses, o juntamente con el nivel de CD4 Aumentar la frecuencia al aproximarse a decisiones críticas 3 - 4 semanas después de iniciar o cambiar la terapéutica

Tabla 9.14. Carga viral en la infección por HIV.

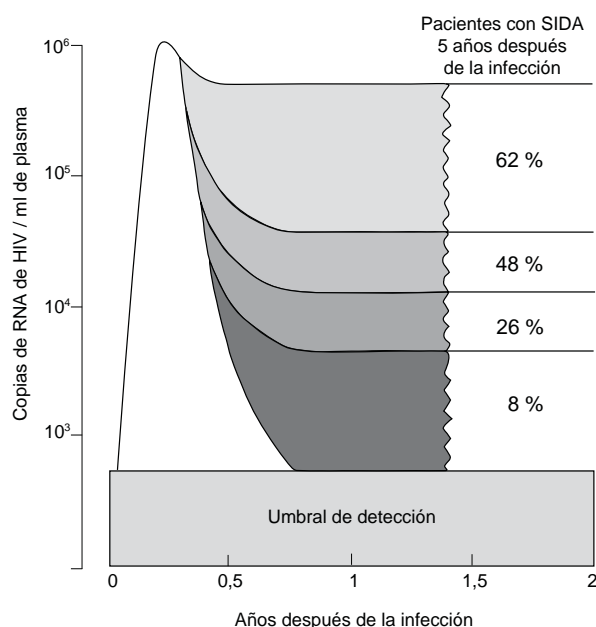


Figura 9.33. Carga viral de HIV como elemento pronóstico de la infección. (Adaptado de Ho DH, Science, 272: 1124, 1996).

das para hibridar específicamente a secuencias de ácido nucleico correspondientes a un gen determinado, a la que se denomina secuencia diana o blanco. Estas están marcadas con alguna molécula detectable (inicialmente se utilizó también material radiactivo) o por un colorante del tipo de los fluoróforos. El nivel de unión entre la sonda y la secuencia diana marcada es cuantificado mediante la medición de la fluorescencia o señal emitida por el colorante al ser analizado. Esta emisión es un directo reflejo de la medida de expresión de un gen específico que contiene la secuencia diana.

Entre los múltiples tipos de microdisposiciones, merecen especial atención los denominados *spotted microarrays* y los *oligonucleotide microarrays* o microarreglos de oligonucleótidos. Los primeros son conocidos también como microdisposiciones de dos canales o de dos colores, ya que dos muestras –cada una marcada con un fluoróforo diferente– se hibridan en el único portaobjeto. Como consecuencia de dicha combinación, sólo se determinan los niveles relativos de expresión. Las sondas utilizadas corresponden a oligonucleótidos de DNA complementario (DNAc) o a productos

de PCR. Los microarreglos de oligonucleótidos o microdisposiciones de canal único, hibridan con una única muestra, por lo cual el resultado obtenido refiere niveles absolutos de expresión. Este ensayo utiliza sondas diseñadas para contener secuencias complementarias al RNA mensajero. Estas sondas son producidas utilizando diversas metodologías tales como la síntesis *in situ*, algún tipo de deposición, o la fotolitografía (Figura 9.32).

8.7 CARGA VIRAL

Concepto

Se denomina carga viral a la cantidad de copias genómicas de un determinado virus por unidad de volumen de un fluido (por ejemplo, el plasma) o de peso de un tejido, siendo la misma una medida de la cuantía de virus presente en ellos.

La carga viral tiene actualmente especial aplicación en el manejo clínico de las infecciones por HIV, HBV, HCV, HCMV y otros agentes. Una síntesis de las técnicas utilizadas, y de sus respectivos límites de sensibilidad y rangos dinámicos se exhibe en la Tabla 9.13.

Dado que la determinación de la carga viral se realiza utilizando las técnicas NAT (*Nucleic Acid Amplification Testing*, es decir las basadas en PCR / RT-PCR, PCR en tiempo real, *branched DNA* o NASBA / TMA) se cuantifican tanto los genomas correspondientes a partículas infectantes como a las que no lo son, al generarse a veces también genomas defectuosos en su código infeccioso, como resultado de la incorporación de mutaciones por la falta de lectura de prueba de la polimerasa viral involucrada (por ejemplo, las RNA polimerasas-RNA dependientes, o las transcriptasas inversas de los retrovirus o de HBV). Así, los valores de carga viral para HIV exceden los correspondientes al título de virus infeccioso en una muestra determinada, aunque habitualmente reflejan en paralelo a estos últimos.

La determinación de la **carga viral** es utilizada como una herramienta valiosísima en el **monitoreo de terapéuticas antivirales, y en casos específicos**, provee también información **pronóstica**. En el caso de la infección por HIV se ha documentado que el curso de la evolución está influido por la carga viral, ya que un porcentaje significativo de los pacientes (62%) evoluciona a SIDA en 5 años si la carga viral, una vez transcurrida la etapa aguda de la infección se mantiene elevada (> de 4,5 log₁₀ / ml), en comparación con el 8% observado cuando la carga es inferior a 10³ copias [$<3 \log_{10}$] / ml (Figura 9.33). En la Tabla 9.14 se observan algunas aplicaciones de la carga viral en la infección por HIV.

En el caso de la infección por HCV, una **respuesta virológica sostenida**, es definida como la ausencia de RNA viral detectable, al cabo de 6 meses de discontinuado el tratamiento. Una **respuesta**

virológica rápida, (ausencia de RNA viral al cabo de 4 semanas de iniciado el mismo), es considerada un elemento predictor de éxito terapéutico. Por el contrario, quienes no alcanzan una **respuesta virológica temprana**, definida como el descenso de al menos $2 \log_{10}$ de la carga viral al cabo de 12 semanas de instituido el tratamiento, muy improbablemente podrían beneficiarse con la prosecución del tratamiento durante otras 36 semanas, por lo cual deberían suspender el mismo.

9. RESPONSABILIDAD MÉDICA EN LA CONSERVACIÓN, MANIPULACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

El médico tiene una responsabilidad crucial en la obtención de un adecuado diagnóstico virológico. No sólo debe conocer la patogénesis de las infecciones que debe diagnosticar—para así adoptar la decisión correcta al recurrir a métodos directos y/o indirectos, y elegir la muestra adecuada y el momento más propicio para su obtención—sino también asegurarse la apropiada recolección y posterior transporte de la muestra clínica hasta el laboratorio. Obviamente, es además imprescindible la correcta interpretación de los resultados obtenidos.

Es responsabilidad del médico y del virólogo el conocimiento de las posibilidades del diagnóstico, la continua actualización en las nuevas metodologías y del envío de las muestras adecuadas en el momento oportuno (Tabla 9.5). Si las muestras no son las adecuadas para cada virus en particular, o para el estadio de la enfermedad puede perderse la posibilidad de realizar el diagnóstico. Por ello, el médico, ante cualquier duda, debe consultar al virólogo sobre las muestras adecuadas, el tiempo y forma de obtención, condiciones de envío, tiempo requerido para la obtención de resultados en el laboratorio, y su interpretación.

Por otra parte, corresponde al virólogo la responsabilidad por: a) la adecuada realización de los procedimientos diagnósticos; b) el em-

pleo cotidiano de controles y el control de calidad de los reactivos y equipos; c) la bioseguridad; y d) los aspectos éticos tales como la confidencialidad de los mismos.

En la actualidad, la complejidad creciente del diagnóstico virológico y la continua incorporación de nuevas tecnologías hacen indispensable una fluida comunicación entre el médico y el virólogo.

Es también **responsabilidad del médico el tratar de evitar circunstancias que pudieran dar origen a falsos resultados positivos o negativos**.

10. SÍNTESIS Y PERSPECTIVAS

El antiguo concepto arraigado en la población médica de buena parte del siglo XX que sostenía que *por descarte, debe ser un virus* actualmente es insostenible. El diagnóstico virológico permite una aproximación racional al descubrimiento de la etiología de las enfermedades causadas por estos parásitos genéticos intracelulares, siendo un pilar fundamental en la toma de decisiones del médico. Diversos estudios virológicos constituyen una herramienta imprescindible para instituir y monitorear medidas terapéuticas ante ciertas infecciones, al tiempo que otros permiten establecer con certidumbre la curación del paciente o la eventual inmunidad del mismo como resultado de infecciones previas o de una adecuada inmunización. El vocablo diagnóstico proviene del griego *diagnostikós*, que significa distinguir, conocer. El advenimiento de novedosas técnicas de biología molecular como el SISPA (*Sequence Independent Single Primer Amplification*: amplificación con un único cebador independiente de la secuencia), o la técnica de secuenciación de alto rendimiento han permitido el descubrimiento de nuevos virus cuya contribución a la patología humana aún debe establecerse.

Bibliografía

- Collier L, Oxford J. "Human Virology". Second Edition, Oxford University Press, 2000.
- Dong J, Olano JP, McBride JW, Walker DH. "Emerging pathogens: challenges and successes of molecular diagnosis". *J Mol Diagn* 2008; 10: 185-97.
- Holodniy M. "HIV-1 load quantitation: a 17-year perspective". *J Infect Dis* 2006; 194 Suppl 1:S38-44. Review.
- Hsiung GD, Fong CKI. "Diagnostic Virology". Third Edition. Yale University Press. New Haven and London, 1983.
- Lassaunière R, Kresfelder T, Venter M. "A novel multiplex real-time RT-PCR assay with FRET hybridization probes for the detection and quantitation of 13 respiratory viruses". *J Virol Methods* 2010;165: 254-60.
- Layden-Almer JE, Cotler SJ, Layden TJ. "Viral kinetics in the treatment of chronic hepatitis C". *J Viral Hepat* 2006;13: 499-504. Review.
- Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoubian S, Sinha T, Lisle C, et al. "Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay". *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2965-70.
- Mahony J. "Detection of respiratory viruses by molecular methods". *Clin Microbiol Rev* 2006; 21: 716-47.
- Nolte FS, Marshall DJ, Rasberry C, Schievelbein S, Banks GG, Storch GA, et al. "MultiCode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses". *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2779-86.
- Piiparinen H, Lautenschlager I. "Quantitative TaqMan assay for the detection and monitoring of cytomegalovirus infection in organ transplant patients". *Method Mol Biol* 2006;335:147-56. Review.
- Specter S, Hodinka RL, Young SA. "Clinical Virology Manual". Third Edition. ASM Press, Washington DC, USA., 2000.
- Speers DJ. "Clinical applications of molecular biology for infectious diseases". *Clin Biochem Rev* 2006; 27:39-51.
- Storch G "Essentials of Diagnostic Virology", First Edition, Churchill Livingstone, USA 2000.
- Wu Wu, Tang YW. "Emerging molecular assays for detection and characterization of respiratory viruses". *Clin Lab Med* 2009; 29: 673-93.
- Zoulim F. "New nucleic acid diagnostic tests in viral hepatitis". Review. *Semin Liver Dis* 2006; 26:309-17.



Ensayos automatizados para el diagnóstico virológico

Alfredo Martínez

1. INTRODUCCIÓN

Arribar a un diagnóstico virológico de certeza en forma rápida permite actualmente desarrollar conductas de profilaxis o terapéuticas más exitosas.

La detección de un determinado anticuerpo (Ac), de un antígeno (Ag) viral o del ácido nucleico de este tipo de agente fue el desafío constante en las últimas décadas, para poner de manifiesto patologías virales para las que, hasta ese momento, sólo se disponía de la clínica y la epidemiología como herramientas diagnósticas. Los ensayos diagnósticos iniciales permitieron definir la infección viral, a través de metodologías artesanales muy laboriosas. La baja sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de las técnicas utilizadas inicialmente estimularon nuevos desarrollos, que permitieron estandarizar y automatizar estas metodologías.

El aislamiento de la cepa viral fue y continúa siendo un procedimiento de elección para el diagnóstico de múltiples infecciones virales; sin embargo, algunos virus se propagan dificultosamente en cultivo y otros no son cultivables. De modo que la detección de un fragmento de ácido nucleico, un antígeno viral o anticuerpos de clase IgM o IgG adquiere importancia para definir una etiología viral.

Los primeros ensayos *in vitro* para la detección de anticuerpos utilizaron el principio de unión Ag-Ac, de naturaleza reversible, o alguna propiedad de las moléculas intervinientes como la capacidad de fijar complemento por las IgM o IgG. Estas reacciones se conocieron con el nombre de pruebas *serológicas* (puesto que en ellas participa el suero sanguíneo) y recibieron distintas denominaciones según el modo o sistema que empleara para la visualización de la reacción. Las pruebas de aglutinación, floculación, precipitación, fijación de complemento, etc. se agruparon con la denominación de inmunoensayos directos (Tabla 10.1).

Posteriormente, utilizando el mismo principio se desarrollaron técnicas con inmunomarcación que permitían observar el resultado por inmunofluorescencia, colorimetría (enzimoinmunoensayos), o midiendo la radiactividad (radioinmunoensayos) (Tabla 10.2).

En la década de 1980, con el advenimiento de los anticuerpos monoclonales, el enzimoimmunoensayo (ELISA o EIE) se transformó en el procedimiento de elección para el diagnóstico. Su elevada sensibilidad, especificidad y reproducibilidad favorecieron el desarrollo de distintas plataformas cuyos formatos utilizaron desde el ELISA en tubos a microplacas, manuales a semiautomatizados o totalmente automatizados. Actualmente los inmunoensayos han

incorporado un nuevo sistema de marcación: la quimioluminiscencia con diversas variantes como la directa, la indirecta, la prolongada o la electroquimioluminiscencia. Esta inmunomarcación se ha incorporado a todos los desarrollos de ensayos automatizados porque mejoró la sensibilidad, especificidad y, por sobre todo, la reproducibilidad de los resultados.

1.1 ENZIMOINMUNOENSAYO (EIE o ELISA)

Los ELISAs (*Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay*) emplean reactivos muy estables; son económicos y de gran sensibilidad. Poseen gran versatilidad porque permiten desarrollar diferentes formatos de acuerdo a la molécula que se desea poner en evidencia. La molécula de captura es fijada a una fase sólida (tubo, microplacas, micropartículas) y con la incubación de la muestra (suero o plasma) a temperaturas y tiempos definidos, se forma el complejo Ag-Ac, eliminándose los excedentes de muestra y reactivos que no intervienen en la reacción mediante lavados con soluciones tamponadas. Los lavados son fundamentales para evitar la presencia de fondo (*background*) que pueda interferir en la lectura del resultado final.

La detección del Ag o Ac o el complejo inmune Ag-Ac es colorimétrica, para lo cual se utiliza un sustrato cromogénico que es desdoblado por la enzima de marcación (peroxidasa o fosfatasa alcalina). Luego se lee la absorbancia a una determinada longitud de onda, que puede transformar el resultado en un valor cualitativo o cuantitativo.

1.2 QUIMIOLUMINISCENCIA

Es la última tecnología de marcado desarrollada. Utiliza una molécula que es capaz de emitir luz (Luminol, ésteres de acridina) y su medición se realiza en un luminómetro.

Existen 4 generaciones de quimioluminiscencia:

- Quimioluminiscencia directa: el anticuerpo está marcado directamente con la molécula luminiscente.
- Quimioluminiscencia indirecta: el anticuerpo está marcado con una enzima, y ésta actúa sobre un sustrato, que es el que emite la luz.
- Electroquimioluminiscencia: el anticuerpo está marcado con un complejo Rutenio-TPA (Tripropilamina) que emite luz sólo cuando es activado eléctricamente (flujo de electrones).
- Quimioluminiscencia prolongada: es indirecta; una enzima actúa sobre un sustrato que va a emitir luz, pero hay una molécula

Reacciones de precipitación sobre gel

- Pruebas de inmunodifusión
- Inmunolectroforesis

Reacciones de precipitación en solución

- Inmunonefelometría
- Inmunoturbidimetría

Reacciones de aglutinación

- Pruebas de **aglutinación** directa
- Pruebas de **aglutinación** indirecta
- Pruebas de inhibición de la aglutinación

Tabla 10.1. Inmunoensayos directos. (Medida directa del complejo Ag-Ac).

Miden una de las moléculas intervinientes: Ag ó Ac

Marcación isotópica: radioinmunoensayos (RIA): (¹²⁵I- ³H [Tritio])

Marcación fluorescente: inmunofluorescencia (IF): fluoresceína

Marcación enzimática: enzimoimmunoensayo (ELISA): peroxidasa-fosfatasa alcalina

Tabla 10.2. Inmunoensayos con Inmunomarcación.

(potenciador) que acelera la reacción entre la enzima y el sustrato.

2. ENSAYOS AUTOMATIZADOS: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Estos ensayos permiten la detección de anticuerpos de clase IgG e IgM y de antígenos virales en el suero o plasma sanguíneo. Todas las reacciones son inmunoensayos con marcaciones enzimáticas o quimioluminiscentes.

La mayoría de ensayos automatizados para el diagnóstico virológico poseen la plataforma clásica de los ELISAs *sandwich* (Figura 10.1) o competitivos (Figura 10.2), con gran sensibilidad y especificidad.

El desarrollo de los ELISAs en equipos automatizados ha evolucionado en diversas generaciones de acuerdo al número y la estructura de las moléculas de captura que fueron incluyéndose en el formato, con el fin de mejorar la sensibilidad y la especificidad. En la actualidad los ensayos de 3ª generación son los más utilizados para el tamizaje (*screening*) y diagnóstico de infecciones virales como el HIV, y las hepatitis A, B y C. De igual modo, existen desarrollos de 4ª generación donde la detección de anticuerpos y antígenos puede realizarse en la misma plataforma (por ejemplo: la detección del Ag p24 de HIV y anticuerpos anti-HIV). Estos ensayos tienen una mejorada sensibilidad por reducción de los tiempos de ventana serológica.

La automatización de estos ensayos permitió estandarizar las plataformas de detección.

Los primeros equipos automatizados para ELISA permitieron el dispensado de las muestras y reactivos en forma automática, con la incubación, lavados y lectura en el mismo equipo. Estos equipos po-

dían procesar desde una muestra a varias muestras dependiendo del diseño, pero tenían la limitación de que sólo realizaban un tipo de ensayo por vez, es decir, trabajaban en lote (*batch*). Con la introducción del concepto de *flujo continuo*, los nuevos equipos automatizados para Virología pueden detectar más de un analito en forma simultánea e inclusive independizarse del número de muestras, trabajando con tubos primarios y código de barras. La mayoría de estos equipamientos posee un *software* bidireccional, que permite recibir y enviar datos al sistema informático del laboratorio.

Los ensayos automatizados para el diagnóstico virológico se clasifican por su utilización:

- **Ensayos de tamizaje:** se utilizan para estudiar la presencia de un analito o agente en poblaciones enteras (o en un subgrupo poblacional).
- **Ensayos de diagnóstico:** son utilizados para el diagnóstico de una enfermedad en particular o una condición basada en la sospecha clínica que debe estar presente.
- **Ensayos confirmatorios:** son técnicas utilizadas para la verificación o confirmación de resultados previos (de otra determinación o prueba) que permiten establecer un diagnóstico.

Todos estos ensayos pueden ser **cualitativos** y **cuantitativos**, de acuerdo al tipo de resultado.

2.1 ENSAYOS AUTOMATIZADOS CUALITATIVOS

Son ensayos cuyos resultados se expresan en forma binaria: Reactivo / No reactivo; Positivo / Negativo. Es decir, definen la presencia o ausencia de un analito por encima o por debajo de un valor

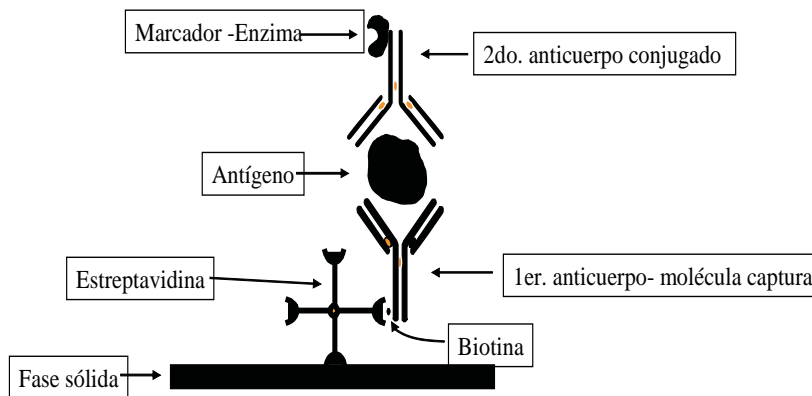


Figura 10.1. ELISA *Sandwich* (para Ag o Ac).

Reacciones competitivas

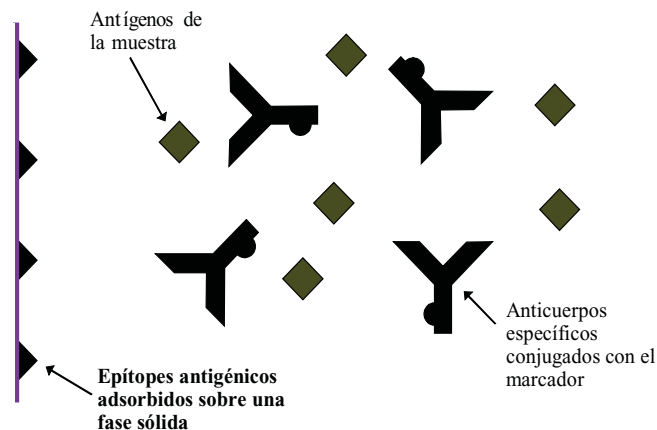


Figura 10.2. ELISAs competitivos (con Ag como molécula de captura).

definido como valor de corte, que puede ser una concentración determinada. El valor de corte es establecido para una determinada condición clínica, que se evalúa en la población general.

Los resultados se expresan en valores absolutos (sin unidades) y como la relación entre la absorbancia de la muestra y la absorbancia del valor de corte: S/Co (*Sample / Cut off*). En Virología, algunos de estos resultados son definidos como Relación de Positividad (RP).

De igual modo, ambos ensayos comparten parámetros a validar o verificar tales como sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, y robustez; se diferencian entre sí en que los ensayos cualitativos poseen sólo un límite de detección mientras que los cuantitativos tienen este límite de detección y también poseen un límite de cuantificación.

2.2 ENSAYOS AUTOMATIZADOS CUANTITATIVOS

Estas determinaciones expresan un resultado cuantificado en unidades definidas o consensuadas internacionalmente. Estos ensayos tienen un rango dinámico expresado por una mínima y una máxima concentración del analito que se puede detectar. Dentro del rango dinámico está el de utilidad clínica del ensayo. Por ello, es importante conocer su límite de cuantificación, que no es necesariamente igual al límite de detección.

Definir el límite de cuantificación permite evaluar la reproducibilidad del ensayo, siendo aquél un evento importante especialmente en aquellas determinaciones que definen una conducta terapéutica.

3. CALIFICACIÓN DEL INSTRUMENTAL

El ente regulador argentino INAME (Instituto Nacional de Medicamentos) exige, mediante la disposición 853, la calificación del instrumental que debe realizar el proveedor. Este proceso abarca dos etapas de procedimientos: calificación de la instalación y calificación de la operación. Ambos procedimientos deben realizarse en el lugar donde funcionará el instrumento en forma sistemática.

La calificación de la instalación verifica que el instrumento funcione y está referida a las necesidades de consumo eléctrico, amperaje, descarga a tierra, fuentes de poder accesorias e involucra también al *software* del equipamiento y su robótica.

La calificación de la operación es el procedimiento que verifica –mediante pruebas específicas– que el equipamiento realiza las determinaciones para las que fue diseñado en las condiciones preestablecidas. Este proceso verifica, por ejemplo, las temperaturas de cubas de incubación, el funcionamiento de los lectores de absorbancia, luminómetros, volúmenes de dispensadores, etc.

Todo equipamiento automatizado debe disponer de su calificación; de esta manera, el paso siguiente es la verificación de los parámetros de los ensayos que se realizarán con dicho equipo.

4. VALIDACIÓN Y/O VERIFICACIÓN DE LOS ENSAYOS

La validación de los ensayos automatizados es realizada por el fabricante, evaluando los parámetros según sea un ensayo cualitativo o cuantitativo (Tabla 10.3).

En los ensayos de Virología, el usuario debe verificar generalmente la sensibilidad, la especificidad y el valor de corte. Para ello, el laboratorio puede adquirir paneles serológicos comerciales,

Cuantitativos	Cualitativos
Sensibilidad y especificidad	Sensibilidad y especificidad
Selectividad e interferencia	Probabilidad de falsos positivos y negativos
Límite de detección	Límite de detección
Rango de linealidad	Límite de corte (<i>Cut off</i>)
Incertidumbre	Incertidumbre, región de error
Exactitud, precisión	Robustez
Robustez	
Límite de cuantificación	

Tabla 10.3: Parámetros que valida el fabricante de ensayos automatizados.

o utilizar muestras clínicas de pacientes que cumplan con requisitos definidos con respecto a la obtención y conservación de las mismas.

4.1 ESTANDARIZACIÓN

Los ensayos automatizados en Virología han permitido universalizar las determinaciones de diagnóstico que, hasta no hace mucho tiempo, carecían de patrones de procedimientos. La estandarización fue el principal logro de los ensayos virológicos automatizados, es decir, permitir trabajar en igualdad de condiciones sin que el medio ambiente o el usuario puedan interferir en el resultado final.

4.2 CONTROLES, CALIBRADORES Y ESTÁNDARES

Las determinaciones automatizadas para el diagnóstico virológico incluyen controles positivos y negativos que deben ser procesados paralelamente en cada procedimiento de análisis; dichos controles son provistos por el fabricante. Los calibradores y/o estándares son muestras que conservan la matriz del suero humano y que contienen una concentración de un determinado analito. Se utilizan para calibrar un ensayo cuantitativo, para lo cual se dispone de varias concentraciones.

5. CONCLUSIONES

Los ensayos automatizados modificaron el concepto de diagnóstico en el laboratorio de Virología Clínica. La posibilidad de disponer de un diagnóstico rápido, específico y a bajo costo, con todas las evaluaciones de calidad ha facilitado al médico la definición de conductas terapéuticas.

La reproducibilidad, la estandarización, automatización y la independencia del operador, configuran los principales factores que permiten comparar los resultados obtenidos en los ensayos de diagnóstico virológico entre diferentes laboratorios.

Por todo lo expresado, estos ensayos automatizados deben cumplir con normativas de calidad, que surgen de programas de control de calidad que cada laboratorio debe disponer para una mejora continua. Por ello son importantes para el laboratorio de Virología Clínica los programas de controles internos y, sobre todo, el control externo de calidad, que permite al laboratorio asegurar la confiabilidad de sus ensayos.

Bibliografía

- García-Campaña, AM. "Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo". *Ars Pharmaceutica* 2001; 42: 81-107.
- Ismail N, Fish GE, Smith MB. "Laboratory evaluation of a fully automated chemiluminescence immunoassay for rapid detection of HBsAg, antibodies to HBsAg, and antibodies to Hepatitis C Virus". *J Clin Microbiol* 2004; 42: 610-17.
- Jones M, Clark V, Clulow S. "The importance of the quality control of laboratory automation". *J Assoc Lab Automat* 2003; 8: 55-7.
- Katz D, Shi W, Wildes M, Hilliard JK. "Automation of serological diagnosis for Herpes B Virus infections using robot-assisted integrated workstations". *J Assoc Lab Automat* 2002; 7:108-13.

Introducción al aseguramiento de la calidad y control de calidad en el laboratorio de Virología Clínica

Cristina M. Videla - Marta Torres

1. INTRODUCCIÓN

Los laboratorios clínicos producen resultados analíticos que son útiles para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento, control de la evolución y del tratamiento de numerosas enfermedades. Dada la importancia que tiene un resultado de laboratorio sobre la salud del paciente, es fundamental que ese resultado sea confiable y certero. Para ello, todo laboratorio deberá contar con un sistema que asegure la calidad de sus resultados.

Si bien los sistemas de gestión y aseguramiento de la calidad empezaron como una necesidad en la industria, estos conceptos se han extendido a todas las actividades incluyendo a la salud y los laboratorios de análisis clínicos.

Existen diferentes normas internacionales que establecen modelos para implementar sistemas de calidad. Todas definen la necesidad de diseñar y mantener procesos documentados y registrar los resultados de las actividades. Además, indican el uso del medio escrito como soporte de la información de los resultados de los procesos.

Existen varios modelos aceptados y consensuados de normas, emitidas por diferentes organizaciones privadas u oficiales que se pueden aplicar para implementar un sistema de calidad en los laboratorios:

- Las normas internacionales de la familia ISO-9000 constituyen un modelo de sistema de gestión de la calidad y son aplicables a cualquier organización. La ISO-9001:2000 define los elementos del sistema de calidad. Tiene la ventaja de que puede ser aplicada a cualquier tipo de organización, es ampliamente reconocida y establece un punto de referencia para la comparación de distintas organizaciones. Existen normas ISO más específicas relacionadas con la actividad de los laboratorios como la ISO 15189-2003 Laboratorios Clínicos: Requisitos Particulares para la Calidad y Competencia y la ISO 17025-2005 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración.
- Normas de la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE.UU.; que tiene carácter legal y regulatorio en ese país.
- Normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) ex NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*).
- Estándares de la OMS –Organización Mundial de la Salud– para laboratorios clínicos a través de diversos documentos publicados por esta organización.
- Normas IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación): ISO 15189: IRAM traduce y adopta los documentos del TC 212 (Comité Técnico en Salud) de ISO y participa en el Comité MERCOSUR de Normalización, subcomité CSMN 20 de Salud, que elabora normas para la región.

2. DEFINICIONES (FIGURA 11.1)

Definiremos algunos términos de uso habitual relacionados con la calidad de una organización; en nuestro caso esa organización es el Laboratorio de Virología, que puede formar parte del laboratorio general de análisis clínicos o funcionar en forma independiente.

Calidad total: es una filosofía cuyo objetivo es la excelencia de los resultados y se basa en la mejora continua. No sólo gestiona la calidad sino que desarrolla la calidad de la gestión y asegura la sustentabilidad de la organización en el tiempo a través de la

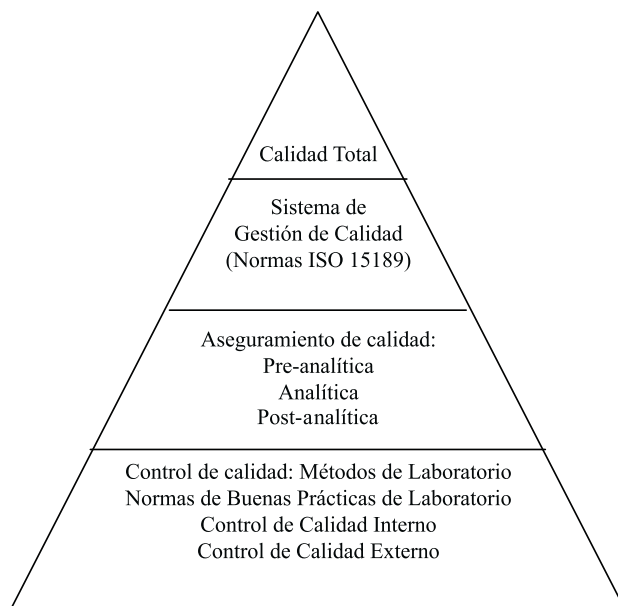


Figura 11.1. Jerarquías de Calidad.

satisfacción de todos los involucrados, desde el paciente hasta los técnicos del laboratorio.

Sistema de Gestión de la Calidad: es la estructura de una organización que se encarga de administrar de forma planificada la calidad de la empresa. Involucra el planeamiento, el aseguramiento y la mejora continua de la calidad de esa organización. El sistema de gestión de calidad tiene como punto de apoyo el Manual de Calidad y se completa con una serie de documentos adicionales como manuales, procedimientos escritos, instrucciones técnicas, registros y sistema de información. El Manual de Calidad es un documento donde se especifica la misión y visión de la empresa con respecto a la calidad. Normalmente, existe un profesional responsable de calidad que vela por el cumplimiento de lo que se especifica en el manual. Todo esto sigue una norma de calidad, siendo la más utilizada la norma ISO 9000.

Aseguramiento de la Calidad: Es el conjunto de acciones sistemáticas encaminadas a proporcionar confianza en los servicios que brinda el laboratorio, esto es que los resultados que aporta el laboratorio son correctos. El aseguramiento de la calidad abarca todos los aspectos del proceso de análisis, desde la planificación hasta la satisfacción del paciente, e incluye las etapas pre-analítica, analítica y post-analítica (Tabla 11.1 - Figura 11.2).

Control de Calidad: Es una parte del sistema de aseguramiento de la calidad y comprende todas las técnicas y procedimientos destinados a monitorear los múltiples factores que pueden afectar los requisitos de calidad.

Suele distinguirse entre el Control de Calidad Interno y Control de Calidad Externo.

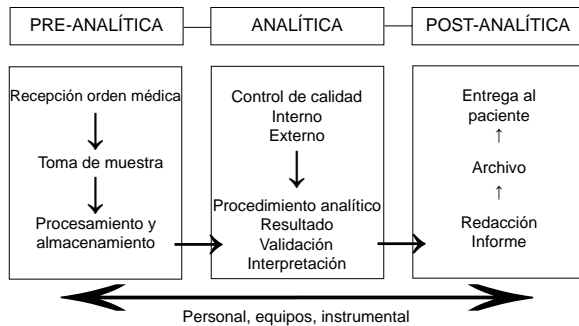


Figura 11.2. Flujo de trabajo del laboratorio.

Los procedimientos de control sirven para comprobar que se mantiene un determinado nivel de exigencia para los resultados pero no aumentan ese nivel. Si se desea aumentar ese nivel la mejor estrategia es identificar las posibles fuentes de error de cada paso del proceso y diseñarlo de manera que se prevengan los posibles errores. Por otra parte, los procesos de control de calidad no pueden detectar equivocaciones que afectan de forma particular a un resultado.

Control Interno de Calidad: consiste en el monitoreo diario de todos los procedimientos llevados a cabo en el laboratorio. Permite validar los ensayos en forma prospectiva.

Control Externo de Calidad: es el control de la calidad de los resultados realizado por una institución ajena al laboratorio. La forma más común de control externo de la calidad son los llamados programas de comparación entre laboratorios o programas de evaluación externa de la calidad, frecuentemente citados con las siglas EQAS (del inglés *External Quality Assessment Scheme*). Este programa consiste en que cada laboratorio participante recibe de la institución a cargo del programa, especímenes para ser evaluados utilizando su metodología habitual, sin conocer su resultado previo. La institución organizadora del programa recopila estos resultados, los analiza y remite a cada laboratorio un informe sobre la calidad de sus resultados.

Normas de Buenas Prácticas del laboratorio –BPL (Good Laboratory Practice- GLP): Describen un conjunto de normas que deben observarse en un laboratorio cuando se efectúa cualquier procedimiento, desde la recolección de la muestra hasta la producción de un informe, incluyendo normas de bioseguridad para el personal interviniente y para terceros. Estas BPL establecen el uso de: técnicas evaluadas y normatizadas, personal entrenado, procedimientos operativos normatizados y monitoreo permanente de la calidad de los resultados.

Certificación y Acreditación: Estas actividades son realizadas por diferentes organismos con autoridad para funcionar como agencias de acreditación de laboratorios tanto al nivel internacional como nacional. **Certificar** significa que el laboratorio cuenta con sistema de aseguramiento de la calidad. **Acreditar** es el reconocimiento de la competencia técnica del laboratorio, indica que el laboratorio no sólo tiene un sistema de aseguramiento de calidad sino que además cumple de manera adecuada con los requisitos. Para ello se requiere que el laboratorio posea un plan de aseguramiento de calidad en el que consten los siguientes ítems:

1. Tener un responsable de supervisión del programa
2. Selección de técnicas sobre la base de los requerimientos médicos de sensibilidad y especificidad
3. Manuales de procedimientos revisados y actualizados periódicamente y cada vez que se introduzca una técnica o se modifique alguna ya existente
4. Control de calidad interno registrado por escrito
5. Control de Calidad Externo y su evaluación
6. Programas de mantenimiento y verificación del funcionamiento de todo el instrumental. Registros de sus calibraciones

Etapa Pre-analítica

Recepción e ingreso de la orden médica
 Procedimientos de obtención de la muestra: indicaciones para el paciente, toma de muestra
 Capacitación del personal
 Condiciones de obtención y transporte de la muestra
 Manejo y conservación de la muestra hasta su procesamiento
 Ingreso de información completa sobre el paciente

Etapa analítica

Mantenimiento del instrumental
 Control de los reactivos: fechas de vencimiento, calibraciones
 Capacitación del personal
 Controles de calidad interno y externo
 Supervisión de los procedimientos y registros de los procedimientos
 Validación de los resultados

Etapa post-analítica

Redacción de informes claros y con valores de referencia
 Resultados en tiempo adecuados
 Informe de resultados críticos al médico

Tabla 11.1. Variables que pueden afectar la calidad de los resultados.

7. Control de fechas de vencimiento de reactivos, registros de la temperatura de heladeras, congeladoras, registros de calibración automática de pipetas, etc.
8. Programas de entrenamiento del personal
9. Auditorías externas

Algunas instituciones que se ocupan de la acreditación de los laboratorios según sus propios requisitos son: el *College of American Pathologists (CAP)* de EE.UU. y el *Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd (CPA)* en Reino Unido. En Argentina, el Organismo Argentino de Acreditación acredita laboratorios según la Norma 15189:2003 IRAM-ISO.



3. CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA

En la Tabla 11.2 figuran las principales normas que deberá instaurar un laboratorio para tener un programa de control de calidad basado en las Buenas Prácticas de Laboratorio. El punto de partida es contar con un manual de procedimientos en donde todos los procedimientos y técnicas estandarizadas deben estar disponibles por escrito en el laboratorio para ser utilizado por el personal técnico. Estos Manuales de Procedimientos Operativos (MPO), en inglés *Standard Operating Procedures (SOP)*, deberán contener la descripción clara y detallada de: a) las técnicas que se realizan en forma rutinaria; b) la preparación de los reactivos correspondientes; c) las medidas de bioseguridad; d) los procedimientos de control de calidad.

Mientras los procedimientos juegan un papel importante en la obtención de un diagnóstico adecuado, la selección, la formación, la evaluación y actualización continua del personal son también fundamentales en el funcionamiento del laboratorio.

3.1 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

En todo proceso de medición se pueden producir errores. Existen dos tipos de errores, los aleatorios y los sistemáticos. Los aleatorios son impredecibles, inherentes a toda medición; su mayor o menor magnitud es la precisión de la técnica, que es una medida de la repetibilidad del mismo. Los errores aleatorios se pueden minimizar con entrenamiento y supervisión del personal y la adherencia estricta a los procedimientos escritos. Como ejemplo se pueden citar aquellos derivados de errores de pipeteo, cambios en los tiempos de incubación, etc.

1. Composición y organización del personal de laboratorio
2. Formación y actualización técnica del personal
3. Elaboración del Manual de Procedimientos Operacionales (MPO)
4. Selección de técnicas analíticas
5. Obtención, identificación, almacenamiento y transporte de muestras
6. Mantenimiento y control periódico de equipos, pipetas y materiales volumétricos
7. Descontaminación, limpieza y esterilización de los materiales en uso
8. Control de reactivos
9. Normas de seguridad
10. Controles internos y externos
11. Evaluación constante de mejoras técnicas

Tabla 11.2. Principales normas utilizadas para establecer un programa de control de calidad, según las buenas prácticas de laboratorio.

Los errores sistemáticos son aquellos que se pueden prevenir y pueden ser generados por factores tales como el uso inadecuado o defectuoso de los materiales o aparatos mal calibrados. Pueden ser detectados por controles externos y el parámetro que los mide es la exactitud.

El objetivo del control interno de la calidad es detectar eventuales anomalías en el proceso de medida. En el caso del laboratorio de Virología se debe tener en cuenta que habrá diferentes procedimientos de control, dependiendo si se trata de métodos de diagnóstico directo (detección de antígeno, aislamiento o detección de ácidos nucleicos) o de métodos indirectos o serológicos.

3.1.1 Métodos de diagnóstico directos

Dentro de los métodos directos se encuentran: a) detección directa de antígenos por técnicas como inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, enzimoimmunoensayo, aglutinación; b) procedimientos clásicos de aislamiento viral en cultivo de células y, c) técnicas moleculares de detección de ácidos nucleicos virales. Cada una de estas técnicas deberá tener sus controles internos positivos y negativos que deberán incluirse cada vez que se realice la técnica. En algunos casos, estas técnicas son artesanales (*home brew*) desarrolladas en los laboratorios y deberán ser debidamente validados con técnicas ya existentes.

Detección directa de antígeno viral. Existen en la actualidad equipos comerciales, que presentan como ventaja estar normatizados y traen incorporados sus controles positivos y negativos.

Deberá controlarse el pH y la esterilidad de las soluciones que se utilicen. Los inmunosueros (anticuerpos monoclonales, antisueros marcados con fluoresceína) se titularán para determinar la dilución adecuada a utilizar y este procedimiento deberá repetirse cada vez que se cambie el reactivo o regularmente, dependiendo de la frecuencia con que se realice el ensayo. Estas titulaciones se pueden realizar sobre células infectadas o sobre muestras clínicas conocidas. Deberá llevarse un registro del comportamiento de los controles, de los antisueros, fechas de vencimiento, control y titulaciones.

Aislamiento viral. Deberán controlarse los reactivos y otros suministros que pueden ser fuente de contaminaciones microbianas, toxicidad para los cultivos celulares e interferencias en la recuperación de algunos virus. Se realizarán controles de esterilidad a todos los medios, sueros y tampones utilizados para el cultivo celular. Las fuentes de toxicidad pueden ser algunos lotes de suero, agua de mala calidad, concentraciones elevadas de antimicrobianos, el contacto con ciertos materiales, el material de vidrio indebidamente lavado o tratado.

El Control de Calidad Interno de los cultivos celulares incluye acciones que deberán estar especificadas en los Manuales de Procedimientos; como ejemplo, algunas de ellas son:

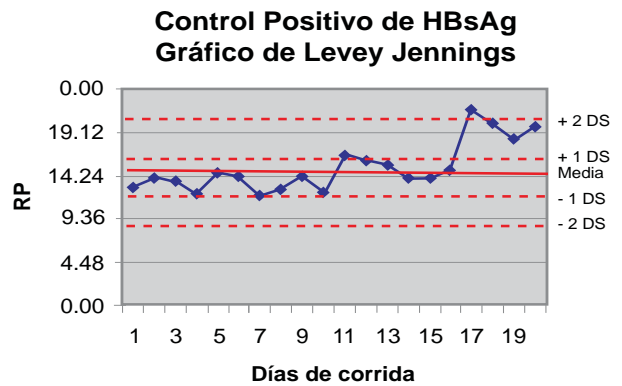


Figura 11.3. Gráfico de Levey Jennings. Control Positivo de HBs Ag por MEIA, AXSYM, Abbott.

1. Control del pasaje de las células especificando en los manuales hasta qué número de pasaje se utilizará.
2. Frecuencia de su repique.
3. Con cuantos días de crecimiento del cultivo éste se utilizará para el aislamiento viral de las muestras clínicas.
4. Con cada inoculación de muestras clínicas se incluirán controles negativos (sin inocular) que se observarán y mantendrán paralelamente con los cultivos infectados.
5. Periódicamente, dependiendo del tipo de cultivo celular y el virus que se intente recuperar, conviene determinar la sensibilidad del sustrato a medida que aumentan los pasajes de los cultivos. Para ello, se pueden realizar titulaciones con un lote de virus de referencia, debidamente titulado. Otra alternativa es reemplazar los cultivos celulares en uso por otros nuevos de menor pasaje.
6. Deberán mantenerse registros de control de calidad de todos los lotes de cultivo celular para establecer la necesidad de repetir inoculaciones, reponer células, etc.
7. Registros de esterilidad, de confluencia, de acciones correctivas.
8. En el caso de cultivos inoculados con muestras clínicas, registrar en una planilla la fecha de inoculación, número de lote de células, temperatura de incubación en la estufa, cambio de medios, aparición de acción citopática, estado de las células, etc.

Técnicas moleculares. Las técnicas moleculares de amplificación de ácidos nucleicos (*NAT*) para detección, identificación y cuantificación de virus constituyen una poderosa herramienta de diagnóstico, precisamente por su alta sensibilidad. Sin embargo, requiere de extremos cuidados para evitar la generación de falsos positivos, que pueden producirse por contaminación con otras muestras o más frecuentemente por *carry over* de DNA de productos ya amplificadas, o también a partir de DNA clonado y de virus derivados de cultivo celular.

Estos inconvenientes se pueden prevenir en parte siguiendo las reglas de Kwok e Higuchi que se refieren al diseño de un laboratorio y los cuidados que deben seguirse en cada área para evitar las contaminaciones. Brevemente, estas reglas establecen:

- a. Tres áreas separadas, una de preparación de reactivos y *master mix*, otra área de preparación de las muestras y un área de amplificación y detección.
- b. La circulación entre estas áreas es unidireccional desde la zona limpia (área preparación de la muestra, área de preparación de reactivos) a la contaminada con producto amplificado (área de amplificación y detección).
- c. Uso de *tips* con filtro
- d. Uso de pipetas separadas para cada área
- e. Reactivos fraccionados
- f. Uso de guantes y su cambio frecuente
- g. Uso de camisolines para cada área

- h. Descontaminación de mesadas y cámaras, por ejemplo con lavandina al 10%, luz ultravioleta, etc.

Los controles internos a utilizar en las técnicas de amplificación, dependerán de los diferentes protocolos. Se aconseja utilizar un control positivo débil para evitar introducir una fuente de contaminación adicional. Este control podrá ser un plásmido, un lote de virus o una muestra clínica. En estos casos se los puede incluir también como control del proceso de extracción del ácido nucleico. Además, se debe incluir un control de los reactivos y un control negativo.

3.1.2 Métodos de diagnóstico indirectos o serológicos

El monitoreo diario de cada ensayo debe realizarse mediante la evaluación con sueros control, construyendo Cartas de Control. Los sueros control pueden provenir del equipo comercial, o ser sueros individuales o *pool* de sueros preparados por cada laboratorio o por los laboratorios de referencia. Se utilizan sueros controles positivos con títulos altos y bajos así como también controles negativos para la determinación que se desea controlar.

Construcción de Cartas de Control. Se deben realizar repeticiones de la determinación serológica a controlar con los sueros control positivos y negativos, unas 20-30 veces a lo largo de 10-20 días de trabajo y se calcula la media y la desviación estándar (DS) de los valores obtenidos. Luego se grafican los valores de la media y DS, siendo el límite superior e inferior media \pm 2DS (Figura 11.3).

En estos gráficos se ingresarán diariamente los valores obtenidos con el control y los puntos se pueden unir dando lugar a los conocidos Gráficos de Levey Jennings. En el eje de las X se colocará el día o número de corrida y en el eje de las Y los valores obtenidos para los controles que dependerán de la técnica utilizada y podrá ser un título de anticuerpos, la absorbancia, o la relación de positividad. El análisis de estas curvas de control permitirá determinar irregularidades en el ensayo. Normalmente, se rechaza el proceso cuando los resultados de los controles superan el límite de \pm 2DS o cuando el 10% o más de los resultados de los sueros control se ubica consecutivamente cerca del límite superior o del inferior. Existen, además, otros criterios estadísticos para la detección de errores como las Reglas de Sheward o las Multi-reglas de Westgard. Cuando se detectan estos desvíos deberá revisarse todo el proceso para identificar errores y tomar las medidas correctivas.

3.2 CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

Los programas externos de calidad suelen ser organizados por asociaciones profesionales u organismos oficiales. En los programas EQAS (Programa de Aseguramiento Externo de Calidad) se procesan muestras desconocidas repartidas en el tiempo entre muchos laboratorios participantes del programa. Estos laboratorios reportan el resultado obtenido al organismo o institución responsable del programa de Control Externo. Los resultados son analizados estadísticamente y se envía la evaluación a cada laboratorio participante. Estos programas comenzaron como programas de participación voluntaria. Hoy, se han convertido en EE.UU. y otros países en un requerimiento para poder funcionar y son requisitos para demostrar la calidad con fines de acreditación.

Un laboratorio que presenta una buena evaluación en un programa de calidad externa analizará correctamente las muestras de los pacientes ya que el tratamiento que reciben las muestras de control externo debe ser el mismo que el que recibe la muestra del paciente. En nuestro país, un ejemplo de un programa de Control Externo de Calidad en serología es el organizado por CEMIC, denominado **Programa Buenos Aires (ProgBA)**. Este programa inicialmente se creó para control externo de marcadores de endocrinología y en la actualidad se ha extendido a diferentes marcadores de hematología, clínica médica y serología para virus (desde 1998).

El ProgBA envía a los laboratorios participantes del programa un juego de 12 muestras de sueros positivas y negativas para los diferentes marcadores virológicos. Los laboratorios participantes procesan mensualmente una muestra y envían sus resultados al ProgBA. Las determinaciones que se controlan son los principales marcadores que se estudian en el Banco de sangre (anticuerpos anti-HCV, anti-HIV 1/2, anti-HBV *core*, y HBsAg) y, además, otros marcadores como anticuerpos anti-rubéola, citomegalovirus, herpes y hepatitis A.

Todos los meses, el ProgBA analiza los resultados recibidos de los laboratorios, y determina el porcentaje de concordancia de esos resultados con el resultado previo (obtenido al momento de la preparación de los sueros, por las técnicas y las marcas comerciales utilizados por los participantes) (Figura 11.4). Anualmente se realiza un informe final con todos los resultados, lo que permite determinar el desempeño de cada laboratorio.

Este programa es voluntario y tiene fines educativos. Sus objetivos son integrar al profesional bioquímico a la filosofía y a la práctica del Control de Calidad, colaborar con el bioquímico en la confiabilidad de los resultados, comparar los resultados emitidos

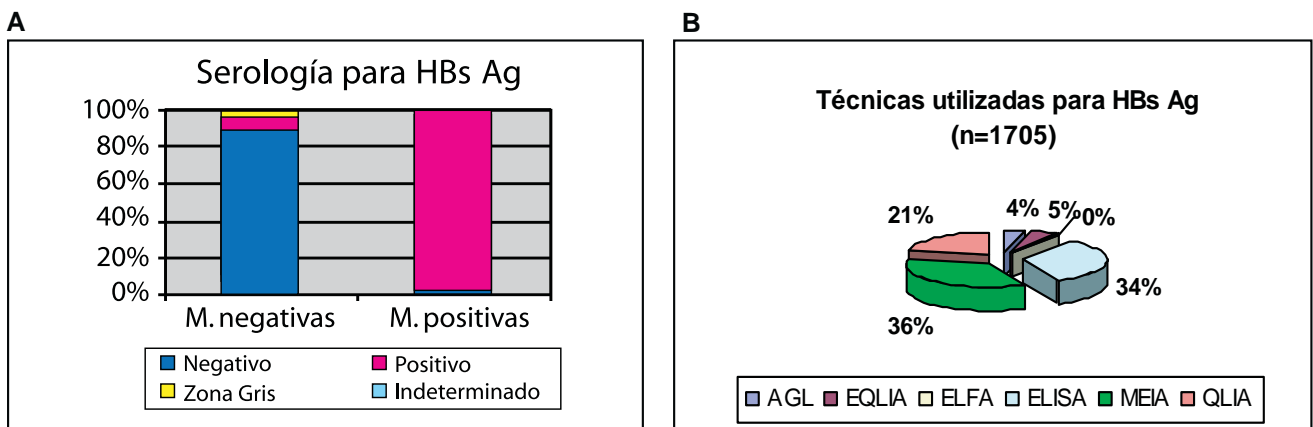


Figura 11.4. Serología para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg). Informe final de los laboratorios participantes.

a) Concordancias con los resultados previos en muestras positivas y negativas para HBsAg. Se observa un 97% de concordancias en muestras positivas y un 89% en las negativas.

b) Técnicas utilizadas por los laboratorios participantes. AGL: aglutinación; EQLIA: electroquimioluminiscencia; MEIA: micro partículas inmunoensayo automatizado; ELFA: enzimoimmunoensayo fluorescente automatizado; ELISA: enzimoimmunoensayo; QLIA: quimioluminiscencia.

(Videla C. Informe final ProgBA, Módulo de Serología. Programa XIX, 2005).

Técnica cuantitativa Estudios de hormonas, conteo de células, hemostasia)	Técnica cualitativa Técnicas confirmatorias de HIV y de HCV (WB, RIBA) aglutinaciones de látex, inmunolectroforesis, inmunofluorescencia	Técnica semi-cuantitativa Serología por Inmunofluorescencia
Especificidad	Especificidad	Especificidad
Repetibilidad y reproducibilidad	No aplicable	No aplicable
Justeza (aproximación)	No aplicable	No aplicable
Sensibilidad: Límite de detección Límite de cuantificación	Sensibilidad diagnóstica	Sensibilidad diagnóstica
Linealidad	No aplicable	No aplicable
Contaminación entre muestras (<i>carry over</i>), si es necesario	Sí	Sí
Estabilidad	Sí	Sí
Robustez	Sí	Sí
Valores de referencia	No aplicable	No aplicable
Interferencias	Sí	Sí
Correlación con: técnicas patrón o técnica usada anteriormente en el laboratorio	Correlación con: técnicas patrón o técnica usada anteriormente en el laboratorio	Correlación con: técnicas patrón o técnica usada anteriormente en el laboratorio

Tabla 11.3. Validación y verificación de técnicas de diagnóstico.

por los laboratorios participantes y controlar las metodologías y el instrumental utilizados para las mediciones del laboratorio clínico.

Otro Programa Externo de Calidad en Serología, organizado estatalmente en nuestro país, es el que distribuye el Instituto Carlos G. Malbrán para la Red de Hepatitis Virales a todas las instituciones del país que integran esa red.

4. ELECCIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y SU VALIDACIÓN

El proceso de validación de las técnicas analíticas constituye una etapa clave de un sistema de aseguramiento de calidad y es un requisito de las normas para la certificación y acreditación de laboratorios. La forma de realizar la validación de una técnica dependerá si se trata de un procedimiento desarrollado en el laboratorio o si es comercial y, además, dependerá de si se trata de un ensayo cuantitativo o cualitativo.

La validación de una técnica analítica podría definirse como un proceso de evaluación sistemático para demostrar que el ensayo elegido cumple con los requisitos necesarios para el uso que se le va a otorgar; estos requisitos se traducen de manera práctica en la determinación de una serie de parámetros de desempeño analítico, entre los que se pueden mencionar:

1. Precisión: repetibilidad y reproducibilidad
2. Exactitud
3. Especificidad
4. Límite de detección
5. Límite de cuantificación
6. Linealidad e intervalo de linealidad.
7. Robustez: insensibilidad de un ensayo analítico a pequeños cambios en el procedimiento

La validación implica que el comportamiento del ensayo se conoce y que es posible evaluar la incertidumbre en el valor obtenido, de modo que el usuario puede estar seguro del grado de confianza del resultado.

Si se trata de ensayos desarrollados en el laboratorio habrá que determinar todas las variables especificadas anteriormente, y a este proceso se lo llama validación del ensayo. Si se trata de ensayos comerciales habrá que verificar que las especificaciones determinadas por el fabricante se comportan de la misma forma en el laboratorio. A este proceso se lo denomina Verificación. En este caso se

determinará: linealidad (rango de trabajo); estimar la imprecisión y error al azar mediante un experimento de replicación; estimar el sesgo y error sistemático mediante un experimento de comparación de técnicas. Antes de comenzar con la validación de un nuevo procedimiento se deberá conocerlo y entrenar al personal sobre él. En la Tabla 11.3 se describen los parámetros a determinar de acuerdo al tipo de técnica. Existen guías para la determinación de estos parámetros elaboradas por distintas organizaciones de normalización como la CLSI, OMS, etc.

Presentaremos dos ejemplos de verificación de técnicas de diagnóstico. La primera es el ensayo automatizado de detección de antígeno de superficie de Hepatitis B (HBs Ag) por medio de la técnica MEIA en el sistema AXSYM (Abbott). Se verificaron los parámetros definidos por el fabricante de límite de detección (*cut off*), reproducibilidad, sensibilidad y especificidad. Se utilizó el control positivo del equipo, que es trazable con el Estándar Internacional de HBs Ag (WHO) con una concentración de 4-17 ng/ml y dos diluciones del mismo (10^{-1} y 10^{-2}), que se denominó *estándar secundario* (Ss). Se testearon 2 veces por día durante 2 días seguidos. Para evaluar el límite de detección y reproducibilidad se prepararon 20 replicandos del Ss en concentración un 20% por encima y un 20% por debajo del límite de detección propuesto por el fabricante de 0.6-1.5 ng/ml.

El valor de referencia de esta determinación se expresa como la razón entre la lectura de la muestra/ lectura del negativo (S/N) y este valor debe ser mayor e igual a 2 para considerar un resultado positivo. De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 11.4 la sensibilidad en diferentes concentraciones del estándar y el límite de detección coincide con el validado por el fabricante (0,6-1,5 ng/ml).

En la Tabla 11.5 se observan los resultados del experimento para determinar reproducibilidad. Este tipo de experimento requiere utilizar el *estándar* a dos concentraciones, una por debajo y la otra por encima del valor de corte y repetir las 20 veces. Las concentraciones por debajo y por encima del valor de corte que presenten 95% de resultados repetidos negativos ó 95% de positivos, respectivamente permiten determinar el intervalo 95% para ese valor de corte.

La especificidad fue evaluada en 100 donantes de sangre por duplicado.

De este ensayo de verificación se puede concluir que: a) El límite de detección obtenido coincidió con el propuesto por el fabricante en el

	PURO (4-17 ng/ml)	10 ⁻¹ (0,4-1,7 ng/ml)	10 ⁻² (0,04-0,17 ng/ml)
S/N	21,06 (+)	3,21 (+)	1,38 (-)
CV%	1,91	3,52	3,97

Tabla 11.4. Evaluación de la sensibilidad en diferentes concentraciones del estándar secundario para detección de HBs Ag por MEIA, AXSYM, Abbott. (Martínez A., Lichstenztejn D., Suárez A., Aguiar G., Carballal G. "Validación de un ensayo cualitativo automatizado en Virología". Revista Argentina de Microbiología 2006; 37: 54).

Concentración Ss +20%		Concentración Ss -20%	
Promedio S/N	% positivo	Promedio S/N	% negativo
2,97 (+)	99	1,32 (-)	99,5

Tabla 11.5. Reproducibilidad y límite de detección en concentraciones del estándar secundario (Ss) cercano al valor de corte para detección de HBs Ag por MEIA, AXSYM, Abbott. (Martínez A., Lichstenztejn D., Suárez A., Aguiar G., Carballal G. "Validación de un ensayo cualitativo automatizado en Virología". Revista Argentina de Microbiología 2006; 37: 54).

Gold standard: Cultivo clásico + rápido

Ensayo evaluado Antigenemia pp65	Positivo	Negativo	Total
Positivo	14 (A)	2 (B)	16 (A+B)
Negativo	0 (C)	32 (D)	32 (C+D)
Total	14 (A+C)	34 (B+D)	48 (N)

Tabla 11.6. Comparación de antigenemia pp65 con la técnica patrón (aislamiento en cultivo) para el diagnóstico de infección activa por citomegalovirus. (Videla C. "Citomegalovirus y trasplante renal: Experiencia del laboratorio de Virología de CEMIC". Primer Simposio Internacional de Virología Clínica en Argentina, Buenos Aires 5-8 de Noviembre, 2003).

Sensibilidad = $A/A+C \times 100 = 100\%$

Especificidad = $D/B+D \times 100 = 94\%$

Valor predictivo positivo (VPP) = $A/A+B = 87\%$. Es una medida de los falsos positivos

Valor predictivo negativo (VPN) = $D/C+D = 100\%$. Es una medida de los falsos negativos.

Eficiencia = $A+D/N$ corresponde al total de resultados que concuerdan con los resultados verdaderos = 95,8%

inserto; b) considerando el Límite de confianza de 95%, las diluciones del Ss $\pm 20\%$ fueron detectadas dentro de dicho intervalo por lo que los resultados en zonas cercanas al valor de corte son consistentes y reproducibles; c) el coeficiente de variación (CV%), fue menor en valores de dosis (S/N) altos que en los valores de dosis bajos: 1,92% vs. 3,97%. d) la especificidad en 200 muestras de 100 donantes de sangre fue del 99,5% y coincidió con las especificaciones del fabricante (99,95%).

Otra forma de verificación de ensayos cualitativos es realizar una comparación de ellas, es decir, que las mismas muestras sean analizadas por dos o más técnicas y que los resultados sean comparados. Se compara el nuevo ensayo con respecto al procedimiento cualitativo ya en uso en el laboratorio, o con la técnica patrón (*gold standard*) para esa determinación, o con un procedimiento cuantitativo o con el diagnóstico clínico. También se pueden utilizar paneles de referencia o paneles de control de calidad externo (*proficiency test*).

Con los resultados de comparación se realizan tablas de contingencia (2 x 2) entre el ensayo a evaluar y la técnica anterior o patrón y así se pueden estimar la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo, negativo y la eficiencia del procedimiento.

A título de ejemplo, en la Tabla 11.6 se muestran los resultados para la validación de la técnica de antigenemia pp65 de citomegalovirus en polimorfonucleares de sangre periférica por inmunofluorescencia en comparación con el *gold standard* para el diagnóstico de infección activa por citomegalovirus (aislamiento en cultivo de fibroblastos, en tubos –procedimiento clásico– y en *shell vials* –procedimiento rápido). Las muestras de sangre se procesaron paralelamente mediante ambos procedimientos.

Los resultados de este experimento demostraron que el ensayo evaluado presentó muy buena sensibilidad y eficiencia comparada con el *gold standard* para el diagnóstico de infección activa por citomegalovirus.

Bibliografía

- Berte LM. "Seguridad y cuidado del paciente a través de la implementación de un sistema de calidad en el laboratorio Clínico". En el Curso organizado por Programa Buenos Aires de Control de Calidad (CIRHE-CEMIC): Aseguramiento de la Calidad en Laboratorios Clínicos y Bancos de Sangre. Buenos Aires, 2006.
- Clark L, Garret P, Martin R, Kristen L. "User protocol for Evaluation of Qualitative test Performance; Approved Guideline". *NCCLS* 2002; (20) EP12-A, N°15.
- Francis J, Barret SP, Ogilvie MM, Sutherland SJ. "Guidelines for virological and non viral serological examination of specimens in routine diagnostic microbiological laboratories". *Clin Pathol* 2004; 57: 1-5.
- Health Protection Agency. "Good laboratory practice when performing molecular amplification assays. National Standard Methods" 2005; QSOP38 Issue2. <http://www.hpastandardmethods.org.uk/pdf.sops.asp>.
- Jacobson RH. "Principles of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases. OIE". In: *Manual of Standards for Diagnostic test and Vaccine* 1996; 8-15.
- Martínez A, Lichstenztejn D, Suárez A, Aguiar G, Carballal G. "Validación de un ensayo cualitativo automatizado en Virología". *Rev Arg Microbiol* 2006; 37: 54.
- PAHO. Manual de Procedimientos de Control de calidad para los Laboratorios de Serología de los bancos de sangre. PAHO/HP/HCT/94.21, 1994.
- Videla C. "Citomegalovirus y trasplante renal: Experiencia del laboratorio de Virología de CEMIC". Primer Simposio Internacional de Virología Clínica en Argentina, Buenos Aires 5-8 de Noviembre, 2003
- Web: www.iso.org

Conceptos sobre epidemiología de las infecciones virales

Jorge López Camelo - Fernando Poletta

1. ¿QUE ES LA EPIDEMIOLOGÍA?

La **epidemiología** es el estudio de la distribución de las enfermedades y de sus factores determinantes. El término epidemiología se deriva de las palabras griegas "epi" que significa "sobre" y "demos" que es "pueblo", y se refiere al estudio de la salud y la enfermedad de las poblaciones humanas, específicamente de los modelos de salud y enfermedad y de los factores que influyen sobre ellos.

La epidemiología difiere de la medicina clínica en dos aspectos principales: 1) los epidemiólogos estudian grupos de personas, no individuos; 2) los epidemiólogos estudian personas sanas, además de enfermas y tratan de encontrar las diferencias entre los afectados y los no afectados, la relación entre estas diferencias y la etiopatogénesis de la enfermedad.

Una vez obtenido el conocimiento epidemiológico de una enfermedad, se lo utiliza para tratar de entender las causas que la determinan, para programar políticas de salud pública y encauzar el tratamiento. La aplicación de esta información obtenida de poblaciones en la toma de decisiones sobre pacientes individuales es lo que se conoce como **epidemiología clínica** ó su denominación más reciente: **medicina basada en la evidencia**.

2. DISEÑOS E INDICADORES DE EFECTO

2.1. TIPOS DE ESTUDIOS EN EPIDEMIOLOGÍA

El diseño de un estudio de investigación epidemiológica constituye una aproximación teórica para poder abordar el problema o

situación a investigar. Constituye la parte más importante de toda investigación, ya que en este ejercicio teórico el investigador define y condiciona la forma, los procedimientos y el análisis a utilizar en la investigación.

Kleinbaum, Kupper y Mörngstren señalan como objetivos de la investigación epidemiológica los siguientes:

- Describir el estado de salud de las poblaciones.
- Explicar la etiología de las enfermedades.
- Predecir el número de casos de enfermedad y la distribución del estado de salud dentro de las poblaciones.
- Controlar la distribución de la enfermedad en la población.

La utilización de diferentes abordajes (diseños de investigación) para responder a estas eventuales hipótesis de trabajo obedece al tipo de problema o variable que intentará ser explicada, de allí la importancia de definir adecuadamente el problema o circunstancia a investigar.

Existen numerosos esquemas para clasificar los diseños de investigación. Se ha adoptado aquí el que clasifica los estudios en **observacionales** y **experimentales**. Los estudios observacionales son aquellos en que sólo se observa a los sujetos y se registran sus características y estudios experimentales son aquellos en los que existe algún tipo de intervención por parte del investigador (administración de un fármaco, un procedimiento o un tratamiento) (Figura 12.1).

Los estudios observacionales pueden ser descriptivos (no prueban hipótesis causa-efecto), entre los que se encuentran los **reportes de serie de casos**, los estudios de **corte transversal** y los estudios de **prueba diagnóstica**; o analíticos (prueban hipótesis causales) como por ejemplo los estudios de **casos y controles** y los estudios de **cohorte**.

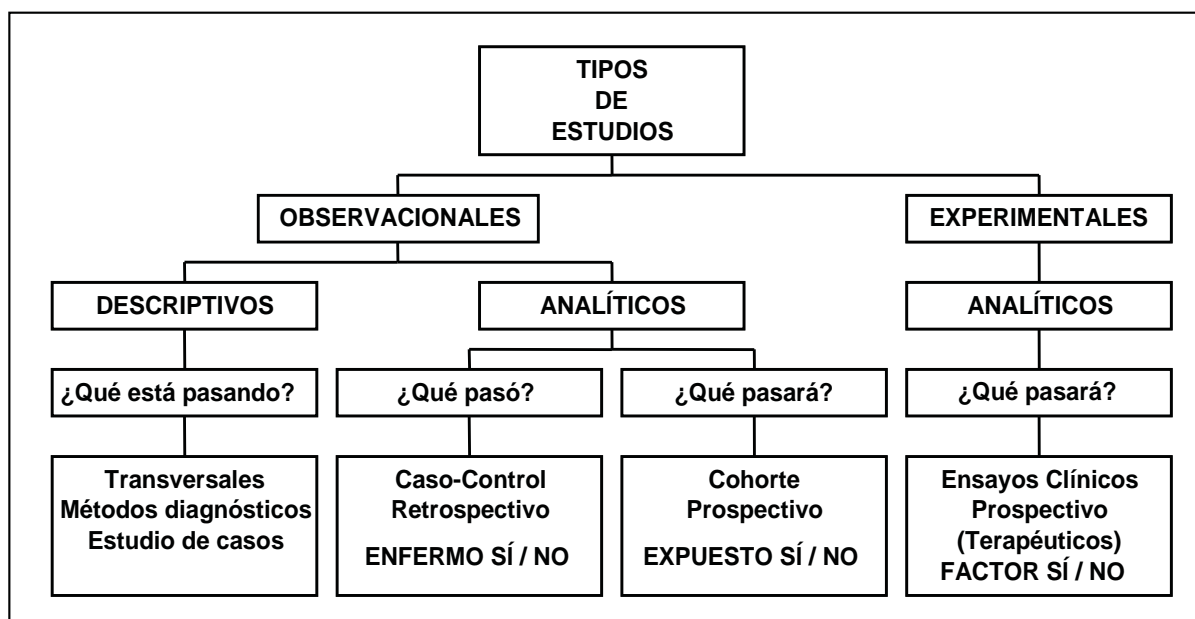


Figura 12.1. Tipos de diseños de investigación.

Por otro lado, los estudios experimentales son siempre analíticos y prospectivos, y si participan pacientes humanos son conocidos como **ensayos clínicos**.

Reporte de serie de casos. Son simples recuentos descriptivos de características interesantes observadas en un grupo de pacientes observados en un período de tiempo relativamente breve. En general, estos informes no incluyen sujetos control, es decir personas sin la enfermedad o problema que se describe.

Estudios transversales. También conocidos como encuestas, estudios de prevalencia, y estudios epidemiológicos; estos estudios analizan las características de un grupo de personas en un momento determinado (más que en un período dado). Están diseñados para determinar "¿Qué está pasando?" En este tipo de estudios pueden estudiarse la relación entre dos o más variables de interés, aunque siempre la unidad de estudio es la población.

Estudios de prueba diagnóstica. Dentro de los estudios transversales, las tareas diagnósticas constituyen un área muy importante de la práctica médica. Los procedimientos para evaluar cuantitativamente la eficacia de un proceso de diagnóstico se basan en determinar su capacidad para clasificar correctamente los sujetos en dos o más grupos (enfermos/sanos; infectado/no-infectado; etc.). Se trata de determinar cómo se ajustan a la realidad los resultados de clasificación, obtenidos con la prueba diagnóstica, y para ello es preciso conocer esa realidad mediante algún ensayo fiable (prueba de referencia o *gold standard*).

El caso más sencillo de prueba diagnóstica es aquel en el que el resultado de la prueba es dicotómico, pudiendo entonces reflejarse en una tabla como la que se observa en la Figura 12.2a.

En este contexto se utilizan índices para evaluar la calidad de la prueba diagnóstica; los más utilizados son: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y valor global o eficiencia de la prueba.

Sensibilidad (S). Es la proporción de verdaderos positivos identificados por la prueba del total de enfermos. ($S = a / a+c$)

Especificidad (E). Es la proporción de verdaderos negativos identificados por la prueba del total de sanos. ($E = d / b+d$).

A)	Técnica de Referencia (Gold standard)		
Técnica a evaluar	Enfermos (+)	Sanos (-)	Total
Positiva (T+)	a) Verdaderos positivos (VP)	b) Falsos positivos (VP)	a + b
Negativa (T-)	c) Falsos negativos (FN)	d) Verdaderos negativos (VN)	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

B)	Técnica de Referencia (presencia del virus)			S= 95% (87-100)
Técnica a evaluar	SI (+)	NO (-)	Total	E= 98% (94-100)
RT-PCR Positiva	23	1	24	VPP= 95% (87-100)
RT-PCR Negativa	1	56	57	VPN= 98% (94-100)
Total	24	57	81	VG= 97% (89-100)

Figura 12.2. Tabla de contingencia para pruebas diagnósticas. En B se puede observar un ejemplo de evaluación de un ensayo de RT-PCR para detección de virus influenza A (datos de Atmar y col. 1996).

Valor predictivo positivo (VPP). Es la proporción de sujetos que verdaderamente tienen la enfermedad, de entre los que dieron positivo a la prueba ($VPP = a / a+b$).

Valor predictivo negativo (VPN). Es la proporción de sujetos verdaderamente sanos sobre el total de los que dieron negativo a la prueba ($VPN = d / d+c$).

Valor global o eficiencia (VG). Es la probabilidad de acierto de la prueba, es decir los verdaderos positivos sumado a los verdaderos negativos sobre el total ($VG = a+d / a+b+c+d$).

Podemos ver como ejemplo datos tomados del trabajo de Atmar *et al.* (1996) donde se evaluó la prueba de RT-PCR para la detección de virus de influenza tipo A (Figura 12.2b).

Estudios de casos y controles. Son estudios retrospectivos ("¿Qué pasó?") porque partiendo de la presencia o ausencia de un resultado (o enfermedad) se buscan analizar antecedentes para detectar posibles causas o factores de riesgo. En este tipo de estudio pueden analizarse más de un factor de riesgo y su relación con una patología.

Estudios de cohorte. Este tipo de estudios son llamados también prospectivos ("¿Qué pasará?") debido a que el resultado de interés aparece después de comenzado el estudio. En los estudios de cohorte los grupos de sujetos a comparar se forman de acuerdo a la presencia o ausencia de algunas características que se sospecha sean precursoras de algún efecto en la salud o factor de riesgo de alguna enfermedad. Los sujetos son clasificados de acuerdo a su exposición o no al factor de riesgo de interés y son seguidos por un período de tiempo especificado *a priori* para luego analizar cuantos desarrollaron la enfermedad en cada grupo. Este tipo de diseño permite analizar la relación entre un factor de exposición y varias consecuencias en la salud.

Ensayos clínicos. Son estudios en los que se busca obtener conclusiones acerca del efecto de algún tratamiento o procedimiento en particular. En los **ensayos clínicos controlados** unos de los grupos de pacientes es sometido al nuevo tratamiento y se lo compara con otro grupo expuesto a un placebo o a algún tratamiento ya conocido.

2.2. INDICADORES DE EFECTO

La epidemiología debe utilizar información básica y aplicar herramientas analíticas adecuadas. A partir de la aplicación de esto se obtendrán las medidas cuantitativas que permitirán establecer las conclusiones.

Para cumplir con su ciclo de investigación la epidemiología debe elaborar tres tipos de medidas:

1. Medidas de ocurrencia: medidas de tendencia central (media, mediana, moda) y dispersión (desvío estándar, amplitud, percentiles), frecuencias relativas y absolutas, tasas, razones, proporciones.
 2. Medidas de asociación: riesgo relativo, riesgo atribuible, *odds ratios*, índices.
 3. Medidas de significación estadística: derivadas de la aplicación de tests estadísticos; por ejemplo: prueba de chi cuadrado (χ^2), prueba *t* de Student, entre otros.
- Desarrollaremos brevemente algunas de ellas:

Incidencia y prevalencia. Los índices de incidencia (frecuencia) y de prevalencia son las principales medidas de la enfermedad. **La incidencia mide el número de casos nuevos** de un padecimiento en una población en un período de tiempo determinado. La prevalencia en cambio, mide el número de personas en una población que tienen la enfermedad en un momento dado.

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de casos nuevos en un tiempo dado}}{\text{Población con riesgo de desarrollar la enfermedad}}$$

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Total de casos en un tiempo dado}}{\text{Población Total}}$$

La incidencia mide la aparición de la enfermedad y, en cambio, la prevalencia mide la existencia de la enfermedad en la población.

Una variación en la incidencia es consecuencia de un cambio en el equilibrio de factores etiológicos, ya sea debido a fluctuaciones naturales (estacionalidad) ó posiblemente a la aplicación de un programa preventivo eficaz. En consecuencia, la incidencia es una medida de importancia para el investigador que busca la etiología de la enfermedad. Por otra parte, la prevalencia depende principalmente de dos factores: incidencia y duración de la enfermedad. Por ende, un cambio en la prevalencia de una enfermedad puede ser consecuencia de un cambio en la incidencia, en el resultado de la enfermedad (restablecimiento o muerte), ó en ambos.

Medidas de riesgo. El **riesgo absoluto** es sinónimo de incidencia (o frecuencia) y significa el índice de aparición del estado o enfermedad. Es la cifra básica a partir de la cual se calcula el riesgo relativo. El **riesgo relativo (RR)** es el cociente entre el índice de incidencia en un grupo que presenta el factor (expuestos: por ej fumadores) y la incidencia en el grupo que no lo presenta (no expuestos: por ej. no fumadores) e indica al médico clínico en qué medida está aumentando el riesgo del paciente expuesto de sufrir la enfermedad en comparación con el paciente no expuesto. La correspondiente tabla de contingencia puede ser observada en la Figura 12.3.

$$\text{Riesgo Relativo (RR)} = \frac{\text{Incidencia en Expuestos}}{\text{Incidencia en No-Expuestos}} = \frac{I_e}{I_{ne}} = \frac{a / (a + b)}{c / (c + d)}$$

Asimismo, el RR indica el beneficio que se podría obtener para el paciente si se eliminara el factor de exposición. Es importante destacar de que el RR no mide la probabilidad de que alguien con el factor presente la enfermedad, ya que por ejemplo un RR = 3 significa que la probabilidad de presentar el padecimiento es 3 veces mayor para el paciente que presenta el factor comparado con otro individuo que no presenta el factor.

Sin embargo, los individuos que presentan el factor podrían tener probabilidades muy bajas de adquirir la enfermedad, si ésta fuera poco frecuente en la población. Por esta razón el RR es una medida de efecto que puede calcularse a partir de estudios prospectivos (cohorte y ensayos clínicos), ya que en estos tipos de estudio se puede calcular, además, la incidencia de la enfermedad.

En los estudios retrospectivos (casos y controles) donde se forman los grupos de estudio como enfermos vs. no enfermos, no es posible calcular la incidencia de la enfermedad. En este caso, la medida de asociación que permite cuantificar el riesgo se denomina **Odds Ratio (OR)** (Figura 12.3).

$$\text{Odds Ratio (OR)} = \frac{a \times d}{b \times c}$$

Medidas de mortalidad. El **índice de mortalidad global** mide la proporción de la población que muere cada año o el número de muertes en la comunidad con referencia a la población total (que por conveniencia se toma usualmente a la población a la mitad del año).

$$\text{Mortalidad global} = \frac{\text{Todas las muertes en un año civil}}{\text{Población a mitad del año}} \times 1000 = \text{muertes por 1000}$$

La mortalidad global expresa la actual mortalidad observada en una población bajo estudio y resume el efecto de dos factores: 1) la probabilidad de morir (que depende de la edad); y 2) la distribución de estratos de edad en la población.

Este índice es una cifra combinada, por lo tanto debe ser el punto de partida para la obtención de índices ajustados por edad, sexo, grupo étnico, según causa, entre otras.

Uno de estos índices ajustados, el **índice de mortalidad por casos**, representa la probabilidad de muerte entre casos diagnosticados o la mortalidad de un padecimiento determinado.

	Enfermos	Sanos	Total
Expuestos	a	b	a + b
No Expuestos	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

Figura 12.3. Tablas de contingencia para medidas de riesgo.

$$\text{Mortalidad por casos} = \frac{\text{N}^\circ \text{ casos de la enfermedad por unidad de tiempo}}{\text{N}^\circ \text{ muertes por enfermedad por unidad de tiempo}} \times 100$$

Este índice se utiliza principalmente en enfermedades infecciosas agudas, aunque es limitada su utilidad para enfermedades crónicas porque el período desde el comienzo hasta la muerte puede ser largo y variable.

La mortalidad por casos para la misma enfermedad puede variar en distintas epidemias al modificarse el equilibrio entre agente, hospedero y ambiente.

3. EPIDEMIOLOGÍA DE INFECCIONES VIRALES

La epidemiología de las enfermedades infecciosas es caracterizada por la presencia de un *agente infeccioso*, la presencia de una población susceptible y la capacidad de transmisión del agente infeccioso.

A pesar que los principios, conceptos y métodos epidemiológicos son aplicables a la epidemiología de enfermedades infecciosas, otros conceptos adicionales son necesarios para describir los fenómenos resultantes de la relación entre los eventos de la transmisión de la enfermedad (contagios). Estos conceptos adicionales incluyen: la probabilidad de transmisión, los patrones de contacto y el número básico de reproducción.

La principal característica de la epidemiología de enfermedades infecciosas (en relación a enfermedades crónicas) es la consideración de la exposición (infección) como un proceso dinámico que incluye tipo de contacto, patrones de infectividad, susceptibilidad, grado y duración de la infección.

4. LÍNEAS DE TIEMPO DE LA INFECCIÓN

La historia natural de toda enfermedad infecciosa presenta una dinámica propia de la transmisibilidad y de la patogenia, cuya comprensión es fundamental para el diagnóstico y para la adopción de adecuadas medidas asistenciales y de prevención. La línea de tiempo a partir de la exposición al agente infeccioso puede ser descrita con referencia a la dinámica de la infectividad (transmisibilidad) y a la de la enfermedad (patogenicidad) (Figura 12.4).

Si consideramos la infectividad, a partir de la exposición de un individuo susceptible a un agente infeccioso, comienza el período de latencia, que puede definirse como intervalo de tiempo comprendido entre el momento de exposición y el inicio de la transmisibilidad del agente infeccioso. Durante la incubación el individuo afectado aún no es infectivo. El período de transmisibilidad es el intervalo durante el cual se puede transmitir la infección. En cuanto a la enfermedad, a partir del momento de la exposición ocurren: el período de incubación: intervalo que transcurre desde el momento de la exposición hasta la aparición de los primeros síntomas o signos (período prodrómico), y luego el período de manifestaciones clínicas durante el cual el hospedero presenta signos y síntomas clínicos característicos de la enfermedad. La configuración de las líneas de tiempo son específicas para cada agente y el conocimiento de ellas tiene importantes implicancias en la salud pública y en el diseño de estudios de investigación.

Por ejemplo, para la varicela el período de latencia es más corto que el período de la incubación, de tal forma que un niño con varicela se torna infeccioso antes de la aparición de los primeros síntomas. En

el virus de inmunodeficiencia adquirida (HIV) el agente infeccioso tiene un corto período de latencia (en el orden de días a semanas) y un largo período de incubación (mediana mayor a 10 años), de tal forma que una persona infectada con HIV puede infectar a otra persona por un largo período de tiempo antes de que los primeros síntomas aparecen. Esta dinámica del HIV constituye un verdadero dilema en Salud Pública para implementar acciones de prevención.

La cadena epidemiológica es la serie de eslabones que intervienen en la transmisión de un agente desde una fuente infectiva a un huésped susceptible. Se identifican cuatro áreas principales: agente causal, mecanismos de transmisión, hospedero susceptible y medio ambiente. Las propiedades que caracterizan los efectos del agente etiológico son: la **transmisibilidad**, la **patogenicidad**, y la **inmunogenicidad**.

La transmisibilidad es la capacidad del agente para propagarse de un hospedero a otro, ello depende de la infectividad: la capacidad para penetrar en los tejidos y multiplicarse, de la frecuencia de contactos que el hospedero mantiene con susceptibles y del tiempo durante el cual el mismo elimine los patógenos. Un parámetro fundamental en la epidemiología de las enfermedades infecciosas es la probabilidad de transmisión.

5. PROBABILIDAD DE TRANSMISIÓN

La probabilidad de transmisión es la probabilidad que, dado un contacto entre un agente infeccioso y un hospedero susceptible, transferirá exitosamente la infección de tal forma que el nuevo hospedero se torne infectado. Estimar la probabilidad de transmisión y su variabilidad en una población es importante para entender la dinámica de la infección y evaluar el efecto de la intervención. La probabilidad de transmisión depende de las características del agente infeccioso, la susceptibilidad del huésped, el tipo y la definición de contacto.

5.1. ESTIMACIÓN DE LA PROBABILIDAD DE TRANSMISIÓN

Pueden utilizarse varios métodos para estimar la probabilidad de transmisión. Dos métodos, cuyos abordajes son opuestos, son frecuentemente utilizados:

1. Tasa de ataque secundaria
2. Método binomial.

El primero identifica los individuos infectados e identifica la proporción de individuos susceptibles. El método binomial comienza identificando los individuos susceptibles para estimar la tasa de infectados.

5.2. TASA DE ATAQUE SECUNDARIA

El concepto del método de tasa de ataque secundaria o caso-contacto es identificar a las personas susceptibles que hicieron contacto con el agente infeccioso, según definición metodológica *a priori* de contacto. Las personas infectadas que introdujeron la enfermedad son llamados **casos índices** o **casos primarios**, los infectados por éste se denominan **casos secundarios** y los infectados por estos **casos terciarios**. Entonces, la **Tasa de Ataque Secundario (TAS)** es la probabilidad de ocurrencia de la enfermedad entre personas susceptibles identificadas (o presuntamente identificadas) que hicieron contacto (según definición operativa) con la persona infectada. Se calcula como:

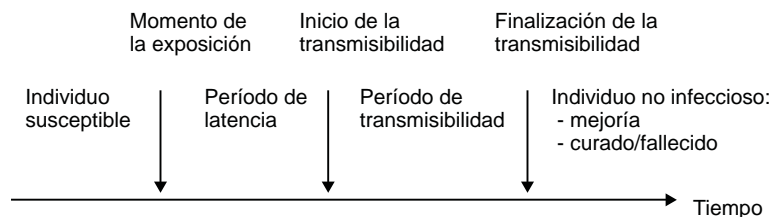
$$TAS = \frac{\text{Número de personas expuestas que desarrollaron la enfermedad}}{\text{Número total de personas susceptibles expuestas}}$$

Los datos requeridos son el conocimiento del período de infección, el de incubación, la definición de contacto y la identificación de personas susceptibles. Por ejemplo, para estimar la TAS de varicela en una casa con 8 personas (susceptibles), de la cual dos fueron infectados por el caso índice, la $TAS = 2/8 = 0.25$, es decir 25% resultaron infectados. La estimativa de la TAS es usada frecuentemente para evaluar la efectividad de una vacuna o campaña de vacunación.

5.3. EL MODELO BINOMIAL

El modelo binomial es frecuentemente usado cuando las personas susceptibles hacen más de un contacto con personas infectadas. La probabilidad de transmisión durante un contacto entre una persona susceptible y una persona infectada es denotada como p . La probabilidad de personas susceptibles que escapan a la enfermedad es denotada como $q = 1 - p$. Supongamos que una persona hace n contactos con una persona infectada o 1 contacto con n personas infectadas, la probabilidad de ser infectada durante cualquier contacto es independiente de

Dinámica de la infección



Dinámica de la enfermedad

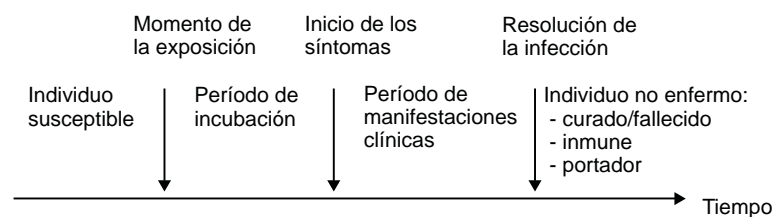


Figura 12.4. Curso natural de las enfermedades infecciosas (Modificado de Halloran ME, 2001). Nota de los editores: el término latencia hace mención en este diagrama al período de la infección que comprende desde el momento en que se inicia la misma, hasta la producción de la progenie viral transmisible. No se refiere en sentido virológico estricto al concepto de *latencia viral* expresado en esta obra en el capítulo 5 ("Patogenia de las infecciones virales") u otro como el 23 ("Familia *Herpesviridae*"), donde se define la latencia como la mantención del genoma viral funcional –durante toda la vida del individuo–, sin producción de virus infeccioso en dicho estado).

cualquier contacto previo. Entonces la probabilidad de estar infectada después de hacer n contactos es $(1-q^n) = 1 - (1-p)^n$. La probabilidad de transmisión bajo este modelo es estimada según:

$$p = \frac{\text{Número de susceptibles que se tornan infectados}}{\text{Número total de contactos con infectados}}$$

La diferencia del modelo binomial con TAS es el denominador. Mientras que la tasa de ataque secundaria es el número de susceptibles, en el modelo binomial es el número de contactos.

Por ejemplo, un estudio de la transmisión del HIV fue realizado en una población de 100 parejas sexualmente estables. Al comienzo del estudio un miembro de la pareja era infectado y el otro miembro susceptible. Veinticinco por ciento de los susceptibles se tornaron infectados durante el seguimiento. El número de contactos sexuales reportados en el estudio entre el período de tiempo en que la primera persona se infectó y el final del estudio fue de 1.500. Entonces, la probabilidad de transmisión fue de $25/1.500 = 0,017$. La probabilidad de infectarse después de dos contactos con una persona infectada fue $= 1-(1-p)^2 = 0,034$. Cuando no es posible identificar a las personas infectadas y sus vías de contactos con susceptibles, se puede estimar la probabilidad de transmisión utilizando la prevalencia de la enfermedad como indicador indirecto. En este sentido, la probabilidad de infectarse de una pareja donde se desconoce el estado de la infección es P_p . La probabilidad de infección (PI) después de n contactos es $1-(1-P_p)^n = PI$. Conociendo la proporción de personas infectadas durante el estudio, la prevalencia de la enfermedad y el número de contactos se puede obtener la probabilidad de transmisión p , despejando este indicador en la ecuación.

6. NÚMERO BÁSICO DE REPRODUCCIÓN

El número básico de reproducción (R_0) de casos es el número esperado de casos de enfermedad producidos por un caso infectado durante su período de transmisibilidad cuando penetra en una población totalmente susceptible. No incluye los casos producidos por los casos secundarios y sucesivos.

Por ejemplo, si $R_0=9$ es el número básico de reproducción de casos de sarampión en una población dada, indica que una persona con sarampión, en el período de contagio, puede producir nueve casos nuevos de sarampión. Cada agente infeccioso, en cada población determinada tiene número básico de reproducción específicos. Por ejemplo, los valores de número básico de reproducción para sarampión en Europa antes de la vacunación eran entre 15 y 17, para parotiditis entre 10 y 12, para rubéola entre 7 y 8 y para las tos ferina entre 16 y 17.

El valor poblacional de R_0 es de fundamental importancia para la salud pública de la población. Un $R_0 > 1$, indica que en dicha población es altamente probable que se produzca una epidemia, un valor $R_0=1$, es el estado de una endemia en dicha población y un valor de $R_0 < 1$, es que la enfermedad en cuestión está bajo control y que tiende a desaparecer. Las tasas de R_0 son específicas para cada población o en un determinado período de tiempo. Por ejemplo, el sarampión tiene un R_0 menor en áreas rurales que urbanas y la malaria tendrá un R_0 mayor durante la estación climática donde es alta la tasa de densidad del mosquito vector. En HIV, el R_0 en usuarios de drogas intravenosas será mayor que en una población de individuos que no las usan. El número de básico de reproducción es una cantidad adimensional y la sola información no permite entender la dinámica de la infección. Por ejemplo, el número básico de reproducción puede ser $R_0=9$ para sarampión e idéntico al número de HIV en usuarios de drogas intravenosas. Sin información adicional tal como, la tasa de transmisión, duración del período de infección no es posible llegar a conclusiones sobre el impacto de la enfermedad en la población, información necesaria para la adopción de acciones de prevención.

Por definición, el número básico de reproducción asume que todos los contactos son susceptibles, simplificación que en poblaciones reales no se cumple ya que existe alguna proporción de individuos en la población que son inmunes a la infección. Por lo tanto, el número esperado de nuevos casos producidos por un individuo infectado será siempre menor al número básico de reproducción (R_0) y este nuevo número es llamado número reproductivo efectivo R_e . El número reproductivo efectivo es función del número básico de reproducción y la proporción de personas susceptibles en la población (x); y es denotado por $R_e = R_0 \cdot x$. La proporción de personas susceptibles es dependiente de la edad, por lo tanto, cuanto más alta es la edad promedio de la infección menor el número básico reproductivo. Por ejemplo, el promedio de edad de la infección en sarampión fue entre 5 y 6 años en EE.UU. en 1950, mientras el de rubéola fue entre 9 y 10 años. Por lo tanto, el número básico reproductivo para sarampión fue mayor que el de rubéola.

6.1. ESTIMANDO EL NÚMERO BÁSICO DE REPRODUCCIÓN

La estimación directa del número básico de reproducción no es fácil. Los métodos indirectos pueden ser utilizados asumiendo que la transmisión de la infección está en equilibrio dinámico. Uno de los métodos se basa en que la tasa de incidencia y prevalencia de una enfermedad no cambian, entonces un caso infectado produce en promedio otro caso infectado, es decir $R_e=1$ (número reproductivo efectivo). De la relación $R_e = x R_0$, la proporción de susceptibles es $x = 1/R_0$, entonces R_0 es igual a la inversa de la proporción de susceptibles. Por ejemplo, Fine y Clarkson (1982) analizaron la tasa de incidencia por edad específica y los niveles de inmunidad para sarampión en Inglaterra y Gales desde 1950. Ello estimaron una tasa de susceptibles en torno a 4 millones de habitantes en el total de la población, aproximadamente el 9% (0.09). Por lo tanto el R_0 para sarampión $= 1/0.09 = 11$.

7. LA TASA DE INCIDENCIA COMO FUNCIÓN DE LA PREVALENCIA Y LA TASA DE CONTACTO

7.1. TASAS DE CONTACTO Y MODELOS

A pesar que los conceptos de incidencia y prevalencia en epidemiología general son similares, en la epidemiología de las enfermedades infecciosas la dependencia de eventos en enfermedades infecciosas da como resultado relaciones adicionales entre incidencia y prevalencia. En este sentido, la tasa de incidencia de una enfermedad puede ser expresada como función de la tasa de prevalencia (P), la probabilidad de transmisión (p) y la tasa de contacto (c) para un período de tiempo determinado (t) de personas infectadas. De esta forma la tasa de incidencia en un período de tiempo:

$$I(t) = cpP(t) \quad (1)$$

Bajo esta forma, el número de personas que se torna infectado por unidad de tiempo (incidencia) depende del número de afectados, la prevalencia de la enfermedad, la tasa de contacto y la probabilidad de transmisión. Por ejemplo, en malaria la probabilidad que un individuo se torne infectado por la picadura de un mosquito (probabilidad de transmisión), puede ser estimada despejando de la formula (1) como $p = I(t)/cP(t)$, donde $I(t)$ es la incidencia estimada de nuevos casos de infección de malaria, c es el número de picaduras de mosquitos por persona por unidad de tiempo y $P(t)$ es la proporción de mosquitos capturados con el agente infeccioso en sus glándulas salivales.

8. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

Es la recolección permanente y sistemática de información para determinar la distribución y tendencias de las enfermedades, en especial aquellas que tienen o puedan tener gran trascendencia sanitaria y social. Posee tres objetivos básicos: identificar problemas, orientar

las intervenciones y sugerir hipótesis para la investigación. Los principales sistemas utilizados son la declaración obligatoria de enfermedades, la notificación realizada por los laboratorios, los registros de enfermedades y los sistemas centinela. Cada país de acuerdo con su situación epidemiológica determina la lista de enfermedades infecciosas a notificar a la administración sanitaria.

Como ejemplo de vigilancia epidemiológica se puede mostrar las medidas de reciente implementación por parte de los países del Cono Sur para el caso de una eventual pandemia de influenza (fuente: Red de vigilancia de enfermedades infecciosas emergentes del cono sur. OPS, 2005; <http://www.paho.org>)

En Argentina, las medidas consistieron en el fortalecimiento de una red de vigilancia con unidades centinelas localizadas en la Capital Federal, Córdoba, Neuquén, Provincia de Buenos Aires (Mar del Plata), Río Negro, Salta, Santa Cruz, y Tucumán. Se fortaleció la capacidad diagnóstica de nuevas cepas de influenza en los centros nacionales de influenza (CNI) incluyendo influenza

aviar H5N1 e influenza A (H1N1) pandémica, para lo cual, se implementaron técnicas moleculares de detección de estos virus emergentes. La continua vigilancia epidemiológica mediante la Red Nacional de Laboratorios de influenza y otros virus respiratorios permitió la rápida caracterización de las cepas de influenza A H1N1 que produjo la pandemia del año 2009 (Ver Capítulos 14, 59 y 59.1).

El plan de contingencia para este tipo de eventualidades tiene un enfoque multi-sectorial. Plantea: reforzar la vigilancia epidemiológica (humana y animal), fortaleciendo la vigilancia virológica de influenza y la capacidad de diagnóstico de laboratorio; regularizar la restricción de viajes o cuarentena; promover e implementar medidas de control de infecciones; manejo de contactos y clínico de los casos; preparación de la red asistencial de salud para la entrega de atención médica; así como, establecer las medidas de difusión y comunicación que requiere una emergencia con las características de una pandemia.

Bibliografía

- Anderson RM, May RM. Infectious diseases of humans. Dynamics and control, Oxford: Oxford University Press, 1991.
- Atmar RL, Baxter BD, Dominguez EA, Taber LH. "Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus". *J Clin Microbiol* 1996; 34:2604-6.
- Giesecke J. Modern infectious disease epidemiology. 2ª ed. Oxford, Oxford University Press, 2001.
- Halloran ME. Concepts of transmission and dynamics. En: Thomas JC, Weber DJ, eds. Epidemiologic methods for the study of infectious diseases. Oxford, Oxford University Press, 2001; 56-85.
- Kleinbaum D, Kupper L, Mörgenstern H. Epidemiologic Research. Principles and quantitative methods. Lifetime Learning Publ. California, 1982.
- Musher DM. "How contagious are common respiratory tract infections?" *N Eng J Med* 2003; 348:1256-66.



Los patógenos virales humanos

Infecciones respiratorias de origen viral: Impacto y diagnóstico etiológico

Guadalupe Carballal - Marcela Echavarría

1. DEFINICIONES

Los virus productores de **Infección Respiratoria Aguda (IRA)** penetran por la mucosa del tracto respiratorio, replican en él y producen cuadros respiratorios de diferente gravedad. La infección ocurre habitualmente por inhalación de aerosoles con gotitas de Flüge o por gotas mayores, contaminadas con secreciones infectadas. Es muy frecuente la auto-inoculación por manos contaminadas o por fomites (mascaras de oxígeno, nebulizadores, pañuelos, etc.) (Figura 13.1).

Los virus respiratorios que pueden producir infección en el ser humano son numerosos (Tabla 13.1). Algunos son conocidos desde hace mucho tiempo (influenza, respiratorio sincicial, adenovirus, rinovirus, parainfluenza, etc.) mientras que otros (metapneumovirus humano, bocavirus, coronavirus HCoV-NL63, SARS, etc.) se descubrieron en los principios del siglo XXI mediante metodologías moleculares. A principios de 2009, se detectó la primer pandemia de influenza de este siglo que fue producida por la emergencia de un nuevo virus influenza A (H1N1).

Las IRA se clasifican en altas o bajas, según afecten al tracto respiratorio superior ó inferior, respectivamente. Las IRA altas afectan los órganos ubicados por encima de la laringe y los cuadros clínicos pueden ser rinitis, laringitis supraglótica, faringitis, sinusitis y otitis. Las IRA bajas afectan los órganos ubicados por debajo de la laringe y los cuadros son: laringitis subglótica, laringotraqueobronquitis, traqueítis, bronquitis, bronquiolitis y neumonía.

La etiología de las IRAs puede ser de diverso origen: viral, bacteriano, por micoplasmas, clamidias, rickettsias, hongos, y con mucha menor frecuencia, parásitos. Pero la causa más frecuente son los virus y las bacterias.

Se debe diferenciar a los virus respiratorios propiamente dichos, de otros que también emplean el tracto respiratorio como puerta de entrada y replican en su mucosa y tejido linfóide pero no quedan allí localizados, sino que se diseminan por viremia a otros órganos (por ejemplo: rubéola, sarampión, parotiditis, viruela, etc)

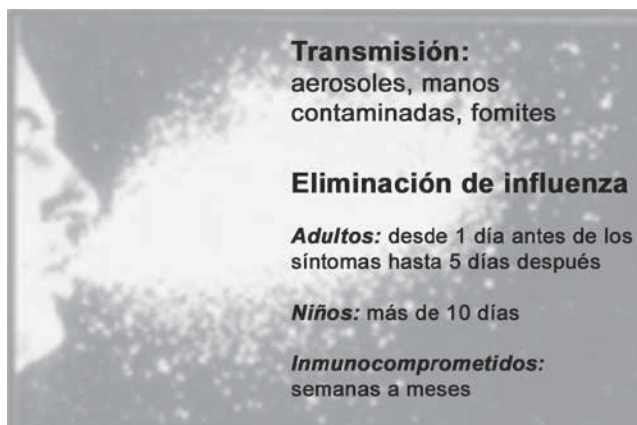


Figura 13.1. Diseminación de virus respiratorios. Ejemplo: influenza.

Este capítulo describe el diagnóstico de los virus causantes de IRA en conjunto. Sus características, cuadros clínicos, epidemiología y diagnóstico específico se tratan en los capítulos correspondientes. La patogenia, mecanismos de defensa y evasión inherentes a estas infecciones se tratan en los Capítulos 5, 7 y 8, respectivamente.

1.1 IMPACTO

Las IRA altas constituyen la mayor causa de morbilidad en el ser humano en todo el mundo, mientras que las IRA bajas son una de las primeras causas de mortalidad en niños menores de 4 años en países en vías de desarrollo.

Los individuos en mayor riesgo de padecer una IRA baja grave de origen viral son: niños pequeños; ancianos; pacientes con enfermedades crónicas e inmunosuprimidos.

Las IRA tienen altos costos directos e indirectos para las familias, los servicios de salud y la comunidad en general.

Es de destacar que el **diagnóstico clínico de estas infecciones no permite asegurar cuál es el agente etiológico, ya que muchos virus pueden producir cuadros clínicos similares.** El diagnóstico rápido y específico de las IRA de origen viral, disponible en la actualidad, tiene un alto impacto en el manejo del paciente y en la prevención de la diseminación de estos virus. Numerosas publicaciones demuestran el costo/beneficio de realizar estos diagnósticos. Por ejemplo, el diagnóstico rápido de virus respiratorios en pacientes internados permite reducir hasta un 50% el tiempo de estadía en el hospital, hasta un 30% el uso de antibióticos y hasta un 20% el empleo de otros procedimientos de diagnóstico innecesarios (Halasa, 2005).

Un ejemplo del impacto de las IRA en los Servicios de Salud lo demuestran los datos publicados para EE.UU. (Henrickson, 2005) durante los años 2003-2004 que registraron:

- En menores de 5 años: 2 880 000 casos de IRA baja de origen viral, por año. De ellos, medio millón requirió hospitalización y 500 fueron casos fatales asociados al virus sincicial respiratorio y 200 a influenza.
- En adultos: 11 millones de casos, de los cuales 208 000 debieron ser hospitalizados. Se registraron 61 000 casos fatales por IRA baja por año (36 000 por influenza y 17 000 por sincicial respiratorio y otros virus).

Para Argentina no existen publicaciones indexadas sobre el impacto de las IRA de origen viral. Sin embargo, se realiza una activa Vigilancia Epidemiológica y los registros sobre la frecuencia y estacionalidad de los virus respiratorios se pueden consultar en el Boletín del Grupo de Vigilancia de influenza y otros virus respiratorios (GROG) o en las páginas web del Ministerio de Salud de la Nación.

El impacto de la pandemia por el nuevo virus influenza A H1N1 se describe en el Capítulo 59.

2. VIRUS RESPIRATORIOS QUE AFECTAN AL SER HUMANO Y NOCIONES DE EPIDEMIOLOGÍA

Los virus respiratorios que pueden afectar al ser humano se muestran en la Tabla 13.1.

<i>Cuadro clínico</i>		<i>Serotipos (S) / genotipos (G)</i>	<i>Vacuna*</i>
<i>Frecuentes</i>			
Rinovirus	IRA alta (resfrío común) y baja	más de 100 S	no
Influenza A y B	Gripe o influenza, e IRA baja	varios subtipos, variaciones antigénicas mayores y menores	sí
Sincicial respiratorio	IRA alta y baja (bronquiolitis del lactante y neumonía -menos frecuente-)	Grupos A y B; varios G muchas variantes antigénicas	en desarrollo
Adenovirus	IRA alta: IRA baja (bronquiolitis necrotizante; neumonía)	S: 1, 2, 3, 5, 6, 7 S: 3, 4, 5, 7, 21, 5	no**
Parainfluenza 1, 2, 3, 4	IRA alta: crup, laringitis, IRA baja	4 S	no
<i>Emergentes a partir del año 2000</i>			
Influenza aviaria	IRA baja grave	H5N1 y otros	sí
Influenza A (H1N1)	Pandémica 2009		sí
<i>Nuevos coronavirus</i>			
NSL63 (grupo I)	IRA alta y baja (menos frecuente)	2 G	no
HKU1 (grupo II)	IRA alta y baja	2 - 3 G	no
SARS	IRA baja severa		en desarrollo
<i>Nuevos paramixovirus</i>			
Metapneumovirus	IRA alta y baja (bronquiolitis, neumonía)	G: A y B: 2 linajes en cada genotipo	no
<i>Nuevos parvovirus humanos</i>			
Bocavirus	IRA alta y baja, diarrea, viremia	¿?	no
PARV4	en estudio		no
<i>Nuevos poliomavirus</i>			
Poliomavirus respiratorio			
Ki/Wu	en estudio		no
<i>Menos frecuentes</i>			
Coronavirus humanos <i>Tradicional</i>			
Grupo 1: 229E	IRA alta	2 S	
Grupo 2: OC43	IRA alta		no
Enterovirus	IRA alta, herpangina, úlceras orales		
ECHO, Coxsackie			no
Epstein-Barr	faringitis		no
Sarampión	IRA alta y baja: crup y bronquiolitis en niños neumonía (menos frecuente)		sí
Parotiditis	IRA baja, poco frecuente		sí
<i>Infrecuentes en población general</i>			
Hantavirus	Síndrome pulmonar por hantavirus	varios G	no
<i>En pacientes inmunocomprometidos</i>			
Herpes simplex	traqueobronquitis, neumonía		no
Citomegalovirus	neumonitis intersticial		no
Varicela-zóster	neumonitis intersticial		sí
Epstein-Barr	neumonitis intersticial		no

Tabla 13.1. Virus productores de infección respiratoria en humanos. * Vacunas disponibles al año 2010. Existe una vacuna atenuada conteniendo los serotipos 4 y 7, que se administra por vía oral al personal militar de EE.UU. y Canadá. **IRA:** infección respiratoria aguda. **S:** serotipo. **G:** genotipo.

Estos virus tienen una distribución universal y ocurren en todos los grupos etarios, aunque son más frecuentes en infantes y niños pequeños.

Presentan un período de incubación corto (1-4 días) y se diseminan de persona a persona por aerosoles o por fomites. La inmunidad contra estos virus no es completa y son frecuentes las reinfecciones. Las sobreinfecciones bacterianas (otitis, sinusitis, traqueobronquitis, neumonía) suelen ser una complicación frecuente de las infecciones inicialmente virales.

Las infecciones respiratorias altas (IRA alta) presentan una alta morbilidad. Se estima que cada niño sufre de 6 a 9 episodios por año, mientras que los adolescentes y adultos padecen de 2 a 4 episodios por año.

En EE.UU. ocurren 1.500 millones de IRA alta por año y, aunque los costos de esas infecciones son difíciles de estimar, existen dos claramente asociados: el exceso de prescripción de antibióticos para infecciones que probablemente no son de origen bacteriano, y el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos.

Las IRA bajas son menos frecuentes pero su costo es mucho mayor. El 1,8% de niños en edad escolar y el 13% de niños en edad preescolar con IRA baja deben ser hospitalizados. El costo económico de las IRA baja en niños internados se ha estimado en 2.400 millones de dólares por año. Asimismo, el 11% de los adultos con IRA baja debe ser hospitalizado.

La epidemiología de los virus respiratorios varía de acuerdo al área geográfica. En los países de clima frío a moderado estos virus suelen producir brotes epidémicos todos los años en los meses más fríos.

En Argentina, los brotes epidémicos por virus sincicial respiratorio se registran todos los años durante el otoño e invierno; los de influenza tienen una similar distribución y, a veces, se extienden hasta la primavera. Los adenovirus y los virus parainfluenza suelen ser más frecuentes en primavera.

En las Figuras de los capítulos 15 y 17 se muestran ejemplos de la estacionalidad de los virus respiratorios en población pediátrica de la ciudad de Buenos Aires.

3. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

El diagnóstico clínico de las infecciones respiratorias no permite precisar la etiología, ya que muchos signos y síntomas son similares en las infecciones virales. Sin embargo, existen algunas asociaciones características. Por ejemplo, los rinovirus y coronavirus se asocian a cuadros de resfrío común, aunque éste puede ser producido por muchos otros virus respiratorios; el virus sincicial respiratorio se asocia a bronquiolitis del lactante, pero puede producir neumonía así como también IRA alta; los parainfluenza se asocian a laringotraqueobronquitis (crup); los virus influenza producen la gripe (influenza), síndrome que tiene una definición precisa (véanse los Capítulos 14, 38 y 59), pero este síndrome de influenza o enfermedad tipo influenza puede ser producido por varios virus respiratorios (sincicial respiratorio, adenovirus, metapneumovirus, etc.)

La importancia del diagnóstico etiológico se observa en la Tabla 13.2.

4. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Los diferentes métodos que pueden emplearse para el diagnóstico de virus respiratorios se muestran en la Tabla 13.3.

Es importante recordar que el título de virus en las secreciones respiratorias es más alto en los primeros días del inicio del cuadro clínico, disminuyendo luego rápidamente. Los niños suelen presentar mayores títulos virales en las secreciones respiratorias y eliminan virus durante períodos más prolongados.

Las muestras deben obtenerse en los primeros días del comienzo de los síntomas ya que las posibilidades de detección son menores posteriormente.

Para el diagnóstico de virus respiratorios **son de elección los métodos directos** que permiten detectar el virus infeccioso (aislamiento en cultivo), sus antígenos (inmunofluorescencia, ELISAs, etc.) o su genoma (PCR, RT-PCR, PCR en tiempo real). Por el contrario, los métodos serológicos son de escaso valor diagnóstico.

4.1 EL COMIENZO DE UNA NUEVA ERA EN EL DIAGNÓSTICO Y LA EPIDEMIOLOGÍA DE LOS VIRUS RESPIRATORIOS

La emergencia de seis nuevos virus respiratorios en 2001 (metapneumovirus, coronavirus SARS, influenza aviaria H5N1, los nuevos coronavirus HKU1 y NL63 y el bocavirus), y la aparición de la cepa pandémica de influenza A (H1N1) en 2009, representan un enorme desafío para el diagnóstico completo de los virus respiratorios en la actualidad.

La aplicación de técnicas moleculares de exquisita sensibilidad y especificidad a muestras clínicas está ampliando y revolucionando nuestro conocimiento de la epidemiología de los virus respiratorios en los cuadros de IRA alta o baja, en población pediátrica o en adultos, tanto en pacientes ambulatorios como en internados. Por ello, podemos afirmar que estamos en los comienzos de **una nueva era en el diagnóstico y epidemiología de los virus respiratorios.**

Así, publicaciones recientes han demostrado –mediante el empleo de técnicas moleculares– que la frecuencia de detección de los rinovirus es mucho mayor que la conocida previamente. Algunos estudios demostraron que los rinovirus son el segundo virus en frecuencia en cuadros de IRA baja, después del sincicial respiratorio; además, se postula su importante papel en el desarrollo de cuadros asmáticos (véase el Capítulo 58).

El empleo de técnicas moleculares ha permitido demostrar infecciones múltiples (con uno, dos o más virus en la misma muestra). Eso ha sido observado especialmente con el bocavirus. En un futuro próximo, la cuantificación del material genómico viral en las muestras respiratorias mediante técnicas de PCR en tiempo real contribuirá a un mejor conocimiento de la patogenia de estas infecciones.

El diagnóstico de laboratorio es necesario para:

- Identificar infecciones por eubacterias, clamidias o micoplasmas que requieren tratamiento antibiótico
- En casos de infección viral:
- Evitar el uso indiscriminado de antibióticos, que serán ineficaces, de alto costo y cuyo uso inadecuado contribuye a aumentar la resistencia bacteriana
- Disminuir el empleo de otros procedimientos diagnósticos
- Realizar el aislamiento de los pacientes en cohortes
- Adoptar medidas de higiene para evitar la diseminación intra-hospitalaria o intra-familiar del virus
- En infecciones por virus influenza administrar antivirales específicos
- En infecciones por virus sincicial respiratorio y, en casos seleccionados, administrar antivirales específicos
- En todos los casos, conocer la situación epidemiológica en una comunidad y las cepas virales circulantes, lo que es importante en relación a futuras vacunas
- El descubrimiento de nuevos patógenos: el empleo de nuevas metodologías moleculares en muestras conservadas en el laboratorio que fueron negativas para los virus conocidos en un momento dado, ha permitido, posteriormente, el descubrimiento de nuevos virus como el metapneumovirus, bocavirus, nuevos coronavirus, etc.

Tabla 13.2. Importancia del diagnóstico etiológico en las infecciones respiratorias.

4.2 MUESTRAS: OBTENCIÓN

Las muestras para diagnóstico de infecciones respiratorias de origen viral se indican en la Tabla 13.4. Es de gran importancia obtener estas muestras tempranamente en los primeros 5 días de enfermedad, siendo lo óptimo 3 días desde el inicio de los síntomas, ya que el título de virus en las secreciones disminuye posteriormente.

Las metodologías de obtención de las muestras deben ser cuidadosamente enseñadas a médicos, residentes, enfermeras y **laboratoristas** ya que de su correcta obtención depende el éxito del diagnóstico. Existen numerosos equipos comerciales para obtención de muestras, muchos disponibles en nuestro medio (Figura 13.2 y Figura 13.3).

El aspirado nasofaríngeo (ANF) es la muestra de elección, ya que los virus respiratorios replican en el tejido linfóide de la nasofaringe y el mucus contiene gran cantidad de células con antígenos virales que se podrán detectar con los ensayos rápidos.

El ANF se obtiene mediante la introducción por las fosas nasales de una sonda nasogástrica (K 30 ó 33) conectada a un recipiente colector y éste a una bomba de vacío con la que se realiza la aspiración (Figura 13.3). Es un procedimiento incruento pero requiere un entrenamiento previo.

El ANF se emplea para pacientes internados. Para pacientes ambulatorios otras muestras de más fácil obtención y que dan

resultados adecuados son, en orden de importancia, los hisopados nasofaríngeos con hisopos flexibles y los hisopados nasales y faríngeos combinados.

Los hisopados nasales y faríngeos pueden obtenerse con hisopos usuales (con mangos rígidos de madera o plástico) pero para los nasofaríngeos se requiere un hisopo con mango flexible. En todos los casos es necesario rotar el hisopo sobre las mucosas nasal o **faríngea** para obtener células infectadas.

Actualmente, se encuentran disponibles nuevos hisopos con mangos flexibles que contienen un pequeño cepillo de nylon, en vez de un hisopo tradicional. Este elemento permite obtener excelentes muestras respiratorias con facilidad, y mínimas molestias para el paciente, aunque es necesario un entrenamiento previo para su obtención. Está disponible un video en castellano sobre la obtención de hisopados nasofaríngeos (*véase Bibliografía*).

El esputo no es una muestra adecuada, aunque ocasionalmente, es posible detectar virus en ella. Los lavados nasales son útiles, de obtención algo dificultosa y requieren la cooperación del paciente.

Los lavados broncoalveolares o las biopsias de pulmón son **muestras adecuadas pero de obtención cruenta**, por lo que se utilizan solamente cuando la gravedad del caso lo justifica.

Los procedimientos de obtención de muestras respiratorias y las medidas de bioseguridad que debe adoptar el operador se detallan en el Capítulo 59.

Métodos directos	
Patrón clásico (Gold standard)	
Detección de virus infeccioso:	Aislamiento en cultivo celular: acción citopatogénica más identificación de antígenos por IF u otras técnicas*
Rápidos	
Detección de antígenos:	IF, ELISAs, ELISA de membrana, inmunoensayos ópticos, inmunocromatografía
Postulado como nuevo patrón (Gold standard)	
Detección de ácidos nucleicos:	PCR: para virus individuales, RT-PCR: para virus individuales, PCR o RT-PCR: <i>multiplex</i> artesanales o comerciales, PCR en tiempo real
Métodos indirectos	
Detección de anticuerpos:	Escaso valor para diagnóstico individual pero útil para estudios epidemiológicos

Tabla 13.3. Métodos de diagnóstico de virus respiratorios. IF: inmunofluorescencia; **ELISA**: enzimoimmunoensayo; **PCR**: reacción en cadena de la polimerasa; **RT-PCR**: PCR previa transcripción inversa. * Otras técnicas incluyen: hemaglutinación, hemadsorción, o técnicas moleculares.

Muestras	Para internados	Pacientes ambulatorios
Habituales		
Aspirado nasofaríngeo (ANF)	Sí	
Hisopado nasal y faríngeo combinado (HN y HF)	Sí	Sí
Hisopado nasal (HN), hisopado nasofaríngeo	Sí	Sí
Lavados nasales	Sí	Sí
Sólo si la gravedad del caso lo justifica:		
Lavado broncoalveolar (LBA)	Sí	
Aspirado traqueal	Sí	
Líquido pleural	Sí	
Biopsias de pulmón	Sí	

Tabla 13.4. Muestras para diagnóstico de virus respiratorios. Las muestras deben obtenerse dentro de los 5 días del comienzo del cuadro. Lo óptimo son 3 días.



Figura 13.2. Equipos para obtención de muestras respiratorias.

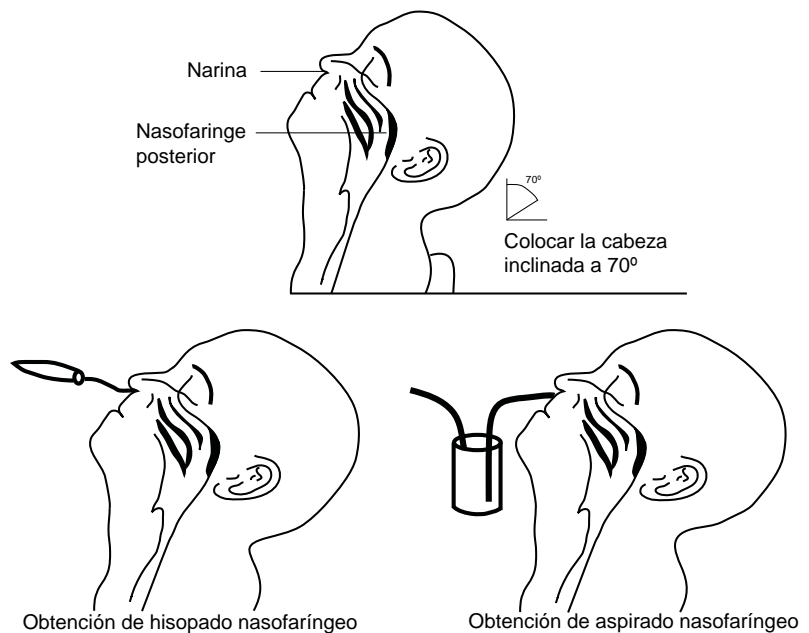


Figura 13.3. Obtención de muestras respiratorias. Arriba: posición de la cabeza del paciente para obtención de muestras respiratorias. / Abajo izquierda: para la obtención del hisopado nasofaríngeo debe emplearse un hisopo flexible que se introduce hasta la nasofaringe y se rota suavemente. Luego se coloca en un tubo con medio de transporte o solución fisiológica según se solicite aislamiento viral o detección de antígenos o técnicas moleculares, respectivamente. / Abajo derecha: para la obtención del aspirado nasofaríngeo se emplea una sonda flexible conectada a un tubo colector y éste a una bomba de vacío. El mucus aspirado se recoge en el tubo colector. Luego de retirar la sonda, ésta se lava (con medio de transporte o solución fisiológica) para arrastrar todo el mucus que queda en la misma.

4.3 CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Las muestras para virus respiratorios deben conservarse a 4° C y enviarse rápidamente al laboratorio, preferentemente refrigeradas en hielo granizado o con enfriadores de uso doméstico **para evitar** la inactivación térmica de los virus si el tiempo de transporte es mayor a una hora.

Esto es especialmente importante cuando se solicita un diagnóstico por aislamiento ya que en este caso se requiere **virus viable** en la muestra. Algunos virus, como el sincicial respiratorio, son sumamente lábiles a temperatura ambiente por lo que el envío rápido y a 4° C es muy importante.

Si se solicita aislamiento en cultivo es indispensable que la muestra se coloque en medio de transporte para virus. Estos medios contienen proteínas para preservar la infectividad, antibióticos y antimicóticos para evitar la contaminación bacteriana y fúngica.

Si se solicita solamente detección de antígenos, o técnicas moleculares y no se dispone de medio de transporte para virus, la muestra puede ser enviada en solución fisiológica. En este caso el envío a 4° C no es indispensable si el tiempo de transporte de la muestra es menor a 2 h. De todas formas, es importante conservar las muestras en heladera hasta el momento de su envío.

Habitualmente, cada laboratorio prepara los tubos con medio de transporte o solución fisiológica, los que deben conservarse a 4° C con indicación de su fecha de vencimiento.

Existen elementos para la obtención y transporte de muestras de origen comercial que contienen el medio de transporte en ampollas y los hisopos correspondientes pero son de alto costo (Figura 13.2).

4.4 TIEMPO DE ESPERA DE RESULTADOS

El tiempo de espera del resultado depende de la técnica empleada. El aislamiento en cultivo puede tardar 7 ó más días. Los ensayos rápidos de detección de antígenos por inmunofluorescencia tienen el tiempo necesario para la tinción y lectura de la muestra (2-3 h.). A esos tiempos debe añadirse el tiempo requerido para la preparación previa de la muestra en los portaobjetos y su fijación en acetona.

Los ensayos rápidos de inmunocromatografía y otros pueden realizarse en 30 min., aunque su sensibilidad es menor a la de otras técnicas.

Las técnicas de PCR y de RT-PCR pueden tardar 1-2 días mientras que las PCR en tiempo real y algunos de los nuevos ensayos moleculares se pueden realizar en 5-6 h.

Es necesario tener en cuenta que, además del tiempo de procesamiento, debe considerarse el tiempo de transporte al laboratorio, la recepción de la muestra, su procesamiento previo, la realización de la técnica elegida, su lectura y, finalmente el ingreso del resultado en el sistema informático y la validación del mismo.

5. AISLAMIENTO EN CULTIVO

5.1 EN CULTIVO CLÁSICO

El aislamiento es el ensayo patrón (*gold standard*). Sin embargo, dada la gran variedad de virus respiratorios potencialmente involucrados en un cuadro respiratorio, se requieren diferentes tipos de cultivos celulares y de métodos de detección posteriores a la aparición de la acción citopática (ACP). Por ello, el aislamiento de virus respiratorios es el procedimiento más complejo de todos los de aislamiento viral. Además de la infraestructura para cultivos celulares y de personal entrenado se requiere de virus viable en la muestra. Por esta razón, el

envío al laboratorio debe realizarse en medio de transporte para virus y refrigerado a 4° C si el tiempo de transporte es superior a una hora.

Los procedimientos de aislamiento incluyen el cultivo convencional (en tubos o policubetas), el cultivo rápido (*shell vial*) y la inoculación en huevos embrionados. Este último procedimiento se empleaba para virus influenza pero ya no se utiliza debido a que los cultivos celulares disponibles tienen una sensibilidad similar.

Los diferentes tipos de células que pueden emplearse para aislar la mayoría de los virus respiratorios, excepto los coronavirus y bocavirus, se indican en la Tabla 13.5.

En resumen, el procedimiento de aislamiento consiste en: 1) cultivar las diferentes células en tubos o policubetas y mantenerlas a 37 °C; 2) inocularlas con la muestra previamente decontaminada e incubarlas a 37° C para sincicial respiratorio, adenovirus y parainfluenza y a 33-34° C para influenza y rinovirus. 3) observar los cultivos diariamente al microscopio invertido para la detección de la ACP; 4) cambiar el medio de cultivo cada 2-3 días; 5) una vez detectada la ACP, puede identificarse el aislamiento por hemaglutinación, hemadsorción, IF o por métodos moleculares.

El tiempo requerido para un aislamiento varía de acuerdo al virus y a su título en la muestra. En general, el tiempo para un resultado varía entre 2 a 14 días.

Un ejemplo del procesamiento de muestras para virus respiratorios por los diferentes métodos se puede observar en la Figura 13.4. Las ventajas y desventajas del aislamiento en cultivo se indican en la Tabla 13.6.

5.2 AISLAMIENTO EN CULTIVO RÁPIDO

El cultivo rápido combina el aislamiento (en células crecidas sobre cubreobjetos en tubos de fondo plano) más la identificación por IF de los antígenos virales en las células en cultivo aún antes de la aparición de la ACP, lo que permite un diagnóstico mucho más rápido que el cultivo convencional. Los resultados están disponibles en 24- 48 h. versus 1-2 semanas en el método clásico (Ver capítulo 9 *Diagnóstico virológico*). Dado que también requiere virus viable, las condiciones del envío de la muestra son idénticas a las mencionadas más arriba.



Cultivos	Virus que detecta
Cultivos primarios de riñón de mono	Influenza*, parainfluenza, adenovirus
Líneas continuas	
MDCK (Madin Darby, riñón de perro)	Influenza
LLC-MK2 (Riñón de mono rhesus)	Parainfluenza, metapneumovirus
HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe)	Sincicial respiratorio, adenovirus
HeLa (carcinoma de cérvix)	Sincicial respiratorio, adenovirus
A549 (carcinoma de pulmón)	Adenovirus
Líneas diploides	
Fibroblastos de embrión humano	
MRC-5	Rinovirus*, sincicial respiratorio
WI-38	Rinovirus*, sincicial respiratorio
Mezclas de líneas celulares**	
R-Mix: A549 + Mv1Lu	Varios virus

Tabla 13.5. Cultivos empleados para diagnóstico de virus respiratorios. El aislamiento de influenza, parainfluenza y metapneumovirus requiere medios de cultivo sin suero y con tripsina (ver capítulos respectivos) * Cultivo a 33-34° C / ** En EE.UU. se obtienen varias mezclas de líneas celulares preparadas y distribuidas por empresas comerciales, no disponibles en Argentina.

**6. MÉTODOS DIRECTOS Y RÁPIDOS:
DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES**

6.1 INMUNOFLUORESCENCIA (IF) (FIGURA 13.5 Y TABLA 13.7)

El fundamento del método es la detección directa de los antígenos virales en las células epiteliales presentes en las secreciones respiratorias. La muestra debe obtenerse tempranamente en el curso de la infección, de preferencia a los 3-4 días del comienzo del cuadro clínico, y la técnica de obtención debe ser adecuada para obtener células infectadas ya que si no contiene suficientes células, será inadecuada y el diagnóstico será falsamente negativo. Por esta razón es importante entrenar a los médicos, residentes, enfermeras y personal de laboratorio en la correcta metodología de obtención de las muestras.

La IF es la técnica de elección para la detección de varios virus respiratorios (influenza, parainfluenza, sincicial respiratorio). Por el contrario, su sensibilidad para Adenovirus es baja y está en estudio para metapneumovirus. Para los restantes virus respiratorios no existen aún reactivos para IF. En 2010 se desarrolló un anticuerpo monoclonal específico para influenza A (H1N1).

La técnica de IF puede ser directa, es decir, los anticuerpos monoclonales específicos para cada virus están marcados con fluoresceína; o indirecta, en la que los anticuerpos monoclonales antivirales específicos no están marcados y se emplea, en un segundo paso, un anticuerpo anti-especie marcado con fluoresceína (anti-Igs de ratón; véase el Capítulo 9 *Diagnóstico virológico*).

La IF directa requiere sólo 30 minutos para la tinción, a diferencia de la IF indirecta que requiere de una y media a dos horas, incluyendo el lavado. A estos tiempos debe añadirse la preparación previa de la muestra y la lectura al microscopio de IF.

Existen reactivos para IF directa que combinan dos anticuerpos específicos marcados con diferentes colorantes fluorescentes, lo que permite la detección simultánea y directa de dos antígenos virales distintos al mismo tiempo.

Aunque la IF continúa siendo la técnica más sensible y específica de todos los métodos rápidos, es también la más demandante técnicamente y requiere personal especializado para su realización y, sobre todo, para la interpretación de su lectura al microscopio de luz ultravioleta.

Brevemente, debe disgregarse el mucus respiratorio y las células contenidas en la secreción deben ser resuspendidas mediante lavados y centrifugación. Luego, son depositadas sobre círculos marcados sobre portaobjetos especiales. Tras el secado, son fijadas con acetona fría y finalmente se realiza la tinción de IF. También puede emplearse la cito-centrifugación sobre portaobjetos, procedimiento más laborioso pero que permite una mejor calidad en las imágenes.

La lectura de la IF es subjetiva, por ello debe ser realizada por personal entrenado. Las imágenes de los antígenos virales teñidos con los anticuerpos específicos son intracelulares y deben estar en las células adecuadas y en el lugar adecuado (en el núcleo para los adenovirus; en el citoplasma para el virus sincicial respiratorio, o en ambos sitios para influenza). La morfología del antígeno suele ser granular de diferente tamaño y de color verde manzana brillante, que se produce por la excitación de la fluoresceína –que se encuentra marcando los anticuerpos– por la luz ultravioleta que emite la lámpara del microscopio. Las imágenes se observan sobre un fondo rojo del colorante de contraste (azul de Evans). El observador debe diferenciar estas imágenes características de los artefactos producidos por detritus celulares, leucocitos, etc., y deben observarse al menos dos células con las inclusiones características para poder realizar un diagnóstico.

Además, es fundamental realizar controles de calidad de: 1) registro de los anticuerpos monoclonales y de los antiseros marcados, empleados en el laboratorio; 2) calidad y título de los anticuerpos monoclonales mediante titulación sobre células infectadas con virus conocidos; 3) entrenamiento del personal que realiza la lectura mediante preparaciones positivas o negativas; 4) incluir diariamente controles positivos y negativos; 5) registro del tiempo de uso de la

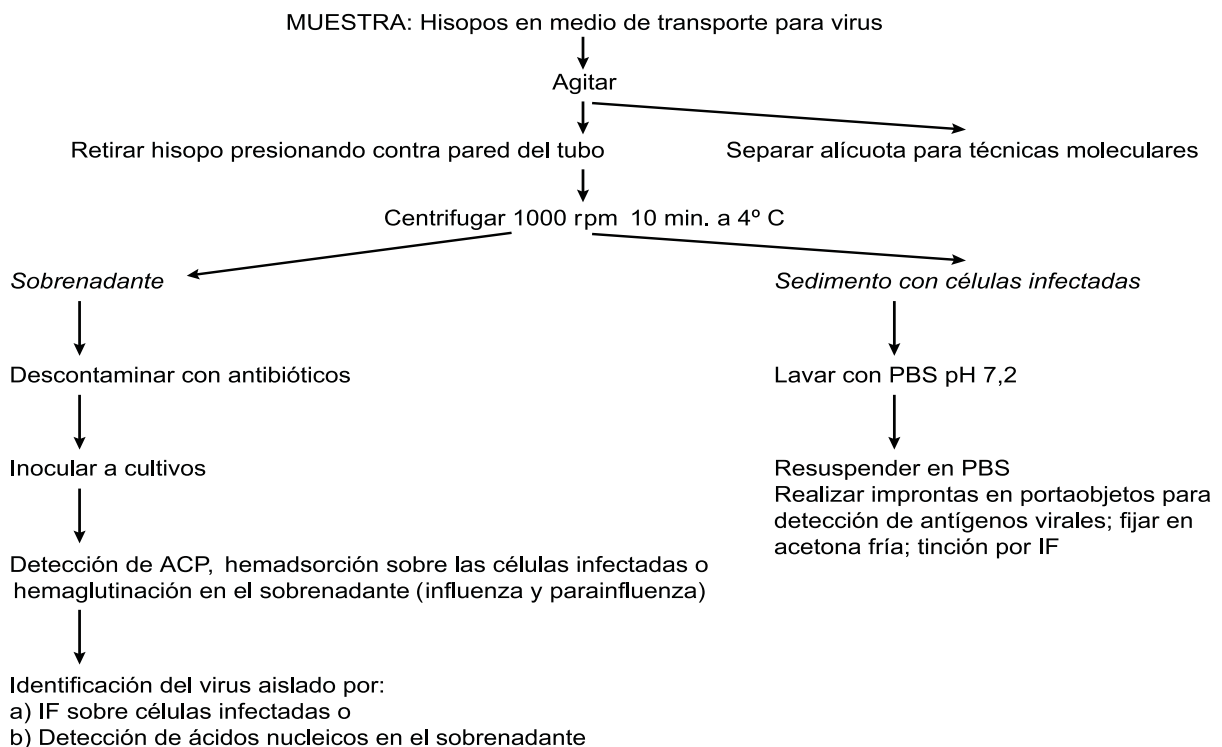


Figura 13.4. Algoritmo para el procesamiento de muestras para diagnóstico de virus respiratorios. PBS: solución salina tamponada. **IF:** inmunofluorescencia. **ACP:** acción citopática.

Este algoritmo se emplea para los virus fácilmente cultivables (influenza, parainfluenza, respiratorio sincicial, adenovirus). Para los virus de difícil cultivo (rinovirus, metapneumovirus) o para aquellos no cultivables (bocavirus, coronavirus, etc.) se están estableciendo nuevos algoritmos diagnósticos basados en el empleo de técnicas moleculares.

Ventajas	Desventajas
<p>Es la técnica patrón (gold standard) Permite obtener la cepa viral Puede permitir la identificación de nuevos virus</p>	<p>Requiere: Infraestructura para cultivos celulares Tiempo para preparación de los tubos con cultivos Laboratorios de mediana complejidad Personal altamente entrenado Largo tiempo de procesamiento Transporte rápido de la muestra en medio de transporte para virus y refrigerada para mantener la viabilidad Alto costo Procedimiento lento: 1-2 semanas Los resultados no están disponibles en tiempos clínicamente relevantes Algunos virus son de propagación difícil y otros no son cultivables</p>

Tabla 13.6. Ventajas y desventajas del aislamiento en cultivo.

Ventajas	Desventajas
<p>Técnica rápida: 2-3 h. Bajo costo Se puede observar la calidad de la muestra Se pueden detectar varios virus simultáneamente No requiere virus viable</p>	<p>Sensibilidad depende de la calidad de los monoclonales y de la muestra La lectura es subjetiva Requiere un microscopio de IF de calidad Requiere personal altamente entrenado y el uso de controles</p>

Tabla 13.7. Ventajas y desventajas de la Inmunofluorescencia.

lámpara de luz ultravioleta del microscopio; y 6) se debe contar con manuales de procedimientos.

6.2 ENZIMOINMUNOENSAYOS (ELISAs)

Los numerosos ensayos de ELISA disponibles (tanto comerciales como artesanales) para detección de virus respiratorios permiten detectar antígenos dentro o fuera de las células y su sensibilidad es similar a la de la IF.

El procedimiento consiste en una fase sólida (celda de poliestireno, o perla, o tubo) sobre cuya superficie se adsorbe un anticuerpo específico antiviral (anticuerpo de captura). Luego se añade la muestra clínica. Si ésta contiene antígeno viral se unirá al anticuerpo de captura y se detectará mediante otro anticuerpo marcado con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina o biotina-avidina). Luego de un lavado cuidadoso para eliminar el anticuerpo marcado no combinado con el antígeno se añade el sustrato de la enzima. El desarrollo de color puede observarse visualmente o, de preferencia, con un colorímetro. A mayor cantidad de antígeno en la muestra más intenso será el color observado.

Ventajas: Puede ser realizado por personal menos especializado que el requerido para la IF; puede adaptarse a equipos semiautomatizados que permiten un procesamiento rápido de un gran número de muestras. Existen varios ELISAs en policubetas para influenza, sincicial respiratorio, metapneumovirus y adenovirus con alta sensibilidad y especificidad. Los distintos formatos de ELISA se detallan en el capítulo 9.

La mayor desventaja de los ELISAs en relación a la IF es que **en los ELISAs no es posible evaluar la calidad de la muestra**. Por lo tanto, si ésta carece de células por obtención defectuosa, el resultado será falsamente negativo.

6.3 OTRAS NUEVAS TÉCNICAS RÁPIDAS: ELISA DE MEMBRANA, INMUNOENSAYOS ÓPTICOS (OIA); INMUNOCROMATOGRAFÍA

Hace algunos años, se han desarrollado numerosos equipos comerciales para detección rápida de antígenos virales. Sus ventajas son su fácil utilización; no requieren de personal especializado ni equipamiento especial y el resultado se logra en 30 min. Por ello resultan muy

útiles al pie de la cama del paciente, en consultorios de emergencia, de pediatría, etc.

Desventajas: su sensibilidad y su especificidad son mucho menores que las de los demás métodos (18-70%). Por ello, su empleo es aceptable solamente durante períodos epidémicos. Si el resultado es negativo debe intentarse el aislamiento en cultivo u otros métodos. Otra gran desventaja es el elevadísimo costo de estos equipos.

Los equipos disponibles son: ELISA de membrana, Inmunoensayos ópticos (*optical immunoassays* –OIA); e Inmuncromatografías o Flujo Lateral.

ELISA de membrana. Permite la detección rápida de antígenos virales sobre una membrana, como fase sólida, contenida en una caja plástica (*cassette*). Luego de la aplicación de la muestra, se añade el anticuerpo antiviral marcado con una enzima y finalmente el sustrato de la misma. Esto resulta en un cambio de color en la membrana si existe el antígeno viral en la muestra. La lectura es visual. Existen equipos comerciales para Influenza A y B y para virus sincicial respiratorio. Por ejemplo: *Becton Dickinson Directigen Influenza A and B*.

Inmunoensayos ópticos (*Optical immunoassays* –OIA). Mediante el empleo de un disco de silicón en lugar de una membrana, los ELISAs fueron modificados a un inmunoensayo óptico (OIA).

La unión del complejo antígeno/anticuerpo y la acción de una enzima sobre el sustrato produce cambios de masa en las características ópticas del disco, lo que resulta en un cambio en el color de la luz reflejada. Existen técnicas disponibles para sincicial respiratorio e influenza A y B. Estos métodos requieren algún entrenamiento del personal y se realizan en 30 min. Su sensibilidad y especificidad son menores que la del aislamiento en cultivo.

Como ejemplos podemos mencionar al *Optical Immunoassay*, *Thermo Electron Corporation*, *Biostar OIA Influenza A and B antigen*, entre otros.

Inmuncromatografía o flujo lateral. El sistema contiene una tira de nitrocelulosa con anticuerpos antivirales conjugados a partículas visualizadoras, contenida en una *cassette* plástico. Al añadir la muestra del paciente, ésta fluye por la tira porosa. Los anticuerpos antivirales no marcados capturan el antígeno viral. Luego, los anticuerpos antivirales marcados reaccionan y producen una línea coloreada visible. Se han desarrollado equi-

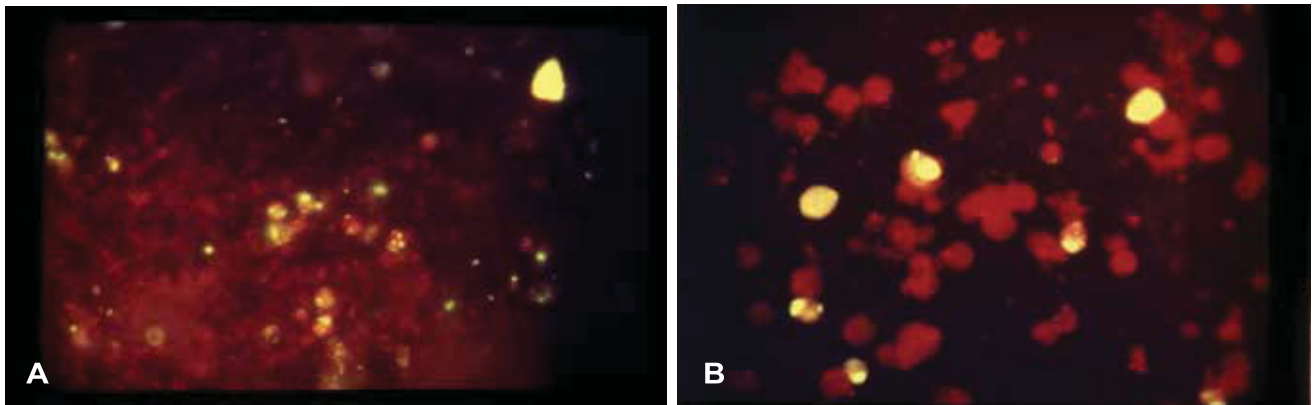


Figura 13.5. Inmunofluorescencia indirecta para virus respiratorios en muestras de aspirados nasofaríngeos. A: Se observan imágenes granulares intracitoplasmáticas características del virus sincicial respiratorio por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales en un aspirado de un niño con bronquiolitis. B: Se observa antígeno de adenovirus de ubicación intranuclear por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales en células de aspirado nasofaríngeo de un niño con neumonía.

pos para sincicial respiratorio e influenza A y B. El resultado se obtiene en 30 min. y no requiere equipamiento especial ni técnicos especializados.

Las desventajas son su elevado costo y que no es posible evaluar la calidad de la muestra. Además, su sensibilidad es menor comparada con el aislamiento en cultivo. Algunos ejemplos son: *Membrane Flow-Through (BD Directigen RSV, Directigen Influenza A y B)*, *Lateral Flow (Meridian Immunocard STAT RSV)*, *BD RSV EZ*, *Binax RSV*.

La sensibilidad de estos procedimientos rápidos para influenza pandémica se detallan en el capítulo correspondiente.

Actualmente, la incorporación de las técnicas moleculares con amplificación ha permitido rediseñar nuevos algoritmos para el diagnóstico de los virus respiratorios, si bien los procedimientos clásicos aún continúan siendo empleados.

7.1 PCR INDIVIDUALES (FIGURA 13.7 A)

Se han diseñado numerosas PCRs artesanales (*in house*) para diagnóstico de todos los virus respiratorios. Se pueden amplificar diversos genes, o áreas de los mismos, altamente conservados. Por ejemplo: para virus sincicial respiratorio (gen de la polimerasa); para influenza A (gen de la proteína de matriz), para influenza B (gen de NS1), para parainfluenza 1, 2, 3 y 4 (gen HN), para adenovirus (gen del hexón o pentón), para metapneumovirus (gen de la nucleoproteína u otros), etc.

Los detalles técnicos (genes, secuencias de *primers*, condiciones de ciclado, etc.) se encuentran en la bibliografía especializada.

Sin embargo, a pesar de las ventajas de su alta sensibilidad y especificidad, la realización de estas PCRs en forma individual para numerosos virus en la misma muestra con fines diagnósticos es un procedimiento laborioso (1-2 días) ya que es necesario en una primera etapa extraer el DNA o RNA viral, realizar la amplificación por PCR o por RT-PCR y, finalmente, detectar los productos amplificados.

Los procedimientos de detección de los productos amplificados pueden ser: a) gel de agarosa, tinción con bromuro de etidio y observación bajo luz ultravioleta de la banda de peso molecular esperado; b) documentación con cámara digital; c) hibridación con sondas específicas y marcadas con enzimas o con isótopos radiactivos y posterior detección por ELISA o por *Southern Blot*, respectivamente.

PCR múltiples (*multiplex*): En los comienzos del siglo XXI debido a la necesidad de detectar varios virus simultáneamente, se han desarrollado numerosas PCR o RT-PCR en formato *multiplex* que permiten la identificación simultánea de varios virus respiratorios en la misma muestra, mediante la utilización y sondas de detección de diferentes *primers*.

7.2 PCR MÚLTIPLES

En la actualidad, existen varias PCRs múltiples tanto artesanales como comerciales.

Artesanales: En 2007, Frymuth F y col. desarrollaron en Francia cuatro PCRs múltiples para detección de varios virus respiratorios en la misma muestra. Una de ellas detecta influenza A, B, metapneumovirus y sincicial respiratorio; una segunda, detecta los 4 serotipos de virus parainfluenza; una tercera detecta los rinovirus, enterovirus y coronavirus; y, una cuarta identifica todos los coronavirus.

7. TÉCNICAS MOLECULARES (TABLA 13.9)

Desde comienzos del siglo XXI, el extraordinario desarrollo de técnicas moleculares para la identificación de nuevos virus (Tabla 13.1), así como la aplicación de técnicas de amplificación de los genomas virales en muestras clínicas para los virus conocidos han revolucionando el conocimiento sobre los virus respiratorios.

Por ello, estamos ante una nueva era en la epidemiología de los virus respiratorios detectados por medio del empleo de la tecnología molecular con amplificación.

Así, se están rediseñando las frecuencias previamente conocidas de detección de virus en diferentes poblaciones (pediátrica o adulta), en cuadros de IRA alta o baja; se está comenzando a detectar la presencia de coinfecciones (2 ó 3 virus diferentes en la misma muestra), cuyas implicancias en la patogénesis y en la gravedad del cuadro clínico se desconocen al momento; se está comenzando a cuantificar por medio de PCR en Tiempo Real los genomas presentes en una muestra. ¿Cuál será la carga viral asociada o predictora de IRA baja, o asociada a mayor gravedad del cuadro clínico? ¿Cómo contribuyen las coinfecciones con más de un virus a la gravedad del cuadro?

Ventajas: Las técnicas moleculares con amplificación presentan una mayor sensibilidad y especificidad en relación al cultivo celular (patrón clásico o *gold standard*) para el diagnóstico de los virus respiratorios cultivables. Para aquellos virus no cultivables o de muy difícil cultivo, las técnicas moleculares están siendo postuladas como nuevos procedimientos patrones.

Otra ventaja es que la detección y amplificación de genomas no requiere de virus viable en la muestra lo que simplifica el transporte de las mismas. Asimismo, esas técnicas son útiles aun cuando la carga viral en la muestra es baja.

Desventajas: La principal desventaja es el alto costo de los reactivos y de los equipos, especialmente en nuestro medio. Otras son la necesidad de personal entrenado; el tiempo necesario para realizar las PCR individuales; la carencia, en muchos casos, de reactivos para control de calidad de los procedimientos artesanales y/o de reactivos comerciales (Tabla 13.9).

Técnica	Tiempo	Sensibilidad	Ventajas	Desventajas
Aislamiento	2-7 días	100% Gold standard	Obtención de la cepa; tipificación	Laborioso Personal entrenado en cultivo celular
Inmunofluorescencia	2-3 h.	50-90%	Vigilancia de influenza A y B Diagnóstico de rutina rápido	No permite obtener la cepa Microscopio de IF de calidad
Inmunocromatografía EIAs en cassette	15-30 min.	18-70%	Vigilancia de influenza A y B; rápido	No permite obtener la cepa Alto costo
RT-PCR	1-2 días	95-100%	Vigilancia de influenza A y B	Personal entrenado; alto costo
RT-PCR en Tiempo Real	4-5 h.	98-100%	Diagnóstico y vigilancia	Personal entrenado; costo

Tabla 13.8. Sensibilidad y especificidad, tiempo de espera de resultados y ventajas y desventajas de las diferentes técnicas para diagnóstico de virus influenza. Al tiempo indicado debe añadirse el tiempo de procesamiento previo de la muestra.

Comerciales: Varias empresas de diagnóstico han desarrollado ensayos moleculares para la detección de un Panel de virus respiratorios, denominado RVP (Respiratory Virus Panel) que permite detectar al menos 12 virus respiratorios en una misma muestra.

Algunos de estos nuevos ensayos son, por ejemplo: el *xTAG RVP Assay*, de *Luminex Molecular Diagnostics* (éste fue el primero de los ensayos múltiples aprobado por la FDA, EE.UU.); entre muchos otros podemos mencionar a: *ResPlex II*, de Qiagen; *Multicode-PLx*, de *EraGen Bioscience*, etc.

La sensibilidad de todos ellos es alta, aunque existen variaciones que dependen del virus analizado. Estos procedimientos varían de acuerdo al tipo de química utilizado para la detección de los productos amplificados, los pasos de los análisis, la hibridación y el número de enzimas utilizadas. Algunos son más laboriosos y los resultados pueden demorar hasta 8 h.

Más recientemente (2009-10), se han diseñado nuevos ensayos de PCR múltiples en los cuales la extracción, amplificación y detección ocurren en un equipo completamente cerrado, lo que disminuye los riesgos de contaminación y resulta menos laborioso. Estos equipos, por ejemplo, el *Film Array Pouch*, de *Idaho Technology*, fue aprobado por la FDA (EE. UU.) a principios del año 2011.

Nuevas técnicas de detección de los amplicones: El *ID Tag Assay*, *Luminex Molecular Diagnosis* emplea un nuevo e innovativo procedimiento de detección.

El ensayo tiene un primer paso de RT-PCR que emplea 14 pares de *primers*; luego, se investigan los amplicones con una reacción de



Figura 13.6. Inmunocromatografía para virus sincicial respiratorio.

extensión (*multiplex target primer extensión –TSPE*) mediante el uso de 21 sondas de oligonucleótidos específicos para los diferentes tipos y subtipos de los 21 virus que se quieren detectar. La hibridación de los productos de TSPE tiene lugar en un microfluído con 21 microesferas marcadas con colorantes fluorescentes. Estas microesferas están recubiertas con sondas específicas para cada virus a detectar. Al añadir los amplicones, estos serán capturados por las microesferas. Luego se añade una molécula marcada con un colorante fluorescente diferente. Las microesferas son analizadas en un nuevo instrumento (*Luminex*) que contiene dos láser, uno de ellos (rojo) excita el colorante interno de la microesfera y el otro (verde) excita la presencia o la ausencia de la extensión de *primers* a través de la molécula marcada.

Otro procedimiento desarrollado hace unos años por una firma francesa permite detectar y realizar la tipificación en especie de los adenovirus. En una primera etapa se detectan por PCR todos los serotipos de este virus y, posteriormente, se identifican las especies por medio de hibridación con sondas marcadas. La reacción se detecta en un formato de ELISA (*Adenovirus Consensus*, *Argene*, Francia).



7.3 PCR EN TIEMPO REAL (FIGURA 13.7 B Y 13.8)

La característica fundamental de las PCR en Tiempo Real consiste en que la amplificación y la detección ocurren simultáneamente. Tanto la sensibilidad como la especificidad de las PCRs en Tiempo Real es similar a las de las PCRs convencionales.

Las PCRs en Tiempo Real pueden estar diseñadas para detectar virus individuales o para múltiples virus. Existen numerosas PCRs en Tiempo Real con diferentes formatos y pueden emplearse para detectar: influenza A ó B, H1N1 pandémica, sincicial respiratorio, adenovirus –todos los serotipos–, virus parainfluenza –1, 2, 3, y 4–, rinovirus, bocavirus, poliomavirus respiratorios, metapneumovirus, coronavirus, SARS, H5N1 aviaria, etc.

La mayor ventaja de las PCRs en Tiempo Real consiste en que la obtención del resultado se puede lograr en pocas horas, es decir en un tiempo clínicamente relevante.

Esto fue ampliamente demostrado durante los inicios de la pandemia por influenza A H1N1, 2009, donde la obtención del resultado en el mismo día de obtenida la muestra fue, en muchos casos, determinante para el manejo del paciente y su entorno.

Amplificación por:

- PCRs directas cualitativas (artesanales-*in house*) para virus a DNA, individuales
- PCRs anidada (*nested*)
- PCR Multiplex comerciales para diferentes virus a DNA
- RT-PCRs artesanales para virus a RNA, individuales
- RT-PCR *Multiplex*, comerciales o artesanales para virus a RNA
- PCRs en tiempo real, artesanales o comerciales para virus individuales o *Multiplex*

Tabla 13.9. Técnicas moleculares para diagnóstico de virus respiratorios.

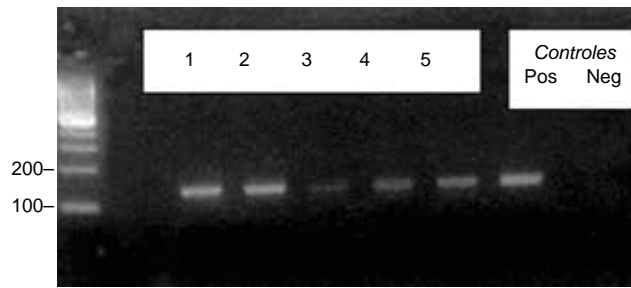


Figura 13.7 A. Técnicas moleculares para diagnóstico de virus respiratorios. Detección de adenovirus por PCR.

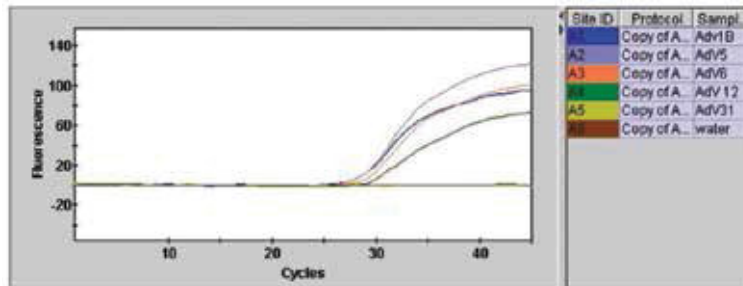


Figura 13.7 B. Técnicas moleculares para diagnóstico de virus respiratorios. PCR en Tiempo Real para detección de diferentes serotipos de adenovirus. Detección de diferentes serotipos de adenovirus por PCR en Tiempo Real. El gráfico con distintas curvas muestra el aumento de fluorescencia -en distintos colores- en función del Ct (ciclo que atraviesa el valor de corte –threshold–). A menor Ct, mayor concentración del genoma viral en la muestra. En el control negativo (agua) no se observa curva. Las diferentes curvas representan la amplificación de los distintos serotipos de adenovirus. Tomado de Echavarría M., Laboratorio de Virología Clínica, CEMIC: *A generic multiplex Real Time PCR for detection of human adenoviruses: Validation with various adenovirus serotypes*, Clinical Virology Symposium, 2005.

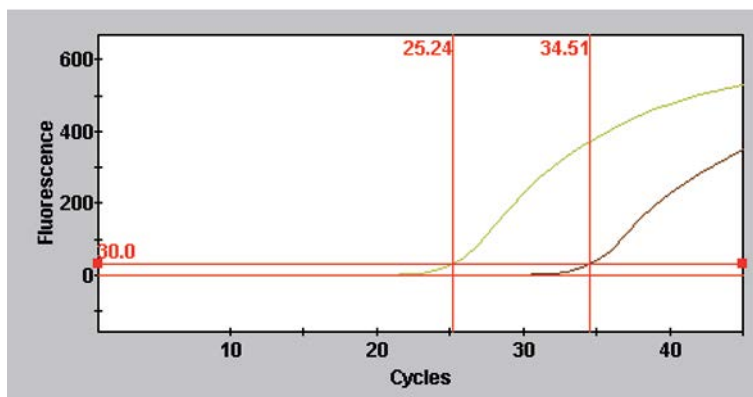


Figura 13.8. Técnica molecular para diagnóstico de virus respiratorios. PCR en Tiempo Real para detección de rinovirus. Se observan dos curvas positivas (obtenidas en el equipo Smart Cyler) correspondientes a dos muestras respiratorias. La muestra que presenta un Ct (ciclo que atraviesa el valor de corte) de 25.24 tiene una mayor carga viral que la muestra con un Ct de 34.51. La línea horizontal representa el control negativo. Laboratorio de Virología Clínica, CEMIC.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad y especificidad • Menor cantidad de la muestra • No requiere virus viable • Permite la detección simultánea de más de un virus • Permite un diagnóstico relativamente rápido: 1-2 días ó 4-5 horas para PCR en tiempo real • Técnicas de reciente desarrollo permiten la detección simultánea de hasta 20 virus diferentes en 5 h. • La PCR en tiempo real permite cuantificar la carga viral presente en la muestra 	<ul style="list-style-type: none"> • Costo de reactivos y equipos • Personal entrenado • No se logra el aislamiento del virus • Riesgo de contaminación si no se cumplen las normas para evitarla • La detección está dirigida a virus específicos • Posibilidad de falsos negativos si hay variaciones en el gen estudiado

Tabla 13.10. Ventajas y desventajas de las técnicas moleculares en relación a los procedimientos convencionales.

8. SEROLOGÍA

Los métodos indirectos son de escaso valor para el diagnóstico de virus respiratorios debido a la presencia habitual de anticuerpos como consecuencia de infecciones previas, lo que dificulta el diagnóstico por medio de la conversión serológica. Además, en el caso de niños pequeños, la respuesta humoral a las infecciones respiratorias puede ser débil.

Sin embargo, constituye una **excepción la infección o reinfección por virus sincicial respiratorio en ancianos** que suelen tener escasa cantidad de secreciones, lo que dificulta el diagnóstico por métodos directos y, en estos casos, la detección de IgM específica es una alternativa para el diagnóstico.

Asimismo, **la serología es de gran utilidad para estudios epidemiológicos retrospectivos tendientes a demostrar la circulación de un determinado virus en una comunidad. Asimismo, los estudios serológicos son de importancia fundamental para investigar la eficacia de las vacunas.**

Las técnicas serológicas que se emplean en la actualidad son IF, ELISA e IHA y neutralización. (Ver Capítulo 9 *Diagnóstico Viroológico*).

9. CONCLUSIONES

El desarrollo y la utilización de técnicas moleculares ha permitido el comienzo de una nueva era en el diagnóstico de las infecciones respiratorias de origen viral.

No solamente se ha aumentado la frecuencia de detección, sino que estos procedimientos **también han permitido identificar nuevos virus en muestras respiratorias**. Además, estas técnicas poseen una sensibilidad mayor en relación a la inmunofluorescencia y al aislamiento en cultivo. En el caso de las PCRs múltiples y, en especial de las PCRs en tiempo real, **la obtención de un resultado en pocas horas resulta de un enorme valor para el manejo del paciente.**

Bibliografía

- Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Goaurin S, Petitjean-Lecherbonnier J, Pozzetto B, *et al.* "Development of three multiplex PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses". *J Virol Methods* 2005;126:53-63.
- Carballal G. Video para obtención de muestras respiratorias. COPAN/Laboratorios Britania, 2009.
- Dong J, Olano JP, McBride JW, Walker DH. "Emerging pathogens: challenges and successes of molecular diagnostics". *J Mol Diagn* 2008;10: 185-97.
- Echavarría M, C Robinson. "Adenoviruses". ASM Manual of Clinical Microbiology, 9th ed., ASM Press. 2006. Washington DC.
- Echavarría M, Maldonado D, Elbert C, Videla C, Rappaport R, Carballal G. "Use of PCR to demonstrate presence of Adenovirus species B, C or F as well as coinfection with two Adenovirus species in children with Flu like symptoms". *J Clin Microbiol* 2006; 44:625-7.
- Gadsby NJ, Hardie A, Claas EC, Templeton KE. "Comparison of the Lumindex RVP Fast Assay with in house real time PCR for respiratory viral diagnosis". *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2213-6.
- Ginocchio CC, St George K. "Likelihood that an unsubtypeable influenza A virus result obtained with the Lumindex xTAG respiratory virus panel is indicative on infection with novel A/H1N1 (swine-like) influenza virus". *J Clin Microbiol* 2009, 47:2347-8.
- Halasa NB, JV Williams. "Medical and economic impact of a respiratory syncytial virus outbreak in a neonatal intensive care unit". *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:1040-4.
- Henrickson, KI. "Cost-effective use of rapid diagnostic techniques in the treatment and prevention of viral respiratory infections". *Pediatr Ann* 2005;34:24-31.
- Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM, *et al.* "Real time PCR assays for detection of Bocavirus in human specimens". *J Clin Microbiol* 2006;44:3231-5.
- Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoubian S, Sinha T, Lisle C, *et al.* "Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty. Human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay". *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2965-70.
- Mahony JB. "Detection of respiratory viruses by molecular methods". *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 716-47.
- Mahony JB, Blackhouse G, Babwah J, Smieja M, Buracond S, Chong S, *et al.* "Cost analysis of multiplex PCR testing for diagnosing respiratory virus infections". *J Clin Microbiol* 2009 , 47: 2812-7
- Mahony JB, Hatchette T, Ojkic D, Drews SJ, Gubbay J, Low DE, *et al.* "Multiplex PCR test sentinel the appearance of pandemic influenza viruses including H1N1 swine influenza". *J Clin Virol* 2009; 45:200-2.
- Nolte FS, Marshal DJ, Rasberry C, Schievelbein S, Banks GG, Storch GA, *et al.* "Multicode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses". *J Clin Microbiol* 2007; 45:2779-86.
- Ohm Smith, Nassos PS, Haller BL. "Evaluation of the Binax Now, BD Directigen and BD Directigen EZ assays for detection of respiratory syncytial virus". *J Clin Microbiol* 2004;42:2996-9.
- Pabbaraju K, Tokaryk KL, Wong S, Fox JD. "Comparison of the Lumindex X TAG respiratory virus panel with in house nucleic acid amplification tests for diagnosis of respiratory virus infections". *J Clin Microbiol* 2008; 46:3056-62.
- Pabbaraju K, Wong S, McMillan T, Lee BE, Fox JD. "Diagnosis and epidemiological study of human metapneumovirus using real-time PCR". *J Clin Virol* 2007; 40:186-92.
- Ruest AS, Michaud S, Deslandes S, Frost EH. "Comparison of the Directigen Flu A/B test, the QuickVue Influenza Test and clinical case definition to viral culture and reverse transcription PCR for rapid diagnosis of influenza virus infection". *J Clin Microbiol* 2003;41:3487-93.
- World Health Organization 2005. WHO Recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis. July 2005 www.who.int/est/disease/avian_influenza/guidelines/rapid_test_influenza-web.pdf
- Wu W, Tang YW. "Emerging molecular assays for detection and characterization of respiratory viruses". *Clin Lab Med* 2009; 29: 673-93.

Orthomyxovirus

Vilma L. Savy - Elsa G. Baumeister

1. INTRODUCCIÓN

La familia *Orthomyxoviridae* incluye 4 géneros asociados a la patología humana: a) *Influenzavirus A* (especie tipo: virus *Influenza A*); b) *Influenzavirus B* (especie tipo: virus *Influenza B*); c) *Influenzavirus C* (especie tipo: virus *Influenza C*); y d) *Thogotovirus* (especie tipo: virus *Thogoto* [un virus que infecta garrapatas –artrópodos de la clase *Arachnida*]).

El nombre con el que se designa a esta familia de virus proviene de su habilidad para unirse al mucus (del latín *Ortho*: verdadero; *myxo*: mucus). Mientras que los virus influenza B y C están prácticamente restringidos al hombre, la mayoría de los influenza A infectan especies aviares y solamente unos pocos subtipos infectan al hombre y otros animales, particularmente cerdos y caballos. Los virus de influenza A y B son los de mayor interés desde el punto de vista de la salud humana y son los más estudiados y mejor comprendidos. La denominación de influenza proviene del latín: *influens*, –*entis*: *influyente*, por su participación en la aparición de epidemias (del latín *epi*: sobre; *demos*: pueblo), ya que originalmente se creía que las mismas ocurrían debido a influencias de los astros.

Los virus influenza son agentes envueltos y su genoma se encuentra segmentado en porciones de RNA de cadena única con polaridad negativa. Las diferencias antigénicas en las proteínas matriz (M1) y nucleoproteína (NP) permiten clasificarlos en 3 tipos: A, B y C. Los virus del tipo A, a su vez, pueden ser subtipificados en base a las características antigénicas de las glicoproteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Los virus de influenza A producen enfermedad en humanos, equinos, porcinos, perros, aves y mamíferos marinos como focas y ballenas. Los virus de influenza B y C producen enfermedad sólo en el hombre. Los virus similares a Thogoto infectan diferentes especies de vertebrados como caballos, perros, camellos e inclusive al hombre y son transmitidos por garrapatas a través de la saliva del arácnido durante su alimentación. El ciclo se inicia al picar a un individuo virémico y luego a un hospedero susceptible. El virus Thogoto produce un rango de enfermedades variables desde leves hasta fatales. Pueden causar abortos en animales; en humanos se los asocia a neuritis óptica, meningitis fatal y encefalitis.

2. ESTRUCTURA

2.1 MORFOLOGÍA

Los viriones de influenza son partículas pleomórficas redondeadas u ovals al microscopio electrónico, con un diámetro de 80 a 120 nm (Figura 14.1). Los virus del tipo A y B son morfológicamente indistinguibles, mientras que los del tipo C presentan las espículas ordenadas hexagonalmente.

Los virus recuperados de seres humanos o de animales, propagados en un primer pasaje en cultivos celulares, presentan gran heterogeneidad desde el punto de vista morfológico.

La envoltura tiene un espesor de 7 a 10 nm y presenta espículas de una longitud de 10 a 14 nm, aproximadamente 500 unidades por virión, que están constituidas por dos glicoproteínas de transmembrana, la HA y la NA. La HA tiene forma redondeada y la NA la de un hongo. La proporción HA: NA es usualmente de 5:1.

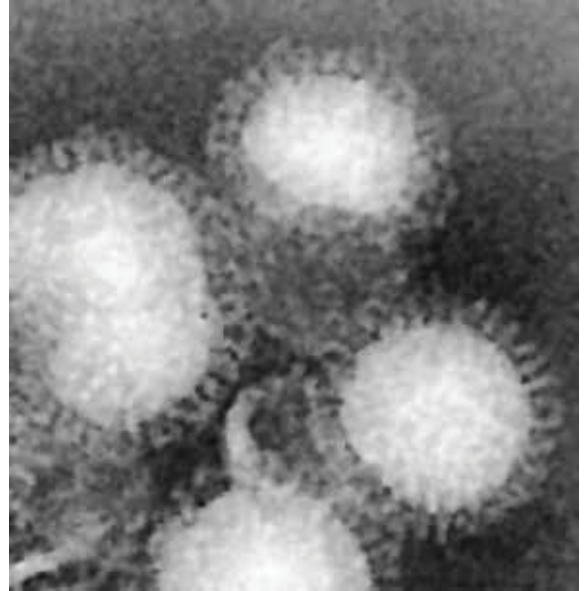


Figura 14.1. Microfotografía electrónica de partículas de virus influenza.

En su interior, la envoltura se encuentra tapizada por la proteína M1 que se contacta con los segmentos de ribonucleoproteína (RNP) del *core* viral. El genoma viral está constituido por segmentos de RNA de simetría helicoidal asociados a la nucleoproteína (NP), que codifican la información para la síntesis de 9 a 11 proteínas estructurales y no estructurales (Figura 14.2).

2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Los ortomixovirus están compuestos aproximadamente por 1% de RNA, 70% de proteína, 20% de lípidos y 5 a 8% de carbohidratos. El contenido en lípidos e hidratos de carbono variará de acuerdo al tipo de célula en la que el virus haya replicado.

2.3 ÁCIDO NUCLEICO

Los virus de influenza A y B contienen 8 segmentos de RNA de cadena única y polaridad negativa, mientras que los del tipo C contienen 7 segmentos. En diferentes preparaciones de virus, el número y la proporción de los segmentos individuales varían de acuerdo con la relación de partículas completas e incompletas; en las mismas preparaciones también pueden estar presentes fragmentos de RNA derivados del hospedador. Los segmentos de RNA de los virus de influenza A y B poseen diferente migración electroforética y el genoma completo de la cepa A/PR/8/34 contiene 13.588 nucleótidos.

Los complejos de ribonucleoproteínas (RNPs) están compuestos por RNA y 4 especies proteicas diferentes. La NP es la subunidad proteica predominante de la nucleocápside y se ha establecido que cada unidad de NP recubre al RNA en una extensión de 20 nucleótidos. Asociados a las RNPs se encuentran los complejos de

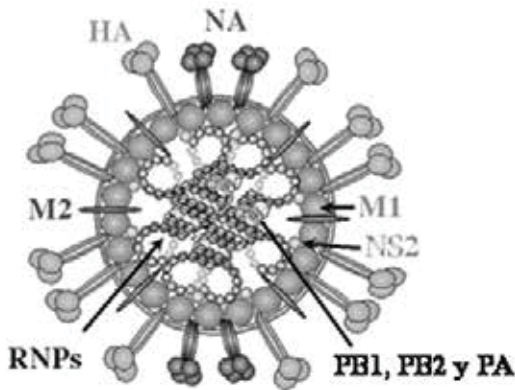


Figura 14.2. Representación esquemática de una partícula de virus influenza.

RNA polimerasa-RNA dependiente conformados por las 3 polimerasas: PB1, PB2 y PA. Las cadenas de las RNPs presentan un bucle en uno de los extremos, formándose la estructura por la cadena plegada hacia atrás y enrollada sobre sí misma (Tabla 14.1).

2.4 PROTEÍNAS

2.4.1 Polipéptido-polimerasas

Las proteínas denominadas PB1, PB2 y PA son codificadas por los segmentos 1, 2 y 3 del RNA viral, los de mayor tamaño del genoma viral. Los segmentos 1 y 2 tienen 2.341 nt. de longitud cada uno y codifican para una proteína de 759 aa. (PB2) y 757 aa. (PB1), respectivamente. El segmento 3 tiene una longitud de 2.233 nt. y codifica para una proteína de 716 aa. (PA). Luego de su síntesis, las 3 proteínas son transportadas al núcleo donde tienen actividad de RNA polimerasa-RNA dependiente. PB1 y PB2 son necesarias para la síntesis del RNA complementario y PA para la síntesis del RNA viral junto con la NP.

En el RNA codificante para PB1 de influenza A (pero no de influenza B) –y en otro marco de lectura– se ha documentado la existencia del código para una segunda proteína denominada PB1-F2. Se ha observado la participación de esta proteína en diversas cepas de influenza A, en eventos de apoptosis de células mononucleares. La co-localización de PB1-F2 con las membranas mitocondriales sugiere la participación de esta organela en el disparo apoptótico de dichas células y, por ende, en la patogénesis viral.

2.4.2 Hemaglutinina

Una de las espículas de la envoltura viral es la HA, glicoproteína de transmembrana, con una masa molecular de 220 kDa. que tiene la propiedad de aglutinar glóbulos rojos de diferentes especies. La HA permite la adsorción de la partícula viral a la célula a través de la unión a receptores de ácido siálico ubicados en la superficie celular; también promueve la liberación del genoma viral al citoplasma celular al fusionar la envoltura de la partícula viral capturada con la membrana de la vesícula endocítica e induce la producción de anticuerpos neutralizantes protectores.

La HA es codificada por el segmento 4 del RNA viral y consta de dos regiones, una globular y una cola fibrilar (Figura 14.3).

Es un homotrímero en el que los monómeros se encuentran unidos de manera no covalente, cada uno compuesto por un polipéptido (HA0) que es procesado proteolíticamente para generar dos subunidades, la HA1 y la HA2, con 319 a 326 y 221 a 222 residuos aminoácidos, respectivamente. Ambas subunidades permanecen unidas por un puente disulfuro. El clivaje post-traduccionales necesario para que el virus sea infeccioso es llevado a cabo por proteasas celulares similares a la tripsina. La virulencia de cada cepa estaría relacionada con la composición aminoácida del sitio de clivaje: la presencia en él de motivos ricos en aminoácidos básicos facilitaría el clivaje que realizan proteasas ubicadas en tejidos fuera del tracto respiratorio provocando así una enfermedad más grave. La HA1 contiene el sitio de unión al receptor celular y la mayoría de los sitios antigénicos de la molécula. El sitio de unión al receptor es un bolsillo localizado en el extremo distal de cada subunidad, inaccesible para los anticuerpos y con una composición aminoácida altamente conservada. Se han podido ubicar 5 sitios antigénicos en la estructura tridimensional de la HA1. Al comparar la secuencia aminoácida de un aislamiento de virus natural y de sus variantes antigénicas seleccionadas en presencia de anticuerpos monoclonales, los cambios de aminoácidos se observan en esos sitios antigénicos.

Se han descrito 16 subtipos de HA (H1 a H16) dentro de los virus del tipo A, que difieren aproximadamente en un 30% en la secuencia aminoácida de la HA1. En cambio, la porción HA2 es mucho más conservada.

La HA2 posee la capacidad de fusionar membranas. Una secuencia de alrededor de 30 aa. hidrofóbicos del extremo C-terminal permite el anclaje de la molécula de HA2 a la envoltura viral. El tratamiento de las partículas virales con la proteasa bromelina produce un clivaje en la posición 175 de las HA2 que libera el ectodominio de la HA como un trímero soluble, comúnmente llamado BHA, que ha permitido estudios cristalográficos de la molécula.



Segmento genómico	Influenza A		Influenza B		Influenza C	
	Segmento RNA (nt)	Polipéptido (aa)	Segmento RNA (nt)	Polipéptido (aa)	Segmento RNA (nt)	Polipéptido (aa)
PB2	2341	759	2396	770	2365	774
PB1	2341	757	2386	752	2363	754
PA	2233	716	2308	726	2183	704
HA	1778	566	1882	584	2071	654
NP	1565	498	1842	560	1809	565
NA	1413	454	1557	466 (NA)	-	-
				100 (NB)		
M	1027	252 (M1)	1188	248 (M1)	1180	242 (M1)
		97 (M2)		109 (BM2)		139 (CM1)
NS	890	230 (NS1)	1098	281 (NS1)	934	286 (NS1)
		121 (NS2)		122 (NS2)		122 (NS2)

Tabla 14.1. Genes de influenza y sus productos. Los datos corresponden a las siguientes cepas: A/PR/8/34; B/AA/1/66 (segmentos 1, 2, 3, 5, 7 y 8); B/Lee/40 (segmentos 4 y 6); C/JJ/50 (segmentos 1, 2, 3 y 6); C/California/78 (segmentos 4, 5 y 7).

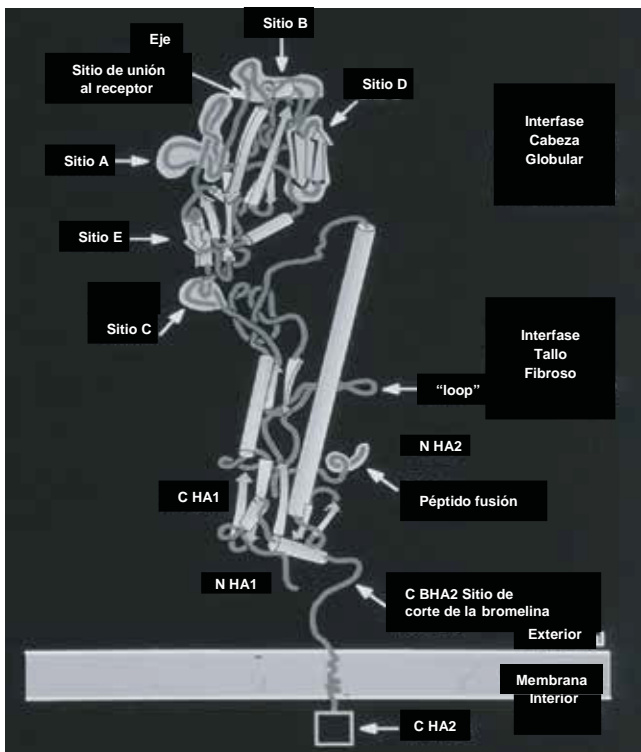


Figura 14.3. Esquema de un monómero de hemaglutinina.

2.4.3 Neuraminidasa (NA)

La NA es la segunda proteína de superficie de los virus de influenza A y B y es codificada por el segmento 6 del RNA viral. Es un homotetrámero con una masa molecular de 240 kDa. Posee dos regiones bien identificables: la cabeza globular con actividad enzimática y el tronco hidrofóbico que permite el anclaje de la molécula en la membrana de la envoltura viral. La enzima cataliza el clivaje de uniones glicosídicas adyacentes al ácido siálico que forma parte del receptor para el virus influenza y mediante su acción enzimática lo destruye. La NA actúa también liberando la progenie viral anclada a la superficie de la célula que le dio origen luego del ciclo de replicación y facilitando el transporte de los viriones a través de la capa de mucina presente en el tracto respiratorio de manera que éstos alcancen las células epiteliales blanco. Las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la NA muestran que el sitio de anclaje de la molécula está ubicado cercanamente a la región N-terminal. El polipéptido tiene una longitud de aproximadamente 470 aa. y presenta varios sitios capaces de ser N-glicosilados. La alta densidad de carbohidratos en el tallo de la molécula refleja la necesidad de protegerla de la proteólisis.

Para los virus del tipo A se pueden distinguir 9 subtipos de NA (N1-N9). Las comparaciones de secuencias aminoacídicas muestran que las NA de los virus tipo A y B tienen una similitud del 30%, la de distintos subtipos de los virus A es aproximadamente del 45% y dentro de un mismo subtipo las diferencias pueden ser menores al 5%. La presencia de un número importante de cisteínas permite en la estructura tridimensional uniones disulfuro, posiciones que están altamente conservadas entre las distintas NA. Además de esas 16 posiciones conservadas existen 49 más, asociadas al sitio catalítico o adyacentes al mismo. El estudio exhaustivo de esta proteína ha tenido como fin alcanzar el desarrollo de antivirales que funcionen como inhibidores de su actividad enzimática.

2.4.4 Proteína con funciones de hemaglutinina-esterasa –fusión de los virus C: HEF

La única glicoproteína de superficie de los virus de influenza C aloja las funciones de unión al receptor celular y de fusión de las HAS

más la actividad destructora del receptor asociada con la NA de los virus de influenza A y B. Esta actividad de destrucción del receptor no es de neuraminidasa, como en los virus A y B, sino de esterasa.

2.4.5 Matriz

Virus de influenza A. El segmento 7 del RNA de los virus de influenza A codifica para dos proteínas, M1 y M2. Este gen tiene una longitud de 1.027 nucleótidos y posee un marco de lectura grande que codifica para la proteína M1 de 252 residuos aminoacídicos aproximadamente. La segunda proteína, la M2, con 88 aa., es derivada de este gen por *splicing* del RNAm. Los primeros 9 aa. son compartidos con la M1 y el resto de la molécula es traducido a partir de un segundo marco de lectura con una secuencia de 263 nt. cercanos al extremo terminal 3' del transcripto y superponiéndose a la secuencia codificante para la M1. La M1 es un antígeno tipo-específico de los virus de influenza y, de acuerdo a las secuencias analizadas, es altamente conservada, es muy abundante y se encuentra asociada con la cara interna de la membrana de la envoltura viral.

La M2 es una proteína de transmembrana y funciona como un canal iónico; permite la entrada de H⁺ produciendo un descenso del pH dentro de la partícula viral, promoviendo una disociación de la M1 y los complejos RNPs inducida por la acidez. Esta proteína ha sido objeto de estudios para el desarrollo de drogas antivirales y así es que en la actualidad se dispone de dos moléculas, la amantadina y la rimantadina, que son capaces de bloquear su actividad de canal iónico.

Virus de influenza B. El segmento 7 del RNA de los virus de influenza B codifica para dos proteínas, M1 y BM2. El gen completo tiene una longitud de 1.191 nt. y contiene 2 marcos de lectura. El primero codifica para una proteína de 248 residuos aminoacídicos, la M1, de los cuales 63 son idénticos a los de la M1 de los virus del tipo A. A partir del segundo marco de lectura y superpuesto al marco de lectura de la proteína M1, se codifica la proteína BM2 de 109 aa. La BM2 también funciona como un canal iónico, pero a diferencia de la M2 necesita de su activación por Na⁺ y es permeable al paso de Cl⁻. Los antivirales que bloquean la función de la M2 de los virus tipo A no son activos en este caso.

La proteína M de influenza C se denomina CM2.

2.4.6 Nucleoproteína

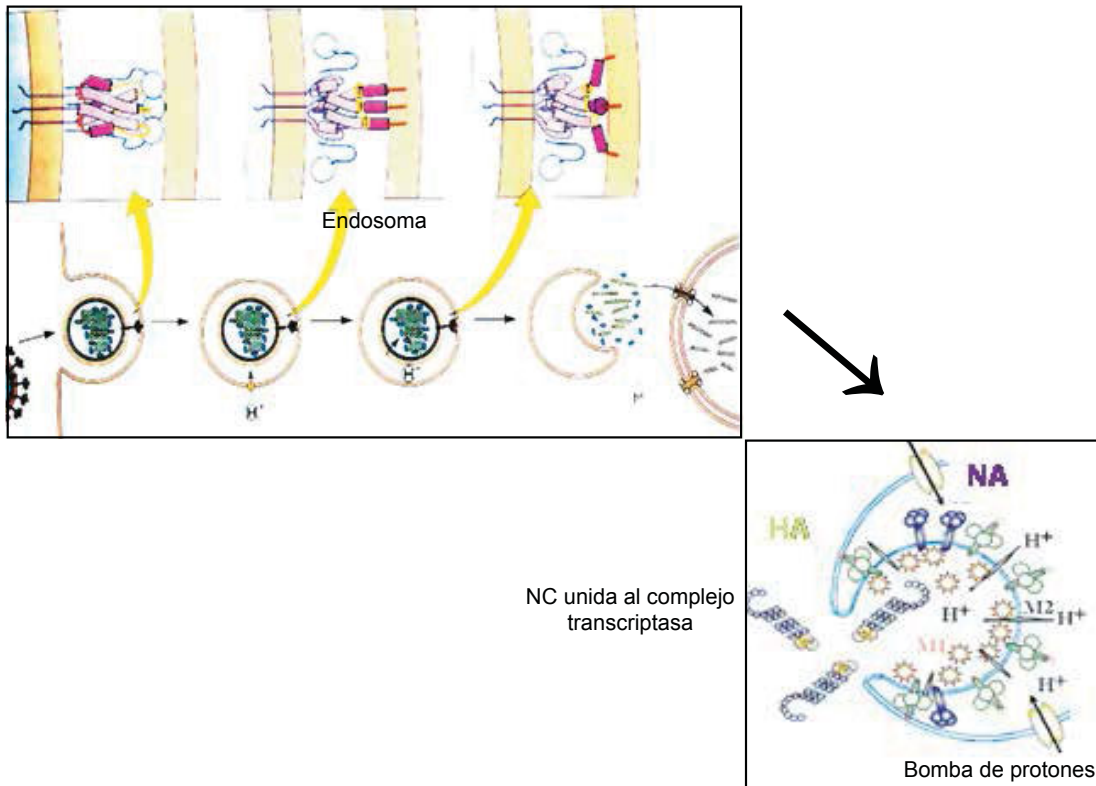
La NP es codificada por el segmento 5 del RNA viral que tiene una longitud de 1.565 nt codificantes para 498 aa. Es la proteína más abundante en la partícula viral y en la célula infectada y es también uno de los antígenos de tipo (A, B o C) junto con la M1. Las moléculas de NP son transportadas al núcleo y allí interactúan con los segmentos de RNA para formar las RNPs junto con las polimerasas PA, PB1 y PB2. La NP de los virus B contiene 560 aa. y la homología con la NP de los virus A es del 47%. La NP de los virus C tiene una longitud de 565 aa. y posee varias regiones de alta homología con las NP de los virus A y B.

La NP es el blanco más importante de reactividad cruzada para los linfocitos T citotóxicos y también induce el desarrollo de anticuerpos específicos de tipo. En la fase tardía de la infección celular es clivada por la acción de caspasas celulares, pasando de un tamaño de 56 kDa. a la forma de 53 kDa., fenómeno que se asocia al comienzo de la apoptosis de la célula infectada.

2.4.7 Proteínas no estructurales

La proteína NS1 es codificada por el segmento 8 del RNA viral. Es expresada en grandes cantidades en la célula infectada pero no es detectada en la partícula viral. Se asocia a polisomas en el núcleo y posee señales de exportación nuclear. La proteína NS2 es también codificada por el segmento 8 del RNA viral. Originalmente se postuló que no se encontraba en la partícula viral pero se la ha detectado asociada a la M1 en el virión. En la célula se la puede encontrar tanto en el núcleo como en el citoplasma. La señal de exportación nuclear tendría como rol la exportación de las RNPs desde el núcleo.

ENTRADA Y LIBERACIÓN EN EL CITOPLASMA CELULAR DEL GENOMA DE INFLUENZA



NC unida al complejo transcriptasa

Bomba de protones

Figura 14.4. Entrada a la célula y etapas tempranas de la replicación viral. (Tomado de Flint y col. Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. ASM Press. 2000).

3. CICLO REPLICATIVO

3.1 ENTRADA

Las HAs de los virus A o B y la HEF de los virus C, se adhieren a los receptores de la superficie celular que son glicoproteínas que contienen residuos de ácido N-acetil neuramínico (virus A y B) o ácido 9-O-acetil N-acetilneuramínico (virus C). A continuación, el virus penetra mediante una endocitosis mediada por el receptor. El bajo pH de la vesícula endocítica (pH 5-6) activa el proceso de desnudamiento y liberación de las RNPs al citoplasma celular. Esto promueve un cambio estructural en la molécula de HA que induce la fusión entre la envoltura del virus y la membrana del endosoma para liberar el *core* interno, a la vez que el ingreso de protones por el canal iónico M2 produce el descenso del pH dentro de la partícula viral produciendo la disociación de las RNPs de la M1, proceso esencial para su migración desde el citoplasma al núcleo celular (Figura 14.4).

3.2 TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN

Luego de la entrada de las RNPs al núcleo, a través de los poros nucleares, se inicia la fase de transcripción del genoma en RNAs mensajeros, catalizada por la RNA polimerasa viral adherida a las RNPs infectantes y la síntesis del RNA complementario, que sirve como templado para la síntesis del RNA genómico. El RNAm es transportado al citoplasma donde dirige la síntesis de proteínas virales. Se pueden distinguir dos fases en la expresión de los genes: la fase temprana caracterizada por la síntesis preferencial de las proteínas NP y NS1 y la fase tardía, principalmente dedicada a la síntesis de los componentes estructurales del virión. En esta etapa, los RNA virales son sintetizados en mayor proporción a lo requerido,

se produce la síntesis preferencial de la HA y la M1 y la reducción de la NS1. La producción de la M2 es aún más tardía. El ingreso al núcleo de M1 y NS2 induce la finalización de la síntesis de RNA y promueve la exportación de nucleocápsides y de pequeñas cantidades de polimerasas unidas al RNA con polaridad [-] hacia el citosol y, finalmente, hacia la membrana plasmática.

3.3 ENSAMBLE Y LIBERACIÓN DE LOS VIRIONES

El ensamble viral tiene lugar en la membrana plasmática de la célula infectada al producirse el proceso de brotación, mediante el cual el *core* RNP-M1 adquiere una envoltura derivada de regiones de la membrana plasmática modificada por contener casi exclusivamente proteínas virales de membrana. Las proteínas integradas a la envoltura viral, HA, NA, M2 y NB de los virus A y B, y la HEF y CM2 de los virus C son sintetizadas en asociación con el retículo endoplásmico e insertadas en la membrana. Por último, la M1 es asociada con la membrana plasmática y forma las bases para la interacción a través de la cual las RNPs virales se ensamblan y brotan de la membrana plasmática de la célula infectada constituyendo la progenie viral (Figura 14.5).

4. PATOGENIA E INMUNIDAD

La patogenicidad y la virulencia del virus influenza están determinadas por varios factores que interactúan, algunos propios del hospedador y otros del virus. Entre los primeros se pueden incluir la presencia de receptores adecuados en la célula hospedadora, la presencia de enzimas celulares necesarias para la entrada y replicación viral, el estado de inmunocompetencia del hospedador y la habilidad del sistema inmune para controlar la replicación viral con escasos daños colaterales asociados a la respuesta inflamatoria. Entre los factores

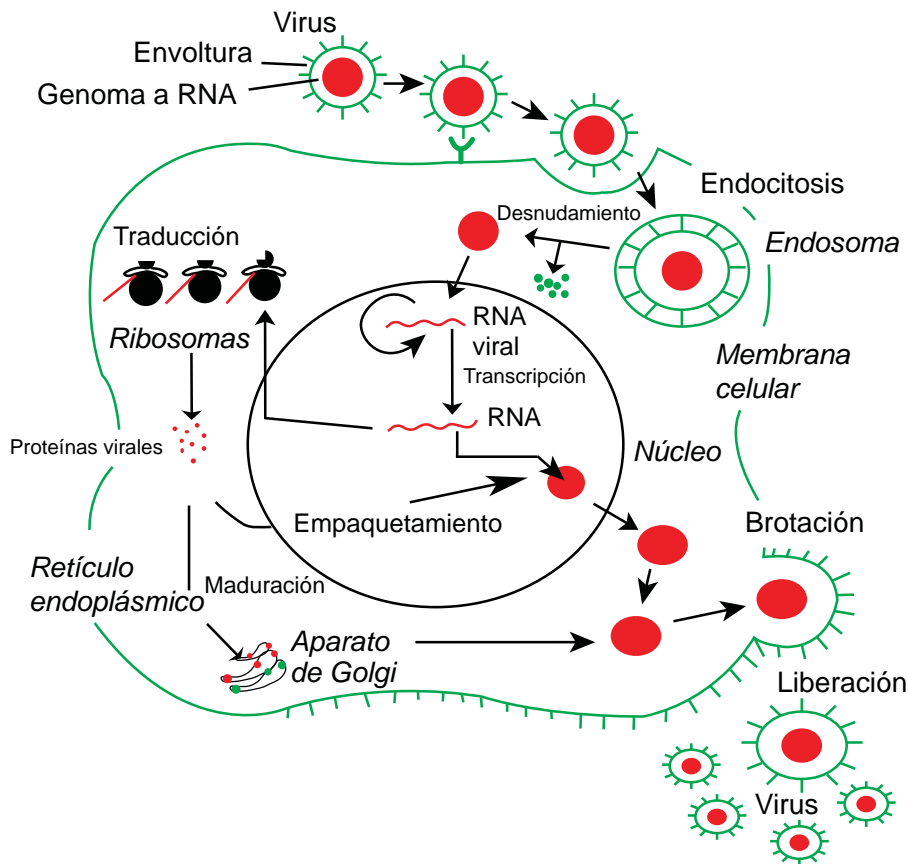


Figura 14.5. Ciclo replicativo de los virus influenza.

virales se cuentan, entre otros, la habilidad para unirse a la célula hospedadora, la restricción del efecto citopatogénico para llegar a un equilibrio adecuado entre replicación viral y control de la infección y, por último, el escape a la inmunovigilancia mediante la variación genética inducida por la presión selectiva ejercida por la respuesta inmune. Los genes codificantes de las proteínas HA, NA, PB1 y NS están asociados con la patogenicidad del virus. En modo análogo, los genes codificantes de las proteínas HA, NA y PB1 también determinan la transmisibilidad de las cepas de influenza.

Un aspecto central de la infección por este virus es su capacidad para evadir al sistema inmune del hospedador al que infecta. Para ello el virus posee diversas estrategias: a) la producción de cambios antigénicos mayores (*shift*) y fluctuaciones antigénicas menores (*drift*); b) la producción del fenómeno de von Magnus; c) la inhibición parcial de la respuesta mediada por interferón; d) la inadecuada presentación de péptidos virales en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase I.

Los cambios antigénicos mayores son el resultado de eventos de reasociación de genes (por ejemplo, los codificantes de las proteínas de superficie viral, HA y NA, presentes cada uno en fragmentos separados) provenientes de cepas de virus con diferentes especificidades de subtipo. Es decir, si una cepa del tipo A subtipo H1N1, reasocia sus genes HA y NA con los de otra del tipo A con especificidad de subtipo H3N2, aquella podría expresar las proteínas que originalmente codificaba con excepción de las de superficie de la partícula, que ahora será también H3N2. Estos cambios drásticos se asocian a la emergencia de pandemias, como las ocurridas en 1918, 1957 y 1968. Muchas veces la emergencia de un nuevo subtipo de influenza A ha producido el cese de circulación de uno anterior. Sin embargo, actualmente cocirculan los subtipos H1N1 y H3N2. Es motivo de controversia si también contribuyeron a la producción de cambios antigénicos mayores fenómenos de recombinación genética (por ejemplo, presencia en una misma cadena –segmento– de

RNA de secuencias provenientes de dos cepas con especificidades de subtipo diferentes), como fuera postulada para la pandemia de 1918. Recientemente, fenómenos de recombinación entre segmentos (genes codificantes de la hemaglutinina y de la matriz) fueron también demostrados en virus influenza aviar H7N3. Por otra parte, los cambios menores son consecuencia de la falta de lectura de prueba de la RNA polimerasa viral, que permite la evolución continua de este virus, dando origen a epidemias que aparecen cada uno a tres años. Son el resultado de la selección de mutantes que muestran alteraciones en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de la HA y/o NA y son causados por mutaciones puntuales en la secuencia del RNA. Ocurren dentro de un tipo (influenza B) o de un subtipo (influenza A, subtipos H2N2, H3N2, etc.). Todas las cepas resultantes de estos cambios están significativamente relacionadas entre sí. Cada variante sucesiva reemplaza a la anterior.

El fenómeno de von Magnus consiste en la producción de partículas virales defectivas que conservan los determinantes antigénicos de superficie, razón por la cual compiten con las partículas infectivas en su interacción con los receptores, sin contribuir a la propagación viral. El fenómeno de von Magnus, por ende, contribuye a la limitación de la infección por influenza mediada por la respuesta inmune del hospedero.

Con respecto a su interacción con el sistema inmune, se ha demostrado que el virus influenza no sólo puede intentar la evasión al mismo mediante los mecanismos de variación antigénica, sino también contrarrestandola específicamente. Influenza también puede inhibir la actividad del interferón. Lo hace actuando a tres niveles: a) interfiriendo con la vía de señalización de inducción del interferón (la proteína NS1 viral interactúa con IRF3, con el RNA bicatenario, y con los factores de transcripción NF-κB y AP-1); b) interfiriendo con la señalización mediada por el interferón (la proteína NS1 de influenza B interactúa con ISG15, mientras que la proteína homónima de influenza A lo logra por mecanismos

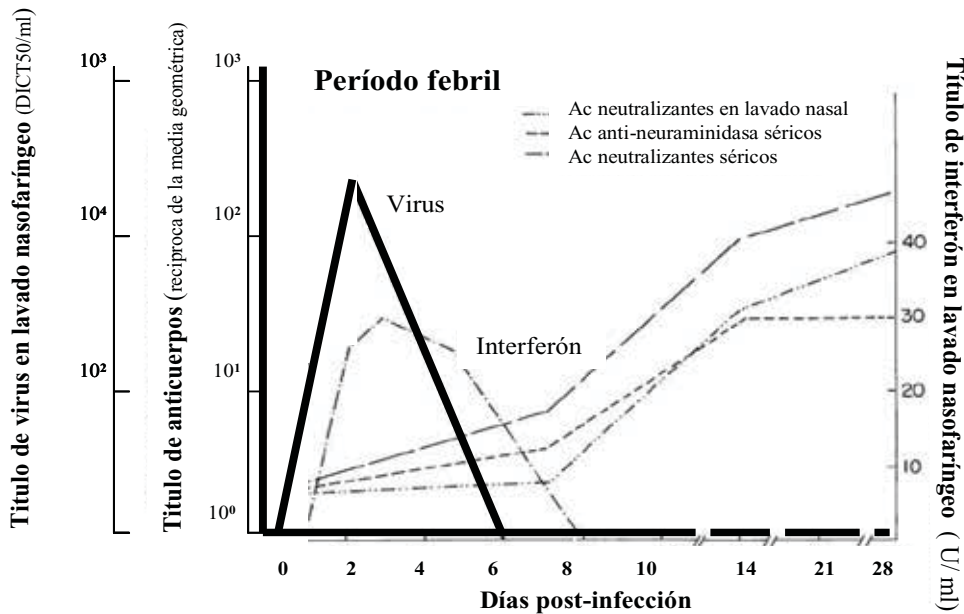


Figura 14.6. Cinética de excreción viral y desarrollo de anticuerpos específicos.

desconocidos); c) interfiriendo con las vías / moléculas efectoras del interferón [NS1 interactúa con la PKR y proteína(s) viral(es) desconocida(s) aumenta(n) la expresión de un inhibidor de la PKR (p58^{IPK})].

La variación antigénica de influenza es un mecanismo central de evasión a la acción de anticuerpos. Por ejemplo, cambios en epítopes B críticos de la HA pueden evitar el apropiado reconocimiento por anticuerpos neutralizantes pre-existentes. El virus influenza también puede producir cambios en las secuencias flanqueantes de epítopes T, que pueden contribuir a la evasión a los linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, dada la cantidad de péptidos derivados de diferentes proteínas virales que son expresadas en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase I, la evasión a los linfocitos T mediante variación antigénica tiene un efecto más restringido que la observada frente a los anticuerpos específicos.

A pesar de los mecanismos de evasión descritos, el virus no produce por lo habitual infecciones persistentes, ya que el sistema inmune del individuo inmunocompetente finalmente logra controlar la infección. Para poder persistir en la naturaleza, influenza adopta la estrategia de *golpear* y *escapar* del hospedero (*hit and run*) afectando a otro individuo susceptible (no inmune).

4.1 PUERTA DE ENTRADA Y TRANSMISIÓN

Influenza entra en el hospedador a través del tracto respiratorio. La vía predominante por la cual este virus se transmite de persona a persona es mediante aerosoles y pequeñas gotas generadas en el tracto respiratorio superior al toser y estornudar. También se puede transmitir por contacto directo con secreciones respiratorias. La persona infectada excreta virus desde 2 días antes de presentar síntomas clínicos hasta aproximadamente 5 días después. Los niños pueden excretar virus durante 10 días o más. El pico de replicación viral se observa al cabo de 48 h. de la infección y luego declina lentamente. Por lo general, el virus puede ser recuperado de secreciones respiratorias hasta 1 a 3 días después de iniciados los síntomas.

La ventilación humana normal en reposo es de unos 6 litros de aire por minuto, con el que se introduce en los pulmones un elevado número de partículas extrañas y gotas aerosolizadas que pueden contener virus. El depósito de éstas depende de su tamaño: peque-

ñas gotas con un diámetro de 1 a 4 μ sedimentan en la pequeña vía aérea mientras que las más grandes o bien no logran entrar en el tracto respiratorio o se depositan en su porción superior. Numerosos mecanismos de defensa, incluyendo barreras mecánicas, bloquean la infección del tracto respiratorio. Éste está cubierto por una capa mucociliar de células ciliadas, células secretoras de mucus y glándulas. Las partículas extrañas que ingresan en la cavidad nasal o en el tracto superior son atrapadas en el mucus, llevadas hacia la faringe y deglutidas. En el tracto respiratorio bajo, las partículas son expulsadas por la acción ciliar de las células epiteliales. En los alvéolos, que carecen de cilios o mucus, los macrófagos son los responsables de destruir las partículas.

Una vez que el virus infectó eficientemente las células epiteliales respiratorias, la replicación ocurre en horas y se producen numerosos viriones. Las partículas infecciosas se liberan de forma preferencial por brotación, desde el polo apical de la membrana citoplasmática de las células epiteliales hacia la vía aérea, produciéndose la rápida infección de las células vecinas. La inusual detección plasmática del virus de influenza aviar tipo A subtipo H5N1, sugiere su liberación por el polo basolateral de la célula (además de la que acaece por el polo apical).

4.2 PATOGENIA

La infección viral induce cambios patológicos a lo largo del tracto respiratorio, pero la patología más significativa se produce en el tracto respiratorio inferior. Mediante estudios de broncoscopia en pacientes sin complicaciones se pudo observar inflamación aguda y edema de las mucosas de laringe, tráquea y bronquios. Las células columnares ciliadas se vuelven vacuoladas, edematosas, pierden las cilias y se descaman. Luego del primer día comienza la descamación y producción de mucus. También se observa edema de la submucosa e hiperemia con un infiltrado de neutrófilos y células mononucleares, estando el antígeno viral presente de modo predominante en las células epiteliales y mononucleares, aunque es infrecuente observarlo en la capa de células basales. En la neumonía viral primaria se produce una neumonitis intersticial con una marcada hiperemia y engrosamiento de las paredes alveolares y con un infiltrado de leucocitos mononucleares, dilatación de los capilares y trombosis. Posteriormente se pierde el epitelio de las paredes

alveolares, se produce edema y exudado dentro del alvéolo, una membrana hialina recubre las paredes de éste último y se produce una hemorragia intraalveolar. Los cambios necrotizantes pueden conducir a la ruptura de las paredes del alvéolo.

Al nivel celular se produce una disminución de la expresión de las proteínas celulares y apoptosis, mecanismo adicional de destrucción celular. La apoptosis de células mononucleares está asociada a la expresión en células mononucleares de la proteína PB1-F2. Luego del tercer a cuarto día de comenzados los síntomas, se produce la mitosis de las células de la capa basal y se regenera el epitelio. La recuperación completa del epitelio probablemente demore un mes.

4.3 RESPUESTA INMUNE

4.3.1 Inmunidad innata

Los virus de influenza replican exclusivamente en las células superficiales del tracto respiratorio. Son liberados en especial desde la superficie apical de las células, lo que limita la diseminación sistémica pero facilita la acumulación de virus en el lumen del tracto respiratorio para la transmisión al próximo hospedero susceptible.

El tracto respiratorio tiene una serie de mecanismos protectores contra la infección de influenza incluyendo la capa de mucina, la acción de las cilias e inhibidores de proteasas que pueden prevenir la entrada efectiva a la célula y desnudamiento del virus. Una vez que las células epiteliales son infectadas, citoquinas proinflamatorias son inducidas y liberadas desde estas células, alcanzando su pico máximo a los 2 días luego de la infección experimental de animales de laboratorio, con importantes manifestaciones clínicas. Luego de la infección por influenza ocurre un incremento de la actividad de células NK y consiguientemente, del interferón (Figura 14.6).

4.3.2 Inmunidad humoral

En el 80% de los individuos infectados naturalmente puede confirmarse una respuesta sérica de anticuerpos. Luego de la infección, pueden detectarse anticuerpos específicos para la HA con isotipos IgM (la de mayor cuantía), IgG e IgA, mientras que en una respuesta secundaria predominan los isotipos IgG e IgA. Los anticuerpos séricos desempeñan un rol muy importante en la resistencia y recuperación de la enfermedad y la transmisión de anticuerpos IgG por vía transplacentaria proporcionaría también un efecto protector.

Los anticuerpos anti-HA son neutralizantes y específicos de cepa, previenen la infección y modifican la enfermedad. Los anticuerpos anti-HA impiden la unión del virus al receptor celular. La inmunidad conferida es duradera. Por el contrario, los anticuerpos anti-NA, no son neutralizantes ni previenen la infección, aunque modifican la enfermedad y disminuyen la transmisión. Estos anticuerpos bloquean estéricamente el acceso de la NA a los sustratos celulares de alto peso molecular (ácido N-acetil neuramínico) de la superficie celular, interfiriendo con la liberación del nuevo virus. La población humana padece infecciones recurrentes con virus antigénicamente distinguibles a pesar de la inmunidad previa, adquirida con un virus del mismo subtipo, lo cual genera una respuesta cruzada de afinidad reducida. Se ha observado que ante una reinfección por virus influenza del mismo subtipo (por ejemplo, una cepa con HA H1) los títulos virales en pulmón son más reducidos y el virus es eliminado más rápido, como consecuencia de la memoria inmunológica.

4.3.3 Inmunidad celular

La inmunidad celular desempeña un papel relevante en la eliminación del virus. Hay dos subpoblaciones de efectores linfocitarios en el humano. El primero consiste en las células que median citotoxicidad relacionadas con los antígenos de histocompatibilidad de clase I con fenotipo CD8⁺ (CTLs). Estos CTLs aparecen en la sangre de individuos infectados hacia el día 14 post-infección y desaparecen el día 21, aproximadamente; muestran un patrón de reactividad cruzada específica del tipo de virus y una subpoblación aún más específica lisa sólo células infectadas con virus homólogo.

La otra subpoblación de linfocitos T corresponde a los relacionados con los antígenos de histocompatibilidad de clase II con fenotipo CD4⁺. A dicha subpoblación pertenecen los linfocitos T *helper* y cierta proporción de linfocitos citotóxicos. Los primeros, a su vez, se subdividen en dos estirpes funcionales: la que colabora con la diferenciación de los linfocitos B en plasmocitos para la producción de anticuerpos (linfocitos T_h) y la de los linfocitos T H1 que promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺. Células T *helper* específicas para antígenos de M o NP pueden proveer colaboración a las células secretoras de anticuerpos para HA. A su vez, una fracción de las células CD4⁺ puede tener actividad citolítica con un rango de especificidades antigénicas similar a las CTLs de clase I. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ contribuyen a la inmunidad contra la infección por virus influenza.

La linfoproliferación es otra medida de la respuesta celular a influenza. Se han aislado linfocitos con respuesta a antígenos de influenza a partir de sangre y de secreciones del tracto respiratorio inferior de individuos infectados. Luego de la infección en humanos se incrementa una respuesta de linfocitos a los antígenos de influenza, comenzando entre el tercer y sexto día post-infección y retornando a la normalidad el día 28.

Influenza A puede deprimir la reactividad en piel a antígenos comúnmente utilizados para medir la hipersensibilidad retardada. Además, puede observarse una depresión de la respuesta blastogénica de los linfocitos de sangre periférica a la estimulación por mitógenos en la convalecencia temprana.

4.3.4 Inmunidad de mucosas

En las secreciones nasales puede detectarse actividad de anticuerpos neutralizantes contra la HA y la NA. En los humanos, los anticuerpos neutralizantes corresponden al isotipo IgA producidos localmente. Los anticuerpos IgA son los primeros mediadores de la resistencia a la infección por el virus en el tracto respiratorio superior, pueden actuar intracelularmente (los así denominados *intracuerpos*) inhibiendo la replicación viral y tienen un papel muy activo en la eliminación del virus infectivo de las células epiteliales del tracto respiratorio. Para alcanzar su sitio de acción, la IgA debe atravesar el epitelio. Una vez dimerizada por la cadena J, se une al receptor Poli-Ig presente en el polo basolateral de la célula epitelial y es transportado en una vesícula a través del citoplasma hacia el polo apical, proceso denominado transcitosis. La producción de TGF β (junto con las IL-5, IL-6 e IL-10) por las células epiteliales promueve la síntesis de IgA secretoria. Esta IgA es responsable del fenómeno de exclusión inmune, que impide el ingreso de partículas virales desde la luz del tracto respiratorio al interior del organismo.

Durante la infección primaria, se detectan anticuerpos IgA, IgG e IgM específicos para la HA en los lavados nasales, aunque los de tipo IgA e IgM son detectados con mayor frecuencia. Los anticuerpos IgA producidos localmente por una infección natural pueden ser detectados hasta 3-5 meses luego de la infección y hay memoria para la IgA local para el antígeno de influenza. La respuesta local de IgA también puede detectarse como IgA en suero. Los anticuerpos de tipo IgG de lavados nasales aparecen sobre todo como consecuencia del trasudado del suero de acuerdo al gradiente de concentración suero-lavado nasal.

5. CUADROS CLÍNICOS

Se da el nombre de gripe a la enfermedad respiratoria aguda, febril, de importancia mundial causada por los virus influenza tipos A, B y C. No tiene signos patognomónicos, por lo que una descripción más precisa sólo se logró luego de los primeros aislamientos de influenza A en 1933, influenza B en 1940 e influenza C en 1947. Sin embargo, se dispone de la descripción de esta enfermedad desde la antigüedad debido a una constante de hechos como su naturaleza explosiva, sus signos respiratorios y sistémicos, su tendencia a la estacionalidad y su elevada tasa de ataque con alta mortalidad en personas de edad avanzada. La presentación de la gripe es extre-

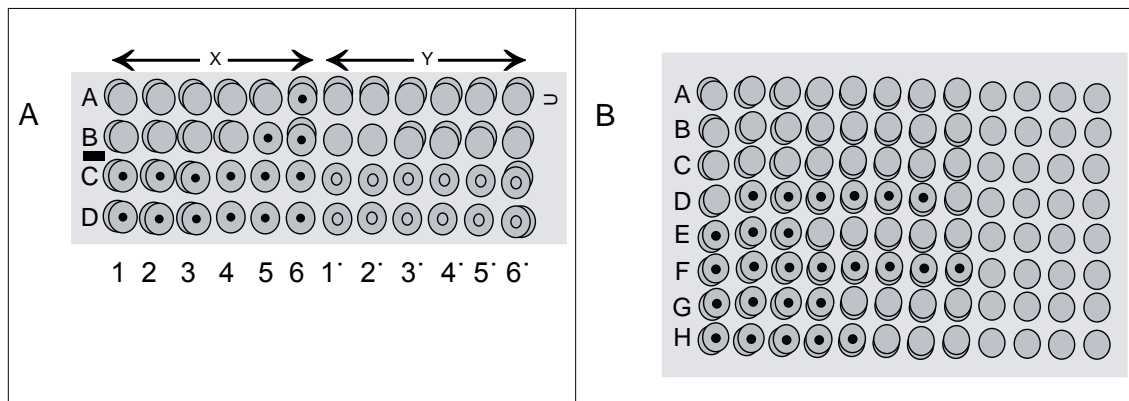


Figura 14.7. A. Reacción de hemaglutinación. Columnas X: eritrocitos de pavo; Columnas Y: eritrocitos de cobayo. Se sembraron cuatro muestras (filas A-D) para detectar en ellas la presencia de la hemaglutinina del virus influenza. Se sembraron diluciones seriadas al doble, comenzando por la columna 1 dentro del grupo X y 1' en el grupo Y (1/2). Filas A y B: fenómeno de hemaglutinación en las primeras cuatro columnas. Filas C y D: No se observa hemaglutinación. **B: Inhibición de la hemaglutinación (IHA) empleando eritrocitos de pavo.** Se utilizaron dos muestras séricas pareadas por cada paciente (una del período agudo y otra de la convalecencia) sembradas en las filas A-B, C-D, E-F y G-H, respectivamente para cuatro pacientes. Comenzando por una dilución sérica 1/10, sembrada en la columna 1, se realizaron subsiguientes diluciones al doble (columnas 2 a 7). Filas A y B: par de sueros de un mismo paciente que no producen IHA; filas C y D: ausencia de IHA en el suero del período agudo (C) y fenómeno de IHA en el 2º suero hasta el 7º pocillo (columna 7), indicando conversión serológica; filas E y F: fenómeno de IHA en ambos sueros mostrando un incremento del título (inversa de la máxima dilución que da positiva la reacción) de anticuerpos IHA en el segundo suero, mayor a 5 diluciones; G y H: fenómeno de IHA en ambos sueros, sin diferencia significativa.

madamente amplia, desde las infecciones asintomáticas que ocurren en alrededor de un 50% de los casos, hasta una enfermedad respiratoria con signos sistémicos –complicaciones multisistémicas que comprenden pulmones, corazón, hígado, riñones y músculos–, hasta la muerte debida principalmente a la neumonía viral primaria o bacteriana secundaria.

La evolución estará influenciada por varios factores que incluyen la edad del paciente, infecciones o vacunaciones anteriores con cepas relacionadas antigénicamente, propiedades intrínsecas del virus (subtipo de virus o nuevas cepas pandémicas), presencia de patologías crónicas que afecten el corazón o los pulmones, falla renal o desórdenes de la inmunidad.

Las infecciones por influenza no pueden ser distinguidas con facilidad en base a los parámetros clínicos de otras infecciones respiratorias: durante los brotes de gripe en la población, el virus influenza se confirma como agente causal en alrededor del 50% de los casos clínicos y cuando se utiliza una definición de caso más estricta se puede llegar a confirmar el 70% de los mismos. La gripe se define como una infección respiratoria alta de comienzo abrupto, con fiebre $\geq 38^\circ\text{C}$ y un síntoma sistémico (mialgias, astenia, escalofríos). Un 90% de los casos presenta tos seca que perdura 1 ó 2 semanas luego de la resolución, al igual que la astenia y el malestar general. La fiebre dura entre 1 y 5 días y el cuadro agudo en general resuelve en una semana. Estudios comparativos sugieren que las infecciones por el subtipo A(H3N2) producen una enfermedad más grave que con el subtipo A(H1N1) o el tipo B. El virus influenza C causa resfrío común aunque, en ocasiones, se asocia con bronquitis y neumonía en adultos y niños. Las infecciones por influenza en niños se manifiestan en forma similar aunque se evidencian algunas diferencias como temperaturas más elevadas y convulsiones febriles en el 20% de los casos admitidos en hospitales. Los niños hospitalizados con influenza pueden presentar un cuadro de falso crup (vocablo derivado del francés *croup*, por el sonido de la tos; se considera verdadero crup al producido en el curso de la difteria), bronquiolitis o neumonía y se observa una relativa prominencia de otitis media y manifestaciones gastrointestinales, especialmente en menores de 6 meses. La letalidad por influenza en niños internados oscila alrededor del 4%.

5.1 COMPLICACIONES

Las complicaciones de la gripe son predominantemente respiratorias. Incluyen bronquitis aguda, laringotraqueobronquitis (crup),

bronquiolitis, neumonía, otitis media, absceso pulmonar, empiema, exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, del asma y de la fibrosis quística. Las complicaciones cardiovasculares se reflejan en anomalías en el ECG, falla cardíaca y miocarditis. A nivel del SNC pueden observarse convulsiones febriles en pediatría, encefalitis, síndrome de Guillain-Barré y síndrome de Reye. Éste último es un desorden multisistémico caracterizado por encefalopatía e hígado graso que ocurre principalmente en niños de 5 a 14 años que padecieron una infección por influenza B. Otras complicaciones son la falla renal, la dificultad en el control de la diabetes, la miositis y las complicaciones graves en los pacientes inmunocomprometidos por cáncer hematológico o receptores de trasplantes. También se ha descrito un pequeño pero significativo exceso de mortalidad atribuido al asma en temporadas de epidemias graves donde circuló influenza A(H3), aunque este dato se reduce a niveles poco significativos en brotes de influenza B. La asociación entre infección por influenza y muerte por bronquitis crónica fue reconocida ya en el siglo XIX. En relación con la edad, las muertes ocurridas por encima de lo esperado en la temporada invernal se registran regularmente en asociación con las epidemias de gripe y alrededor del 90% de este exceso ocurre en individuos mayores de 65 años. Hay que considerar que los individuos de este grupo de edad en general presentan alguna condición médica de base que se suma al riesgo. Por otra parte, existen numerosos informes de brotes de gripe en hogares de ancianos con alta tasa de ataque y elevada mortalidad, en comparación con individuos que viven en la comunidad. Los adultos con diabetes mellitus tienen 1,7 veces más probabilidad de morir por neumonía e influenza que la población general.

Las personas receptoras de trasplantes o con cáncer presentan un aumento de la susceptibilidad a las infecciones por influenza y mayor riesgo de complicaciones pulmonares y muerte. Las neumonías virales prevalecen sobre las de etiología secundaria bacteriana. Los pacientes inmunosuprimidos que padecen gripe excretan virus por períodos más prolongados que los inmunocompetentes. Se ha descrito eliminación de virus durante 21 días por niños que adquirieron la infección nosocomial y hasta por 9 semanas en un caso de infección por HIV. También las embarazadas que cursan entre el segundo y tercer trimestre de gestación durante el brote de gripe presentan un riesgo más elevado, aunque pequeño, de admisión hospitalaria, complicaciones pulmonares y muerte. El virus puede atravesar la placenta e infectar al feto, aunque no se han estableci-

do fehacientemente relaciones concretas entre malformaciones y la etiología viral.

5.1.1 Neumonía

La neumonía viral primaria es común como complicación de la gripe y presenta elevado riesgo de muerte sin infección bacteriana. Tanto influenza A como B pueden producir la neumonía viral primaria. La sintomatología es la correspondiente a la gripe aunque puede haber mayor tos y dolor de tórax (pleurodinia). Se presenta con un rápido deterioro y el intervalo medio entre el comienzo de los síntomas y la muerte es de 6 días. En la neumonía secundaria bacteriana, se documenta la infección bacteriana del pulmón junto a la infección con virus influenza. Estudios realizados durante las últimas pandemias revelan que casi las tres cuartas partes de los pacientes con neumonía fatal o grave tenían una infección bacteriana secundaria. En estos casos el comienzo puede ser insidioso a continuación de los síntomas de gripe, o bien se evidencia la recaída al 4° o 5° día de enfermedad, aunque puede ser más tardía. Los principales agentes bacterianos observados en una revisión de casos fatales fueron: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o infecciones mixtas. En un estudio realizado en Buenos Aires, en pacientes con neumonía de la comunidad que requerían internación, se diagnosticó neumonía por influenza como único agente en el 7,8% de los pacientes y como agente coinfectante en el 9,2%.

6. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

El diagnóstico de laboratorio de la infección por el virus influenza es una herramienta útil en Salud Pública debido al gran impacto en la morbilidad y mortalidad. El diagnóstico desempeña un rol de importancia tanto en el manejo individual del paciente como en el control de brotes. Existe una gran variedad de pruebas de laboratorio, ya sea para detectar la presencia de antígenos virales, ácidos nucleicos virales y partículas virales infecciosas (viriones) o células infectadas presentes en los materiales clínicos, en general muestras de secreciones respiratorias. También hay pruebas serológicas que detectan la respuesta inmune del hospedador (Figuras 14.7 A y B).

La elección de la prueba apropiada depende de la información requerida y de su uso posterior. Así, las pruebas de diagnóstico rápido para detección de antígenos por inmunofluorescencia (IF) o ensayo inmunoenzimático (ELISA) son las recomendadas al nivel hospitalario o en atención primaria para decidir intervenciones con antivirales específicos o como control de infecciones para aislamiento respiratorio del paciente. Estas técnicas son sencillas y no necesitan de un equipamiento sofisticado pero no proporcionan información antigénica de las cepas. Por el contrario, un laboratorio de referencia que participa en un programa de vigilancia de influenza requiere una batería de pruebas que permita un detallado estudio antigénico y genético de las cepas para lo cual es imprescindible realizar previamente el aislamiento viral en huevos embrionados o en cultivos celulares. Por otra parte, las técnicas rápidas tienen, en general, menor sensibilidad que el aislamiento viral o las técnicas moleculares, lo que redundará en un alto valor predictivo positivo. La baja sensibilidad de algunas técnicas puede ser mejorada mediante una buena elección de la muestra clínica a utilizar. Los virus influenza replican primariamente en las células epiteliales columnares del tracto respiratorio; por ende, la toma de muestra debe tender a cosechar la máxima cantidad de células de este tipo infectadas. Los lavados o aspirados nasofaríngeos tienen mayor contenido celular que los hisopados; en los hisopados o lavados faríngeos se obtienen sobre todo células epiteliales escamosas no convenientes para la detección directa del virus aunque éste puede ser aislado en cultivo. El pico de excreción viral se produce al cabo de 48-72 h. de iniciados los síntomas clínicos y luego disminuye notoriamente, por lo que se recomienda la toma de una muestra temprana, aunque en los niños ésta puede obtenerse aun luego de algunos días. Si la muestra va

a procesarse dentro de los 3 días de obtenida, debe conservarse a 4° C y evitar su congelación para preservar la estructura celular en caso de realizar IF, o disminuir la pérdida de infectividad si se va a realizar aislamiento. Para ello también es imprescindible mantener el material en un medio de transporte adecuado para virus. La realización de la toma de la muestra clínica dentro de los primeros 3 días de comienzo de la enfermedad y su adecuada conservación contribuyen en forma relevante a la detección del virus.

6.1 DIAGNÓSTICO RÁPIDO

La técnica más utilizada es la IF con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la nucleoproteína viral. Por lo tanto, debe contarse con reactivos separados para la detección de influenza A y B. También se dispone de anticuerpos monoclonales específicos para algunas HAs como H1 y H3 con los que se puede obtener información con rapidez del subtipo circulante. La ventaja de este método es su adaptabilidad al uso hospitalario y la posibilidad de aplicarlo a la detección de varios virus de forma simultánea. Las pruebas de ELISA para detección de antígenos son mucho menos utilizadas ya que no agregan sensibilidad y suelen ser más prolongadas. Sin embargo, en muchas oportunidades se recomienda el uso de las pruebas de ELISA de membrana, que pueden ser realizadas por personal no entrenado y se consideran útiles para diagnósticos rápidos realizados durante la consulta, a los efectos de implementar terapias específicas o tomar acciones preventivas.

6.2 CULTIVO

Los virus influenza replican en una variedad de células primarias, diploides o continuas pero el sistema más sensible y el más utilizado es la línea celular *Madin-Darby canine kidney* (MDCK), cuyas células contienen en su superficie ácido siálico con uniones α -(2,3) y α -(2,6) galactosa, aunque éste no es el único determinante de sensibilidad. Una condición indispensable para el aislamiento de influenza es la necesidad de agregar enzimas proteolíticas como la tripsina para asegurar el clivaje de la HA y, por ende, el ciclo de replicación viral. Asimismo, la presencia de suero fetal bovino inhibe la producción de virus infeccioso debido a la presencia de sustancias que inactivan las proteasas responsables del clivaje, o bien a macromoléculas glicosiladas que pueden inhibir la unión al receptor por parte del virus. Por lo expuesto, una manera de obtener buenos rendimientos en el aislamiento viral es la utilización de cultivos de células MDCK, lavando la monocapa antes de la inoculación y mantenidas luego con medio libre de suero y con el agregado de tripsina. También se mejora el aislamiento utilizando temperaturas de incubación bajas (33 a 35° C) o centrifugando el inóculo sobre la monocapa celular (cultivo rápido). El efecto citopático consiste en el redondeamiento celular con desprendimiento posterior, que en general se observa dentro de los 7 días de inoculados los cultivos.

El cultivo de virus influenza en huevos embrionados de gallina de 9 a 11 días es de uso amplio en veterinaria y en la producción de vacunas debido a su alto rendimiento. Las muestras se inoculan simultáneamente por vía intraamniótica e intraalantoidea, se incuban a 33-35° C por 3-4 días, al cabo de los cuales se cosechan ambos líquidos. La confirmación del aislamiento en huevos se realiza mediante hemaglutinación y en células por inmunofluorescencia y se titula luego la cosecha por hemaglutinación.

6.3 SUBTIPIFICACIÓN

La diferenciación entre tipos A y B y la determinación de los subtipos de A puede realizarse por RT-PCR (Figura 14.8) ó por inhibición de la hemaglutinación (IHA) con antisueros preparados en ovinos o pollos. Para una mejor caracterización antigénica de los aislamientos, se utilizan antisueros preparados en hurón con los que se detectan más específicamente las variantes antigénicas circulantes. Un aislamiento que presenta una reducción de 4 veces o más en el título IHA respecto de un antisuero preparado con una

Virus	Fecha de toma	Sueros de hurón post-infección		
		B/Yamanashi/166/98	B/Victoria/504/00	B/Hong Kong/22/01
Cepas de referencia				
B/Yamanashi/166/98		1280	<20	80
B/Victoria/504/00		640	640	20
B/Hong Kong/22/01		<20	<20	1280
Cepas de campo				
B/Buenos Aires/MC1/02	09/05/2002	<20	<20	160
B/Buenos Aires/MC4/02	30/05/2002	<20	<20	80
B/Buenos Aires/8039/02	19/06/2002	20	20-40	>2560
B/Buenos Aires/1025461/0	24/06/2002	<20	20	>2560
B/Córdoba/1027716/02	27/06/2002	<20	20	160
B/La Plata/1025279/02	03/07/2002	<20	40	>2560
B/Buenos Aires/7640/02	12/07/2002	<20	<20	160
B/Chaco/H5728/02	06/08/2002	<20	<20	160
B/Córdoba/1035565/02	12/08/2002	<20	<20	48-80
B/Neuquén/1978/02	03/09/2002	<20	<20	160

Tabla 14.2. Resultados de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación de cepas de referencia y de los aislamientos de influenza B (año 2002).

cepa previa se considera que ha experimentado un cambio antigénico significativo. Esta información es utilizada para evaluar la necesidad de modificar la composición de las vacunas a ser aplicadas a la población (Tabla 14.2).

6.4 DETECCIÓN DE RNA VIRAL

La reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (RT-PCR) es ampliamente usada en el diagnóstico, tipificación y subtipificación del virus influenza en materiales clínicos o aislamientos (Figura 14.8). También es utilizada para la diferenciación de los genes virales de alto rendimiento en la producción de vacunas o para el análisis del origen de los segmentos del RNA viral. En general, no se detecta un significativo aumento de la detección viral por este método en relación con el aislamiento. También pueden combinarse de modo apropiado los cebadores y las condiciones de la PCR para realizar una PCR múltiple en un único tubo. La combinación de PCR con el análisis mediante endonucleasas de restricción permite obtener información de las variaciones genéticas del virus obviando el detallado y laborioso análisis de secuencias. La utilización de una plataforma de PCR en tiempo real para la detección de influenza ha demostrado ser igualmente sensible y confiable que la PCR convencional, con las conocidas ventajas del corto tiempo de reacción y la disminución de posibles contaminaciones de laboratorio. La posibilidad de analizar molecularmente las cepas circulantes de influenza mediante secuenciación mejora y completa la calidad de los datos obtenidos a la hora de formular la composición de la vacuna anual.

6.5 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

En general no es útil para el manejo clínico inmediato pero puede establecer un diagnóstico retrospectivo o bien ser una herramienta útil en la vigilancia epidemiológica. Una de las dificultades en la aplicación del diagnóstico serológico es contar con las imprescindibles dos muestras pareadas de suero, ya que las infecciones por el virus de influenza suelen ser reinfecciones y el paciente habitualmente posee anticuerpos circulantes detectados por las técnicas más usuales como la fijación de complemento (FC), que detecta los anticuerpos dirigidos hacia la nucleoproteína, o la IHA que mide los anticuerpos protectores generados por los antígenos de tipo y subtipo. También puede recurrirse a la detección de IgM en una única muestra aunque no es de uso habitual y también tiene baja sensibilidad. La técnica de neutralización que requiere trabajar con

virus infeccioso, provee información similar a la IHA por lo que no se la utiliza de forma habitual. La FC es poco sensible y los anticuerpos que detecta se producen tardíamente como para ser de utilidad diagnóstica.

Cualquiera de las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de influenza será seleccionada con base en la disponibilidad técnica y en la estrategia de trabajo. Pero es de especial importancia tener en cuenta que debido a la gran variabilidad del virus influenza, todo aislamiento de campo puede constituir una valiosa información para la epidemiología de la gripe.

El valor de las diferentes muestras clínicas y la sensibilidad de las técnicas diagnósticas se observan en Tablas 14.3 y 14.4.

7. PROFILAXIS

7.1 VACUNAS INACTIVADAS

La vacunación representa el mayor soporte para la prevención de la gripe. Los anticuerpos dirigidos contra la HA y la NA son los responsables de la protección contra la infección y contribuyen a la mejoría de la enfermedad. En la actualidad, se dispone comercialmente de tres tipos de vacunas inactivadas cultivadas en huevos: a virus enteros (viriones completos), a virus fraccionados (*split*) obtenidas por un paso de ruptura de la envoltura viral, y vacunas con antígenos de superficie purificados. Todas son igualmente inmunogénicas, aunque sólo las dos últimas son las aconsejadas para uso en pediatría.

Las vacunas antigripales desencadenan una respuesta inmune cepa-específica con niveles reducidos de protección para variantes antigénicas respecto de las cepas vacunales y no son eficaces para cepas no relacionadas. Por lo tanto, deben ser trivalentes, incluyendo 15 µg de cada uno de los antígenos correspondientes a los dos subtipos de influenza A (H1N1 y H3N2) y de influenza B. La Organización Mundial de la Salud (OMS), previa consulta con los expertos de sus Centros Colaboradores, recomienda la composición de la vacuna a ser usada en la siguiente temporada del hemisferio norte en febrero y del hemisferio sur en septiembre de cada año. Luego de la vacunación, alrededor de un 90% de los sujetos normales desarrollan títulos de anticuerpos IHA ≥ 40 (es decir, \geq a una dilución 1:40 con resultado positivo) considerados protectores. La protección para la enfermedad ocasionada por infecciones por el virus de influenza A confirmadas por laboratorio en individuos jóvenes sanos, cuando existe buena correlación entre el virus vacunal y el circulante, se estima en un 70-95%. Los grupos de personas definidos por su alto riesgo de

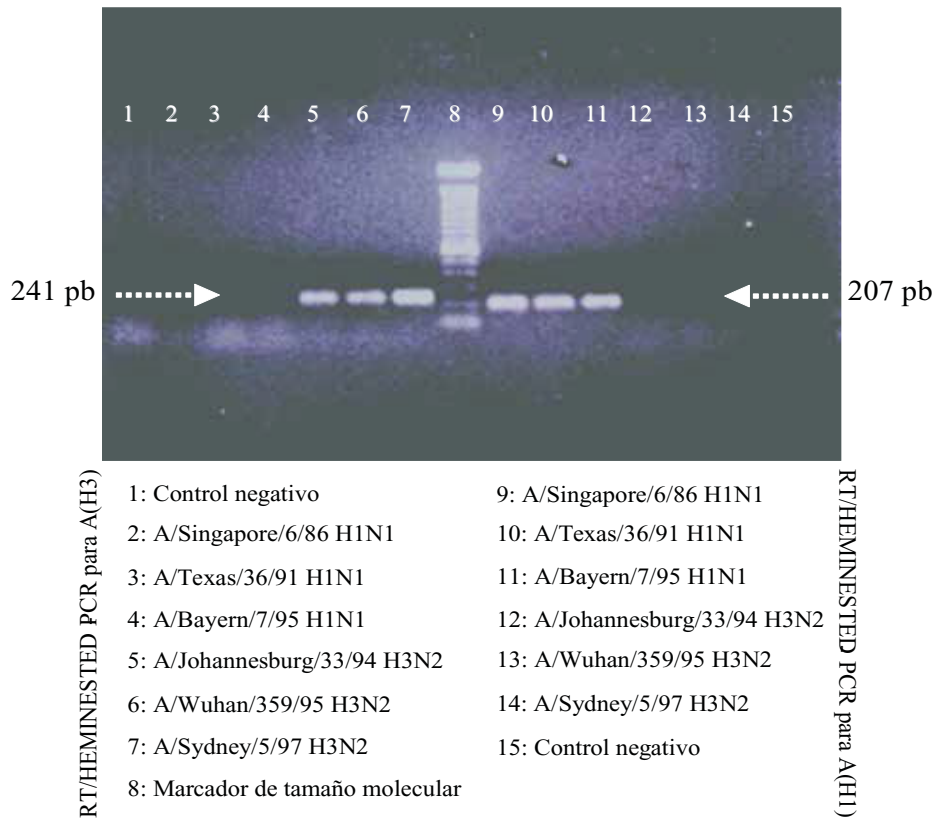


Figura 14.8. Reacciones de RT-PCR hemi-anidada (*hemi Nested*) para detección de cepas de influenza A subtipos H1 (pb = 207) y H3 (pb = 241).

padecer una gripe sintomática o bien una complicación con elevada morbilidad y mortalidad están incorporados en las recomendaciones de las normas nacionales de vacunación. Estas observaciones están avaladas por diferentes estudios epidemiológicos realizados durante epidemias o pandemias de gripe durante las cuales se detectan índices elevados de mortalidad por causas cardíacas, respiratorias o desórdenes metabólicos o renales. Otros datos confiables se han obtenido a raíz de estudios controlados realizados para evaluar el efecto de los programas de vacunación en la reducción de las hospitalizaciones por enfermedades cardíacas o respiratorias. Así, en un estudio realizado en Argentina, luego de implementar programas anuales de vacunación antigripal, se observó una efectividad del 38% en prevenir internaciones por neumonía en individuos mayores de 65 años y del 45% en el grupo de alto riesgo. La mortalidad durante las internaciones por neumonía se ve significativamente disminuida cuando los individuos de este grupo etario reciben de forma conjunta vacuna antigripal y antineumocócica. Por otra parte, lactantes y niños sanos presentan un riesgo aumentado de internación durante la temporada de circulación de virus influenza por lo que en algunos países han recomendado la vacunación de los niños de 6 a 23 meses de edad.

En Argentina, antes de la pandemia, la vacunación en Pediatría se recomendaba sólo para niños de alto riesgo. A partir del 2010 la vacuna antigripal –que incluye, además de las cepas estacionales, la cepa pandémica H1N1– se ha integrado al Calendario Oficial de vacunación en Argentina.

Es gratuita y obligatoria para personal de salud, embarazadas, madres de niños menores de 6 años y niños de 6 a 24 meses. Para mayores de 65 años o personas con enfermedades de riesgo es gratuita con la presentación de una orden médica. (Ver Capítulo de *Vacunas Virales*).

7.1.1 Efectos adversos

Millones de dosis de vacuna antigripal se administran anualmente en todo el mundo y la proporción de efectos adversos es baja. Estos

consisten, en especial, en eritema en el sitio de inyección, aunque algunos pacientes relatan síntomas sistémicos y fiebre que no pudieron detectarse en forma significativa en relación con el placebo. Es controvertido el tema en relación con los pacientes asmáticos y la exacerbación de la hiperreactividad bronquial. Los últimos estudios controlados recomiendan la vacunación debido a sus efectos protectores dada la morbilidad de influenza en este grupo.

7.2. VACUNAS A VIRUS VIVOS

Estas vacunas se producen con virus recombinantes a partir de cepas de virus atenuados adaptadas a la propagación en frío (*cold-adapted*) que funcionan como dadoras de atenuación y los antígenos HA y NA de las cepas recomendadas para la vacuna anual. Son de administración nasal e inducen una respuesta de tipo humoral y celular en el tracto respiratorio superior e inferior. Recientemente, fueron aprobadas para su uso en EE.UU. en una población sana de 5 a 49 años.

7.3 VACUNAS PARA LA PREVENCIÓN DE LA INFLUENZA PANDÉMICA

Luego de los últimos eventos de infección por virus de gripe aviar altamente patógenos en humanos, se desarrollaron virus vacunales candidatos para ser utilizados en la producción de vacunas dirigidas a prevenir la enfermedad por cepas pandémicas. Estas vacunas están principalmente basadas en tecnologías de genética inversa cuyas ventajas más relevantes consisten en la posibilidad de remover las bases moleculares de la alta patogenicidad de este virus y la habilidad de producir virus reasociados utilizando los genes de la HA modificado y de la NA del virus aviar y el resto de los genes provenientes de un virus seguro utilizado en la producción de vacunas, como el A/PR/8/34. El virus obtenido atenuado para el hombre tiene la capacidad de propagarse de forma adecuada en huevos embrionados y en células de mamíferos. Se están llevando

Técnica	Sensibilidad	Tiempo	Tarea
IF	50-90%	2-4 h.	V,D
EIA	50-80%	2-20 h.	V,D
EIA membrana	60-100%	15-30 min.	V,D,P
RT-PCR	90-100%	1-1,5 día	V,D, otra
RT-PCR tiempo real	90-100%	2 h.	V,D, otra

Tabla 14.3. Sensibilidad comparada de diferentes técnicas de detección con respecto al aislamiento en cultivo celulares. V: Vigilancia, D: Diagnóstico, P: Prueba paciente cercano.

a cabo ensayos piloto con el fin de obtener la aprobación de estas vacunas.

En base a la experiencia previa, se implementaron metodologías similares para la obtención de una vacuna eficaz en la prevención de la infección por la nueva influenza A (H1N1).

8. TRATAMIENTO ANTIVIRAL

La terapia antiviral específica para la gripe es posible mediante el uso de dos tipos de drogas: los inhibidores del canal iónico M2 (amantadina y rimantadina) y los inhibidores de la neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir). El primer grupo fue descubierto en los años 60 y actúa sólo sobre influenza A inhibiendo el desnudamiento viral al inicio del ciclo de replicación. Reducen la fiebre y los síntomas en 1 ó 2 días si se administran dentro de las 24 horas transcurridas desde el inicio de los síntomas, aunque también pueden usarse para prevenir la infección. La profilaxis post-exposición en los convivientes previene la enfermedad por influenza A en alrededor de un 70%, pero puede aparecer con rapidez resistencia antiviral. La base genética para la resistencia involucra sustituciones aminoacídicas únicas en las posiciones 26, 27, 30, 31 ó 34 en la porción transmembrana del canal iónico M2. Tienen algunos efectos secundarios indeseables a nivel del SNC, aunque la rimantadina es mejor tolerada que la amantadina.

En los últimos años se ha detectado a nivel mundial un dramático aumento de virus influenza A (H3) resistente a los adamantanos, ya sea por presión adaptativa del virus post-tratamiento o por mutaciones que ocurren naturalmente. Esta observación llevó al cese de la indicación de su uso para tratamiento o quimioprofilaxis de las infecciones por influenza.

El segundo grupo de antivirales compite con la NA viral a nivel del sitio activo en la unión con el ácido siálico del receptor celular, lo que impide la liberación de los nuevos viriones limitando la infección; esta porción de la NA es una región altamente conservada en influenza A y B por lo que el antiviral es efectivo para ambos tipos de virus. Deben ser administrados dentro de las 36 horas transcurridas desde el comienzo de la enfermedad, habiéndose observado reducción de la duración de la misma en 1,5-2,5 días y un 31% de reducción en las complicaciones de la gripe o en la gravedad de los síntomas. Los pacientes que reciben oseltamivir tienen títulos virales significativamente más bajos en hisopados nasales y faríngeos sin disminuir la respuesta humoral a la infección.

A partir del 2008 se comenzaron a detectar cepas de influenza A (H1) estacional resistentes al inhibidor de NA de administración por vía oral (oseltamivir). En algunas regiones esta resistencia llegó a detectarse hasta en el 100% de las cepas estudiadas. Por estudios preliminares realizados para la nueva influenza A (H1N1) se detectaron también algunas cepas resistentes aunque en baja proporción. No ocurre lo mismo con el antiviral de administración por aerosol (zanamivir) para el cual no se detectaron cepas resistentes.

Muestra	Células	IF	ELISA	Cultivo
Lavados o aspirados NF	+++	+	+	+++
Hisopados NF	+	+	+	++
Hisopados o lavados faríngeos	NC	+/-	+/-	+
Hisopados nasofaríngeos	+	+	+	++
BAL (lavado bronco-alveolar)	++	+	+	+++
Biopsia pulmón	++	+	+	+++

Tabla 14.4. Muestras clínicas para la detección de virus influenza. NC: Tipo de células no conveniente.

9. EPIDEMIOLOGÍA

La gripe es una enfermedad de distribución mundial que se presenta con preferencia en las épocas invernales de los países de clima templado, entre mayo y septiembre en el hemisferio sur (Figura 14.9) y entre octubre y marzo en el hemisferio norte.

En los países tropicales puede presentarse durante todo el año, aunque está descrita cierta asociación con las temporadas de lluvia. La gripe epidémica suele manifestarse año tras año, a partir de la circulación de una nueva variante viral o de un subtipo o tipo viral diferente al predominante en años anteriores, lo que determinará también los grupos de población más afectados. Pero, cuando surge un nuevo virus –por cambio de la HA y/o de la NA viral para el cual la población humana no tiene memoria inmune– que logra propagarse eficientemente entre los individuos, se producen epidemias mundiales que se denominan pandemias.

Desde una perspectiva epidemiológica, la gripe constituye un permanente desafío debido a la naturaleza cambiante del virus, su actividad impredecible y la fragilidad de los datos recogidos para establecer el verdadero impacto de la enfermedad. Los parámetros más utilizados son el exceso de mortalidad y de morbilidad, el ausentismo escolar y las tasas de hospitalización. La medición de la magnitud de la morbilidad por gripe tiene limitaciones debidas a que está basada en un diagnóstico clínico carente de especificidad por lo que los datos se computan como síndrome tipo influenza y se relacionan con el total de las consultas por todas las causas. Un índice más útil es la medición del efecto de esta enfermedad sobre la mortalidad registrada en las estadísticas vitales (Figura 14.10), aunque en los certificados de defunción generalmente no se registra la gripe como causa del deceso. Por lo tanto, se registran las neumonías y las complicaciones cardíacas o pulmonares crónicas preexistentes. De todos modos, éstos son datos que sólo podrán dar información retrospectiva. Datos de mortalidad obtenidos en Santa Fe, Argentina, describen el efecto de las epidemias de gripe sobre la mortalidad. Al respecto, se detectó en cuatro temporadas un exceso de muertes asociadas a la circulación de influenza A(H3N2), aunque no en todos los años en que circuló este virus, por lo que se presume la existencia de otros factores asociados a la gravedad de dichas epidemias de gripe (Figura 14.9).

9.1 VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

La OMS ha establecido una red mundial de vigilancia de la gripe con la finalidad de conocer las características de la distribución mundial de estos virus, su estacionalidad y la aparición de nuevas variantes de impacto en la salud humana. Está constituida por alrededor de 110 laboratorios llamados Centros Nacionales de Influenza

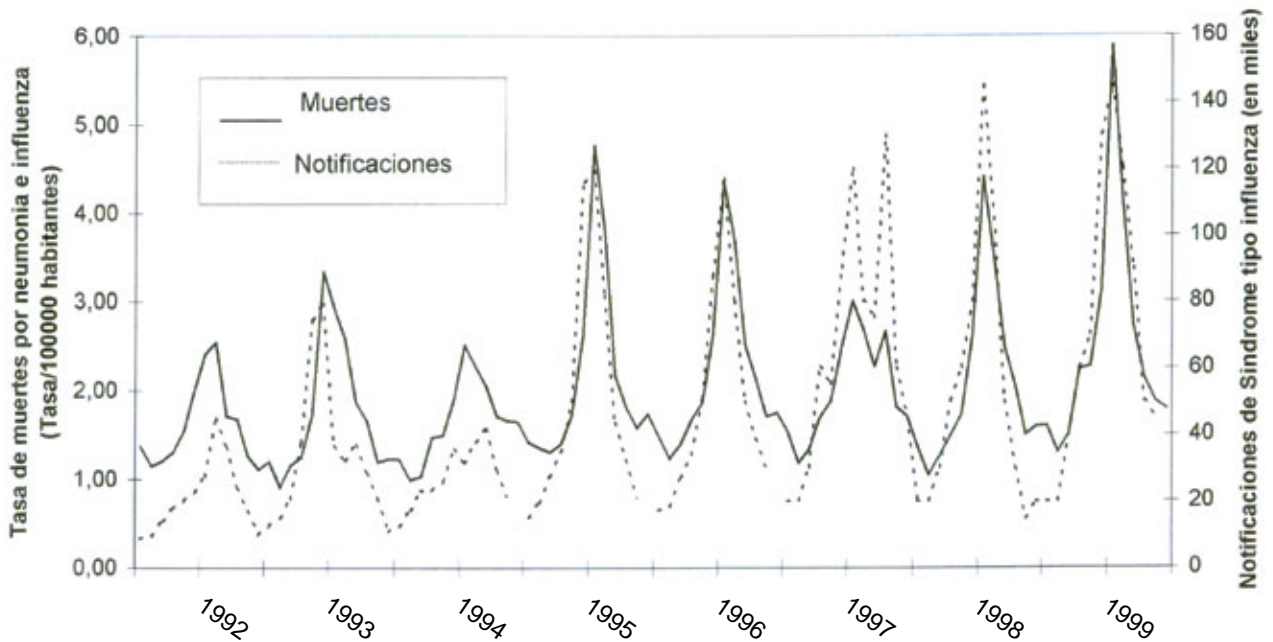


Figura 14.9. Notificaciones por síndrome tipo influenza y muertes por neumonía e influenza. Santa Fe, Argentina 1992-1999. Fuente: Kuszniierz y col. (2002).

cuya responsabilidad es obtener información acerca de las cepas circulantes, sus características antigénicas e impacto epidemiológico. Actualmente, la vigilancia de gripe en Argentina se basa en diferentes estrategias centralizadas en el Ministerio de Salud: la vigilancia virológica mediante una red nacional de laboratorios, las unidades centinela distribuidas en gran parte del país que cuentan con un componente epidemiológico, uno clínico y uno de laboratorio y la notificación obligatoria de casos de síndrome tipo influenza. Los datos se ingresan en un sistema interconectado que permite conocer la situación en cualquier punto del mismo. Cuando los casos denunciados superan el umbral establecido, que en general se ubica entre el 8 y 10% de las consultas, y se obtienen resultados positivos para influenza en las muestras clínicas, se define la situación como epidémica.

La vigilancia virológica permite contar con un elevado número de muestras clínicas positivas para virus influenza que proporcionan información relacionada con las variantes del virus y su correlación con las cepas vacunales. Una proporción de los aislamientos obtenidos se envía periódicamente a los Centros Colaboradores de la OMS, laboratorios de referencia internacional, contribuyendo así con datos nacionales a la información que definirá la composición de las vacunas a utilizar en la población.

10. INFLUENZA PANDÉMICA

Las aves acuáticas de vida silvestre constituyen reservorios naturales de los virus influenza A; evolutivamente se ha establecido en ellas un equilibrio tal, que no enferman. En estas aves circulan todos los subtipos de HA descritos hasta el presente (del 1 al 16) y de NA (del 1 al 9). Las aves acuáticas son las responsables de transmitir estos virus a especies de mamíferos que incluyen humanos, porcinos, equinos y también a las aves de corral, donde pueden establecer linajes permanentes o bien causar infecciones transitorias y a veces muerte. Puede ocurrir que se transmita el virus completo, como ha ocurrido desde 1997 en las infecciones humanas por virus aviar altamente patógeno A (H5N1), o que segmentos del genoma de virus aviares reasociados con segmentos de virus de mamíferos constituyan nuevos virus, como los virus pandémicos de 1957 y 1968 (Figura 14.11).

Por lo general, cuando un nuevo virus de influenza A hace irrupción en la población humana, desaparece el virus que había circulado con anterioridad, excepto en el evento de reintroducción de los virus H1N1 en 1977, momento a partir del cual co-circulan en humanos virus influenza A H3N2 y H1N1 de forma conjunta con influenza B. Los frecuentes brotes de influenza aviar H5N1 altamente patógena en aves de corral de Asia detectados a partir de 2002 y las infecciones a humanos ocurridas en este contexto, han generado expectativas relacionadas con la posibilidad de que este subtipo viral logre una eficiente transmisión persona a persona y se establezca como virus pandémico. Durante sucesivos brotes ocurridos entre 1997 y 2001, este virus se mantuvo antigénicamente homogéneo; pero en 2002 presentó una variación antigénica importante que le otorgó alta patogenicidad para los patos y otras aves acuáticas, hecho no observable por lo habitual en la naturaleza. A partir de 2004, se sucedieron brotes de tal magnitud en China, Japón, Corea, Tailandia, Vietnam, Indonesia, Camboya y Laos que condujeron a la destrucción de más de 150 millones de aves, principalmente pollos, y que afectó –hasta febrero de 2013– al menos a 615 personas con 364 defunciones, extendiéndose luego a países como Turquía, Irak y Egipto, Indonesia, China y Vietnam entre otros.

Los casos humanos se presentaron sobre todo entre niños y adultos jóvenes, con una neumonía viral primaria y fallo multiorgánico con evolución clínica muy agresiva y una letalidad de alrededor del 50%. El contagio se produjo por contacto directo con aves infectadas u objetos contaminados con sus deyecciones y en general afectó a personas que convivían muy estrechamente con las aves enfermas en el medio rural. Hasta el presente no se ha confirmado transmisión eficiente de persona a persona, pero si ocurriera una reasociación con cepas de influenza humana, la probabilidad de transmisión exitosa entre personas sería elevada. Aunque no se conocen con certeza todos los factores que determinan la patogenicidad de los virus influenza, se puede afirmar a la luz de los conocimientos actuales, que un amplio tropismo tisular y la habilidad de replicar sistemáticamente podrían explicar esta característica. Al nivel molecular, uno de los determinantes de alta patogenicidad es la presencia de una serie de aminoácidos básicos en el sitio de clivaje de la HA, lo que le permite utilizar las proteasas presentes en una extensa gama de tejidos y por ende

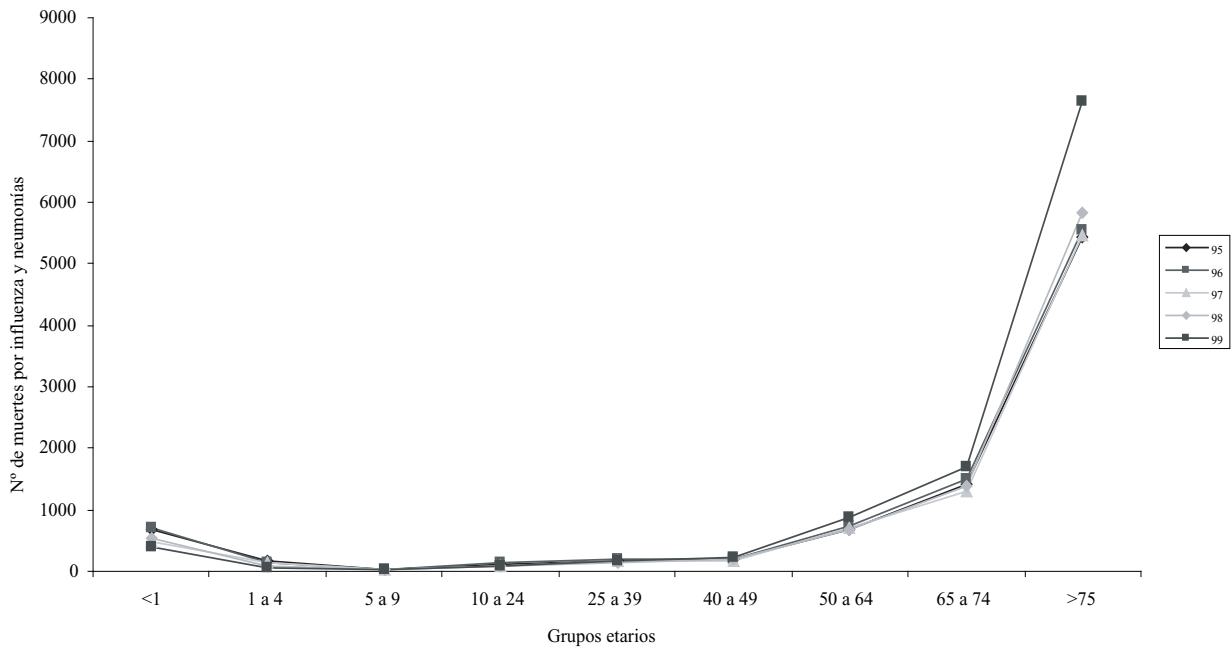


Figura 14.10. Mortalidad por influenza y neumonías en diferentes grupos etarios para los años 1995-1999. Fuente: Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud, Argentina.

replicar en ellos. Por otra parte, diversos hallazgos indican que múltiples constelaciones de genes son necesarias para conferir la alta patogenicidad y que la evolución de la infección es dependiente del hospedador.

Existen dos mecanismos por los cuales este virus aviar podría transformarse en un virus pandémico: una adaptación paulatina al nuevo hospedero por mutaciones acumulativas ocurridas durante una sucesión de pasajes en el hombre o bien una reasociación con genes de virus influenza humanos que le otorgarían la capacidad de infectar y transmitirse en forma eficaz y durable.

La alarma generada en todo el mundo ante la posibilidad de una nueva pandemia se justifica por la sobrecarga de morbi-mortalidad que éstas generan, con el consecuente impacto social. La forma ideal de combatir la emergencia de un nuevo virus para el hombre es inhibir o reducir la probabilidad de infecciones entre las especies. La matanza de las aves infectadas demostró ser el método más eficaz al presente ya que reduce la carga viral y la posibilidad de infectar al hombre. También se han incluido medidas de higiene y cambios en los mercados de aves vivas en las regiones afectadas, así como la instrumentación de un plan de vacunación de las aves en las granjas de la región afectada utilizando una cepa H5N1 inactivada. De todos modos, si no se logra contener la transmisión inter-especie, se deberá apuntar hacia las estrategias de vacunación y de rápida producción de vacunas humanas adecuadas, las que probablemente no se puedan obtener en tiempo y forma a partir del sustrato habitual que son los huevos embrionados. Por lo tanto, están en ensayo nuevas tecnologías basadas en genética inversa utilizando plásmidos con virus H5 o H7 modificados en la secuencia de la HA. Tanto esta tecnología como las vacunas preparadas en cultivos celulares o con adyuvantes alternativos necesitarán la aprobación de los organismos de control luego de ensayos clínicos apropiados, lo que debería realizarse antes de la declaración de la pandemia. En 2005, luego de reconstruirse el genoma completo del virus causante de la pandemia de 1918 mediante genética inversa, se postuló que un virus de influenza (totalmente) aviar había circulado en humanos poco tiempo antes de la pandemia de 1918. Sin embargo, subsiguientes análisis publicados en 2006, desafiaron la hipótesis postulada, sugiriendo que la pandemia de 1918 había sido causada por un virus que circulaba en mamíferos y que luego había experimen-

tado eventos de reasociación de genes. Con independencia de la verdad aún por develar sobre el pasado del virus, la vigilancia de los cambios genéticos que se producen en los virus aviares, que están infectando al hombre en la actualidad, podría ayudar a predecir el desarrollo de su capacidad de transmisión eficiente en humanos.

10.1. LA PANDEMIA DE INFLUENZA A H1N1

Son muchos los hechos involucrados en la aparición de un virus nuevo: sus orígenes, la adquisición de la capacidad para saltar de un reservorio natural a nuevos hospedadores, la posibilidad de producir enfermedad y la de propagarse directamente entre ellos. Se desconoce si el virus H5 N1 pueda llegar a ser el próximo agente causal de una pandemia, por lo que cualquiera de los posibles candidatos sólo podrá ser detectado mediante una cuidadosa vigilancia de eventos no habituales tanto en salud humana como animal.

A pesar de los ingentes esfuerzos realizados en los últimos años para preparar al mundo para enfrentar una nueva pandemia de influenza, la naturaleza y el impacto de las actividades humanas hicieron posible el surgimiento de un nuevo virus no procedente del reservorio aviar sino como consecuencia de diversas reasociaciones de genes de cerdos de distintos linajes, virus aviares y humanos. Los laboratorios carecían de métodos diagnósticos específicos para este agente por lo que en Argentina el primer caso se diagnosticó por aislamiento viral con confirmación posterior por técnicas moleculares en el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán. Luego, se implementó el diagnóstico por RT-PCR en tiempo real siguiendo normas internacionales (CDC/OMS) centralizándose el mismo para atender la demanda de hospitales e instituciones públicas y privadas que no disponían de la tecnología adecuada.

A la vez que se realizaba el diagnóstico individual de los casos probables también fue necesario realizar la caracterización del virus circulante. Se implementó el aislamiento viral en condiciones de alta contención biológica (BSL-3) y la secuenciación del genoma completo para monitorear la sensibilidad a los antivirales disponibles, verificar si se producía reasociación con las cepas de virus influenza A estacionales (ya circulantes en la población y en otras especies animales), determinar si el virus adoptaba cambios

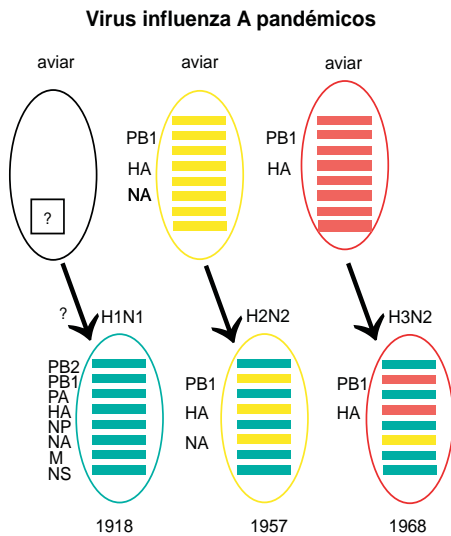


Figura 14.11. Generación de los últimos virus pandémicos hasta 1968.

asociados a mayor virulencia y también trabajar muy estrechamente con los equipos de salud de vigilancia epidemiológica veterinaria para verificar si se producían eventos de salto de especie humano-porcino-aviar.

Los resultados indicaron: que los virus mantenían una alta homología con los virus que habían iniciado el brote epidémico en Norteamérica; que circulaba un solo linaje viral; que no había sufrido reasociación con los virus estacionales; que eran resistentes a amantadina pero mantenían la sensibilidad al oseltamivir; y que no habían adquirido cambios relacionados a factores de virulencia previamente descritos.

Fue posible establecer la transmisión del virus de humanos a un plantel de cerdos de una granja ubicada en la Pcia. de Buenos Aires.

Por otro lado, debido a que la mortalidad inicial observada en nuestro país era mayor a la de otras regiones y a que el brote epidémico se solapaba con la temporada invernal, momento de circulación de otros patógenos productores de IRA, se realizó la búsqueda de otros agentes virales y bacterianos para determinar si los casos severos se asociaban con coinfecciones. Se observó la coinfección con otros virus respiratorios como así también con bacterias productoras de infección respiratoria, estableciéndose la mayor asociación en los casos graves con el *Streptococcus pneumoniae*.

Es sabido la frecuente emergencia de cepas resistentes, seleccionadas en pacientes inmunocomprometidos infectados con virus de influenza bajo tratamiento antiviral. Como consecuencia de la implementación de la secuenciación del genoma completo se mantuvo el monitoreo de la sensibilidad al oseltamivir y fue posible detectar la selección de una cepa resistente en un niño trasplantado renal que había adquirido la infección y había sido tratado con oseltamivir. Afortunadamente la cepa resistente no se diseminó en la población.

Debido al gran requerimiento diagnóstico que generó la pandemia se decidió realizar la transferencia tecnológica del diagnóstico molecular del virus influenza A al resto del país. Se transfirieron una RT-PCR convencional, que amplifica una región del gen que codifica para la proteína matriz, y la RT-PCR en tiempo real implementada en el Laboratorio Nacional de Referencia, recomendada por la OMS. Se aprovecharon las capacidades ya existentes para la realización de ensayos de RT-PCR convencional en los laboratorios de la Red Nacional de Influenza y Virus Respiratorios o de otros laboratorios asociados a esta Red y las limitadas capacidades de RT-PCR en tiempo real ya disponibles en el país.

Si bien la pandemia demandó un gran esfuerzo en muchos aspectos y uno de ellos fue la respuesta del laboratorio, la consecuencia de esta demanda ha sido la implementación de nuevas tecnologías tanto en el Laboratorio Nacional de Referencia como en los laboratorios de la Red Nacional de influenza y Virus Respiratorios lográndose así que el país presente mejores condiciones para afrontar futuros eventos con potencial pandémico.

En relación al virus de la influenza pandémica a H1N1 del 2009, su patogenia se describe en el Capítulo 5; los comienzos de la pandemia en el Capítulo 59; y las vacunas en el Capítulo 59.1.

Bibliografía

- American Lung Association. "The safety of inactivated influenza vaccine in adults and children with asthma". *N Engl J Med* 2001; 345:1529-36.
- Baumeister E, Palacios G, Cisterna D, Soloyov A, Hui J, Savji N, *et al.* "Molecular characterization of severe and mild cases of influenza A (H1N1) 2009 strain from Argentina". *Medicina*, Buenos Aires 2010; 70: 518-23.
- Caberlotto OJ, Cadario ME, Garay JE, Copacastro CA, Cabot A, Savy V. "Neumonía adquirida en la comunidad en dos poblaciones hospitalarias". *Medicina* (Buenos Aires) 2003; 63:1-8.
- Cané A, Casanueva E, Iolster T, Sticco N, Richards L, Sosa P, *et al.* "First isolation of an oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) strain in Argentina". *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29: 384.
- Dayan GH, Nguyen VH, Debbag R, Gómez R, Wood SC. "Cost-effectiveness of influenza vaccination in high risk children in Argentina". *Vaccine* 2001; 19:4204-13.
- Hay A. "Section 2: Virus structure and replication". En: Nicholson K.G., Webster R.G., Hay A. *Textbook of Influenza*, Oxford: Blackwell Science, 1998; 29-106.
- Imaz MS, Eimann M, Poyard E, Savy V. "Exceso de mortalidad asociada a influenza en Argentina". 1992-2002. *Rev Chil Infect* 2006; 23: 297-306.
- Izurieta HS, Thompson WW, Kramarz P, Shay DK, Davis RL, De Stefano F, *et al.* "Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children". *N Engl J Med* 2000; 342:232-9.
- Kuszniarz GF, Imaz MS, Zerbini EV, Savy VL, Knez V, Sequeira MD. "Efecto de las epidemias de influenza sobre la mortalidad en Santa Fe, Argentina, en 1992-1999". *Rev Panam Salud Pública*, 2002; 12: 26-36.
- Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, *et al.* "Influenza: emergence and control". *J Virol* 2004; 78: 8951-9.
- Palacios G, Hornig M, Cisterna D, Savji N, Bussetti AV, Kapoor V, *et al.* "Streptococcus pneumoniae coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza". *PLoS One* 2009; 4: e8540.
- Palese P, Shaw M. "Orthomyxoviridae: The virus and their replication". En: Lippincott, Williams and Wilkins. *Fields Virology*, 2007. New York.
- Pereda A, Cappuccio J, Quiroga MA, Baumeister E, Insaralde L, Ibar M, *et al.* "Pandemic (H1N1) 2009 outbreak on pig farm, Argentina". *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 304-7.
- Pontoriero AV, Baumeister EG, Campos AM, Savy VL, Lin YP, Hay A. "Antigenic and genomic relation between human influenza viruses that circulated in Argentina in the period 1995-1999 and the corresponding vaccine components". *J Clin Virol* 2003; 28: 130-40.
- Pontoriero AV, Baumeister EG, Campos AM, Moreno A, Cadario ME, Savy V. "Surveillance of adamantane resistance among influenza A H3 viruses isolated in Argentina between 2001 and 2007". *Rev Arg Microbiol* 2008; 40: 180-4.
- Russell CA, Jones TC, Barr IA, Cox N, Garten RJ, Gregory V, *et al.* "The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses". *Science* 2008; 320: 340-6.
- Stamboulia D, Bonvehi P, Nacinovich FM, Rüttimann RW. "Immunization against influenza in the elderly: the Argentinian experience.1993-1997". *Vaccine* 1999; 17: S53-S56.
- Taubenberger JK, Morens DM. "1918 Influenza: the mother of all pandemics". *Emerg Inf Dis* 2006;12:15-22.
- Wright PF, Neumann G, Kawaota Y. "Orthomyxoviruses". En: Lippincott, Williams and Wilkins. *Fields Virology*, 2007. New York.
- Zambon M. "Laboratory diagnosis of influenza". En: Nicholson KG, Webster RG, Hay A. *Textbook of Influenza*, Oxford: Blackwell Science, 1998; 300-313.
- Zhang W, Evans D. "Detection and identification of human influenza viruses by polymerase chain reaction". *J Virol Methods* 1991; 33:165-89.

15

PARAMYXOVIRUS

Guadalupe Carballal - Mónica Galiano - Alicia Mistchenko - Cristina M. Videla

Características de la familia Paramyxoviridae

Guadalupe Carballal - Cristina M. Videla

La familia *Paramyxoviridae* incluye al más importante patógeno productor de infecciones respiratorias agudas (IRA) en niños: el virus sincicial respiratorio humano (*human respiratory syncytial virus* -RSV-); a los virus parainfluenza, sarampión y parotiditis, y a un nuevo virus descubierto en el 2001, el metapneumovirus humano (*human metapneumovirus* - hMPV).

Todos los paramyxovirus penetran por vía respiratoria y producen infecciones agudas. Afectan con frecuencia a la población pediátrica, aunque también infectan a adultos, ancianos e inmunosuprimidos.

Los paramyxovirus pueden provocar infecciones localizadas exclusivamente en el tracto respiratorio (IRA) o, además, diseminadas a otros órganos. Los virus que producen IRA son los virus parainfluenza, el RSV y el hMPV. Dado que no producen viremia, no se diseminan a otros órganos. En niños pequeños pueden producir desde IRA leves del tracto superior, hasta IRA del tracto inferior graves y aún mortales. La inmunidad depende fundamentalmente de la IgA en la mucosa respiratoria. Esta respuesta local de IgA suele ser de escasa magnitud y corta duración, por lo cual son frecuentes las reinfecciones. Por ésta y otras causas inherentes a los virus, no existen aún vacunas eficaces para RSV, parainfluenza y hMPV.

Los paramyxovirus que producen infecciones diseminadas son el virus del sarampión y el de la parotiditis. Estos también penetran y replican en el tracto respiratorio pero, además, producen viremia y de esa forma se diseminan a otros tejidos (piel, testículo, glándulas salivales, SNC, etc.). Dada la intensa estimulación antigénica producida por la viremia y por la replicación en órganos se induce una importante respuesta humoral (IgM e IgG) y celular que genera una inmunidad sólida y duradera y resistencia a las reinfecciones. Para prevenir el sarampión y las paperas (vocablo proveniente de *papo*: parótida) existen vacunas a virus vivo y atenuado de gran eficacia.

1. TAXONOMÍA (TABLA 15.1.1)

La familia *Paramyxoviridae* comprende dos subfamilias: *Paramyxovirinae* que incluye cuatro géneros (*Respirovirus*, *Morbillivirus*, *Rubulavirus* y *Henipavirus*) y la subfamilia *Pneumovirinae* (con los géneros *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*). Las subfamilias y géneros se definen de acuerdo a sus características morfológicas (diámetro de la nucleocápside, antígenos, etc.), a la actividad biológica de sus proteínas y a la organización de sus genomas.

Dentro del género *Respirovirus* se incluyen los virus parainfluenza humano (1 y 3) y dentro del *Rubulavirus*, el virus parotiditis (paperas) y los virus parainfluenza humano 2 y 4. En el género *Morbillivirus* se encuentra el virus sarampión y otros productores de enfermedad en animales.

En el género *Pneumovirus* se ubica el RSV y otros que afectan a animales. En el género *Metapneumovirus* se clasifica el hMPV y el pneumovirus aviar que afecta a aves.

En el nuevo género *Henipavirus* se encuentran dos virus muy patógenos productores de zoonosis, el virus Nipah y el virus Hendra. El Nipah se descubrió en 1998 en Malasia y Singapur y recientemente se han reportado casos en Bangladesh. Está asociado a infección respiratoria en cerdos y a encefalitis en humanos, con una mortalidad del 40%. El hombre se infecta indirectamente por contacto con cerdos infectados. El Hendra se describió por primera vez en 1994 en Australia, en cuadros respiratorios en caballos y en el hombre. Ambos virus han sido clasificados como patógenos de clase 4 y sus reservorios son los murciélagos frugívoros.

2. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Los paramyxovirus son esféricos y de mayor tamaño (150-300 nm) que los orthomyxovirus y presentan más pleomorfismo debido a



Género	Especie	Serotipos
Subfamilia <i>Paramyxovirinae</i>		
<i>Respirovirus</i>	Parainfluenza	1, 3
	Sendai (prototipo, apatógeno para el hombre)	
<i>Rubulavirus</i>	Parainfluenza	2, 4 A y 4B
	Parotiditis	1
	Newcastle (aves)	
<i>Morbillivirus</i>	Sarampión Moquillo (perros) Peste bovina (ganado)	1
<i>Henipavirus</i>	Nipah (cerdos, humanos) Hendra (caballos, humanos)	
Subfamilia <i>Pneumovirinae</i>		
<i>Pneumovirus</i>	Virus sincicial respiratorio (<i>Respiratory syncytial virus</i> - RSV)	grupos A y B
<i>Metapneumovirus</i>	Metapneumovirus humano (<i>Human Metapneumovirus</i> - hMPV) Pneumovirus aviarios (aves)	grupos A y B

Tabla 15.1.1. Familia *Paramyxoviridae*.

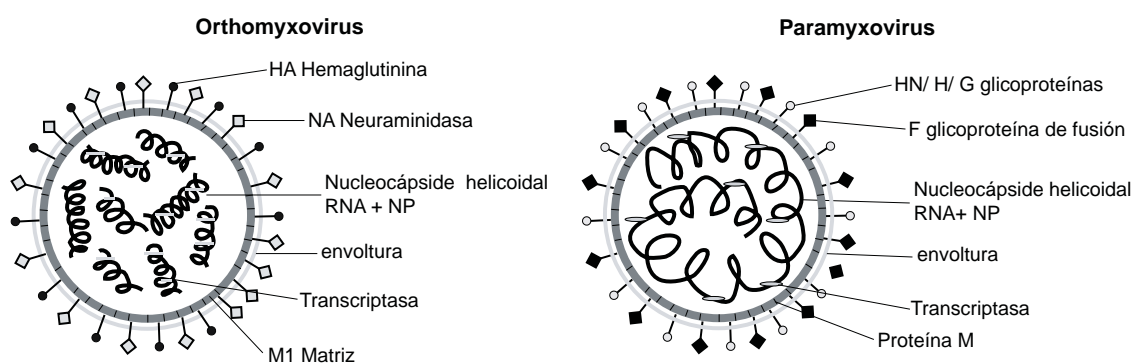


Figura 15.1.1. Diferencias entre *orthomyxovirus* y *paramyxovirus*. Adaptado de: <http://www.pathmicro.med.sc.edu/viral/para-rsv-adeno.htm>.

que poseen una envoltura laxa. Al igual que los orthomyxovirus, los paramyxovirus poseen una nucleocápside tubular con simetría helicoidal que contiene RNA con polaridad negativa y una transcriptasa asociada al virión. Una diferencia esencial es que los paramyxovirus presentan un genoma no segmentado, mientras que el genoma de los orthomyxovirus es segmentado. Esto hace que sean genéticamente más estables, es decir, que no se observa la gran variabilidad antigénica característica de los orthomyxovirus.

Las diferencias entre ambas familias se muestran en la Tabla 15.1.2 y en la Figura 15.1.1. Las diferencias entre los diversos paramyxovirus se indican en Tabla 15.1.3.

La envoltura con doble capa lipídica posee tres proteínas: dos son glicoproteínas y una es no glicosilada y se ubica en la parte interna (proteína M). Las dos glicoproteínas se encuentran en dos proyecciones o espículas (Figura 15.1.1). Una de ellas permite la unión al receptor celular, y se denomina HN, H o G, dependiendo de si contiene la actividad de hemaglutinina y neuraminidasa (glicoproteína HN), sólo de hemaglutinina (H) o si carece de ambas actividades (G). Esto constituye otra diferencia con los orthomyxovirus que contienen la actividad de hemaglutinina y neuraminidasa en espículas separadas.

La otra espícula exclusiva de los paramyxovirus es la glicoproteína de fusión (F), fundamental para la penetración viral por fusión de su envoltura con la membrana celular, así como para la diseminación intercelular. Esto induce la formación de sincicios

(células gigantes multinucleadas) por fusión de las membranas de las células infectadas (Figura 15.1.2). Para actuar, la proteína F debe ser clivada en dos polipéptidos (F1 y F2) que se mantienen unidos por puentes disulfuro, lo que ocurre por acción de proteasas celulares. Si estas enzimas no están presentes, la penetración no ocurre. De acuerdo a la composición del sitio de clivaje de la proteína F, hay dos grupos de paramyxovirus: aquellos que tienen un sitio de clivaje con múltiples aminoácidos básicos y utilizan proteasas intracelulares (ubicadas en el aparato de Golgi) y otro grupo en que el sitio de clivaje presenta sólo un aminoácido básico y requiere de proteasas externas para su cultivo *in vitro*. En el virus parotiditis y en el RSV existe otra proteína integral de membrana, la SH, cuya función aún no está determinada.

3. CULTIVO

Los paramyxovirus son muy lábiles al calor, la desecación y a la congelación y descongelación. Por ello, en el transporte de las muestras para diagnóstico por aislamiento debe tenerse extremo cuidado en un envío rápido y convenientemente refrigerado (4° C) para evitar la inactivación viral, siendo recomendable la inoculación inmediata de la muestra en los cultivos celulares.

Los paramyxovirus crecen en cultivos primarios de riñón de primates y en algunas líneas continuas (LLC-MK2, HEp2, VERO).

Característica	<i>Orthomyxovirus</i>	<i>Paramyxovirus</i>
Forma	esférica	esférica, pleomórfica
Formas filamentosas	frecuentes	poco frecuentes
Tamaño (nm)	100	150-300
Envoltura con espículas	sí	sí
Glicoproteínas HA y NA en espículas separadas	sí	no
Glicoproteína F	no	sí
Nucleocápside: diámetro (nm)	9	14-18
RNA con polaridad negativa	sí	sí
Genoma segmentado	sí	no
Transcriptasa (RNA polimerasa-RNA dependiente)	sí	sí
Replicación en:		
núcleo	sí	no
citoplasma	no	sí
Formación de sincicios	no	sí
Inclusiones citoplasmáticas	no	sí

Tabla 15.1.2. Diferencias entre los *Orthomyxovirus* y *Paramyxovirus*. HA: hemaglutinina; NA: neuraminidasa.

Virus	Parainfluenza	Sincicial respiratorio	Parotiditis	Sarampión	Metapneumovirus
Serotipos	1, 2, 3, 4A y 4B	1 (Grupos A y B)	1	1	1 (Grupos A y B) ?
Nucleocápside: diámetro en nm	18	14	18	18	?
Adsorción mediada por:	HN	G	HN	H	G
HA	+	-	+	+ *	-
NA	+	-	+	-	-
Proteína F	+	+	+	+	+
Hemadsorción	+	-	+	+	-
Inclusiones: - citoplasmáticas - nucleares	+ -	+ -	+ -	+ +	+ -

Tabla 15.1.3. Características diferenciales entre los paramyxovirus. HA: hemaglutinina; NA: neuraminidasa. * sólo aglutina glóbulos rojos de primate.

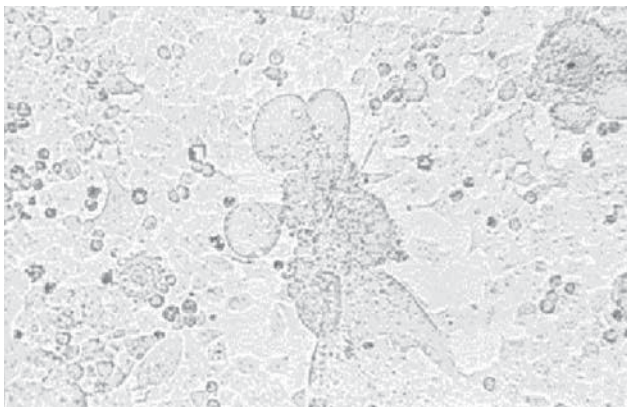


Figura 15.1.2. Acción citopática del RSV en cultivo de células HEp2. Obsérvese la formación de sincicios.

Para el aislamiento de parainfluenza y el hMPV, se debe adicionar tripsina al medio de cultivo para que sea efectiva la infección.

La mayoría no produce una clara acción citopatógena, con excepción del RSV y del virus sarampión que producen sincicios (Figura 15.1.2). Por ello, la presencia de un paramyxovirus en un cultivo puede demostrarse por reacciones de hemaglutinación o hemadsorción (Capítulos 3 y 9), ya que todos producen hemaglutinación, con las únicas excepciones del RSV y el hMPV. Los antígenos virales en los cultivos infectados también pueden detectarse por inmunofluorescencia (IF). Los paramyxovirus no se propagan en huevos embrionados en el primer pasaje, con la excepción del virus parotiditis.

Dadas las dificultades inherentes al adecuado transporte de las muestras debido a la gran labilidad de estos virus se prefieren para diagnóstico los procedimientos rápidos (detección de antígenos por IF o ELISA o técnicas moleculares).

4. CICLO REPLICATIVO

El genoma de los paramyxovirus contiene 8-10 genes. Entre los diferentes géneros, los genes presentan un orden particular (Figura 15.1.3) y esta característica permite su clasificación. El ciclo de replicación es similar para todos los paramyxovirus y se desarrolla en el citoplasma, si bien varía ampliamente la duración del período de latencia.

Los receptores celulares para los respirovirus y rubulavirus son ricos en ácido siálico. Para el virus del sarampión el receptor celular es la proteína de superficie CD46 o la molécula SLAM (dependiendo de la cepa). La adsorción ocurre a través de la glicoproteína de

envoltura viral, que recibe nombres distintos de acuerdo a la actividad que posea: H (actividad de hemaglutinina), HN (ambas funciones: hemaglutinina –HA– y neuraminidasa –NA) o G (sin actividad de HA ni NA). Una vez ocurrida la adsorción al receptor, la entrada se realiza con intervención de la otra glicoproteína de envoltura (F) por fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática a pH neutro, liberándose luego las nucleocápsides en el citoplasma.

La síntesis del RNA de los paramyxovirus se realiza en el citoplasma, donde el RNA neoformado se asocia con las proteínas de la nucleocápside (NP). Éstas últimas se forman en exceso y su acumulación en el citoplasma de las células infectadas produce los característicos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos que pueden detectarse por IF para un diagnóstico rápido en células descamadas del tracto respiratorio.

El RNA genómico de los paramyxovirus posee polaridad opuesta a la del RNA mensajero viral, por lo cual se denominan virus con RNA de cadena negativa. La síntesis de RNA de los paramyxovirus parecería ser dependiente de interacciones específicas entre la proteína L (polimerasa) con la nucleoproteína NP y una fosfoproteína P con el genoma viral. La formación de racimos de P junto a L a lo largo de la nucleocápside sugiere un efecto cooperativo entre ambas proteínas para la síntesis de RNA viral.

El genoma está flanqueado en su extremo 3' terminal por una región de alrededor de 50 nucleótidos denominada *leader* y una región en su extremo 5' de 50-161 nucleótidos denominada *trailer*. Estas dos regiones son esenciales para la transcripción y replicación del genoma. Entre cada gen existe una región intergénica que contiene una secuencia de comienzo, una secuencia intergénica y una de finalización de la transcripción. Estas regiones varían en secuencia y en longitud en los distintos géneros. La transcripción se produce a partir del extremo 3' a lo largo de la formación lineal de genes por un mecanismo secuencial de terminación y reiniciación (*stop-start*) durante el cual la polimerasa – actuando en *cis*– es guiada por señales conservadas presentes al final de cada gen para producir una serie de RNAm monocistronicos subgenómicos.

Las señales GS (*gene-start*) y GE (*gene-end*) presentes en cada gen del RSV dirigen la iniciación transcripcional y la terminación y poliadenilación, respectivamente. Estas señales parecen operar independientemente para cambiar la polimerasa a modos de *apagado* y *encendido* (*on-off*) respectivamente, en los cuales la polimerasa se mueve a lo largo del genoma con y sin síntesis de RNA. En el modo *on* –modo de síntesis activado por la señal GS– la polimerasa transcribe hasta que se encuentra con una señal GE. En el modo *off* –modo no sintético activado por una señal GE– la polimerasa se mueve a lo largo del genoma a través de las regiones intergénicas hasta que se encuentra con la siguiente señal GS y se reinicia la síntesis. Es absolutamente necesario que se termine la transcripción de un gen para poder comenzar la del gen siguiente.

Subfamilia Paramyxovirinae

Género *Respirovirus*: especie *virus Sendai*, especie *virus Parainfluenza 1 y 3*



Género *Morbillivirus*: especie *virus Sarampión*

Género *Henipavirus*: especie *virus Hendra*, especie *virus Nipah*

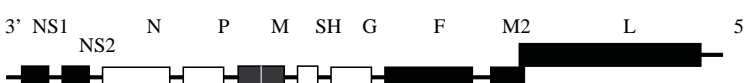


Género *Rubulavirus*: especie *virus Parotiditis*, especie *virus Parainfluenza 2 y 4*



Subfamilia Pneumovirinae

Género *Pneumovirus*: especie *virus Sincicial respiratorio humano*



Género *Metapneumovirus*: especie *Pneumovirus aviario*, especie *Metapneumovirus humano*

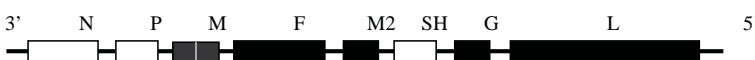


Figura 15.1.3. Organización del genoma de los paramyxovirus. Adaptado de: a) "Fields Virology"; 4th edition, Lippincott Williams and Wilkins, 2001; b) "Hendra and Nipah viruses: different and dangerous" de Eaton BB *et al.*, *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 23-35.

La replicación del RNA ocurre cuando la polimerasa cambia a un modo de lectura en el cual las señales de transcripción son ignoradas. Esto produce un intermediario replicativo de sentido positivo, el anti-genoma, que sirve después como templado para la formación de los genomas de la progenie viral. El RNA anti-genómico es varias veces menos abundante que el RNA genómico. La síntesis del anti-genoma es dependiente de la síntesis de la proteína NP que se encapsida simultáneamente con el RNA naciente.

El ensamblaje y posterior liberación de viriones tienen lugar en el citoplasma. En primer término se produce la combinación de la nucleocápside con RNA genómico (-) o anti-genómico (+). A continuación, se añaden las proteínas auxiliares de la nucleocápside. El RNA mensajero (+) no se encapsida, por lo que se ha postulado la existencia de secuencias nucleotídicas específicas donde se inicia la encapsidación en el RNA genómico y en el templado intermediario anti-genómico. Las proteínas de la nucleocápside se sintetizan en polirribosomas citoplasmáticos mientras que las proteínas de envoltura se producen en ribosomas unidos al retículo endoplásmico rugoso.

Bibliografía

- Eaton BT, Broder CC, Middleton D, Wang LF. "Hendra and Nipah viruses: different and dangerous". *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 23-35.
- Hall CB. "Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus". *N Engl J Med* 2001; 344: 1917-28.

Estas proteínas poseen un péptido señal que induce la unión del ribosoma a la membrana celular y el anclaje en ésta de las proteínas de envoltura, que será glicosilada por enzimas celulares. Durante el ensamblaje y maduración de los nuevos viriones, las nucleocápsides se ubican en zonas cercanas a la membrana celular, la que es modificada por acción viral y expresa glicoproteínas de origen viral que dan lugar a los fenómenos de fusión celular, con la típica formación de sincicios (Figura 15.1.2). Los nuevos viriones emergen por gemación arrastrando una envoltura que contiene lípidos de origen celular y glicoproteínas virales (HN, H o G y proteína F). Cada uno de los paramyxovirus se describen en los capítulos siguientes.

ADENDUM

Mientras este capítulo se encontraba en la etapa de prueba de galera, se descubrió un nuevo receptor para el virus sarampión en células epiteliales polarizadas: la molécula de nectina-4, perteneciente a la superfamilia de las Igs (Mühlebach M *et al.*, 2011; Noyce R *et al.*, 2011).

- Henrickson K. "Parainfluenza viruses". *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 242-64.

Virus Sincicial Respiratorio (RSV)

Guadalupe Carballal - Cristina M. Videla

El virus sincicial respiratorio humano (RSV) pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, género *Pneumovirus*.

El RSV se aisló por primera vez en 1956 al analizarse muestras obtenidas de un chimpancé con síntomas respiratorios; se lo denominó "agente de la coriza del chimpancé". Posteriormente, se lo recuperó de dos niños con neumonía y crup en EE. UU. A partir de allí, este nuevo virus se reconoció como un patógeno humano y se denominó **virus sincicial respiratorio** (*respiratory syncytial virus* -RSV-) debido a su capacidad para formar sincicios en células de cultivo. Numerosos estudios epidemiológicos establecieron claramente al RSV como el agente viral más importante en las infecciones graves del tracto respiratorio inferior en la población pediátrica de todo el mundo. También se lo reconoce como un agente importante de infección respiratoria en ancianos y en pacientes trasplantados de médula ósea, siendo asimismo frecuente en la población adulta.

1. CARACTERÍSTICAS

Los virus de la subfamilia *Pneumovirinae* son pleomórficos, con envoltura, con una nucleocápside helicoidal que contiene una molécula única de RNA genómico, no segmentado y de polaridad negativa y que replican en el citoplasma.

El genoma del RSV contiene 10 genes que codifican para 11 proteínas. En la nucleocápside, la nucleoproteína N, la fosfoproteína P, la polimerasa L y el factor antiterminador M2-1 se encuentran asociados al RNA genómico para formar la replicasa viral. La nucleocápside está cubierta por una envoltura que contiene 3 glicoproteínas de transmembrana: la proteína de unión al receptor (G), la proteína de fusión (F) y la proteína pequeña hidrofóbica (SH). La proteína de matriz M forma una cubierta proteica en la cara interna de la envoltura. Existen dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2, que se detectaron en significativa cantidad en células infectadas, pero de las que en los viriones sólo se hallaron trazas. Ambas proteínas, actuando en cooperación obligatoria, median la resistencia del virus a los interferones α y β .

Como todos los virus RNA, el RSV presenta una gran variabilidad, probablemente como resultado de una elevada tasa de mutación espontánea producida durante la replicación.

Proteína F. Dirige la penetración viral por fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática de la célula hospedadora, liberando la nucleocápside al citoplasma. Cuando la infección es más avanzada, la proteína F expresada en la superficie celular puede mediar la fusión con células adyacentes para formar los sincicios. Éste es un efecto citopático característico y, probablemente, una vía de diseminación del RSV. La proteína F es clivada por una proteasa celular en la red trans-Golgi para producir dos subunidades unidas por puentes disulfuros: F_1 y F_2 . El clivaje expone un nuevo extremo N-terminal de F_1 que es el péptido de fusión, un segmento hidrofóbico rico en glicina que se inserta dentro de la membrana celular de la célula blanco durante el proceso de fusión.

Proteína G. Es la que presenta la mayor diversidad, tanto genética como antigénica, entre todas las proteínas del RSV. Es una glicoproteína de transmembrana de tipo II que tiene 289-299 aminoácidos con un dominio citoplasmático N-terminal (aminoácidos 1-37), un dominio hidrofóbico (aminoácidos 38-66), que le sirve tanto de péptido señal como de anclaje a la membrana, y un ectodominio (aminoácidos 64-289/299) constituido por los dos tercios restantes del extremo C-terminal orientados hacia el exterior de la membrana (Figura 15.2.1). Durante la replicación, también se sintetiza una forma soluble de la proteína G, la proteína Gs, que constituye el 16-20% de la proteína G total sintetizada en cultivo, pero cerca del 80% de la proteína G liberada al medio de cultivo 24 h. post-infección. Se postula que podría actuar como señuelo para atrapar anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína G del RSV y minimizar los efectos neutralizantes de la respuesta inmune.

El ectodominio C-terminal de la proteína G tiene una región central altamente conservada en todos los RSV humanos con cuatro residuos de cisteína (posiciones 173, 176, 182 y 186). Esta zona es ligeramente hidrofóbica y ha sido propuesta como el sitio posible de unión del virus al receptor celular.

Flanqueando esta región central, hay dos segmentos de la proteína con un elevado grado de variación de secuencia y un alto contenido de serina y treonina, que son sitios potenciales para O-

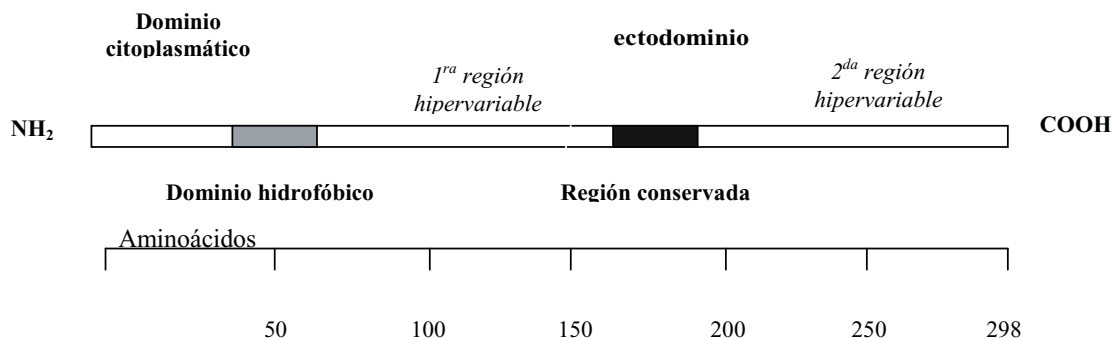


Figura 15.2.1. Estructura de la glicoproteína G del RSV: representación lineal de la estructura primaria. Adaptado de la Tesis doctoral "Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en Argentina" de Galiano M. realizada en el laboratorio de Virología, CEMIC. Facultad de Medicina, UBA, abril de 2004.

glicosilación. También tienen un alto contenido de prolina, lo que podría contribuir al tipo de estructura secundaria no plegada. Esta composición aminoacídica, junto con el alto contenido de azúcares O-glicosilados, le confieren una estructura similar a la de las mucinas.

2. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Por reacciones de neutralización, se encontraron pequeñas variaciones antigénicas en las cepas de RSV, pero sólo el uso de anticuerpos monoclonales permitió reconocer la existencia de dos grupos antigénicos principales denominados A y B. Las principales diferencias se observaron en la glicoproteína G.

La existencia de ambos grupos se confirmó con el análisis de secuencias, donde el grado de divergencia aminoacídica en la proteína G fue de hasta 47% entre cepas de los grupos A y B y de hasta 20% entre cepas del mismo grupo. Las otras proteínas del RSV presentaron menor divergencia aminoacídica entre los dos grupos antigénicos. Estos dos grupos existen por lo menos desde hace 20 años, presentan una distribución mundial, y pueden coexistir en un mismo período epidémico, si bien generalmente el grupo A es más frecuente que el B.

3. GENOTIPOS

Dentro de cada grupo se han identificado diferentes genotipos. Los análisis de numerosas cepas de RSV (en su mayoría del grupo A) demostraron la extensa diversidad de la glicoproteína G. La presencia de genotipos se ha determinado por: a) estudio del patrón electroforético del ácido nucleico tratado con enzimas de restricción (de los genes de las proteínas N, F, G y SH); b) el agrupamiento de las secuencias nucleotídicas en árboles filogenéticos.

Estos estudios de epidemiología molecular permitieron el descubrimiento de múltiples eventos: a) en la mayoría de las epidemias se observó cocirculación de múltiples genotipos de ambos grupos, con mayor frecuencia del grupo A; b) en una misma comunidad se observó el reemplazo de los genotipos predominantes por otros nuevos durante epidemias consecutivas; c) los genotipos de RSV exhibieron amplia distribución mundial y las cepas aisladas en lugares geográficamente distantes y en años diferentes estuvieron más relacionadas entre sí que cepas circulantes en un mismo sitio durante la misma epidemia, aunque hubo una cierta tendencia al agrupamiento temporal más que geográfico; d) en cada linaje se observó una progresiva acumulación de cambios aminoacídicos; e) los cambios nucleotídicos sinónimos tuvieron una distribución uniforme a lo largo del gen de la proteína G, al tiempo que los cambios no sinónimos se acumularon preferentemente en las dos regiones variables de la molécula de G, lo cual sugirió una selección positiva debido a la presión de la respuesta inmune.

Aunque los datos de secuencia para la proteína G de las cepas del grupo B son mucho más limitados que para los del grupo A, el patrón evolutivo del grupo B y los cambios en las secuencias entre las cepas presentan las mismas características observadas en el grupo A.

Estos resultados ilustran la capacidad de la glicoproteína G para acomodar múltiples cambios de secuencia, particularmente dentro del tercio C-terminal, que es antigénicamente relevante (véase el Capítulo 53 *Epidemiología molecular de RSV en Argentina*).

4. CUADROS CLÍNICOS

Población pediátrica. El RSV es el más importante patógeno en las IRAs en niños pequeños, tanto por su frecuencia como por su gravedad. Además, constituye la principal causa de hospitalización por IRA baja en lactantes, siendo el agente causal primordial de las bronquiolitis del lactante en todo el mundo.

El riesgo de enfermedad grave por RSV está aumentado en los niños prematuros, de bajo peso al nacer, sexo masculino, falta de lactancia materna y exposición pasiva al humo de tabaco. Las enfermedades preexistentes (trisomía 21, cardiopatías congénitas,

afecciones crónicas pulmonares, o inmunodeficiencias) representan un riesgo extra.

El RSV produce IRA altas, tanto en niños como en adultos. Luego de un período de incubación de 4-5 días, la enfermedad comienza como IRA alta (rinitis, faringitis, etc.); sin embargo, en aproximadamente la mitad de los lactantes este virus no queda localizado en el tracto respiratorio alto sino que puede diseminarse en 3 a 4 días en el tracto bajo produciendo IRA baja (bronquitis, bronquiolitis –infección de bronquiolos terminales– y neumonía). En las bronquiolitis son características las sibilancias, el aumento de la frecuencia respiratoria, hiperaireación, costillas horizontales y descenso de las cúpulas diafragmáticas en la radiografía de tórax. Las neumonías suelen ser intersticiales aunque pueden también ser lobares, siendo indistinguibles de otras neumonías virales. Las atelectasias son frecuentes. En los niños con anomalías congénitas cardíacas o respiratorias las infecciones con RSV pueden ser fatales.

La primoinfección, que ocurre habitualmente antes del año de vida, suele ser más grave que las reinfecciones. La replicación viral en la mucosa del tracto alto produce cuadros leves, frecuentes en niños de 3-5 años, en niños mayores y en adultos, los que suelen ser indistinguibles del resfrío común. En niños menores de 1 año, el 50% de las bronquiolitis y el 25% de las neumonías son debidas al RSV en países del hemisferio norte y también en Argentina.

Estudios realizados en EE.UU. demostraron por seroconversión que el 40% de los niños, antes de cumplir el año de vida, ya se han infectado con RSV, al segundo año el 50% posee anticuerpos contra este virus y a los 4 años el 100%. La leche materna contiene IgA específica y se ha demostrado su efecto protector para prevenir las infecciones graves en lactantes.

Numerosos estudios han descrito la asociación entre la infección por RSV en la infancia y el posterior desarrollo de hiperreactividad bronquial y sibilancias recurrentes. Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la asociación entre la infección por RSV en edades tempranas y el desarrollo posterior de asma. Sin embargo, los mecanismos específicos y responsables de esta secuela a largo plazo no están completamente dilucidados. Entre los procesos postulados se encuentran: producción de neuropéptidos y sensibilización aumentada de ciertos receptores, prostaglandinas, activación de mastocitos y eosinófilos, producción de IgE anti-RSV y liberación de citoquinas pro inflamatorias (IL-4, IL-6, RANTES, MIP-1 alfa, IL-8 y factor de necrosis tumoral alfa). La cantidad, persistencia y duración de esta respuesta parece estar relacionada de forma directa con el desarrollo posterior de sibilancias y/o asma.

Adultos y pacientes inmunodeprimidos. En adultos sanos la infección aguda por RSV es frecuente, en particular en el personal médico o en personas relacionadas con el cuidado de niños pequeños. Estos episodios se caracterizan por rinorrea, faringitis, tos, bronquitis, fatiga y fiebre. La enfermedad dura alrededor de 5 días. El RSV es una de las 4 causas principales de hospitalización por neumonía de la comunidad en adultos previamente sanos. En ancianos, en especial aquellos con enfermedades subyacentes, puede ocurrir neumonía grave y desarrollo de dificultad (*distress*) respiratoria, requiriendo hospitalización y ventilación mecánica.

En individuos gravemente inmunocomprometidos, hay mayor incidencia de IRA baja y progresión a neumonía en más del 50% de los casos. La mortalidad asociada a neumonía por RSV en adultos con inmunosupresión por leucemia o trasplante de médula ósea puede alcanzar el 80 - 100%.

Las reinfecciones son muy comunes debido a que la inmunidad es de corta duración (IgA en mucosas) y a la amplia diversidad genética observada en este virus.

5. PATOGENIA

El RSV replica en primer término en el epitelio respiratorio superior y desciende al inferior a través de la aspiración de secreciones o por diseminación a través del epitelio. El virus también puede diseminarse entre células adyacentes por fusión, sin emerger al fluido extracelular aunque no se conoce la importancia de este mecanismo *in vivo*.

Durante la bronquiolitis hay necrosis y proliferación del epitelio bronquiolar, destrucción de las células epiteliales ciliadas e infiltrado peribronquiolar de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. La infección por RSV produce un daño considerable al epitelio y a las células ciliadas de los bronquiolos, lo que interfiere con la remoción de mucus y detritus celulares, facilitando la acumulación de exudado en bronquiolos y alvéolos. Un factor importante que contribuye a la gravedad de la IRA baja en infantes es el diámetro pequeño de los bronquiolos, que se obstruyen con facilidad durante las fases de necrosis y edema. En la neumonía, hay engrosamiento de las paredes interalveolares por la infiltración por células mononucleares y acumulación de fluido en el espacio alveolar.

Los anticuerpos específicos contra RSV son protectores, ya que se ha observado baja proporción de enfermedad grave por RSV durante las primeras 5 ó 6 semanas de vida, cuando los anticuerpos maternos presentan altos títulos. Además, la administración parenteral de anticuerpos neutralizantes contra RSV a infantes de alto riesgo es una de las terapias indicadas en estos casos –inmunización pasiva artificial (véase el ítem 7.1 "Tratamiento").

Respuesta inmune. El sistema inmune tiene un rol primordial en la recuperación de la infección por RSV y la resistencia a la reinfección. Estudios realizados en el modelo ratón, determinaron que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, individualmente o en conjunto, son importantes en la eliminación del virus durante la infección primaria y que los anticuerpos específicos contra RSV no son necesarios para la eliminación del virus en ese momento, pero son muy importantes en restringir la replicación y la enfermedad, así como también la reinfección. Por lo tanto, ambos tipos de respuesta inmune, humoral y celular, contribuyen a resolver la infección por RSV.

Con respecto a la resistencia a la reinfección, se ha demostrado que las proteínas F y G son las únicas que inducen anticuerpos neutralizantes contra el virus y producen protección de larga duración frente a la infección experimental por RSV. En el modelo experimental del ratón BALB/c, los anticuerpos median la resistencia a largo plazo a la reinfección. Algunos estudios han revelado que los anticuerpos dirigidos contra la proteína F proveen protección cruzada contra ambos grupos (A y B), mientras que la protección inducida por la proteína G es grupo-específica. Otros estudios determinaron que la respuesta inmune estaba estrechamente relacionada al genotipo infectante y que simples cambios de aminoácidos y de sitios de glicosilación en el extremo C-terminal de la glicoproteína G podían anular el reconocimiento por parte de los anticuerpos.

Los anticuerpos neutralizantes séricos contra el RSV persisten con títulos altos y por más tiempo que la IgA secretoria, pero los primeros protegen pobremente el tracto respiratorio en comparación con IgA local. Por lo tanto, se postula que tanto los mecanismos inmunes locales como los anticuerpos séricos contribuyen a la protección contra la reinfección.

La infección por RSV de las células epiteliales y macrófagos del tracto respiratorio provoca la activación transcripcional de una serie de genes celulares involucrados en la inflamación, la respuesta inmune y la apoptosis e induce la producción aumentada de linfocinas proinflamatorias, incluyendo IFN- γ , IL-6, IL-8, RANTES, TNF- α y otros. Cada vez existe mayor evidencia de que las células epiteliales del tracto respiratorio inferior pueden funcionar como *células blanco* y también como *activadoras* de la respuesta inflamatoria en la infección por RSV, que se ve amplificada posteriormente a través de mecanismos vía IFN- γ y por la secreción de quimioquinas.

Las linfocinas pueden tener actividad antiviral directa y también pueden atraer y activar macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos T y células NK. Dichas células pueden ayudar a resolver la infección, pero también pueden causar daño tisular, ya sea por ataque directo de las células infectadas o por la liberación de linfocinas adicionales.

En resumen, se ha demostrado que algunas proteínas del RSV pueden modular la señalización molecular y la regulación de las respuestas de citoquinas y quimioquinas a la infección, las señales para la apoptosis y las respuestas innatas y adaptativas a la infección (véanse los Capítulos 5, 7 y 8 de este libro y la revisión de Oshansky *et al.*, 2009).

Los pacientes con defectos en la inmunidad mediada por células pueden presentar infecciones persistentes y eliminar virus por largos periodos (meses). Esto ha sido observado en niños con SIDA y en aquellos tratados con drogas inmunosupresoras, lo que indica que la integridad del aparato inmunológico es necesaria para lograr la eliminación de la infección.

Datos experimentales recientes sugieren que el RSV podría permanecer en estado latente en lugares inmunológicamente privilegiados del pulmón evadiendo la respuesta inmune. Se ha propuesto que esta persistencia del RSV en el aparato respiratorio mantendría una estimulación constante del sistema inmunitario y sería responsable de la inflamación crónica, de los cambios en el patrón de IFN y otras citoquinas que se observan en niños con hiperreactividad bronquial inducida por RSV.

6. EPIDEMIOLOGÍA

El RSV tiene una distribución mundial. En climas templados presenta un claro patrón estacional donde las epidemias ocurren anualmente y comienzan a fines del otoño, durante el invierno y hasta comienzos de la primavera. Cada epidemia dura aproximadamente cinco meses, con picos durante diciembre, enero o febrero en el hemisferio norte, y en junio, julio o agosto en el hemisferio sur. En áreas tropicales o subtropicales las epidemias ocurren durante la estación de las lluvias. En Finlandia y otros países escandinavos las epidemias son bienales, con un pico menor desde febrero a agosto y otro mayor desde setiembre a marzo.

Mundialmente, el RSV es la principal causa de hospitalización debido a IRA en lactantes y niños de corta edad, infectando inclusive a neonatos a pesar de la presencia de Ig G materna anti-RSV. Es el principal agente productor de bronquiolitis y una de las causas más frecuentes de neumonía durante los primeros años de vida, las que ocurren con mayor frecuencia entre las 6 semanas y los 9 meses de vida. El mayor número de casos se observa en el grupo etario de 3 a 6 meses de edad.

En países desarrollados, la mortalidad debida a las infecciones por RSV es de 0,3 a 1% en niños hospitalizados. En países en vías de desarrollo, el RSV causa hasta el 70% de las IRAs bajas. La tasa de mortalidad puede alcanzar el 7%.

La morbilidad y mortalidad son más altas en niños con enfermedades predisponentes (afecciones pulmonares o cardíacas crónicas e inmunosupresión). Estos niños poseen, además, un mayor riesgo de sufrir infecciones intrahospitalarias.

Las reinfecciones son muy frecuentes durante los primeros años de vida, aunque la gravedad de la enfermedad es menor en las reinfecciones. Algunos estudios mostraron que las reinfecciones por RSV tienden a ser con virus del grupo heterólogo; sin embargo, otros estudios indican que cuando la primoinfección ocurre antes de los 6 meses, las reinfecciones pueden involucrar virus del mismo grupo antigénico. Numerosas publicaciones demuestran que las cepas pertenecientes al grupo A producen infecciones de mayor gravedad clínica que las del grupo B; sin embargo, otros estudios no encuentran correlación alguna entre la misma y el grupo antigénico. Estas divergencias podrían deberse a criterios diferentes en la elección de los parámetros para evaluar la gravedad del cuadro clínico.

Las reinfecciones en adultos también son comunes aunque menos graves y usualmente son sintomáticas.

En niños y adultos inmunosuprimidos, la tasa de mortalidad por RSV varía de 20 a 67%. El mayor riesgo de sufrir enfermedad fatal por RSV se encuentra en los pacientes trasplantados de médula ósea, con tasas de mortalidad de 80 a 100%.

6.1 EPIDEMIOLOGÍA EN ARGENTINA

Estudios realizados en Buenos Aires determinaron que el RSV es el agente detectado más a menudo en niños menores de 4 años, con IRA del tracto respiratorio inferior. Las frecuencias varían del 16 al 40%, dependiendo de la edad de la población, el tipo y la calidad de la muestra respiratoria, del método empleado para el diagnóstico y



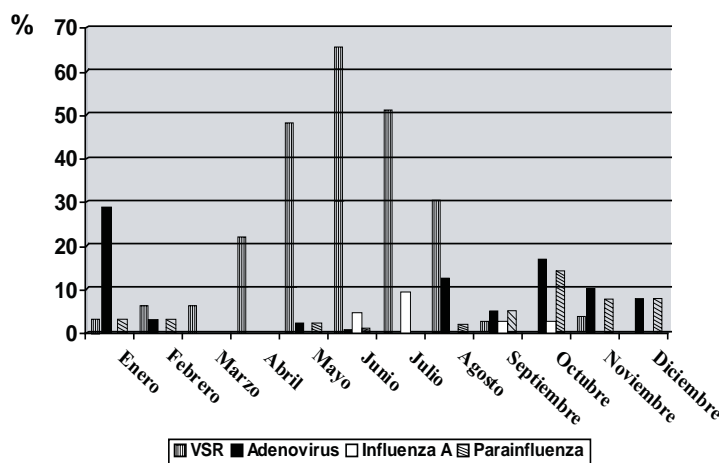


Figura 15.2.2. Estacionalidad de virus respiratorios detectados en niños menores de 5 años con IRA baja, Buenos Aires, 1995-2001. Adaptado de la Tesis doctoral "Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en Argentina" de Galiano M. realizada en el laboratorio de Virología, CEMIC. Facultad de Medicina, UBA, abril de 2004.

del período estudiado, siendo más habitual en menores de 1 año y asociado predominantemente a bronquiolitis y neumonías.

Un ejemplo de la estacionalidad del RSV en Buenos Aires se puede observar en la Figura 15.2.2. Durante el período 1995-2001, el RSV presentó un comienzo abrupto con una frecuencia claramente mayor durante los meses más fríos del año, con un claro pico en junio. La epidemia duró 5 meses, de abril a agosto, con una notable disminución de los casos en septiembre y octubre y algunos casos aislados durante noviembre, enero y febrero. Estos datos coinciden con estudios previos en nuestro país.

Con respecto a la tipificación del RSV se estudiaron 300 cepas –aisladas en 12 períodos epidémicos– (Figura 15.2.3) mediante IF y por ELISA con anticuerpos monoclonales dirigidos en el primer caso contra la proteína F y en el segundo contra la proteína G. La prevalencia de ambos grupos (A y B) varió a lo largo del período estudiado, observándose que los dos grupos cocircularon durante la mayoría de los años, excepto en 1993 y 2000 donde sólo se observó circulación del grupo A. En los años donde hubo cocirculación, se observó un claro predominio del grupo A, con excepción del año 1999 en el que hubo ligero predominio del grupo B y en los años 1994 y 1997 donde las frecuencias fueron similares. En los períodos epidémicos en los que predominó el grupo A las frecuencias de este grupo variaron desde 55 a 97%.

La caracterización antigénica de la glicoproteína G con un panel de anticuerpos monoclonales realizado en cepas del grupo A aisladas en 1995-2001, determinó la presencia de 17 perfiles antigénicos diferentes a las cepas patrón del grupo A (A/Long y A/Mon3/88), demostrando así la gran diversidad antigénica de esta proteína.

Con estas cepas caracterizadas antigénicamente se realizó un estudio filogenético, que permitió determinar los genotipos del RSV del grupo A y B circulantes en Buenos Aires durante el período 1995-2001. Las cepas del grupo A se pudieron agrupar en 5 genotipos (GA1, GA2, GA3, GA5 y GA7) y las del grupo B en 3 genotipos (GB3, GB4, SAB3; véase el capítulo 53 Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en Argentina).

7. PROFILAXIS Y TRATAMIENTO

El RSV se disemina por secreciones respiratorias, principalmente por grandes gotas o por manos y fomites contaminados (sondas, pañuelos, máscaras de oxígeno, etc.) más que por aerosoles (microgotas de Flügge). El período de eliminación es prolongado y la contagiosidad es muy alta. Por ello, son frecuentes los brotes epidémicos en salas de pediatría, *nurseries*, guarderías, etc. El RSV es una causa importante de infecciones intrahospitalarias. En unidades de neonatología se han reportado frecuencias de infección intrahospitalarias por RSV del 26

y el 47%. El personal hospitalario parece ser el principal factor diseminador de esta infección. Las medidas propuestas para disminuir las infecciones intrahospitalarias son: a) visitas limitadas; b) activa vigilancia de infecciones por RSV en los pacientes internados y en las nuevas admisiones; c) aislamiento de los pacientes en cohortes; d) institución de barreras para evitar la diseminación; e) lavado de manos.

Dado que el RSV es sumamente lábil a la desecación, al calor y a los detergentes, la adecuada higiene de manos y objetos constituye un factor de primordial importancia para evitar la transmisión intrahospitalaria de este virus. Otras precauciones muy efectivas son –además del estricto lavado de manos– el uso de guantes, barbijos y protectores oculares para evitar la transferencia pasiva de secreciones contaminadas a pacientes y también para evitar el contagio en el personal.

7.1 TRATAMIENTO

El tratamiento de las bronquiolitis por RSV es sintomático (oxígeno, broncodilatadores, humidificación del aire) e incluye desde la remoción de secreciones hasta la asistencia respiratoria, en los casos más graves. Los broncodilatadores y corticoides son de uso controvertido.

La ribavirina (*Virazole*) es un análogo de guanósina que inhibe la polimerasa viral y la producción de RNAm. Al 2013, es la única droga aprobada –desde hace años– para el tratamiento de la bronquiolitis grave por RSV en infantes y en inmunocomprometidos. Su administración es difícil ya que debe ser aerosolizada. Su eficacia es limitada y su costo muy elevado. Además, ya se han detectado mutantes de RSV resistentes a la misma.

Se han ensayado diversos antivirales, tales como inhibidores de la fusión –mediada por la proteína F que se unirá a receptores tipo Toll (TLR-4), de la replicación, oligómeros anti-sentido; RNA interferente (siRNA), inhibidores de la proteína N, etc. Algunas de estas drogas han sido discontinuadas, otras se encuentran en diversas fases de experimentación *in vitro* e *in vivo* –en modelos animales– pero ninguna ha sido aún aprobada para uso humano. Se está realizando una activa búsqueda para el desarrollo de nuevos antivirales para RSV por lo que se anticipa que, en un futuro próximo, se contará con alguna droga efectiva para tratar las IRAs bajas de gravedad, así como también con vacunas –en desarrollo– para lograr la interrupción de la transmisión.

7.2 PROFILAXIS PASIVA

Se han aprobado tres preparaciones de inmunoglobulinas para uso profiláctico, una inmunoglobulina policlonal con alto título de an-

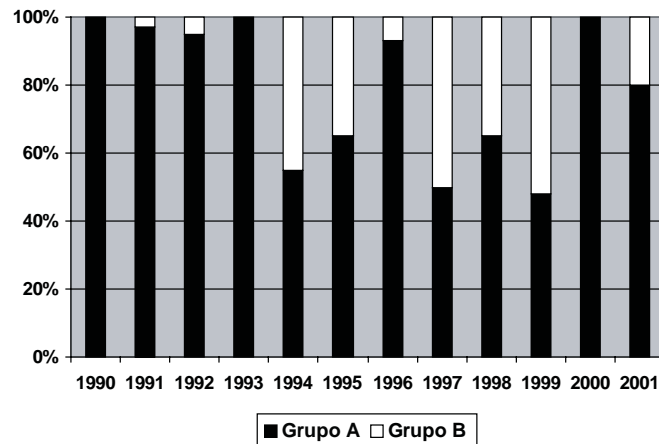


Figura 15.2.3. Frecuencia de grupos A y B de RSV durante 12 períodos epidémicos consecutivos (1990-2001) en Buenos Aires, Argentina. Adaptado de la Tesis doctoral "Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en Argentina" de Galiano M. realizada en el laboratorio de Virología, CEMIC. Facultad de Medicina, UBA, abril de 2004.

anticuerpos anti-RSV (*RSV-IVIG*, *Respigam*); un anticuerpo monoclonal humanizado, específico contra la proteína F (palivizumab; *MEDI-493*, *Synagis*) y, recientemente, un nuevo monoclonal, el motavizumab. Este anticuerpo parece ser superior al palivizumab en cuanto a protección de necesidad de hospitalización en niños en riesgo de infecciones graves por RSV. Estos anticuerpos se utilizan eficazmente en la inmunoprofilaxis pasiva para proteger contra la enfermedad grave por RSV a niños de alto riesgo durante los períodos epidémicos, aunque son de alto costo y la duración de su efecto es limitada.

7.3 VACUNAS

Hasta el momento (principios de 2013) no se ha autorizado el uso de vacuna alguna para RSV. El desarrollo de una vacuna para este virus se enfrenta a varios obstáculos: la corta edad de la población a vacunar, menores de 6 meses; la inmadura y escasa respuesta inmune de los lactantes; el efecto inmunosupresor de los anticuerpos maternos en los primeros meses de vida; la dificultad de lograr un equilibrio entre atenuación e inmunogenicidad en las cepas virales a incluir en la vacuna.

Durante la década de 1960, se ensayó la primera vacuna para RSV que consistió en virus inactivado con formalina (FI-RSV). Esta vacuna se evaluó en niños de 2 a 7 meses de edad. Esta vacuna falló en proteger contra la infección pero, además, indujo una mayor gravedad de la enfermedad y casos fatales luego de infección natural con virus salvaje.

Posteriores estudios de patogénesis realizados en ratones BALB/c permitieron postular diversas hipótesis, para explicar los efectos adversos de la vacuna inactivada con formalina, que se mencionan a continuación: a) la vacunación no produjo niveles adecuados de anticuerpos séricos neutralizantes y tampoco indujo inmunidad local secretoria. b) la inmunización con FI-RSV seguida por la exposición al RSV salvaje indujo una elevada relación $CD4^+ / CD8^+$ y eosinofilia pulmonar: por lo tanto, la eliminación del virus no fue eficiente probablemente debido a la falta de respuesta de células T citotóxicas $CD8^+$, responsables de la eliminación del virus y reguladores de la respuesta inmune celular al RSV. c) se indujo una respuesta Th2 con incremento en la producción local de IL-4, IL-5 y IL-10, provocando un aflujo de linfocitos y eosinófilos con liberación de mediadores adicionales, originando inflamación y broncoconstricción. d) un estudio del 2008 sugiere que la falta de protección con la vacuna inactivada no se debería a la alteración del antígeno –producida por la formalina– sino a la baja afinidad de los anticuerpos inducidos por la misma, debido a una inadecuada estimulación de los receptores tipo Toll (TLR).

Por lo tanto, una vacuna contra RSV efectiva para infantes seronegativos deberá inducir niveles protectores de anticuerpos neutralizantes, respuesta de células T citotóxicas $CD8^+$ específicas contra el RSV, y un patrón de respuesta de linfocitos $CD4^+$ similar al producido por la infección natural.

Se están investigando otras estrategias para la producción de una vacuna adecuada. Éstas son: péptidos sintéticos, antígenos virales recombinantes, vacunas a DNA, vectores basados en virus vaccinia recombinantes defectivos en su replicación, virus de la estomatitis vesicular recombinante, vacunas a subunidades basadas en las proteínas F y G, purificadas a partir de células infectadas con RSV, y vacunas a virus vivo atenuado.

Se están estudiando dos tipos de vacunas a subunidades; una contiene proteína F purificada y la otra, proteína G conjugada al *Staphylococcus*. Estas vacunas inactivadas poseen algunas posibles desventajas: podrían no inducir una buena respuesta de células T $CD8^+$ y también podrían inducir agravamiento de la enfermedad. De todas formas, son buenas candidatas para su uso en ancianos y niños seropositivos y también se está estudiando su uso para la inmunización materna.

Además, se han producido mutantes de RSV atenuadas *cp* (*cold-passaged*) a las cuales se adicionaron mutaciones *ts* (*temperature-sensitive*) por mutagénesis química. Sólo una vacuna atenuada, llamada *cpts* RSV 248/404, llegó a evaluarse en bebés seronegativos de 1-2 meses de edad. Esta vacuna fue inmunogénica y protectora, pero produjo leve congestión nasal, indicando la necesidad de una mayor atenuación para este grupo en particular.

Con el uso de nuevas técnicas de genética inversa y la capacidad para obtener RSV recombinante infeccioso a partir del cDNA, se han recreado biológicamente virus como el *cpts* 248/404, que fue posteriormente modificado con mutaciones atenuantes adicionales, o por delección de genes (evento simbolizado por Δ) de las proteínas SH, NS1, NS2 o M2-2. Estas delecciones produjeron mutantes con diferentes niveles de atenuación en chimpancés. En la actualidad, dos de estas candidatas a vacuna están siendo evaluadas en ensayos clínicos: la *cpts* 248/404 Δ SH y la *cpts* 248/404/1030 Δ SH (con una mutación adicional).

8. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico puede realizarse por métodos directos como aislamiento en cultivos celulares, detección directa de antígenos virales (rápido) o por técnicas moleculares.

La muestra de elección para el diagnóstico de infecciones por RSV en pacientes internados es el aspirado nasofaríngeo (ANF), obtenido en los primeros días de enfermedad mediante aspiración con bomba de vacío. Los hisopados nasales y faríngeos combinados, obtenidos con

los nuevos hisopos flexibles disponibles (véanse los capítulos 9 y 59) son de fácil obtención y se recomiendan para pacientes ambulatorios. Las muestras para detección de antígeno pueden colocarse en solución fisiológica y en el caso de que se realice aislamiento, se deben utilizar medios de transporte para virus como caldo triptosa o solución salina de Hanks con el agregado de gelatina o albúmina al 1% y antibióticos y antimicóticos. El transporte de la muestra se debe realizar en condiciones de Bioseguridad, en un recipiente con hielo o conservador de frío. Estas muestras, si no se envían inmediatamente al laboratorio, se pueden conservar a una temperatura de 4° C no más de 72 h. No se deben congelar, ya que si se realiza detección directa de antígeno mediante IF, la congelación y posterior descongelación de las células produce la ruptura celular y la pérdida del antígeno viral almacenado dentro de ellas. Además, el virus pierde viabilidad a temperaturas mayores a -70° C. Cuando se emplean técnicas moleculares la conservación de las muestras no es tan estricta (véase el cap. 9 *Diagnóstico Viroológico*).

8.1 AISLAMIENTO

El aislamiento puede realizarse en una gran variedad de células de origen humano o animal. El RSV crece en varias líneas continuas siendo de elección las HEp-2 y también líneas diploides (MRC-5) y líneas primarias de riñón humano y bovino. La ACP consiste en los típicos sincicios que aparecen entre los 4 y 8 días post-infección (Figura 15.2.2). Dado que otros virus (sarampión) también producen sincicios, la identificación del virus aislado debe realizarse por técnicas inmunohistoquímicas (IF) sobre la monocapa infectada. La centrifugación de las muestras sobre los cultivos celulares crecidos en tubos o en el formato *shell vial* permite una mayor recuperación del virus y acelerar los tiempos de la aparición de la ACP.

Dada las dificultades en el transporte de las muestras y el alto costo y complejidad del aislamiento en cultivo, los métodos de elección en el diagnóstico de RSV al nivel clínico son los procedimientos rápidos.

8.2 PROCEDIMIENTOS RÁPIDOS

La detección de antígeno por IF con anticuerpos monoclonales se realiza sobre improntas realizadas con las células descamadas del

tracto respiratorio (aspirados o hisopados nasofaríngeos). Es de excelente sensibilidad y permite dar un resultado en horas. La IF tanto directa como indirecta con monoclonales tiene una sensibilidad similar al aislamiento en cultivo, sin los inconvenientes de éste.

Existen varios ELISAs de origen comercial para detección de antígeno de RSV que también tienen una alta eficiencia, aunque inferior a la de la IF. Existen ELISAs, en el formato tradicional, que permiten procesar numerosas muestras simultáneamente y también hay formatos individuales inmunocromatográficos (*cassettes*) –BD Directigen™ RSV Test; RSV OIA; Fisher Sure-View RSV– que pueden ser utilizados por los médicos en sus consultorios, dan un resultado en menos de una hora y son útiles en períodos epidémicos, pero que presentan menor sensibilidad en períodos no epidémicos.

8.3 TÉCNICAS MOLECULARES

Existen ensayos comerciales y artesanales basados en la detección de RNA viral en las secreciones respiratorias por transcripción inversa y PCR (RT-PCR). Estos ensayos superan la sensibilidad del cultivo o la detección de antígeno y además, es posible realizar una PCR *multiplex* para detectar varios virus respiratorios en un único ensayo. También existen RT-PCR en tiempo real (véase el cap. 9 *Diagnóstico Viroológico*).

8.4 SEROLOGÍA

El diagnóstico serológico no es útil dado el tiempo necesario para la conversión serológica y la pobre respuesta humoral en los niños lactantes. Sin embargo, la detección de Ig M específica puede ser útil para estudios en adultos o en niños mayores, aunque su sensibilidad es inferior a la de la detección de antígeno y a la de las técnicas moleculares.

ADENDUM

Mientras este capítulo se encontraba en la etapa final de prueba de galera, se descubrió un receptor para el RSV, la molécula de nucleotina, que interactúa en el polo apical de las células del epitelio respiratorio con la proteína F viral (Tayyari F, *et al. Nat Med*, 2011).

Bibliografía

- Carballal G, Videla C, Espinosa M, Savy V, Uez O, Sequeira M, *et al.* "Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994". *J Med Virol* 2001; 64:167-74.
- Carballal G, Videla C, Sequeira MD, Mistchenko A, Arbiza J. "Respiratory syncytial virus: changes in prevalence of subgroup A and B among Argentinian children, 1990-1996". *J Med Virol* 2000; 61: 275-9.
- Carbonell-Estrany X, Simões EA, Dagan R, Hall CB, Harris B, Hultquist M, *et al.* "Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high risk children: a noninferiority trial". *Pediatrics* 2010; 125: 35-51.
- Collins PL, Murphy BR. "New generation live vaccines against human respiratory syncytial virus designed by reverse genetics". *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 166-73.
- Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. "Respiratory syncytial virus". En "Fields Virology" (Knipe DM, Howley PM, ed.) Lippincott-Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001. pp: 1443-1486.
- Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, Bataille JP, *et al.* "Lack of affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease". *Nat Med* 2009; 15:34-41.
- Frabasile S, Delfraro A, Facal L, Videla C, Galiano M, de Sierra MJ, *et al.* "Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial virus (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001". *J Med Virol* 2003; 71: 305 - 12.
- Galiano, M. "Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en Argentina". Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Abril 2004.
- Galiano M, Luchsinger V, Videla C, De Souza L, Sánchez Puch S, Palomo C, *et al.* "Intragroup antigenic diversity of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Argentina and Chile". *J Med Virol* 2005; 77: 311-6.
- Galiano MC, Palomo C, Videla C, Arbiza J, Melero J, Carballal G. "Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups A and B) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995-2001)". *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2266-73.
- Olszewska W, Openshaw P. "Emerging drugs for respiratory syncytial virus infection". *Expert Opin Emerg Drugs* 2009; 14: 2007-17.
- Openshaw, PJ. "Antiviral immune responses and lung inflammation after respiratory syncytial virus infection". *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 121-25.
- Oshansky CM, Zhang W, Moore E, Tripp RA. "The host response and molecular pathogenesis associated with respiratory syncytial virus infection". *Future Microbiol* 2009; 4: 279-97.
- Papenburg J, Boivin G. "The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus". *Rev Med Virol* 2010; 20: 345-60.
- Trento A, Casas I, Calderón A, García-García ML, Calvo C, Pérez-Breña P, *et al.* "Ten years of global evolution of the human respiratory syncytial virus BA genotype with a 60 nucleotide duplication in the G protein gene". *J Virol* 2010; 84: 7500-12.
- Vidaurreta SM, Marccone DN, Ellis A, Ekstrom J, Cukier D, Videla C, *et al.* "Acute viral respiratory infection in children under 5 years. Epidemiological study in two centers in Buenos Aires, Argentina". *Arch Argent Pediat* 2011; 109: 296-304.

Virus Parainfluenza y virus Parotiditis

Cristina M. Videla

1. VIRUS PARAINFLUENZA

1.1 CUADROS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLOGÍA (TABLA 15.3.1)

La primoinfección –habitualmente en niños pequeños– se manifiesta como IRA del tracto superior (rino-faringitis, rinitis, etc.) de escasa gravedad. Sin embargo, también pueden afectar el tracto inferior produciendo crup (laringo-tráqueo-bronquitis obstructiva), bronquiolitis y neumonía. Estas formas de presentación pueden ser de gravedad y, con escasa frecuencia, llevar a la muerte. Los parainfluenza 1, 2 y 3 están asociados con aproximadamente el 41% de los cuadros de crup grave, siendo el parainfluenza 1 el más importante. Las primoinfecciones suelen ser producidas por el virus parainfluenza 3, habitualmente después del primer mes de vida, pudiendo producir bronquiolitis y neumonía.

Los tipos 4 A y 4 B pueden producir tanto IRA alta como baja en todos los grupos etarios, aunque menos graves. Algunos estudios señalan a la tráqueo-bronquitis como el cuadro más frecuente en las infecciones por parainfluenza 4.

Los niños y adultos inmunocomprometidos pueden desarrollar infecciones graves, y aun mortales, por parainfluenza, especialmente por tipo 1. En estos pacientes se han detectado infecciones respiratorias con excreción muy prolongada de estos virus.

Las reinfecciones son frecuentes, tanto en niños como en adultos, ya que la inmunidad es de escasa duración y es tipo-específica. Frecuentemente las reinfecciones son producidas por el tipo 3 y se presentan como IRA altas, siendo clínicamente indistinguibles de las causadas por los virus del resfrío común (rhinovirus). Son frecuentes los brotes epidémicos en guarderías infantiles e intra-hospitalarios.

Con respecto al patrón estacional, el pico es diferente de acuerdo al tipo de parainfluenza. En EE. UU. los tipos 1 y 2 son más frecuentes en otoño y comienzo de invierno y el tipo 3 en primavera y verano. En Argentina, los escasos estudios realizados sobre epidemiología de estos virus muestran que presentan mayor frecuencia en otoño y primavera.

1.2 DIAGNÓSTICO

Se realiza por métodos directos (aislamiento del virus en cultivos celulares o detección de antígeno). Los métodos directos son de elección, en especial los procedimientos rápidos. De éstos, los más

empleados son IF y ELISA, para detección de antígeno viral en ANF (muestra de elección) o en otras muestras respiratorias.

El aislamiento puede realizarse en cultivos primarios de riñón de mono o en líneas continuas como LLC-MK2, que son sensibles si se incorpora al medio de cultivo tripsina para clivar la proteína F. Producen escasa acción citopatógena (ACP), excepto el tipo 2 que produce sincicios. Por ello, deben realizarse reacciones de hemadsorción y/o hemaglutinación (con glóbulos rojos de cobayo) a los 7 y 14 días post-infección.

La diferenciación entre los paramyxovirus y otros virus que también producen hemadsorción se realiza por IF con anticuerpos monoclonales específicos para cada tipo sobre la monocapa infectada o por inhibición de hemadsorción con antiseros específicos para parainfluenza 1 y 3.

Otro método directo de diagnóstico es la detección del RNA viral por RT-PCR, en el formato de *multiplex* que detecta parainfluenza 1, 2 y 3. En la actualidad, existen varias RT-PCR múltiples, de origen comercial, que permiten detectar todos los paramyxovirus así como también otros virus respiratorios con elevada sensibilidad y especificidad. Recientemente, se han desarrollado diferentes protocolos de PCRs en Tiempo Real.

El diagnóstico serológico no es recomendable debido a la escasa respuesta inmune humoral a estos virus, en especial en lactantes. Además, dada la existencia de reacciones cruzadas entre los diferentes virus parainfluenza y considerando que el tipo 3 es el que más precozmente infecta, la seroconversión frente a uno de los tipos no asegura la correcta identificación del tipo causal.

1.3 TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

A fines de 1960, se ensayaron vacunas a virus inactivado con formalina. Se observó que los niños desarrollaban anticuerpos en títulos bajos y que no se inducía respuesta Ig A secretoria en mucosas. Se están estudiando vacunas a virus vivo y atenuado para administración intranasal, vacunas a subunidades –utilizando las proteínas HN y F–, vacunas recombinantes entre virus bovinos y humanos, cepas modificadas genéticamente por genética inversa y vacunas heterólogas –con parainfluenza antigénicamente relacionado como parainfluenza bovino. Sin embargo, al 2013, no existe vacuna licenciada alguna para los paramyxovirus.

La amantadina, la rimantadina y el interferón tienen acción *in vitro*, pero no se ha demostrado su eficacia *in vivo*. El uso de inmunoglobulinas podría ser una opción terapéutica, que aún no ha sido



Virus parainfluenza	Síndrome más frecuente en la primoinfección		Grupo etario más afectado
	IRA altas	IRA bajas	
Tipo 1	rinitis, rinofaringitis	crup	6 meses a 6 años
Tipo 2	rinitis, rinofaringitis	crup, bronquitis	6 meses a 6 años
Tipo 3	rinitis, rinofaringitis	bronquitis, bronquiolitis, neumonía	0 a 6 meses
Tipos 4A y 4B	rinitis, rinofaringitis	diferentes cuadros respiratorios	0 a 5 años

Tabla 15.3.1. Cuadros clínicos asociados al virus parainfluenza. IRA: infección respiratoria aguda; IRA alta: del tracto respiratorio superior; IRA baja: del tracto inferior.

muy estudiada. Por lo tanto, la única profilaxis es evitar la exposición al contagio en los lactantes, así como una adecuada higiene de objetos y manos en contacto con el niño.

2. VIRUS PAROTIDITIS

El virus parotiditis produce infecciones endemo-epidémicas durante todo el año (casos esporádicos) y brotes epidémicos con mayor frecuencia en invierno, en especial en poblaciones susceptibles (escuelas, asilos, concentraciones militares, etc.).

Se acepta que existe un solo tipo antigénico. Por ello y debido a la intensa estimulación antigénica producida por la viremia, la inmunidad suele perdurar durante toda la vida.

Aunque el virus parotiditis es serológicamente monotípico, se han detectado variaciones genéticas entre las distintas cepas y se lo ha clasificado en 10 genotipos (A-L) basados en la secuencia nucleotídica de la proteína SH de membrana que es la más variable.

La emergencia reciente de epidemias de paperas en países con programas de vacunación efectivos, junto con estudios que demuestran diversidad antigénica entre las cepas, cuestiona la afirmación de que el virus productor de paperas sea monotípico.

2.1 CUADROS CLÍNICOS Y COMPLICACIONES (TABLA 15.3.2)

El cuadro clínico habitual es la parotiditis. La enfermedad tiene un período de incubación de 18-20 días. Consiste en la tumefacción de una o ambas parótidas, lo que produce dolor al abrir la boca, hablar o masticar. Otras glándulas salivales pueden estar afectadas y se observa edema en el orificio del conducto de Stenon. Varios órganos se pueden ver afectados sintomáticamente: testículos, SNC, epidídimo, próstata, ovario, hígado, páncreas, bazo, pulmón, timo, corazón, glándulas mamarias, pulmón y tiroides.

Generalmente, esto ocurre luego de la parotiditis pero pueden ser clínicamente evidentes antes, durante o después y aun en ausencia de la parotiditis.

Una complicación importante de la infección por este virus es la orquitis que se desarrolla en alrededor de un cuarto de todos los varones; con frecuencia es unilateral y ocurre después de la pubertad. Esto puede producir atrofia testicular y por lo tanto esterilidad. El compromiso meníngeo (meningitis *aséptica*) se presenta con menor frecuencia (11% de los casos), a veces sin la típica tumefacción de la parótida. Las encefalitis debidas a este virus son de escasa frecuencia.

La sordera sería otra complicación de la diseminación del virus al SNC.

2.2 PATOGÉNESIS

El virus penetra por vía mucosa orofaríngea. Durante el período de incubación replica en el epitelio del tracto respiratorio, luego pasa a tejidos linfoides y produce una fugaz viremia que le permite diseminarse a otros órganos (glándulas salivales, testículo, riñón, SNC).

El virus se encuentra en saliva 6 días antes del comienzo de los síntomas hasta la aparición de IgA secretoria, evento que ocurre alrededor de 5 días después del comienzo de la enfermedad. Es decir, que el período de diseminación viral a través de saliva es de 7 a 10 días. La viremia desaparece con la detección de la respuesta inmune humoral específica alrededor de los 11 días post-infección. El virus parotiditis infecta también a los linfocitos T.

Los síntomas clínicos iniciales están relacionados con la infección de las glándulas parótidas, ya que el virus multiplica en las células epiteliales de los ductos produciendo tumefacción y dolor. Usualmente se disemina al riñón y la viruria se puede detectar por períodos prolongados, hasta 14 días después del comienzo de los síntomas. El SNC también puede ser invadido por este virus con o sin síntomas de parotiditis y la llegada del virus sería a través del plexo coroideo por traspaso de células mononucleares infectadas.

Otros órganos que puede infectar son testículos, páncreas y corazón. Cuando la infección ocurre en el primer trimestre del embarazo, el virus –a través de la viremia materna– llega a la placenta y al feto pudiendo producir aborto. Cuando la infección ocurre en el último mes del embarazo se han reportado casos de cuadros respiratorios graves en el recién nacido.

Pueden existir infecciones inaparentes entre el 20 y 35% de los casos. La infección induce inmunidad que persiste durante toda la vida.

2.3 DIAGNÓSTICO

Habitualmente, el diagnóstico es clínico. Sin embargo, en los casos atípicos es necesario el diagnóstico virológico. El virus puede aislarse de saliva durante los primeros 4 días del comienzo de los síntomas; de orina hasta 2 semanas y de LCR dentro de los 8-9 días desde el comienzo de los síntomas de meningitis.

Los cultivos primarios de riñón de mono son las células más sensibles, siendo la formación de sincicios el efecto citopático característico, aunque no todas las cepas lo producen y por lo tanto es necesario realizar hemadsorción con glóbulos rojos de cobayo. La identificación del virus aislado puede realizarse por IF. En la actualidad, en las meningitis, el diagnóstico de elección es la detección del RNA viral por RT-PCR en LCR.

El diagnóstico serológico (seroconversión) por fijación de complemento, o inhibición de hemaglutinación ha sido muy utilizado, especialmente para confirmar casos de meningo-encefalitis, si bien es necesario tener presente que por fijación de complemento hay reacciones cruzadas con otros paramyxovirus. Actualmente, existen ensayos de ELISA y de IF para detección de IgM específica, que tienen gran sensibilidad diagnóstica y mayor rapidez.

2.4 EPIDEMIOLOGÍA Y PROFILAXIS

El virus parotiditis se transmite por contacto directo con saliva o microgotas de Flügge desde pocos días antes del inicio de los síntomas hasta una semana después. La aparición de casos clínicos suele ser esporádica durante todo el año, aunque se observan brotes epidémicos en invierno y primavera. En los países desarrollados se ha observado una marcada disminución en la incidencia de parotiditis luego de la introducción de la vacuna. La vacuna actualmente en uso es a virus vivo y atenuado (cepa atenuada Jeryl - Lynn), obtenida por 17 pasajes en fibroblastos de embrión de pollo. Presenta elevada eficacia e inocuidad ya que una sola inoculación produce seroconversión en más del 95% de los vacunados. La inmunidad es de larga duración. La inmunización puede realizarse con vacuna única en niños, adolescentes y adultos sin historia de parotiditis previa, o bien como vacuna combinada (triple viral: paperas, sarampión, rubéola, o MMR, acrónimo de los vocablos en inglés *measles, mumps, rubella* [sarampión, parotiditis, rubéola]). Ésta se emplea en la inmunización de niños de 12-15 meses. Si bien la parotiditis es una enfermedad benigna, la vacunación es aconsejable debido a que este virus es una causa frecuente de meningitis *aséptica*, sordera y esterilidad en el hombre.

Síndrome más frecuente	Parotiditis
Complicaciones	Orquitis, epididimitis, meningitis, encefalitis, pancreatitis, sordera, anexitis
Síndrome menos frecuente	Meningitis sin parotiditis, infecciones respiratorias bajas
Infecciones inaparentes	20 a 40% de los casos

Tabla 15.3.2. Espectro evolutivo de la infección por virus parotiditis.



Bibliografía

- Chanok RM, Murphy BR, Collins PL. "Parainfluenza Viruses". En *Fields Virology* (Knipe DM, Howley PM ed.) Lippincott-Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001, pp: 1341-79
- Palacios G, Jabado O, Cisterna D, Ory F, Renwick N, Echaverria JE, *et al.* "Molecular identification of mumps virus genotypes from clinical samples: standardized method of analysis". *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1869-78.
- Rubin S, Mauldin J, Chumakov K, Vanderzanden J, Iskow R, Carbone K. "Serological and phylogenetic evidence of monotypic immune responses to different mumps virus strains". *Vaccine* 2005; 24:2662-8.

Metapneumovirus Humano

Guadalupe Carballal - Mónica Galiano - Cristina M. Videla

1. HISTORIA DE SU DESCUBRIMIENTO

El metapneumovirus humano (hMPV) es uno de los más recientes ejemplos de cómo las nuevas técnicas de biología molecular sumadas a los procedimientos clásicos de aislamiento en cultivo celular pueden ayudar a identificar un organismo hasta ahora desconocido.

La historia del MPVh comenzó en Holanda en 2001 cuando van der Hoogen y col. observaron que cultivos celulares inoculados con aspirados nasofaríngeos de niños con IRA presentaban un efecto citopático que no podía ser identificado con los monoclonales dirigidos contra los virus más frecuentes como RSV u otros habitualmente detectados por inmunofluorescencia. Casualmente, dichas muestras provenían de niños con síntomas respiratorios similares a los causados por la infección con RSV. El microscopio electrónico mostró partículas virales pleomórficas y filamentosas, similares a las de los paramyxovirus. Al estudiar sus características bioquímicas se observó que era sensible al cloroformo, que para su replicación en células de riñón de mono (tMK) necesitaba tripsina, y que no presentaba actividad hemaglutinante. Estos datos preliminares permitieron su ubicación como miembro de la familia *Paramyxoviridae*.

Luego se utilizaron técnicas de PCR empleando oligonucleótidos específicos para un amplio rango de paramyxovirus (RSV, parainfluenza, sarampión, paroditis, virus simiano 5, Sendai, Newcastle), en condiciones de baja astringencia, por lo tanto más inespecíficas y con mayores posibilidades de detectar virus potencialmente relacionados. Todos los intentos fueron negativos, sugiriendo que este nuevo agente no estaba relacionado a los paramyxovirus conocidos hasta el momento. Finalmente, utilizando una técnica denominada *Random Arbitrarily Primed* (RAP-PCR), los investigadores fueron capaces de identificar secuencias genéticas únicas. El análisis filogenético de dichos fragmentos reveló que el nuevo patógeno era un paramyxovirus, más cercanamente relacionado al pneumovirus aviar (APV), único representante hasta ese momento conocido del género *Metapneumovirus*. Posteriormente, se demostró que este nuevo virus era capaz de causar infección respiratoria en primates pero que no causaba patología en aves. Por lo tanto, este virus se consideró como el primer patógeno humano miembro de dicho género y se lo denominó **Metapneumovirus humano (hMPV)**. Este género, junto con el género *Pneumovirus*, cuyo representante más importante es el RSV, forman parte de la subfamilia *Pneumovirinae*, dentro de la familia *Paramyxoviridae*.

Estudios epidemiológicos posteriores demostraron la presencia del hMPV en América, Europa, Asia, Australia y Sudáfrica. La epidemiología y manifestaciones clínicas asociadas con hMPV son indistinguibles de las producidas por RSV, con IRAs que pueden ser graves y que afectan a niños, adultos, ancianos e inmunocomprometidos. Si bien ha sido identificado en el 2001, el hMPV no es un patógeno nuevo, ya que se halló evidencia serológica de infecciones producidas por este virus en sueros obtenidos a partir de la década de 1950 y, además, se han obtenido aislamientos virales en muestras respiratorias de los últimos 10-20 años en Europa y Canadá. Se especula que este virus se podría haber originado a partir del virus aviar, en algún evento zoonótico ocurrido hace poco más de 50 años.

El interrogante que surge es: ¿por qué no pudo ser identificado hasta el 2001? Las respuestas son: a) porque el hMPV no replica

en forma eficiente en las líneas celulares que habitualmente se emplean para aislamiento de virus respiratorios; b) su replicación es lenta y la acción citopática no es clara; c) su aislamiento requiere el tratamiento con tripsina de los cultivos; d) no presenta reactividad cruzada en estudios serológicos; y e) presenta muy baja homología genética con otros patógenos respiratorios.

2. ESTRUCTURA

Su genoma consiste en una cadena simple de RNA de aproximadamente 13 Kb que contiene los genes codificantes para ocho proteínas: N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), M (proteína de matriz), F (proteína de fusión), M2 (factor de elongación de la transcripción/regulador de la síntesis de RNA), SH (proteína hidrofóbica pequeña de superficie), G (glicoproteína de unión) y L (polimerasa). Estos genes se organizan en el siguiente orden: 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5', es decir, en la misma secuencia que para el APV o pneumovirus aviar. Existen dos grandes diferencias entre los genomas del hMPV y el RSV: el orden de los genes es diferente, y el hMPV no presenta genes no estructurales (NS). En el RSV, las proteínas codificadas en estos genes (NS1 y NS2) han sido recientemente identificadas como antagonistas del IFN; sin embargo, se desconoce la significación de la ausencia de estas dos proteínas en el hMPV. En el RSV, las proteínas externas de membrana F y G constituyen los principales antígenos, y se cree que cumplen la misma función en el hMPV.

Los análisis filogenéticos realizados sobre un gran número de aislamientos permitieron identificar dos grandes grupos genéticos, A y B, y dos subgrupos menores dentro de cada grupo (A1, A2, B1 y B2). Se desconoce si estos grupos representan diferentes grupos antigénicos.

3. PATOGENIA

Los estudios sobre patogenicidad e inmunología del hMPV son aún limitados. Se han investigado modelos animales (ratones BALB/c y rata del algodón) ya que el virus replica en altos títulos en pulmón. Dentro de los primates no humanos, el chimpancé sería el que mejor reproduce la enfermedad humana.

4. CUADROS CLÍNICOS

4.1 EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

En niños se han descrito síntomas de IRA alta o baja. Los hallazgos clínicos asociados con la infección por hMPV son muy similares a los producidos por RSV. Estos hallazgos son: a) el diagnóstico más frecuente es el de bronquiolitis, seguido por neumonía y crup; b) se observa otitis media hasta en un 50% de los casos; c) los síntomas más frecuentes son: tos, rinoresaca, fiebre, disnea, sibilancias y retracciones; d) hay hipoxia (saturación de oxígeno < 90%) en un 30% de los casos; e) las radiografías de tórax muestran atelectasia, hiperinsuflación e infiltrados; f) niños con enfermedades crónicas subyacentes (cardiopulmonares, pacientes inmunosuprimidos y prematuros) pueden sufrir enfermedad más grave; g) el hMPV podría causar reinfecciones a lo largo de toda la vida, aunque las reinfecciones serían menos graves que la primoinfección; y h) existiría una posible asociación entre la infección por hMPV y la exacerbación de cuadros asmáticos.

4.2 EN POBLACIÓN ADULTA

Aunque hay escasos estudios sobre el impacto del hMPV en la población adulta, se lo asocia principalmente con síndromes tipo influenza y resfríos. La infección ocurre en todas las edades, aunque suele ser más frecuente en adultos jóvenes. Los ancianos, en especial aquellos con enfermedades cardíacas o pulmonares crónicas pueden presentar cuadros de IRA baja grave que requieren hospitalización.

La infección por hMPV puede tener un desenlace fatal en individuos inmunocomprometidos, y se sugiere que la coinfección con RSV podría conducir a enfermedad respiratoria más grave.

En síntesis, la presentación clínica del hMPV es muy similar a la del RSV, con consecuencias más graves en infantes, ancianos y personas con enfermedades subyacentes.

5. DIAGNÓSTICO

El hMPV puede detectarse en todas las muestras respiratorias habituales (véanse los caps. 9 y 13). Este virus presenta una propagación sumamente lenta y fastidiosa en cultivos celulares, produciendo una aceptable acción citopática (ACP) sólo en células de riñón de mono (tMK o LLC-MK2). La ACP empieza a observarse 10 a 20 días post-infección. Con algunas cepas pueden observarse sincicios similares a los producidos por RSV; con otras cepas se observan células redondeadas y destrucción. El hMPV también replica en HEp-2 o VERO, pero sin presentar ACP. Además, su aislamiento es dependiente de la presencia de tripsina en el medio de cultivo.

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales específicos para la detección directa y rápida de antígenos de hMPV en muestras respiratorias, alternativa útil para los laboratorios que no cuentan con técnicas moleculares. También existe un ELISA de origen comercial. Estas dos técnicas tienen una sensibilidad similar entre sí pero menor a la de los procedimientos moleculares.

La detección de hMPV por técnicas moleculares es la más empleada para diagnóstico, ya sea la PCR directa, en formato de PCR en tiempo real, o como parte de una PCR *multiplex* que permite detectar otros virus respiratorios. La mayoría de los protocolos de PCR se basan en la amplificación de los genes que codifican para las proteínas L, N o F, que son los más conservados. Debido a la existencia de 2 linajes genéticos de hMPV con considerable diversidad genética dentro de cada grupo, la detección del virus podría ser subestimada si los oligonucleótidos seleccionados para la PCR no son los adecuados. Algunos estudios señalan a los genes N y L como los más indicados para el diagnóstico molecular.

El diagnóstico serológico de este virus por IF sobre células infectadas o por ELISA con lisados de células infectadas, al igual que para todos los virus respiratorios, tiene un valor limitado y permite sólo un diagnóstico retrospectivo. Dado que la infección es casi universal durante la infancia, es necesario demostrar un aumento del título de anticuerpos específicos en más de 4 veces para confirmar una infección reciente.

6. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

Aún no existen vacunas, antivirales o preparaciones de anticuerpos que hayan sido aprobadas para la prevención o el tratamiento de la infección por hMPV. Algunos estudios recientes muestran que la ribavirina y la inmunoglobulina policlonal intravenosa, proveniente de dadores sanos, utilizadas para el tratamiento de la infección por RSV presentan similar actividad *in vitro* contra ambos virus. Por el contrario, el palivizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la proteína F del RSV, no presentó actividad alguna contra el hMPV.

7. EPIDEMIOLOGÍA

El impacto del hMPV como causa de IRA se evaluó en varios estudios, la mayoría en niños hospitalizados. Mediante técnicas mo-

Año	Muestras negativas para otros virus	Muestras analizadas para hMPV	Muestras hMPV (+)	
			n	%
1998	86	13	1	7,7
1999	57	18	3	16,6
2000	63	38	5	13,2
2001	27	20	0	0,0
2002	25	11	2	18,2
Total	258	100	11	11,0

Tabla 15.4.1. Frecuencia de hMPV en aspirados nasofaríngeos negativos para otros virus respiratorios, provenientes de niños < 5 años con IRA baja. Buenos Aires (1998-2002). Adaptado de "Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina". Galiano M, *et al. J Med Virol* 2004;72:299-303.

leculares, el hMPV se detectó en el 5-10% de esos casos, lo que indica que este virus constituye la segunda causa de IRA baja en esta población, luego del RSV que presenta frecuencias de alrededor del 30%.

Los estudios de seroprevalencia indican que virtualmente todos los niños han sido infectados antes de los 5-10 años de edad. En niños menores de un año, la seroprevalencia fue menor para hMPV que para RSV. La edad media de los niños hospitalizados por infección con hMPV es mayor que la de aquellos internados por RSV; esto sugiere que la primoinfección por hMPV podría ocurrir a una edad más tardía que la primoinfección por RSV.

La observación de casos de infección grave en adultos y de reinfecciones en pacientes inmunocomprometidos sugiere que, a pesar de las infecciones frecuentes en la infancia, las reinfecciones por hMPV serían frecuentes durante toda la vida, ya sea debido a una respuesta inmune incompleta y/o a la adquisición de nuevos genotipos, como también se ha demostrado para el RSV.

El hMPV produce epidemias anuales con una distribución estacional que se superpone a la del RSV, con la mayor parte de los casos reportados durante el invierno y comienzos de primavera.

8. PRIMEROS ESTUDIOS SOBRE hMPV EN ARGENTINA

En el primer estudio publicado sobre este virus en Argentina se analizaron 100 muestras respiratorias provenientes de niños menores de 5 años con IRA baja obtenidas durante 1998-2002 y que habían sido negativas por IF para los virus respiratorios conocidos. Empleando RT-PCR como técnica de diagnóstico, se detectó hMPV en el 11% de los casos. El virus se detectó desde junio a enero y la mayor frecuencia se observó en primavera, ligeramente más tarde que los brotes epidémicos producidos por RSV y coincidiendo con el patrón estacional observado para los virus parainfluenza y adenovirus en Argentina (Figura 15.4.1).

El 91% de los niños positivos para hMPV fueron hospitalizados. La proporción de varones:mujeres fue de 9:2. La mediana de edad fue de 5 meses, lo que fue ligeramente mayor que para los niños hospitalizados con infección por RSV. Los niños infectados con hMPV estuvieron internados durante un promedio de 11,5 días, en comparación con una media de 5 días para los infectados por RSV. De los pacientes internados, el 71% requirió suplemento de oxígeno, aunque ninguno de ellos requirió intubación; el 86% presentó bronquiolitis y el 14% un síndrome pertussis-simil. En dos casos hubo presencia concomitante de conjuntivitis y otitis media. Los síntomas más fre-

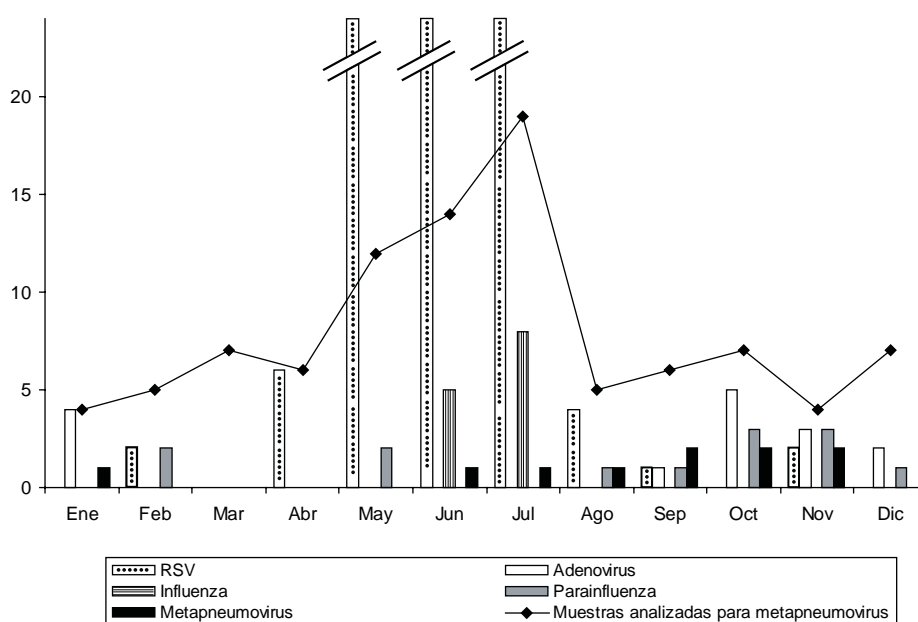


Figura 15.4.1. Cocirculación del hMPV y otros virus respiratorios en niños < 5 años en Buenos Aires (1998-2002). "Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina". Galiano M, et al. *J Med Virol* 2004;72:299-303.

cuentas fueron: tos, fiebre y dificultades respiratorias (Galiano M y col., 2004).

Otro estudio, realizado por Laham y col. sobre 396 infantes con síntomas respiratorios atendidos en cuatro hospitales de Buenos Aires entre junio y septiembre de 2002 detectó 22 niños infectados con hMPV (6%). El diagnóstico se realizó por RT-PCR sobre lavados nasales. La edad media fue de 161 días. Los síntomas más frecuentes fueron rinorrea, tos, sibilancias y se diagnos-

tico neumonía en el 14% de los pacientes con hMPV. El patrón de estacionalidad de este virus mostró un pico hacia el final del invierno. Además, se midieron los niveles de algunas citoquinas inflamatorias en los lavados nasales (IL-12, TNF- α , IL-6, IL-1 β y IL-8) y se observó que los mismos fueron más bajos en los pacientes con infección por hMPV que en los infectados por RSV, sugiriéndose que podrían existir diferentes mecanismos de enfermedad o de activación de la inmunidad innata.

Bibliografía

- Boivin G, De Serres G., Cote S, Gilca R, Abed Y, Rochette L et al. "Human metapneumovirus infections in hospitalized children". *Emerg Infect Dis* 2003;9:634-40.
- Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Ishiko H, Kobayashi K. "Comparison of the seroprevalence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus". *J Med Virol* 2004;72:304-6.
- Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. "Human metapneumovirus infections in young and elderly adults". *J Infect Dis* 2003;187:785-90.
- Galiano M, Videla C, Puch SS, Martinez A, Echavarría M, Carbalal G. "Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina". *J Med Virol* 2004;72:299-303.
- Guerrero-Plata A, Casola A, Garofalo RP. "Human metapneumovirus induces a profile of lung cytokines distinct from that of respiratory syncytial virus". *J Virol* 2005; 70: 14992-7.
- Gioula G, Kyriazopoulou-Dalaina V. "Human metapneumovirus and pediatric patients: A mini review". *J Ped Infect Dis* 2009; 4: 351-6.
- Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. "Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses". *Clin Infect Dis* 2004;38:983-90.
- Laham FR, Israele V, Casellas JM, Garcia AM, Lac Prugent CM, Hoffman SJ et al. "Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy". *J Infect Dis* 2004;189:2047-56.
- Papenburg J, Boivin G. "The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus". *Rev Med Virol* 2010; 20: 245-60.
- Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL et al. "Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong". *Emerg Infect Dis* 2003;9:628-33.
- Spetch I, Guerrero-Plata A, Jewell AM, Piedra PA, et al. "T lymphocytes contribute to antiviral immunity and pathogenesis in experimental human metapneumovirus infection". *J Virol* 2008; 82: 8560-9.
- van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R., Fouchier RA et al. "A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease". *Nat Med* 2001;7:719-24.
- van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R et al. "Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients". *J Infect Dis* 2003;188:1571-7.



15.5

Sarampión

Alicia S. Mistchenko

1. ESTRUCTURA VIRAL

El virus sarampión pertenece al orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Morbillivirus*. Es un virus de 125-250 nm de diámetro, pleomórfico, con una envoltura lipídica donde se insertan las principales proteínas antigénicas y una nucleocápside de simetría helicoidal que contiene la ribonucleoproteína conformada por una hebra de RNA de cadena única, no segmentada, de polaridad negativa y el complejo de la polimerasa viral. Entre la ribonucleoproteína y la envoltura lipídica hay un segundo componente estructural constituido por la proteína M que envuelve internamente a la nucleoproteína.

El genoma tiene una longitud de 15894 nucleótidos, está dividido en seis unidades de transcripción con una amplia región intergénica de función desconocida entre los genes M y F. El RNA codifica al menos ocho proteínas, tres de las cuales –la nucleocápside (N), la fosfoproteína (P) y la denominada *large* (L; en inglés grande) conforman la ribonucleoproteína (RNP), (Figura 15.5.1).

El gen P es complejo y utilizando diferentes ORF (abreviatura del inglés *open reading frame*: marco de lectura abierto), en el mismo RNAm, codifica además de la proteína P, dos proteínas no estructurales, la proteína C y la proteína V, que funcionan coordinadamente en la replicación viral. La proteína C participa en la regulación de la cantidad de transcritos de RNAm en relación a la replicación del RNA viral y la proteína V actuaría como represor de la replicación.

Finalmente, los genes H y F codifican dos glicoproteínas de envoltura que participan en la unión y entrada del virus a la célula; son la hemaglutinina (HA) y la proteína de fusión. A diferencia de otros paramyxovirus, dado que la HA del virus sarampión no utiliza ácido siálico como receptor, éste carece de actividad de neuraminidasa.

La HA es una glicoproteína de tipo II, tetramérica, y tiene una doble función: la de unirse al receptor celular y la de participar en el mecanismo de fusión. La proteína de fusión es una glicoproteína de tipo I, trimérica, codificada como precursor inactivo (F0) que es escindido en el *trans*-Golgi por proteasas celulares generando un fragmento corto (F2) y uno largo (F1), unidos por un puente disulfuro. Este proceso expone el dominio hidrofóbico y fusogénico del extremo N-terminal del segmento F1, se realiza a pH neutro y es imprescindible para que el virus sea infeccioso. Morfológicamente se manifiesta por la formación de sincicios (Figura 15.5.2).

2. PATOGENIA

El sarampión es una enfermedad sistémica que se acompaña de una fase inicial con inmunosupresión generalizada, responsable de la mortalidad asociada a la infección, seguida por una sólida respuesta inmune protectora. Este efecto paradójico parece relacionarse con interacciones tempranas del virus con células inmunes.



Figura 15.5.1. Representación esquemática del genoma del virus sarampión.

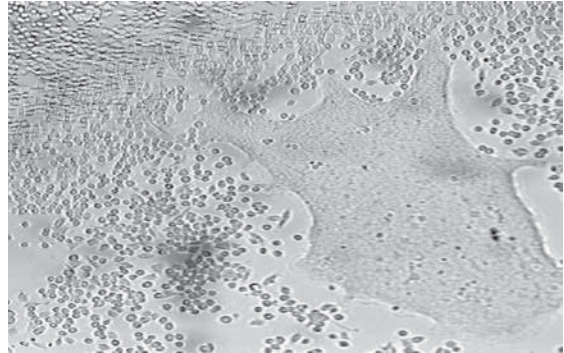


Figura 15.5.2. Efecto citopático del virus sarampión en monocapa de células VERO. Se observan las células gigantes multinucleadas, producto de la fusión de células infectadas (160x).

El virus se une a la célula hospedadora mediante la interacción de las glicoproteínas de superficie con receptores celulares, CD150 o molécula de señalización SLAM (*signalling lymphocyte activation molecule*), expresada selectivamente en algunas células T y B, utilizado por todas las cepas salvajes y el CD46 (miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas) expresado en células nucleadas y utilizado por las cepas vacunales.

La vía de ingreso al organismo es respiratoria. Luego de su interacción con los receptores basolaterales de las células del epitelio de tráquea, bronquios y células dendríticas inmaduras intersticiales, el virus es captado y transportado a los tejidos linfáticos regionales.

En los estadios iniciales de la infección y en la viremia primaria la propagación es de célula a célula; de este modo, los ácidos nucleicos y las proteínas virales pueden ser detectados en una fracción pequeña de linfocitos y monocitos de sangre periférica. Existe linfopenia, particularmente a expensas de las células T. Luego de la replicación inicial en los tejidos linfoides, el virus causa una nueva viremia, llamada secundaria, con invasión de todo el organismo y replicación extensa en los epitelios pulmonares y en la cavidad bucal, por donde se excreta.

La reacción inflamatoria afecta la integridad de los epitelios respiratorios y la conjuntiva y causa los pródromos iniciales. La aparición del exantema marca el comienzo de la respuesta inmune, inicialmente IgM, seguida de IgA, y luego IgG (principalmente los isotipos IgG1 y IgG4). Los antígenos virales pueden ser detectados en la piel, en particular cerca de los vasos sanguíneos y en las células endoteliales de los capilares dérmicos. Sin embargo, dado el aspecto máculo-papular del exantema, el virus no se transmite a partir del mismo. Luego de varios días de evolución, el virus es eliminado eficientemente por una respuesta inmune específica.

El sarampión causa una marcada y transitoria inmunosupresión que se caracteriza por una disminución de la hipersensibilidad retardada, de la respuesta proliferativa específica de antígeno y de la producción de IL-12. Esta anergia (del latín, falta de reacción) persiste semanas después de la infección aguda. Así, la inmunosupresión puede actuar como factor predisponente a infecciones secundarias que contribuyen a aumentar la mortalidad por sarampión, sobre todo en pacientes con inmunodeficiencias primarias o secundarias (HIV, leucemias, tratamientos con corticoides, desnutrición grave).

3. CUADROS CLÍNICOS

El sarampión es una enfermedad altamente transmisible caracterizada por manifestaciones prodrómicas tales como fiebre, tos, coriza y conjuntivitis, un exantema patognomónico (manchas de Köplik) seguido por un exantema máculo-papular que se extiende entre el tercer y el séptimo día, contabilizados desde el inicio de los síntomas.

El tiempo transcurrido desde el contacto inicial hasta el comienzo del exantema (período de incubación) es de 14 días (rango 7-18). Los pródomos preceden en 2 a 4 días al exantema y se caracterizan por la aparición del triple catarro (nasal, conjuntival y bronquial), fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ y manchas de Köplik (pequeños puntos blanquecinos perlados en la mucosa bucal) de presencia fugaz aunque patognomónica.

La aparición del exantema máculo-papular da inicio al período de estado; tiene una progresión céfalo-caudal; empieza por la cara y el cuello, alcanza luego manos y pies y tiende a ser confluyente, en particular en el tronco. Luego ocurre una descamación fina y el exantema empieza a desaparecer, manteniendo la misma progresión. Con cierta frecuencia se acompaña de linfadenopatías, anorexia y diarrea.

Aproximadamente el 30% de los casos padece alguna complicación, que ocurre en especial en niños pequeños, en desnutridos y en inmunodeprimidos. Las complicaciones más frecuentes son la diarrea, la otitis media, la neumonitis intersticial y la neumonía. Menos frecuentes son las complicaciones graves como la encefalitis (0,1%) y los síndromes convulsivos (0,6%).

Además de la forma de presentación característica, en individuos que reciben inmunoprofilaxis pasiva con inmunoglobulinas o en niños con bajos títulos de anticuerpos maternos, las manifestaciones pueden ser atípicas o atenuadas. En ellos, el período de incubación puede ser más prolongado y el exantema más discreto.

3.1 INFECCIÓN PERSISTENTE

Aunque el virus sarampión no es –por definición– neurotrópico, puede establecer una infección persistente en células del SNC. Existen tres diferentes complicaciones neurológicas que resultan de distintas interacciones del virus con el tejido neural. La encefalitis post-infecciosa usualmente aparece 5-14 días después del exantema y es causada por un mecanismo autoinmune de naturaleza desconocida. La encefalitis de cuerpos de inclusión aparece en inmunocomprometidos después de un período de latencia de 3-6 meses y podría deberse a la invasión directa del tejido neural por el virus. La tercera forma es la panencefalitis esclerosante subaguda (PEES o –en inglés– SSPE), que se manifiesta 2-10 años después de la infección primaria y se define como una enfermedad neuro-

degenerativa crónica progresiva y fatal, causada por la infección persistente de neuronas y oligodendrocitos.

4. DIAGNÓSTICO

En la actualidad se utilizan preferentemente métodos de detección molecular y serológicos. El aislamiento en cultivo se emplea para la conservación y caracterización de cepas, en especial con fines epidemiológicos.

Para llegar al diagnóstico podemos emplear cuatro preguntas básicas: ¿Qué material debo obtener? ¿Cuándo lo debo obtener? ¿Qué estudio solicito? ¿Qué información me dará? Las respuestas a estos interrogantes se muestran en la Tabla 1.

4.1 DETECCIÓN DEL VIRUS

El virus sarampión se elimina en secreciones respiratorias y orina por períodos variables, y puede aislarse en líneas específicamente preparadas para su crecimiento como B95-8 (linfocitos de mono transformadas con virus Epstein-Barr) y Vero-DogSLAMtag – Vero-DST (células de riñón de mono transfectadas con el receptor SLAM). En ellas produce sincicios de células gigantes.

El virus puede ser detectado directamente por amplificación de ácidos nucleicos con RT-PCR en el mismo tipo de muestras. Estos templados pueden ser secuenciados para determinar marcadores moleculares de genotipo.

4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS

El virus sarampión es monotípico desde el punto de vista serológico. Sin embargo, la diversidad genética en la secuencia de nucleótidos permite identificar clados y genotipos. En 1998, la Organización Mundial de la Salud publicó la primera guía con la nomenclatura unificada que debería aplicarse a cualquier virus salvaje identificado, así como protocolos estándar para la caracterización y cepas de referencia. Se define un nuevo genotipo cuando la secuencia de nucleótidos comparada con la secuencia de referencia difiere en más del 2,5% en el gen N y 2% en el H.

Estas guías se van actualizando periódicamente y al presente se aceptan 8 clados (A-H) que incluyen los 22 genotipos. Los clados B, C, D, G y H contienen múltiples genotipos (B1-3, C1-2, D1-10, G1-3, H1-2). Los diferentes genotipos no se asocian con diferencias en la gravedad de la enfermedad y todos pueden ser neutralizados con suero de personas vacunadas.

Existe una clara relación entre el genotipo y la región geográfica donde fue aislado. La identificación del genotipo permite detectar la fuente de infección, rastrear las rutas de transmisión y determinar si el virus es autóctono o importado y resulta en un componente

Muestra	Momento	Método	Indicación
Suero	Primeros 30 días desde el comienzo del exantema	Detección de IgM (IF/ELISA)	Infección aguda
Suero	Período agudo y convalecencia	Detección de IgG (IF/ELISA) (seroconversión)	Infección aguda
Aspirado nasofaríngeo	Primeras 48 h. desde el inicio del exantema	Aislamiento en cultivo	Infección aguda
Orina	Hasta 7 días después del inicio del exantema	Aislamiento en cultivo	Infección aguda
Leucocitos de sangre periférica	Hasta 28 días desde el inicio del exantema	RT-PCR	Infección aguda
Líquido cefalorraquídeo	Manifestaciones clínicas de encefalitis	RT-PCR	Infección aguda
Líquido cefalorraquídeo	Manifestaciones clínicas de panencefalitis esclerosante subaguda	Detección de Ig G (IF/ELISA)	Infección persistente

Tabla 15.5.1. Diagnóstico de sarampión. IF: Inmunofluorescencia; ELISA: Enzimoimmunoensayo; RT-PCR: Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa.

relevante en la vigilancia epidemiológica. De este modo, la documentación de los cambios de los genotipos virales en una región y durante un período de tiempo permite demostrar si hay transmisión endémica.

4.3 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

Los métodos recomendados son la inmunofluorescencia (IF) y los ELISA de captura. Habitualmente, la IgM específica se detecta hasta 30-40 días después del inicio del exantema. Vale advertir que en muestras precoces, por ejemplo las obtenidas en las primeras 72 horas desde el inicio del exantema, el resultado puede ser negativo hasta en el 20% de los casos (falso negativo). Por eso, en esa situación se recomienda una muestra posterior.

La detección de IgG se utiliza para evaluar exposición previa o conversión serológica; en general, se emplean métodos de IF, ELISA o neutralización. La conversión serológica es también un marcador de infección aguda.

5. EPIDEMIOLOGÍA

El sarampión es una enfermedad humana altamente contagiosa, de distribución mundial. El virus no tiene reservorios animales ni tiene portadores asintomáticos, es monotípico y existe una vacuna efectiva para su prevención. Estas características, sumadas a la elevada mortalidad, sobre todo en niños de países en vías de desarrollo, permitieron postularlo como un virus candidato a la erradicación. Las estrategias conducentes a este fin, es decir, campañas masivas de vacunación, comenzaron en América en 1993 y durante esa década se extendieron a otros continentes. El objetivo es la erradicación del virus hacia el año 2020, lo que tiene implícito realizar vigilancia epidemiológica para detectar los casos probables y la caracterización molecular de los genotipos virales.

En Argentina, las dos últimas epidemias se registraron en el año 1991, causada por el genotipo C1, y en 1998, por el genotipo D6. En ambas ocasiones la población más afectada fue la de menores de 2 años. En nuestro país está en vigencia el Programa Nacional de Eliminación del Sarampión desde el año 1993, que hace obligatoria la notificación de los casos sospechosos, el bloqueo con vacunas de

todas las personas que estuvieron en contacto con el caso y altas coberturas en la población mediante campañas masivas de vacunación. Desde el punto de vista epidemiológico, los casos deben ser clasificados como importados (si el exantema aparece en los 21 días subsiguientes al regreso del extranjero) o de transmisión local –autóctonos– (si la transmisión fue en el país). Se recomienda la identificación del genotipo y el análisis de las rutas de llegada al país.

6. TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

No hay tratamientos antivirales efectivos y aprobados para uso humano.

Vitaminas. El suplemento de vitamina A en niños de 6 meses a 2 años, principalmente desnutridos, mostró efectividad en la disminución de la mortalidad asociada a complicaciones como la neumonía y la diarrea.

Inmunoglobulinas. Se recomienda su uso (inmunización pasiva) en embarazadas, inmunocomprometidos o niños de 6-12 meses convivientes con casos de sarampión.

Vacunas. Se utilizan cepas de virus atenuados en una vacuna única o combinada con la que previene la rubéola y las paperas (triple viral; MMR: abreviatura del inglés de los términos *measles*, *mumps* y *rubella*). Existe un 5% de individuos no respondedores a la vacuna, quienes ante la segunda dosis desarrollan protección. Los esquemas regulares de vacunación indican una dosis al año, otra a los 4-6 años y un refuerzo a los 11-12 años.

NOTA

Este capítulo se finalizó en el año 2008.

ADENDUM

Mientras este capítulo se encontraba en la etapa de prueba de galera, se descubrió un nuevo receptor para el virus sarampión en células epiteliales polarizadas: la molécula de nectina-4, perteneciente a la superfamilia de las Igs (Mühlebach M *et al*, 2011; Noyce R *et al*, 2011).



Bibliografía

- Dhiman N, Jacobson RM, Poland GA. "Measles virus receptors: SLAM and CD46". *Rev Med Virol* 2004; 14: 217-29.
- Riddell MA, Rota JS, Rota PA. "Review of the temporal and geographical distribution of measles virus genotypes in the prevaccine and postvaccine eras". *Virol J* 2005; 2: 87.
- Rima BK, Duprex WP. "Molecular mechanisms of measles virus persistence". *Virus Res* 2005; 111:132-47.
- Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. "Modulation of immune functions by measles virus". *Springer Semin Immunopathol* 2002; 24:127-48.
- Schneider-Schaulies J, Niewiesk S, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. "Measles virus in the CNS: the role of viral and host factors for the establishment and maintenance of a persistent infection". *J Neurovirol* 1999; 5: 613-22.

Adenovirus

Marcela Echavarría

1. GENERALIDADES

Los adenovirus se descubrieron en la década de 1950, durante una activa búsqueda de los agentes causantes del resfrío común. Se los aisló por primera vez al observar la degeneración espontánea de cultivos primarios de adenoides extirpadas de niños en EE.UU. Simultáneamente, otros investigadores, recuperaron este virus en cultivos celulares inoculados con muestras respiratorias de reclutas militares con enfermedad respiratoria aguda o neumonía atípica. Estos virus recibieron inicialmente diversos nombres como *adenoid-degenerating agent* o *RI-67* (infección respiratoria del recluta #67) y en 1956 se adoptó el término *adenovirus* por haber sido inicialmente aislados de adenoides.

1.1 TAXONOMÍA

Los adenovirus están ampliamente distribuidos en la naturaleza y pertenecen a la familia *Adenoviridae* la cual incluye especies de origen humano y animal. Los adenovirus han sido aislados de todas las especies estudiadas de mamíferos placentarios, de marsupiales, aves, reptiles y anfibios. La familia *Adenoviridae* se subdivide en cuatro géneros: *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Mastadenovirus* y *Siadenovirus*. El género *Mastadenovirus* del griego *mastos* (mamas) infecta a mamíferos e incluye los virus de humanos, simios, bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caninos y murinos. Existen al menos 19 especies dentro del género *Mastadenovirus* pero solamente 7 especies se asocian con infección en humanos. Estas 7 especies se denominan A, B, C, D, E, F y G.

1.2 ESTRUCTURA

Todos los miembros de la familia *Adenoviridae* poseen una partícula viral de tamaño, estructura y composición polipéptica similar. Sin

embargo, presentan antígenos específicos de especie y se caracterizan por presentar una gran variabilidad genética.

Los adenovirus carecen de envoltura, poseen simetría icosaédrica y un diámetro de 70 a 90 nm. La cápside está formada por 252 capsómeros divididos en 2 tipos: 240 hexones que ocupan las 20 caras triangulares del virus y 12 pentones que se ubican en los 12 vértices de la partícula. Cada pentón posee una base y una fibra –proyección externa de longitud variable–; (Figura 16.1).

Los polipéptidos estructurales del virión se designan con números romanos (Tabla 16.1). El hexón, el pentón y la fibra (polipéptidos II, III y IV) son los constituyentes principales de la cápside. Cada hexón está formado por tres cadenas idénticas del polipéptido II (proteína compleja de 900 residuos) y cada fibra, por tres unidades idénticas del polipéptido IV. Los hexones poseen epítopes específicos de género, especie y serotipo; los pentones, de género y especie; y la fibra posee determinantes antigénicos específicos de especie y serotipo.

El hexón presenta antígenos específicos de género (α) y otros específicos de serotipo (ϵ). Estos últimos son los responsables de la inducción de anticuerpos neutralizantes y se utilizan en la clasificación en serotipos por técnicas de neutralización.

Los pentones están formados por 2 unidades estructurales: la base y la fibra. La base lleva un determinante antigénico denominado β que es común a los pentones de todos los serotipos de *Mastadenovirus*. La fibra posee un determinante específico de tipo (γ) que induce anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, técnica utilizada para clasificar los adenovirus en especies.

El genoma viral es un DNA de doble cadena, lineal, no segmentado, de 30.000 a 45.500 pb y un peso molecular que oscila entre los 20 y 30 megaDaltons, dependiendo de la especie. Además, presenta secuencias nucleotídicas terminales que son repeticiones invertidas y, en el extremo 5' de cada cadena se encuentra una proteína de 55 kDa unida covalentemente que actúa de cebador para el comienzo de la replicación viral.

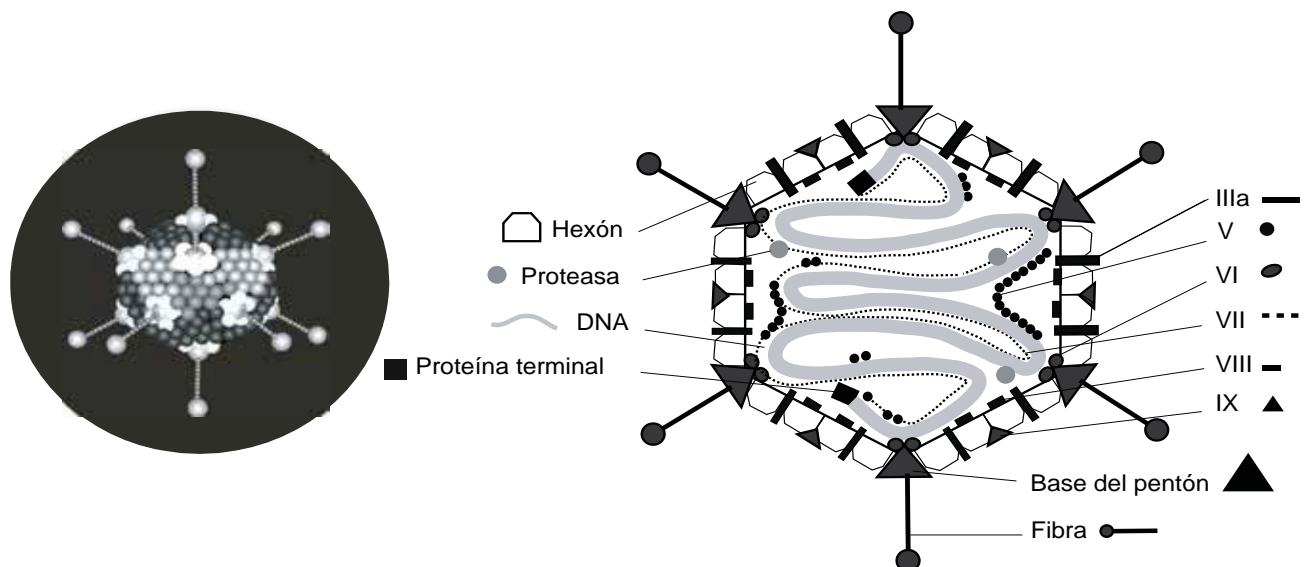


Figura 16.1. Esquema de la partícula de adenovirus. Tomado y modificado de Shenk y Horwitz, 2001.

Proteínas de la cápside		
Nombre	Localización	Funciones conocidas
II	Hexón monómero	Estructural
III	Pentón base	Penetración
IIIa	Asociada a la base del pentón	Penetración
IV	Fibra	Unión a receptor; hemaglutinación
V	Core	Histona-símil; empaquetamiento?
VI	Hexón polipéptido menor	Estabilización/ensamble de la partícula?
VII	Core	Histona-símil
VIII	Hexón polipéptido menor	Estabilización/ensamble de la partícula?
IX	Hexón polipéptido menor	Estabilización/ensamble de la partícula?
TP	Genoma - Proteína terminal	Replicación genómica

Tabla 16.1. Proteínas de la cápside y core, localización y funciones.

Especie y subespecie	Serotipos	Potencial oncogénico en roedores	% G+C	Hemaglutinación		Longitud fibra (nm)	Enfermedades/ infecciones
				Rhesus	Rata		
A	12, 18, 31	Alto	48-49	-	+ / -	28-31	Gastrointestinal
B1	3, 7, 16, 21, 50	Débil	50-52	+	-	9-11	Respiratoria Miocarditis
B2	11, 14, 34, 35	Débil	50-52	+	-	9-11	Cistitis hemorrágica Enfermedad diseminada Persistencia en riñón
C	1, 2, 5, 6	Ninguno	57-59	-	+ / -	23-31	Respiratoria Conjuntivitis Enfermedad diseminada Persistencia en tejido linfoide
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	Ninguno	58	+ / -	+	12-13	Queratoconjuntivitis
E	4	Ninguno	57-61	-	+ / -	17	Respiratoria/ conjuntivitis
F	40, 41	Ninguno	57-59	-	+ / -	~ 29	Gastroenteritis
G	52	NR	NR	NR	NR	NR	Gastroenteritis

Tabla 16.2. Propiedades de los 52 serotipos de adenovirus humanos y patología asociada.

El DNA está asociado a los polipéptidos V y VII formando un *core* organizado en forma de 12 subunidades esféricas, cada una de las cuales está en contacto con un vértice de la cubierta icosaédrica.

1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS ADENOVIRUS HUMANOS

Hasta el momento, se han reconocido 52 serotipos diferentes de adenovirus humanos. La designación de serotipo se basa en: a) neutralización de la infectividad, la cual es tipo-específica y está dirigida contra los epítomos de la proteína del hexón y, b) inhibición de hemaglutinación, la cual está dirigida a epítomos de la proteína de la fibra.

Los diversos serotipos están agrupados en 7 especies: A, B, C, D, E, F y G, según sus características inmunológicas, biológicas y bioquímicas, su potencial oncogénico en roedores, la capacidad para aglutinar eritrocitos de diversas especies, las longitudes de sus fibras, la homología y las relaciones G+C de sus DNAs y los ta-

maños de dos polipéptidos internos (Tabla 16.2). La homología de DNA entre serotipos de diferentes especies oscila entre el 4-23%, mientras que la homología del DNA entre miembros de una misma especie es superior a 48%. Dentro de distintas especies, existen reacciones cruzadas de *bajo-nivel*, pero en patrones reproducibles. El análisis del DNA con enzimas de restricción indica que existen 2 *clusters* de homología en la especie B denominadas subespecies B:1 y B:2. Este *clustering* podría representar un progenitor común de los miembros del grupo. Además, se han documentado recombinantes intertípicas 3/16 que contienen el gen del hexón de un serotipo (3) y el gen de la fibra de otro serotipo (16).

La gran variabilidad genética en los adenovirus humanos se expresa claramente en la existencia de los distintos serotipos. Más aún, se ha demostrado que hay cepas variantes de adenovirus con alteraciones a nivel del DNA genómico, no reflejadas en cambios de las propiedades serológicas. Se utiliza el término **genotipo o variante genómica** para definir a una entidad viral distinta dentro

de un serotipo determinado, que puede identificarse por análisis del DNA con endonucleasas de restricción. Recientemente, se han identificado nuevos tipos de adenovirus (53, 54 y 55) utilizando sólo métodos genómicos y bioinformáticos. La incorporación de estos nuevos tipos en la clasificación existente no ha sido aún confirmada (al 2010) ya que no se han utilizado los métodos convencionales de neutralización y hemaglutinación.

Aproximadamente, la mitad de los serotipos de adenovirus humanos producen enfermedad manifiesta en el hombre. Los diferentes serotipos se asocian con distintas manifestaciones clínicas (Tabla 16.2).

1.4 REPLICACIÓN

La unión inicial del adenovirus humano a las células hospedadoras está mediada por la fibra del virus que se une al receptor denominado *CAR* (*Coxsackie-Adenovirus Receptor*). Se ha propuesto otro receptor para los adenovirus de la especie B (sBAR) y el ácido siálico para algunos serotipos de la especie D (8, 19 y 37). La internalización del virión se logra cuando la proteína de la base del pentón se pone en contacto con las integrinas α_5 . El virus se decapsida y el transporte del genoma al núcleo es mediado por microtúbulos. Las proteínas virales se expresan y la replicación del DNA viral, que se produce en el núcleo, comienza 12 h. después de la infección. En el núcleo tienen lugar la replicación del DNA, la transcripción, el ensamblaje y la maduración del virión (Figura 16.2). La traducción de los mensajeros virales ocurre en el citoplasma. Se postula que el egreso de adenovirus se produce vía lisis de la célula hospedadora, aunque este mecanismo ha sido discutido.

Fases. El ciclo de replicación se divide en 2 fases: una fase temprana que precede a la replicación del DNA viral y una fase tardía que se caracteriza por la expresión de las proteínas estructurales de la cápside. Se han identificado 6 regiones diferentes de transcripción temprana que se localizan en ambas cadenas complementarias: E1A, E1B, E2A, E2 B, E3 y E4. La primera proteína que se expresa es el transactivador E1A que induce la transcripción de algunos genes celulares y virales inhibiendo otros, para permitir la replicación del DNA viral. El DNA viral codifica un total de 8

unidades de transcripción diferentes. La mayoría de las unidades de transcripción generan un grupo complejo de RNAm con diferentes *splicing* que codifican múltiples proteínas.

La duplicación del DNA utiliza a la proteína de 55kD unida covalentemente al extremo 5' como iniciador y la duplicación del DNA de ambas cadenas se realiza en forma semiconservativa. Los RNAm de las 5 regiones de transcripción tardía L1, L2, L3, L4 y L5 codifican todas las proteínas estructurales del virus, con excepción de los polipéptidos IX y IVa2 (Figura 16.3). Los polipéptidos estructurales del virus son transportados al núcleo donde comienza el ensamblaje. Las partículas virales recién formadas constituyen agregados cristalinos en forma de cuerpos de inclusión intranucleares. El ciclo de replicación dura alrededor de 30 h. y produce 100.000 partículas nuevas por célula.

1.5 RESISTENCIA A AGENTES FÍSICOQUÍMICOS

Por ser desnudos, los adenovirus son resistentes a la inactivación a temperatura ambiente y a la acción de solventes orgánicos (éter, cloroformo, etc.), pero son susceptibles a la acción del hipoclorito de sodio al 1%; glutaraldehído al 2% y al dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,25%. Además, son sensibles a temperaturas mayores de 56 °C y pierden su infectividad con la luz UV. Los adenovirus son estables a bajo pH y resistentes a las secreciones gástricas y biliares, lo cual les permite penetrar por vía digestiva y replicar y alcanzar altos títulos en el intestino.

Su resistencia a agentes químicos y físicos les permite sobrevivir por períodos prolongados fuera del hospedador. Los virus en cultivos celulares pueden mantener su infectividad por semanas cuando son almacenados a 4 °C, por meses a -20 °C y por años a -70 °C o en nitrógeno líquido. Además, el virus puede permanecer viable por 8-12 semanas en superficies ambientales en condiciones de baja humedad y temperaturas de 25-37 °C, lo que favorece su transmisión nosocomial.

1.6 MODOS DE TRANSMISIÓN

Las infecciones por adenovirus pueden transmitirse por vía respiratoria por medio de gotas de Flügge, y en menor medida por gotas mayores; por autoinoculación por manos contaminadas; por ruta

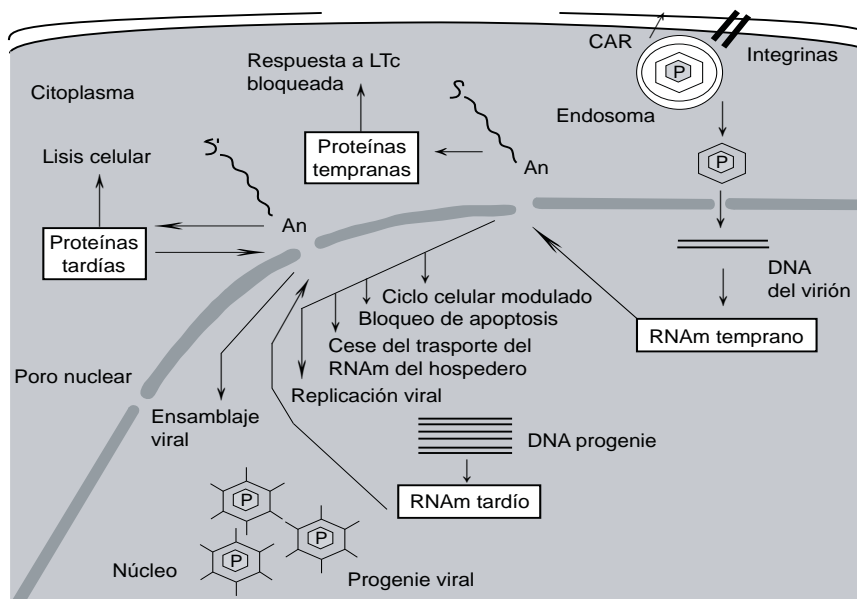


Figura 16.2. Esquema del ciclo de replicación de adenovirus. Tomado de Shenk y Horwitz, 2001.

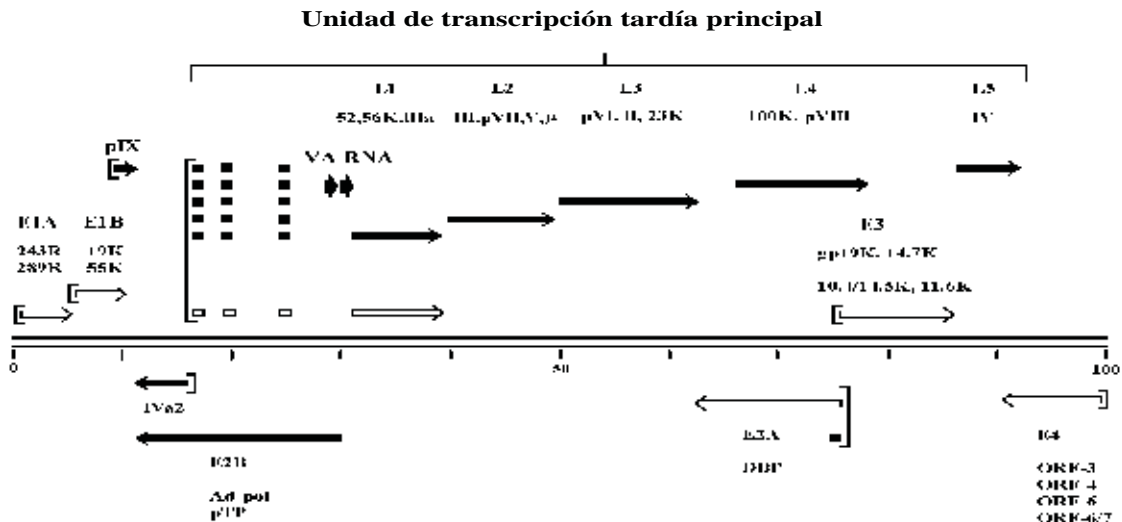


Figura 16.3. Representación esquemática del proceso de expresión de genes. Mapa de transcripción de Adenovirus 2. (E: RNAm tempranos. L: RNAm tardíos). Tomado de *Fields*, 2001.

fecal-oral; por vía ocular y por agua de natatorios. También pueden transmitirse por fomites como pañuelos, mascarillas de oxígeno, nebulizadores, instrumentos oftalmológicos, utensilios de cocina u otro material contaminado con secreciones respiratorias, oculares o materia fecal de una persona infectada.

En los adenovirus respiratorios (serotipos epidémicos 4 y 7), es importante la diseminación respiratoria, por contacto y aerosoles. Los serotipos responsables de infecciones oculares (8, 9, 11 y 37) se propagan por contacto, manos contaminadas o instrumentos oftalmológicos, así como por agua de natatorios. Los serotipos entéricos 40 y 41 se propagan por la vía fecal-oral. Esto es posible dada la resistencia del virus al pH ácido del estómago, a la bilis y a proteasas pancreáticas y a su estabilidad por varios días fuera del hospedero.

2. CUADROS CLÍNICOS

Los adenovirus han sido aislados prácticamente de todos los órganos del ser humano y se los ha asociado con numerosos y diferentes síndromes clínicos. Las infecciones por estos virus son frecuentes durante la infancia y aunque generalmente son autolimitadas y asintomáticas, pueden causar severa morbilidad y alta mortalidad en todos los grupos etarios. Luego de la primoinfección existe inducción de la inmunidad celular y humoral serotipo específica. La infección y replicación de los adenovirus ocurre en diferentes tipos de células y tejidos tales como el tracto respiratorio, conjuntiva, tracto gastrointestinal, tracto urinario, miocardio e hígado. La afinidad diferencial que presentan las fibras de los diferentes tipos de adenovirus por distintos componentes de la membrana celular sería uno de los factores responsables de la marcada diferencia de tropismos observada entre los miembros de las 7 subespecies. Los distintos serotipos causan diferentes manifestaciones clínicas (Tabla 16.4).

Luego de la primoinfección, los adenovirus pueden eliminarse en materia fecal por largos períodos (meses y años), especialmente los de la especie C. El mecanismo de la infección persistente que permite esta eliminación prolongada no está totalmente dilucidado. La detección de genoma del adenovirus serotipo 2 en amígdalas de niños sanos por hibridación permite demostrar la infección persistente en ganglios linfáticos. Los adenovirus de la subespecie B:2 (serotipos 11, 34, 35) se han aislado generalmente de orina de pacientes inmunosuprimidos. Estos serotipos tienen tropismo por el riñón y tracto urinario y son eliminados por orina en estadios de inmunosupresión, sugiriendo reactivación de virus latente.

2.1 INFECCIONES RESPIRATORIAS

La mayoría de las infecciones respiratorias ocurren temprano en la niñez y son autolimitadas y leves. Sin embargo, los adenovirus son responsables del 5% de las infecciones respiratorias en niños menores a 4 años y del 10% de las infecciones respiratorias que requieren hospitalización en este grupo etáreo. Los síntomas de la infección de las vías respiratorias altas son faringitis con amigdalitis exudativa y, frecuentemente conjuntivitis, congestión nasal y tos. Los pacientes presentan, por lo general, fiebre, mialgia y cefalea.

Los adenovirus también pueden afectar el tracto respiratorio inferior y producir laringotraqueobronquitis, bronquiolitis, neumonías y neumonías necrotizantes. Éstas últimas pueden ser graves especialmente en niños menores de dos años en quienes pueden ser fatales o dejar severas secuelas pulmonares que llevan a la insuficiencia respiratoria crónica.

Ciertos serotipos de adenovirus pueden causar un síndrome *tipo pertussis* que no puede ser clínicamente diferenciado del de etiología bacteriana.

Los adenovirus causan infecciones respiratorias de menor importancia en adultos. Sin embargo, han ocasionado brotes de enfermedad respiratoria aguda entre reclutas militares con tasa de hospitalización cercana al 50%.

2.2 INFECCIONES OCULARES

Las infecciones oculares por adenovirus son comunes. La manifestación más frecuente es la conjuntivitis folicular aguda. También pueden producir: a) fiebre faringoconjuntival, con síntomas respiratorios altos; b) conjuntivitis folicular aguda, que puede aparecer como entidad clínica independiente y que puede presentar compromiso de la córnea en 5 a 10% de los pacientes; c) queratoconjuntivitis epidémica, una infección más severa, que puede durar de 4 a 6 semanas.

2.3 INFECCIONES GASTROINTESTINALES

Los adenovirus se asocian a un 3-15% de las gastroenteritis virales infantiles y son los segundos agentes más importantes causales de diarrea infantil en los países de occidente, después de los rotavirus. La diarrea es usualmente acuosa, no sanguinolenta y sin leucocitos y puede durar un promedio de 10 días. Puede asociarse con fiebre, vómitos y dolor abdominal. Los adenovirus entéricos incluye a los serotipos 40 y 41 que son los más prevalentes en gastroenteritis.

2.4 INFECCIONES EN PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS

Los individuos con alteraciones en la inmunidad celular tienen mayor riesgo de desarrollar infecciones por adenovirus. Las manifestaciones pueden incluir fiebre, enfermedad respiratoria, gastroenteritis, cistitis hemorrágica, nefritis, hepatitis, conjuntivitis, meningoencefalitis, pancreatitis, miocarditis y enfermedad diseminada severa (Tabla 16.4). Se han observado infecciones severas y enfermedad diseminada fatal en neonatos, pacientes con inmunodeficiencias congénitas y pacientes trasplantados.

Debido al incremento de deficiencias inmunológicas por aumento en el número de trasplantes de órganos, tratamientos anti-neoplásicos y a la infección por HIV, la prevalencia de infecciones por adenovirus también ha aumentado. La frecuencia de infecciones por adenovirus varía desde un 4 a un 60%, según diferentes poblaciones de pacientes inmunocomprometidos estudiadas en EE.UU. La mortalidad asociada varía de un 10 a un 60%.

En niños, la enfermedad por adenovirus se debe generalmente a primoinfección, por contagio de persona a persona, a partir del ambiente o de órganos trasplantados. Por el contrario, en adultos inmunocomprometidos, la principal vía es la reactivación.

En pacientes con trasplante de médula ósea se ha observado un aumento significativo en la incidencia de infección por adenovirus del 5 al 31%. Este incremento podría deberse a factores tales como regímenes de acondicionamiento más agresivos, aumento de los

trasplantes en general, una mayor alerta de este patógeno y el uso de métodos de diagnóstico más sensibles y rápidos. La infección por adenovirus puede semejar enfermedades causadas por otros agentes o enfermedades con manifestaciones clínicas similares. Por ejemplo, la infección por adenovirus puede asemejarse a la enfermedad injerto contra hospedador en pacientes trasplantados. El diagnóstico correcto, rápido y temprano es fundamental para el manejo del paciente ya que con la infección viral se recomienda la disminución o discontinuación del tratamiento inmunosupresor mientras que en la enfermedad injerto con hospedador, éste deberá incrementarse.

Muchos de los serotipos aislados de pacientes con SIDA, en especial los del subgrupo D, pocas veces son aislados en pacientes inmunocompetentes o de pacientes con otro tipo de inmunodeficiencias.

3. EPIDEMIOLOGÍA

Los adenovirus se encuentran distribuidos mundialmente y las infecciones ocurren durante todo el año, con menor número de casos en verano. La incidencia anual es mayor en niños que en adultos.

Las infecciones por adenovirus pueden ser epidémicas, endémicas o esporádicas. Los serotipos más frecuentes son de la especie C (1, 2 y 5), de la subespecie B:1 (3 y 7), y de la especie F (40 y 41). En pacientes inmunocomprometidos las especies más frecuentes son la C, B:2 y A.

Enfermedades	Serotipos asociados		Hospedador frecuente	Muestras clínicas
	Frecuente	Infrecuente		
Infección respiratoria alta	1-3, 5, 7	4,6,11,14,15,18,21,29,31	Infantes, niños	ANF, HNF, HF
Infección respiratoria baja	3,4,7,21	1,2,5,7,8,11,35	Infantes, niños, IC	ANF, HNF, LBA, Tejido pulmón
Síndrome tipo pertussis	5	1,2,3,12,19	Niños	HF
Enfermedad respiratoria aguda	4,7	2,3,5,8,11,14,21,35	Reclutas militares	HF, LBA, Tejido pulmón
Conjuntivitis aguda	1-4,7	6,9,10,11,15-17,19,20,22,37	Niños	Hisopado conjuntival
Conjuntivitis hemorrágica aguda	11	2-8,14,15,19,37	Niños	Hisopado conjuntival
Fiebre faringoconjuntival	3,4,7	1,2,5,6,8,11-17,19-21, 29,37	Niños	ANF, HNF, HF, Hisopado conjuntival
Queratoconjuntivitis epidémica	8,9,37	2,3,4,5,7,10,11,13-17,19,21, 23,29	Cualquier edad	Hisopado conjuntival
Gastroenteritis	40,41	1,2,3,5,7,12-18,21,25,26,29,31	Niños, IC	Materia fecal
Cistitis hemorrágica	11	7,21,34,35	Niños, IC	Orina
Hepatitis	1-3, 5,7	4,31	Infantes, niños, IC	Tejido hígado, sangre
Miocarditis	7,21		Niños, adultos	Tejido miocardio, sangre
Meningoencefalitis	7	1-3, 5,6,11,12,32	Niños, IC	Tejido cerebro, LCR
Enfermedad venérea	2,37	1,5,7,11,18,19,31	Adolescentes, adultos	Hisopado de lesión
Enfermedad diseminada	1,2,5,11,34,35	3,6,7,14, 21,29-31,37-39,43,45	IC, neonatos	Sangre, LBA, orina, tejido involucrado

Tabla 16.4. Enfermedades asociadas a adenovirus, serotipos, hospedadores y muestras clínicas para el diagnóstico. IC: inmunocomprometidos; ANF: aspirado nasofaríngeo; HNF: hisopado nasofaríngeo; HF: hisopado faríngeo; LCR: líquido cefalorraquídeo; LBA: lavado broncoalveolar.



De los adenovirus que producen infecciones respiratorias, los serotipos 1, 2, 5 y 6 son en su mayoría endémicos, mientras que los serotipos 3, 4, 7, 14 y 21 se relacionan con brotes epidémicos en comunidades cerradas de internados, guarderías y población militar.

El patrón epidemiológico de la infección respiratoria por adenovirus en las poblaciones civiles difiere de la población militar. Desde 1954, los serotipos 4 y 7 estuvieron relacionados con epidemias de enfermedad respiratoria aguda, que afectaba a la población militar de EE.UU. La prevención de estas infecciones se instrumentó en 1980 mediante una vacuna por vía oral que se autorizó sólo para la población militar. En 1997, al interrumpirse la administración de esta vacuna comenzaron a registrarse nuevos brotes de infección respiratoria.

Los serotipos 8, 19 y 37 son causantes de infección ocular y son a menudo endémicos, detectándose en países en desarrollo con condiciones de higiene insuficientes. Los serotipos entéricos 40 y 41 se detectan en forma endémica en todo el mundo.

3.1 INFECCIONES RESPIRATORIAS EN NIÑOS DE ARGENTINA

Infección Respiratoria Baja. En Argentina, las infecciones respiratorias agudas bajas son la tercera causa más frecuente de muerte en menores de un año, después de la patología perinatal y congénita, lo cual representa el 10% de las muertes en este grupo etáreo. Los adenovirus constituyen la tercera causa más común de infección respiratoria del tracto inferior en menores de 5 años, luego del virus sincicial respiratorio y el metapneumovirus.

Estudios realizados en aspirados nasofaríngeos obtenidos de niños internados en hospitales generales de Argentina con infección respiratoria baja mostraron una prevalencia del 3 al 7%. En hospitales especializados esta prevalencia fue mayor (11%) y, durante brotes nosocomiales, ascendió a un 34%. En estos estudios, la detección de adenovirus se realizó por métodos rápidos (inmunofluorescencia). Dado que la sensibilidad de esta técnica puede ser baja para este virus, la prevalencia para adenovirus en Argentina podría estar subestimada.

A diferencia del virus sincicial respiratorio, que mostró claros picos durante los meses más fríos del año, los adenovirus se detectaron en menor número, pero a lo largo de todo el año con pequeños brotes al final del invierno y durante la primavera.

Durante los primeros dos años de vida, la incidencia de adenovirus fue del 6% en menores de 5 meses; del 32%, entre 6-11 meses y del 21% entre 12-24 meses de vida. Esta observación es opuesta a lo que ocurre con el virus sincicial respiratorio donde el 43% de las infecciones ocurrieron en menores de 5 meses. Los diagnósticos clínicos en niños fueron: laringotraqueobronquitis, bronquitis, bronquiolitis o neumonía.

Los estudios genómicos con enzimas de restricción realizados en adenovirus aislados en niños de Argentina mostraron que la mayoría pertenecieron a la especie C y B, pero también se detectó la especie E. Dentro de las cepas con serotipo 7, se identificó un nuevo genotipo que se denominó 7h, y se relacionó con elevada mortalidad o con recuperación con graves secuelas pulmonares, sugiriendo una mayor virulencia de esta cepa.

La mortalidad asociada a la enfermedad por adenovirus, oscila entre el 14 y el 40% (durante brotes nosocomiales) para el serotipo 7, especialmente el genotipo 7h. Es de destacar que en estos estudios la mayoría de los casos fatales ocurrieron en niños eutróficos, sin enfermedad de base. Alrededor de un 14% de los pacientes presentaron secuelas graves que desencadenaron en insuficiencia respiratoria crónica.

Además del compromiso respiratorio, se han reportado manifestaciones extrapulmonares (afectación del SNC, tracto gastrointestinal, hígado, bazo y riñones).

Infección respiratoria alta. Un estudio recientemente realizado en Argentina por PCR en hisopados nasales de niños con cuadros respiratorios del tracto superior demostró una prevalencia de adenovirus de 9%. La especie predominante fue C, seguida de las especies B, E, F y la presencia de coinfecciones con más de una especie.

4. PATOGÉNESIS

Los estudios sobre la patogenia de adenovirus son escasos y limitados debido a la falta de modelos animales capaces de reproducir adecuadamente la enfermedad humana. A pesar de los numerosos avances producidos desde 1953 en el conocimiento de la estructura del virión del adenovirus, las características de la replicación y la identificación funcional de los genes, poco se sabe sobre el mecanismo molecular por el cual el adenovirus produce tan diverso espectro de cuadros clínicos. Además, aún no se ha podido determinar la razón por la cual los distintos serotipos inducen diferencias tan significativas en la gravedad y tipo de enfermedades.

Los adenovirus se caracterizan por su capacidad de suprimir la expresión del genoma de la célula hospedadora y por la abundante síntesis de proteínas virales estructurales que tiene lugar en la misma. Esto resulta en una acumulación de proteínas virales en forma de cuerpos de inclusión intranucleares que interfieren con el funcionamiento celular normal.

Si bien la mayoría de los autores sostiene que los adenovirus causan una infección lítica, existen controversias al respecto. Los primeros estudios de patogénesis realizados en cultivos celulares condujeron a la hipótesis de que la muerte celular se debía a la acumulación intranuclear de proteínas estructurales virales no ensambladas, particularmente la fibra, interfiriendo con el funcionamiento celular. La proteína de la base del pentón se asocia con una actividad tóxica responsable del desprendimiento de las monocapas celulares en cultivo.

Algunas proteínas codificadas por la región E3 del genoma viral tienen una estructura semejante a la de ciertas proteínas de la membrana celular. Entre ellas, la glicoproteína 19 kD es capaz de unirse a la cadena pesada del HLA Clase I impidiendo su glicosilación y evitando así su reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos.

Estudios realizados en *Sigmodon hispidus* (cotton rats) demostraron que la replicación de adenovirus serotipo 5 en pulmón producía una neumonía similar a la inducida en humanos. Las células epiteliales respiratorias infectadas por los serotipos 2 y 5 no se lisaban, sino que estaban severamente dañadas y probablemente morían porque los genes tempranos del adenovirus inhibían la síntesis de DNA y proteínas celulares.

Los estudios en *Sigmodon hispidus* sobre la patogénesis de la neumonía por adenovirus sugieren que la primera etapa de la enfermedad es una respuesta a TNF α , que induce una respuesta inflamatoria con polimorfonucleares y que la fase tardía de la enfermedad es el resultado de una respuesta celular, ya que fue claramente relacionada con el grado de expresión de HLA clase I presente en la superficie celular.

Dado que los esteroides reducen la inflamación y las reacciones inmunológicas, se estudió la administración de hidrocortisona en *cotton rats* y se observó que se eliminaron las dos fases de la respuesta inflamatoria.

Para lograr una comprensión más completa de la patología por Adenovirus en el humano se deberá continuar con estudios de este tipo, incluso incorporando nuevos modelos animales que asemejen más precisamente la enfermedad en humanos.

4.1 LATENCIA Y PERSISTENCIA

Los adenovirus pueden producir infecciones persistentes, especialmente los de las especies A, B:2 y C. Los adenovirus, especialmente los de la especie C, pueden ser eliminados por materia fecal en forma asintomática por períodos que pueden superar los 2 años.

Los adenovirus pueden permanecer latentes en nódulos linfáticos. Es así que los primeros experimentos de Rowe y col., en 1953, permitieron aislar los serotipos 1, 2, 5 y 6 de la especie C a partir de piezas de adenectomía que sufrieron degeneración espontánea al ser colocadas en cultivo de tejido. No está claro si los adenovirus pueden permanecer latentes en linfocitos periféricos. Los escasos estudios realizados sobre este hecho son controvertidos. En un estudio utilizando hibridación *in situ*, se detectó DNA



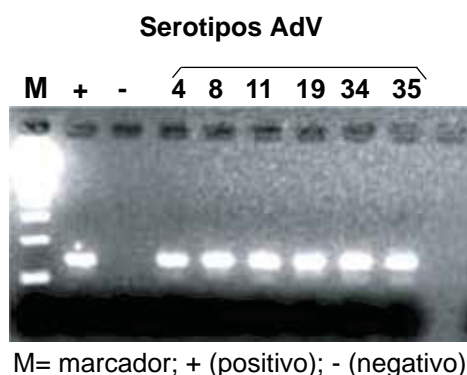


Figura 16.4.A. PCR genérica para distintos serotipos de adenovirus. Corrida de productos de amplificación de adenovirus (139 pb) en gel de agarosa al 10% teñido con bromuro de etidio.

de adenovirus en linfocitos periféricos de adultos. Por el contrario, otros investigadores, utilizando la técnica de PCR, no encontraron evidencia de persistencia de adenovirus en linfocitos periféricos o fue en muy baja proporción. Al presente, los mecanismos moleculares y los genes necesarios para establecer latencia no están completamente dilucidados.

4.2 ONCOGENICIDAD

Los adenovirus humanos estudiados son capaces de transformar células de roedores en cultivo a un fenotipo oncogénico. Sin embargo, sólo algunos serotipos pueden inducir directamente la formación de tumores en ratas y hamsters. La especie A es altamente oncogénico en hamsters recién nacidos mientras que la especie B presenta baja oncogenicidad.

A pesar de los intensos esfuerzos para demostrar si el adenovirus juega un rol en las neoplasias humanas, no existe al momento evidencia sobre este proceso.

5. RESPUESTA INMUNE

El adenovirus destina gran parte de su genoma a sintetizar productos que modulan las respuestas inmunes del hospedador. El virus codifica tres productos de genes que facilitarían la persistencia, antagonizando la respuesta antiviral del hospedador. Es así que algunas proteínas como la E1 19 K, E3 14.7K y E3 10.4/15.4 juegan un rol fundamental para permitir la infección persistente en células linfoides.

Todas estas proteínas protegen a la célula infectada de la acción citolítica del TNF por interferencia de la unión del TNF a su receptor. El TNF posee dos tipos de efecto antiviral: inhibir la replicación de Adenovirus e inducir la muerte de células infectadas.

Una cuarta proteína, la E3 19K inhibe la presentación antigénica mediante la unión al CMH clase I impidiendo su glicosilación y así disminuyendo su transporte a la superficie. Esto evita el reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos a las células infectadas, disminuyendo así la respuesta inflamatoria de la fase tardía. Este mecanismo se ha demostrado en adenovirus del subgrupo C que producen infección latente.

Otro mecanismo de evasión a la respuesta inmune está a cargo de los *virus-associated* (VA) RNAs que inhiben la respuesta celular a IFN α y β . El INF es uno de los principales mecanismos de defensa antiviral a nivel celular ya que inhibe la replicación viral por inducción de una proteína quinasa, *PKR*, que es activada por el RNA de doble cadena producido en numerosas infecciones virales. Los VA RNAs se unen a la *PKR* e inhiben su activación.

Apoptosis: El gen de expresión temprana E1A codifica para dos proteínas que activan la transcripción. La expresión de E1A induce la apoptosis dependiente de p53. La proteína E1b-19K del adenovi-

rus inhibe la apoptosis inducida por E1A, mediante un mecanismo indirecto, que se postula es por interferencia de la función represora.

Todos estos mecanismos le permiten a los adenovirus evadir la respuesta inmune del hospedador debido a la habilidad del virus de persistir y replicar virus infeccioso a niveles bajos durante largos períodos y eliminarlos en forma intermitente en heces y secreciones respiratorias.

6. DIAGNÓSTICO

Los síntomas y signos causados por adenovirus no pueden diferenciarse, desde el punto de vista clínico, de otras entidades virales o bacterianas. Por esta razón, el diagnóstico virológico es imprescindible para el diagnóstico etiológico. Además, conocer la etiología permite separar a los pacientes con infección respiratoria en cohortes de acuerdo al virus detectado y extremar las normas de bioseguridad a fin de evitar transmisiones nosocomiales. Asimismo, para llevar a cabo estudios epidemiológicos es necesario detectar el virus y caracterizarlo.

Los adenovirus pueden ser aislados de diversas muestras clínicas como materia fecal, hisopados faríngeos, aspirados nasofaríngeos, hisopados oculares, orina, líquido cefalorraquídeo, sangre, lavado broncoalveolar y diversos tejidos obtenidos por biopsia. Los adenovirus son termoestables y no requieren necesariamente ser refrigerados durante el transporte de las muestras aunque se sugiere conservación a 4 °C y envío rápido al laboratorio. Los hisopados y biopsias deben ser trasladados en medio de transporte para virus. Las muestras preferentemente deben obtenerse dentro de la semana del comienzo de síntomas.

El diagnóstico virológico puede realizarse por métodos directos (detección del virus como agente infeccioso, como partícula viral, como antígenos o como genomas) o por métodos indirectos o serológicos.

6.1 MÉTODOS DIRECTOS

6.1.1 Aislamiento en cultivo celular

El aislamiento del virus es el método *gold standard*. Los cultivos primarios, las líneas diploides y las líneas continuas son permisivas a la infección por adenovirus. Todos los adenovirus, excepto los serotipos 40 y 41, crecen bien en células epiteliales humanas y producen ACP. Las líneas más utilizadas son A-549 (carcinoma de pulmón humano), HEP-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana), KB (carcinoma epidermoide de boca) y Graham 293 (línea de riñón humano transformada con adenovirus 5). Éstas últimas son particularmente útiles para el cultivo de los adenovirus entéricos 40 y 41.

La ACP se caracteriza por un redondeamiento y agrupamiento de las células en racimos y formación de cuerpos de inclusión intranucleares. El pH del medio cae en forma notoria. La rapidez con la que aparece la ACP depende de la concentración de

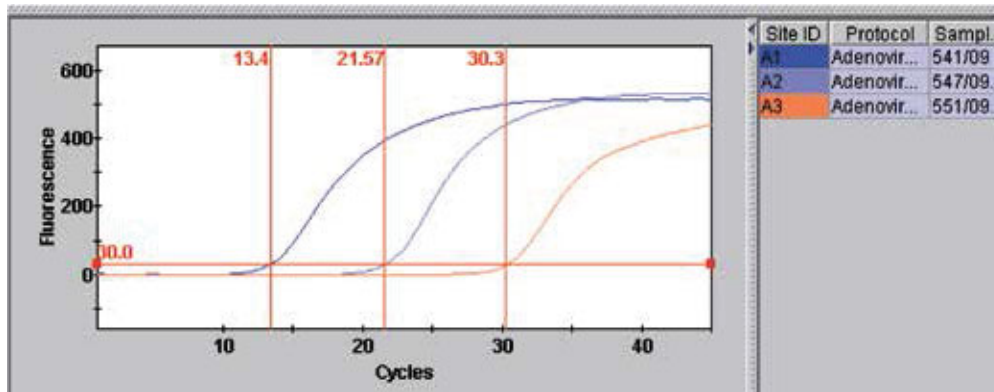


Figura 16.4.B. PCR en Tiempo Real para la detección de adenovirus en tres muestras respiratorias. La presencia de las curvas en azul indica presencia de virus. A menor Ct (13.4) mayor es la concentración de virus en la muestra.

viriones en la muestra, la sensibilidad de la célula hospedadora y el serotipo involucrado. En general, la ACP aparece a los 3-4 días, aunque en algunas muestras puede demorar hasta 28 días. La presencia de ACP debe confirmarse por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales.

La sensibilidad del cultivo puede ser subóptima en algunas muestras clínicas como sangre. Otras desventajas del aislamiento en cultivo son su costo, el riesgo de contaminaciones fúngicas y bacterianas; el tiempo, la toxicidad de la muestra y, además, requiere la presencia de virus viable en la muestra clínica.

Tipificación. Luego del aislamiento de una cepa de adenovirus, puede identificarse el serotipo utilizando métodos de inhibición de la hemaglutinación o neutralización con antisueros hiperinmunes tipo-específicos producidos en animales. Existen antisueros contra los 51 serotipos actuales. Sin embargo, muchas veces se obtienen resultados ambiguos debido a las reacciones cruzadas entre los serotipos llamados *intermedios*.

En la actualidad se está realizando la serotipificación por métodos moleculares (PCR seguido de secuenciación). El gen hexón posee 7 regiones hipervariables, tres de las cuales son serotipo específicas (A1, A3 y B1). Por ello, es posible la tipificación de los adenovirus por secuenciación de la región serotipo específica, especialmente la de la región variable B1 del *loop 2*. Estas regiones se amplifican por PCR, los amplicones son clonados, secuenciados y comparados con los serotipos patrones.

Otro método de tipificación rápido y eficiente es el análisis por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que consiste en el análisis del DNA viral con enzimas de restricción lo que permite caracterizar los distintos tipos genómicos dentro de un serotipo dado. Los patrones de restricción con distintas endonucleasas de las cepas prototipo y de las variantes genómicas de mayor circulación se encuentran disponibles. Este método constituye una herramienta útil para estudios de epidemiología molecular.

6.1.2 Detección directa de antígenos virales por métodos de inmunomarcación

Los métodos de detección de antígeno son ampliamente utilizados para el diagnóstico de infecciones respiratorias y gastrointestinales ya que los resultados son rápidos. En muestras respiratorias y oculares puede utilizarse la inmunofluorescencia mientras que los métodos de inmunoensayo pueden aplicarse para detectar tanto proteínas asociadas a células como antígenos proteicos libres. En muestras de materia fecal, los antígenos pueden detectarse por inmunoensayo o aglutinación con látex. Aunque ya en desuso, también puede utilizarse la microscopía electrónica.

Inmunofluorescencia (IF). En este método se utilizan actualmente anticuerpos monoclonales contra la proteína del hexón. Permite la rápida detección del antígeno viral en la muestra clínica la

cual debe contener células. Resulta rápido y muy útil en el caso de muestras respiratorias o biopsias. Se obtiene una mejor sensibilidad cuando las muestras fueron obtenidas durante los primeros 4-5 días del comienzo de la enfermedad. No puede aplicarse en muestras de sangre. Las muestras positivas se caracterizan por presentar inclusiones intranucleares o una tinción citoplasmática granular. La sensibilidad para la detección de adenovirus por IF comparada con el cultivo varía del 40-60%. En niños con infección respiratoria la sensibilidad de la IF es más alta que en adultos debido a una mayor carga viral en secreciones y a un período de eliminación de virus más prolongado.

Enzimo inmunoensayos (ELISA): Resultan de gran utilidad para la detección de adenovirus entéricos (40 y 41) en los casos de gastroenteritis en muestras de materia fecal. Existen ELISA genéricos o específicos para serotipos 40 y 41 siendo su sensibilidad mayor al 90%. Sin embargo, en otras muestras (respiratorias, oculares y orina) la sensibilidad es menor (65-75%).

Histopatología: La infección por adenovirus puede detectarse histológicamente en biopsias o autopsias de tejidos teñidas con hematoxilina y eosina. Los tejidos infectados se caracterizan por la presencia de *smudge cells* (células con el núcleo cubierto de material basofílico oscuro que rodean la membrana nuclear) y por células con inclusiones intranucleares basofílicas o eosinofílicas, rodeadas de un halo claro. Este estudio puede complementarse con la detección de antígenos por inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales.

6.1.3 Detección de partículas virales

Por microscopía electrónica. La morfología característica de los adenovirus permite su identificación rápida siempre que exista un elevado número de partículas (10^6 - 10^8 partículas/ml). Este método es de utilidad para el diagnóstico de gastroenteritis aguda por adenovirus donde altas concentraciones de virus son excretadas en heces. Sin embargo, requiere de personal entrenado y un microscopio electrónico. Dado que la sensibilidad es baja no puede utilizarse en otras muestras clínicas.

6.1.4 Detección del genoma viral

La detección de DNA de adenovirus puede realizarse con métodos moleculares sin o con amplificación. Estos últimos métodos son altamente sensibles, rápidos y sumamente útiles cuando un virus no-infectivo está presente en las muestras o cuando la carga viral es muy baja para detectarse por cultivo.

Hibridación. Es un método sin amplificación. La hibridación *in situ* es útil para estudios de patogénesis aunque se ha observado falta de sensibilidad para su uso en el diagnóstico clínico.

PCR. La amplificación del genoma viral mediante PCR permite aumentar la sensibilidad de detección. La PCR puede aplicar-

se a todas las muestras clínicas por ello la selección de las mismas se relaciona al cuadro clínico presente (**Tabla 16.4**). Históricamente, este método se utilizaba para estudiar los mecanismos moleculares y la caracterización de los genes. Pero hacia 1997, su utilización comenzó a aplicarse en el diagnóstico clínico dada su alta sensibilidad y rapidez. Existen PCR genéricas capaces de detectar todos los serotipos de adenovirus que son generalmente utilizadas para el diagnóstico virológico (Figura 16.4.A y 16.4.B) y PCR especie-específicas o serotipo-específicas útiles para la caracterización de los mismos.

PCR Convencional. Las PCR genéricas amplifican genes con regiones altamente conservadas como los del hexón, de la fibra o del VA RNA. Luego de la amplificación, la detección de los productos se realiza en geles teñidos con bromuro de etidio o por hibridación con sondas marcadas. Estos procesos pueden llevar 24-48 hs. La sensibilidad de la PCR generalmente supera al cultivo. Una de las mayores utilidades de la PCR es para el diagnóstico de enfermedad diseminada por adenovirus dado que la presencia del virus en sangre es difícilmente detectada por otros métodos.

Real Time PCR. La PCR en tiempo real es sumamente atractiva ya que permite cuantificar el virus y determinar así la carga viral. Además, los resultados pueden obtenerse en horas ya que la amplificación y detección de los productos se realiza de modo simultáneo. Pueden utilizarse tanto en forma cualitativa como cuantitativa. Las PCR en tiempo real genéricas, por lo general, utilizan más de un par de *primers* y varias sondas marcadas a fin de detectar todos los serotipos de adenovirus (Figura 16.4.B). Una de las mayores utilidades de la PCR en tiempo real es la determinación de la carga viral en sangre de pacientes trasplantados de médula ósea. Este método permite realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad y permite realizar pronóstico y seguimiento de la misma. En estos pacientes, generalmente se realiza un seguimiento de la carga viral en sangre a fin de realizar intervenciones terapéuticas. Este método está en pleno crecimiento en la actualidad.

6.2 MÉTODOS INDIRECTOS O SEROLÓGICOS

La infección aguda por adenovirus puede diagnosticarse por la presencia de IgM específica o por seroconversión. En infantes, las respuestas serológicas son más débiles que en niños o adultos. Los anticuerpos IgM se detectan sólo en el 20 a 50% de las infecciones. Además, puede haber resultados falsos negativos cuando hay una respuesta serológica pobre, como en los pacientes inmunocomprometidos. La detección de seroconversión es un método retrospectivo ya que requiere de sueros del período agudo y del período de convalecencia. Su utilidad radica en la determinación del estado inmune de un paciente o para estudios epidemiológicos.

Entre los métodos serológicos podemos mencionar: a) Las técnicas de inmunomarcación (por ELISA o IF) que son las más empleadas en la actualidad; b) La reacción de fijación del Complejo que ya no se emplea.

Los ensayos para determinar anticuerpos serotipo-específicos incluyen la inhibición de la hemaglutinación, que se basa en la capacidad hemaglutinante de las glicoproteínas terminales de las fibras y los ensayos de neutralización que detectan anticuerpos tipo específico y requiere el uso del mismo serotipo que está produciendo la infección. Estos dos métodos son sensibles y miden anticuerpos serotipo específicos pero son laboriosos y no se utilizan en el diagnóstico de rutina.

7. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

Las infecciones por adenovirus no pueden prevenirse totalmente. Sin embargo, pueden aplicarse normas para controlar la transmisión en hospitales y centros oftalmológicos como son el aislamiento de pacientes infectados, el cumplimiento de buenas prácticas de lavado de manos y limpieza y la desinfección del

instrumental, equipos y materiales usados con pacientes infectados. Dada la alta afinidad de los adenovirus por mucosas o tejido ocular, debe siempre evitarse el contacto mano-ojo y mano-boca. Asimismo, la adecuada cloración del agua de piletas de natación previene estas infecciones.

7.1 VACUNAS

En la década de los sesenta, y con el objeto de prevenir enfermedades agudas respiratorias entre la población militar, se desarrollaron vacunas a virus vivo de adenovirus serotipos 4 y 7, que eran administradas por vía oral. En 1980, se autorizó su uso solamente en reclutas de EE.UU. Fue así que se inició su administración rutinariamente al ingresar a entrenamiento militar. Estas vacunas lograron prevenir las enfermedades respiratorias agudas asociadas con adenovirus. Sin embargo, el laboratorio responsable decidió poner fin a la producción de la vacuna, lo que llevó a la reaparición de brotes de infección aguda respiratoria entre los militares en entrenamiento desde 1997. En la actualidad se está trabajando para reinstaurar tal vacuna en la población militar.

7.2 TRATAMIENTO

Aún no existe un tratamiento antiviral específico para adenovirus. Sin embargo, el uso de ciertos antivirales no específicos como cidofovir, ribavirina han demostrado ser efectivos en algunos casos graves.

La ribavirina es un antiviral de amplio espectro que es capaz de inhibir *in vitro* la replicación de adenovirus. Aunque existen publicaciones que lo asocian a éxito terapéutico, otros han documentado la falla del mismo. Por lo tanto, su utilidad clínica es aún discutida dada la falta de estudios clínicos randomizados. Parecería que el éxito del tratamiento se relaciona con la instalación en la fase temprana de la enfermedad. Por esto, la importancia de diagnósticos rápidos y precoces.

El cidofovir también ha sido postulado como tratamiento eficaz ya que inhibe la replicación de adenovirus *in vitro* por ser un análogo de nucleósido. Produce toxicidad renal manejable. Algunas publicaciones basadas en casos clínicos y en un estudio prospectivo describen la utilidad del cidofovir en pacientes trasplantados de médula ósea con enfermedad por adenovirus. La falta de grupos controles y el bajo número de pacientes estudiados limitan su significación estadística. Sin embargo, su utilización ha aumentado en estos últimos años especialmente en pacientes trasplantados de médula ósea en quienes se realiza vigilancia de rutina a fin de instaurar un tratamiento temprano o incluso un tratamiento *pre-emptive*.

Otras estrategias de tratamiento incluyen la disminución de la inmunosupresión o la inmunoterapia con una infusión de linfocitos del dador. Ésta es un área de intensa investigación que está siendo recientemente explorada en pacientes trasplantados con infección severa o diseminada. La generación de linfocitos T citotóxicos grupo específico *in vitro* para el control de la infección por adenovirus está en amplio desarrollo en la actualidad.

8. ADENOVIRUS COMO VECTORES

Los adenovirus se pueden utilizar como vectores para transferir DNA para distintas funciones: 1) Transferir DNA eficientemente a células en cultivo, dado que algunas células son difíciles de transfectar, pero en su mayoría son susceptibles a la infección por adenovirus, se utilizan para transferir genes clonados. 2) Transferir genes funcionales a una célula *in vivo* para corregir una alteración congénita (por ejemplo, el transporte del regulador transmembrana de la fibrosis quística) 3) Transferir genes que controlan el crecimiento celular y la apoptosis (por ejemplo, en tratamiento de cáncer se utilizan algunos vectores que introducen genes citotóxicos o pro-apoptóticos para ser selectivamente tóxicos a células malignas). 4) Vectores para inmunizaciones: transferir DNA que codifica para un

epítipo o antígeno útil como un agente inmunogénico contra infecciones o tumores (por ejemplo, vectores con antígenos p24 (para HIV), o proteína F del virus sincicial respiratorio).

La ventaja de usar adenovirus como vectores se basa en que la replicación viral no requiere que las células del hospedador estén en división, como ocurre para otros vectores como los retrovirus (excepto los lentivirus). La desventaja radica en que son altamente inmunogénicos, induciendo inmunidad celular y humoral. Estas respuestas inmunes disminuyen el período durante el cual se expresa el transgen.

Estos vectores pueden diseñarse para que sean competentes en su replicación o defectuosos en ciertos genes necesarios para producir una infección productiva. Cuando estos vectores son utilizados para inmunización, se desea que exista replicación viral para aumentar así la expresión de epítipes inmunogénicos. Sin embargo, cuando se los utiliza en terapia génica se los diseña para que su replicación sea defectiva. Este área constituye un campo de intensa investigación en la actualidad. Se espera un progreso significativo en un futuro inmediato no sólo en la aplicación clínica de terapia génica sino en el desarrollo de vacunas recombinantes.

Bibliografía

- Carbballal G, Siminovich M, Murtagh P, Cerqueiro C, Avila M, Salomon H, *et al.* "Etiological, clinical and pathological analysis of 32 fatal cases of acute respiratory infections in Argentinian children under 5 years of age". *Rev Infect Dis* 1990;12:S1074-80.
- Carbballal G, Videla C, Espinosa MA, Savy V, Uez O, Sequeira M, *et al.* "Multicentered Study of Viral Acute Lower Respiratory Infections in Children from Four Cities of Argentina, 1993-1994". *J Med Virol* 2001;64:167-74.
- Echavarría M, Forman M, Ticehurst J, Dumler JS, Charache P. "PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals". *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3323-26.
- Echavarría M, Forman M, van Tol MJ, Vossen JM, Charache P, Kroes AC. "Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR". *Lancet* 2001;358:384-5.
- Echavarría M. "Adenoviruses". En: Zuckerman, Banatvala, Pattison, Griffiths y Schoub, Editores. *Principles and Practice of Clinical Virology*, Fifth edition, West Sussex, Inglaterra, Willey, 2009;463-88.
- Echavarría M, Ray S, Ambinder R, Dumler JS, Charache P. "PCR detection of adenovirus in a bone marrow transplant recipient: hemorrhagic cystitis as a presenting manifestation of disseminated disease" *J Clin Microbiol*, 1999. 37:686-89.
- Echavarría M. "Adenoviruses in the immunocompromised host" *Clin Microbiol Rev*, 2008; 21: 704-15.
- Ginsberg HS, Prince GA. "The molecular basis of adenovirus pathogenesis". *Infect Agents Dis* 1994;3:1-8.
- Kajon AE, Dickson LM, Murtagh P, Viale D, Carbballal G, Echavarría M. "Molecular characterization of an adenovirus 3/16 intertypic recombinant isolated in Argentina from an infant hospitalized with acute respiratory infection". *J Clin Microbiol* 2010, 48: 1494-6.
- Murtagh P, Cerqueiro C, Halac A, Avila M, Kajon A. "Adenovirus type 7h respiratory infections: a report of 29 cases of acute lower respiratory disease". *Acta Pediatr* 1993;82:557-61.
- Robinson C, Echavarría M. "Adenoviruses" ASM Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition, ASM Press. 2010 (USA).
- Videla C, Carbballal G, Misirlan A, Aguilar M. "Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalized children from Argentina". *Clin Diagn Virol* 1998;10:17-23.

Vigilancia epidemiológica de las virosis respiratorias en Argentina

Oswaldo Uez

La vigilancia epidemiológica de influenza y de los otros virus respiratorios consiste en la detección y caracterización temprana de las cepas que circulan cada temporada en una comunidad determinada y en la evaluación de su repercusión en la población.

En el caso de los virus influenza el monitoreo de las cepas circulantes es especialmente importante para detectar la emergencia y diseminación de las variantes antigénicas que pueden señalar la necesidad de reformular las vacunas en uso.

En Argentina, los estudios sobre influenza comenzaron en la década del 60 cuando los laboratorios de Virología del Instituto Nacional de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires - hoy denominado Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)- y del Instituto de Virología "Dr. M. Vanella" de la Universidad de Córdoba fueron incorporados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a su Red Internacional de Laboratorios para la Vigilancia de influenza. Así, se comenzaron a estudiar los brotes anuales de influenza humana y animal en equinos y cerdos en nuestro país. En 1985, el laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. J. Jara" (INE), de Mar del Plata es designado Centro Nacional de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica de influenza.

En la actualidad, los tres centros mencionados actúan como Centros Nacionales de Influenza OMS y trabajan en forma conjunta con el Ministerio de Salud de la Nación. La obtención de los datos de vigilancia epidemiológica se realiza mediante diferentes sistemas:

1. Sistema de Notificación Obligatoria de Casos
2. Vigilancia Viroológica por los tres Centros Nacionales de Influenza y la Red Nacional de Laboratorios de Influenza y Virus Respiratorios
3. Vigilancia por el Sistema de Médicos Centinela

1. SISTEMA DE NOTIFICACIÓN OBLIGATORIA DE CASOS

El Sistema de Salud debe notificar al Ministerio de Salud de la Nación los casos de influenza detectados en el sistema público de Salud. Hasta 1999 se trabajó sin definición estricta ni confirmación virológica de casos y la sola notificación presentaba el inconveniente del atraso en el envío y en el análisis de los datos. De todos modos, este sistema permite comparar los años epidémicos y la concordancia con la detección viral y provee de corredores endémicos por provincia o por país.

En la Figura 17.1 se presenta el corredor endémico con la notificación para los años 2000 a 2005 en Argentina.

2. VIGILANCIA VIROLÓGICA

Es efectuada por los laboratorios especializados y permite:

- Detectar tempranamente la circulación de influenza y otros virus respiratorios
- Conocer su circulación en función de los meses del año y semanas epidemiológicas, las regiones geográficas afectadas y los grupos de edad
- Caracterizar los virus y detectar sus variantes
- Identificar virus nuevos y, en el caso de los virus influenza, monitorear la concordancia de los virus circulantes con las cepas incluidas en la fórmula vacunal que se utiliza para inmunizar a esa comunidad

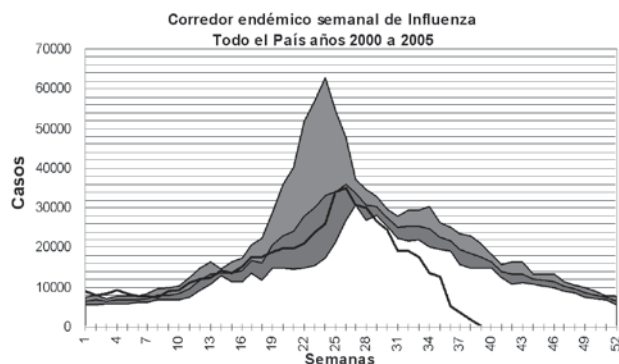


Figura 17.1. Corredor endémico semanal de influenza. Argentina, años 2000 a 2005.

En el período 1993-1995, la Dirección Nacional de Medicina Sanitaria del Ministerio de Salud invitó a 7 laboratorios del país a participar de un estudio multicéntrico de infecciones respiratorias agudas. De ese estudio y con la formación de nuevos recursos humanos en Virología, se desarrolló una Red de Laboratorios a nivel nacional que en la actualidad cuenta con 23 laboratorios en 14 jurisdicciones. Este sistema tiene como laboratorio cabecera el INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". El personal de los laboratorios de esta red ha sido capacitado para realizar un diagnóstico rápido mediante detección de antígenos de influenza, parainfluenza, adenovirus y virus respiratorio sincicial en muestras de pacientes con infección respiratoria aguda. Los resultados son informados al médico dentro de las 24 horas de enviada la muestra. Este sistema procesa aproximadamente 20 000 muestras anuales, provenientes en su mayoría de pacientes menores de 5 años hospitalizados, aunque también se obtienen datos de pacientes ambulatorios y de otros grupos de edades.

Las muestras positivas para influenza son enviadas desde los laboratorios colaboradores a los Centros Nacionales de Influenza para el aislamiento viral, la subtipificación y la caracterización antigénica y molecular de los virus aislados.

3. VIGILANCIA POR EL SISTEMA DE MÉDICOS CENTINELAS

Una de las ventajas de este sistema es proveer información en forma rápida. Los médicos centinela son clínicos o pediatras que se inscriben voluntariamente en el programa y se comprometen a informar el porcentaje de consultas por **enfermedad tipo influenza (ETI)** en relación al total de consultas recibidas en su lugar de trabajo. Además, obtienen muestras respiratorias (hisopados en medio de transporte para virus) de uno de cada tres pacientes ambulatorios y las envían, en general por correo, a los laboratorios de su localidad, pertenecientes a la Red de Laboratorios para realizar el diagnóstico etiológico rápido de los virus respiratorios. Las características de este sistema son:

- Es sensible, por trabajar con una definición amplia de caso
- Es específico ya que se obtiene la confirmación por diagnóstico virológico, diferenciando así influenza de los otros virus respiratorios

Porcentaje de ETI en consultas totales a Médicos Centinelas de Mar del Plata. Pcia. de Buenos Aires. N° de virus influenza y otros virus respiratorios. INE "Dr. Juan H. Jara", 2005.

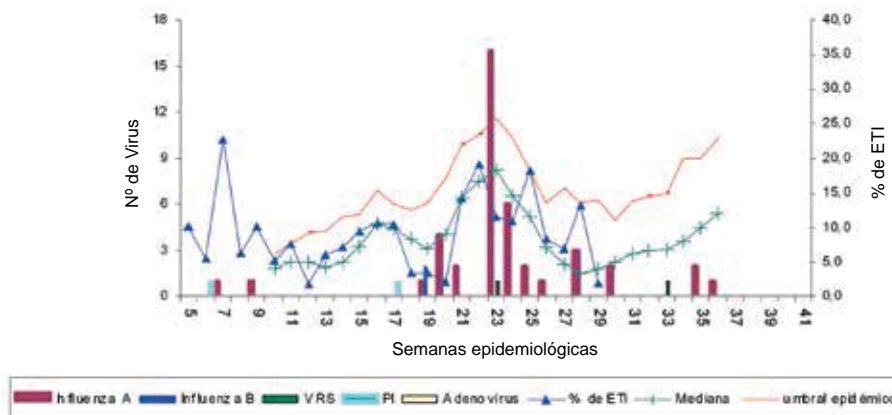


Figura 17.2. Porcentaje de Enfermedad Tipo Influenza (ETI) en consultas a Médicos Centinelas de Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

- Es oportuno, ya que la difusión de la información es rápida permitiendo al sistema de salud realizar intervenciones
- Es representativo, ya que los datos se pueden generalizar por las características de difusión de los virus influenza
- Es aceptable, por ser un sistema de trabajo voluntario

Este sistema se comenzó a utilizar en el INE, Mar del Plata en 1997 y ha demostrado ampliamente su efectividad. Se observó una elevada correlación entre el sistema de notificación obligatoria y el de los médicos centinela, observándose la respuesta más rápida del sistema de los médicos centinelas.

En la Figura 17.2 se presenta el resultado de la vigilancia de la UC de Mar del Plata sobre el corredor endémico del año 2005, donde la notificación queda debajo del valor umbral, indicando así que la circulación de influenza no fue epidémica para ese año.

4. VIGILANCIA POR EL SISTEMA DE UNIDADES CENTINELAS

Actualmente, se está implementando en varias jurisdicciones de nuestro país la organización de **Unidades Centinelas (UC)**, las cuales cuentan con un laboratorio, un grupo de médicos centinelas y un epidemiólogo. Entre los años 2003 y 2005, fueron capacitados en estas UC más de 200 profesionales en la vigilancia, prevención y control de las enfermedades respiratorias de origen viral. Además, las UC se han informatizado con un acceso nacional y regional a los efectos de obtener la información epidemiológica y virológica en forma semanal. La información es centralizada por un servidor en la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación. Esta estrategia fue posible mediante el apoyo de un crédito del Banco Mundial para la mejora de la vigilancia en Argentina (Programa VIGIA).

Los tres Centros Nacionales de Influenza actúan como referencia de los laboratorios de las UC y realizan el aislamiento viral, la sub-tipificación y la caracterización antigénica y molecular de los virus aislados. Se está operando con este sistema en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, La Pampa, Mendoza, Neuquén, Río Negro, Santa Cruz, Santa Fe, Salta, San Juan, Tierra del Fuego y Tucumán. El resto de las jurisdicciones se incorporarán paulatinamente.

En la Figura 17.3 se observa el flujograma de información entre las UC y las autoridades nacionales e internacionales. En la Tabla 17.1 se observa la caracterización de cepas de influenza, realizadas en el INE, Mar del Plata, y en el CDC, Atlanta EE.UU.

Durante la capacitación de las UC se discuten el Programa de Prevención y Control de Influenza y el Plan de Preparación para la Pandemia de Influenza Aviaria a fin de generar grupos de tra-

bajo sobre el tema en las distintas regiones del país. Este Plan fue elaborado por el INE en el año 2002 y presentado en la reunión de la Oficina Sanitaria Panamericana (OPS) realizada en Chile en ese año. El Plan ha sido actualizado siguiendo los lineamientos de OPS/ OMS y en la actualidad se dirige desde el Ministerio de Salud, Dirección de Emergencias Sanitarias. Este Plan contiene componentes de Vigilancia de Influenza humana y animal, así como también intervenciones farmacológicas y no farmacológicas, medidas de Salud Pública asistencial y no asistencial y de Comunicación Social.

Las UC comenzarán a vigilar en los hospitales de su región el porcentaje de internaciones por neumonía e influenza –según la clasificación internacional de enfermedades (CIE-10, J10-J18)– sobre las internaciones totales; el porcentaje de muertes por la misma causa sobre las muertes totales; y así también el ausentismo laboral.

Desde el año 2004, el nivel de alerta para la posible pandemia de Influenza Aviaria fue de Fase 3, lo que significa que un nuevo subtipo de virus influenza afecta a humanos pero sin diseminación humano-humano a contactos cercanos. La diseminación del virus por medio de las aves acuáticas con hábitos migratorios es muy amplia y afecta a varios países de Asia, África y Europa. Estas aves migratorias pueden transmitir el virus a las aves de corral y de éstas a humanos.

En los períodos de alerta de pandemia (fases 3, 4 y 5) las UC vigilarán que todo caso de extranjeros provenientes del área del brote que presente ETI o enfermedad respiratoria aguda grave / neumonía (CIE-10 J10-J18) ambulatorios o internados sea notificado rápidamente a las autoridades sanitarias; que se obtenga una muestra para estudio virológico y que se realice el seguimiento de los contactos del caso para implementar las acciones de control.

5. IMPORTANCIA DE LA TIPIFICACIÓN Y SUBTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE INFLUENZA EN RELACIÓN A LA FÓRMULA VACUNAL

Los tres Centros Nacionales de Influenza de nuestro país realizan cada año una selección representativa de las cepas de influenza aisladas, las que son enviadas al Centro Colaborador de OMS para la región, el CDC (Atlanta, EE.UU.).

La información virológica semanal es remitida a las autoridades nacionales de salud y a la red informática de la OMS (Flunet). Estos datos permiten detectar tempranamente el comienzo de la circulación viral y, mediante una rápida caracterización de los virus, conocer la concordancia con las cepas incluidas en las vacunas administradas a esa población.

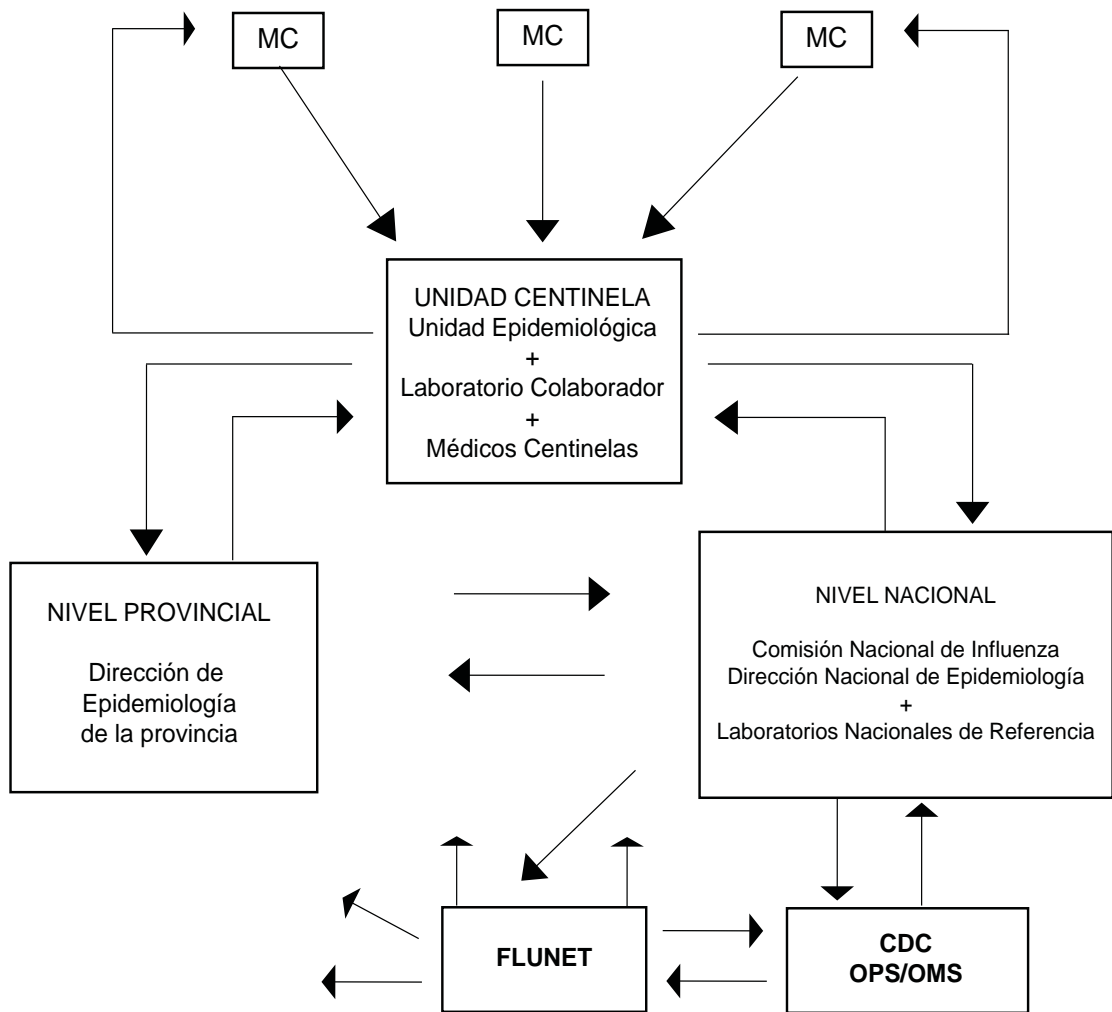


Figura 17.3. Red de vigilancia epidemiológica de virus respiratorios en Argentina.

Unidad centinela	Flu A	Cultivo A (H3)	Caracterización INE	Caracterización CDC
Mar del Plata	39	25 (64,1%)	6 A (H3N2)	10 A/California/07/2004 (H3N2)
Maipú	1	1	--	--
Olavarría	1	-	--	--
La Pampa	5	5 (100%)	--	--
Río Gallegos	3	2 (66,6%)	--	--
TOTAL	49	32 (65,3%)	6 A (H3N2)	10 A/California/07/2004 (H3N2)

Tabla 17.1. Caracterización de cepas de influenza (2005) aisladas en el INE, Mar del Plata, de las diferentes unidades centinelas y confirmación del CDC, Atlanta, EE.UU.

Año	Cepas aisladas	Cepas vacunales recomendadas por OMS
1992	A/ Taiwán/1/86	A/ Beijing/353/89 (H3N2) B/ Panama/45/90 A/ Singapore/6/86 (H1N1)
1993	A/Beijing/32/92 (H3N2) B/Panama/45/90	A/Beijing/353/89 (H3N2) B/Panama/45/90 A/Texas/36/91 (H1N1)
1994	A/Guandong/25/93 (H3N2) A/Johannesburg/33/94 (H3N2)	A/Beijing/32/92 (H3N2) B/Panama/45/90 A/Singapore/6/86 (H1N1)
1995	A/Johannesburg/33/94 (H3N2) B/Harbin/7/94	A/Shangdong/9/93 (H3N2) o A/Guandong/25/93 B/Panama/45/90 A/Singapore/6/86 (H1N1)
1996	A/Wuhan/359/89 (H3N2)	A/Johannesburg/33/94 (H3N2) B/Beijing/184/93 o B/Harbin/7/94 A/Singapore/6/86
1997	B/Beijing/184/89 A/Bayern/07/95 (H1N1)	A/Wuhan/359/89 (H3N2) B/Beijing/184/93 A/Singapore/6/86
1998	A/Sydney/05/97 (H3N2)	A/Wuhan/359/89 (H3N2) B/Beijing/184/93 A/Bayern/07/95 (H1N1)

Tabla 17.2. Diferencias entre las cepas de influenza aisladas en Argentina y las vacunales recomendadas por OMS para el período 1992-1998. Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara", Mar del Plata.

Esta vigilancia ha permitido detectar en Argentina –entre los años 1994 y 1997– una falta de correlación entre las cepas vacunales y las circulantes (Tabla 17.2). Esta grave situación pudo ser corregida a partir de 1998 cuando la OMS, a partir de estos datos, decidió reformular la vacuna anual contra influenza para su uso en el hemisferio sur.

Actualmente, los tres Centros Nacionales de Influenza se encuentran en condiciones de realizar el diagnóstico de influenza H5N1. El INEI (Buenos Aires) cuenta con antisueros para detectar virus H1, H2, H3, H4, H5, H7, H8, H9 y H11. Con estos reactivos se puede subtipificar aislamientos de los nuevos subtipos. Además, se cuenta con una PCR para matriz que detecta todas las cepas de influenza A de cualquier origen. Se puede también detectar N1 y N2 por PCR. Para estudios serológicos en humanos se dispone de antígenos H1, H3, H5, H7 y H9.

Los laboratorios de los otros dos Centros Nacionales de Influenza (Córdoba y Mar del Plata) cuentan con PCR para detectar H1, H3, H5, N1 y N2, y antisueros para H5.

Bibliografía

- Boletín Epidemiológico 23, 2005. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación Argentina. http://www.msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/index.asp
- Implementación de Unidades Centinela de Influenza, 2002. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación Argentina. Uez O., Savy V., Rico O., Del Monaco R., Fidani J., Rolla M. http://direpi.vigia.org.ar/pdf/UC_influenza.pdf
- Virus respiratorios, Epidemiología y Vigilancia. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Medicina. Autor: Uez O. Directora de tesis: Dra. Carballal G. Codirectora: Dra. Vacchino M. 1999.
- WHO Guidelines for Global Influenza Surveillance 2004; 2006. <http://www.who.int/csr/disease/influenzane트워크/en/index.html>
- WHO Recommended Surveillance Standards (2° ed.) 1999; 2006 (cited July 2006). http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/WHO_CDS_CDR_ISR_99_2_EN/en
- WHO Influenza A (H1N1) –update www.cdc.gov/flu/weekly/ (wwwdev.dcd.govhttp://) www.cdc.gov/flu/weekly/fluactivity.htm
- WHO Influenza A (H1N1) www.who.int/Flunet
- Páginas de Ministerio de Salud, Argentina: www.msal.gov.ar/

La vigilancia de influenza humana y animal se organizó en Argentina con la formación de un comité ejecutivo en el 2002 con la participación de Servicio Nacional de Sanidad Animal, Universidad Nacional de La Plata, CEVAN, Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria, AMEVA, UBA-Facultad de Ciencias Veterinarias, Centro Nacional de Control de Biológicos y los tres Centros Nacionales de Influenza.

Actualmente se está realizando el control de importaciones y la vigilancia activa de aves infectadas por serología de las aves reproductoras, de postura, pollos de engorde y aves de traspatio.

La Argentina cuenta con la ventaja de ser uno de los países libres de influenza aviaria, altamente patógena, y la vigilancia es uno de los requisitos imprescindibles para el mantenimiento de este estado.

Cuando este capítulo estaba en etapas finales de edición, surgió la pandemia por el nuevo virus de influenza A H1N1, 2009. La existencia del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de virosis respiratorias en Argentina permitió dar rápida respuesta a esa emergencia sanitaria. (Ver Capítulos 14, 59 y 59.1).



Rubéola

Marta T. Zapata

La rubéola es una enfermedad infecto-contagiosa, con síntomas leves y una erupción generalizada. En niños es una enfermedad autolimitada sin consecuencias, pero cuando ocurre durante el primer trimestre del embarazo existen riesgos severos de daño al feto. La palabra rubéola, del latín *rubellus* significa un *poquito rojo*.

En 1941, el oftalmólogo australiano Norman Gregg demostró por primera vez el potencial teratogénico de la infección rubeólica adquirida durante los primeros meses del embarazo. Así, se abrió un camino tendiente a confirmar sus hallazgos y dar respuesta a los muchos interrogantes que surgieron con relación a la teratogénesis inducida por virus. En 1964, se registró una severa epidemia de rubéola en EE.UU. que estimuló la realización de numerosas investigaciones para definir la incidencia de defectos congénitos, la patogenia de la infección intrauterina, las manifestaciones patológicas resultantes del daño fetal, así como muchos aspectos epidemiológicos y virológicos hasta entonces desconocidos.

La infección rubeólica plantea, sin lugar a dudas, un importante problema médico, centrado casi exclusivamente en la mujer embarazada por amenazar seriamente la vida y la salud de su hijo desde antes de su nacimiento.

1. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS RUBÉOLA

1.1 MORFOLOGÍA Y CULTIVO

El virus rubéola es el único miembro del género *Rubivirus*, uno de los cuatro géneros que integran la familia *Togaviridae*. Serológicamente, no está relacionado a otros togavirus, por lo que se lo incluye en el género *Rubivirus*, siendo el hombre el único hospedero.

El virus rubéola es una partícula esférica, de 60-70 nm. La nucleocápside es de simetría icosaédrica, rodeada por una envoltura lipoproteica, adquirida durante la brotación del virus desde las vesículas citoplasmáticas o de la membrana plasmática. La envoltura contiene lípidos de la célula hospedera y polipéptidos virales incluyendo uno o más glicopéptidos en proyecciones o espículas. El RNA es lineal, infectivo, de cadena única, polaridad positiva y su genoma es de 10 kb. El virus replica sólo en citoplasma y madura por brotación.

El virus puede ser aislado en líneas celulares como RK-13, AGMK, aunque su cultivo es difícil, motivo por el que no se utiliza habitualmente para diagnóstico.

En células VERO pueden hallarse altos títulos de virus (10^5 - 10^7 UFP/ml); por ello se utilizan para obtener antígenos para pruebas diagnósticas. Las titulaciones pueden realizarse por diferentes métodos. Inicialmente, se utilizó un ensayo de interferencia con la replicación en cultivos infectados con paramixovirus. La acción citopática (ACP) que produce el virus rubéola en VERO es difícil de reconocer, especialmente a baja multiplicidad de infección. El tratamiento del virus a pH ácido induce cambios conformacionales irreversibles en las glicoproteínas E1 y E2 que llevan a una mayor exposición de E2 y permite que el virus se fusione con las membranas lipídicas adyacentes formando células gigantes con múltiples núcleos (sincicios). Utilizando este conocimiento, se desarrolló un método que consiste en tratar cultivos de VERO, al sexto día post-infección con pH ácido por 5 min. y luego continuar con la incubación a pH neutro. A las 16 hs. post-tratamiento se observan los sincicios. Este método es útil para titular cepas de rubéola. Otro

método es el ensayo de placas baja agarosa. Los títulos virales obtenidos por ACP, sincicios y plaqueo son similares.

1.2 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Y NO ESTRUCTURALES

El virión contiene tres polipéptidos mayores: E1 (PM 58.000), E2 (PM 42.000-47.000) y C (PM 33.000). E1 y E2 están glicosilados y localizados externamente sobre la envoltura viral; E2 está presente en el virión de dos formas: E2a y E2b. El mapeo peptídico mostró que ambos son muy similares, y no están estructuralmente relacionados a E1 y C. La diferente movilidad electroforética podría estar relacionada al diferente número de glúcidos en las moléculas. La proteína C está asociada al RNA genómico, formando la nucleocápside.

De acuerdo con Waxham y Wolinsky, E1 y E2 aparecerían en el virión componiendo espículas de distribución espacial en forma de hexámeros, semejantes a otros alphavirus. Para el virión de rubéola, el hexámero podría estar compuesto por cinco moléculas de E1 y una sola de E2. Dentro de esta estructura, la molécula de E2 podría formar un heterodímero con una molécula de E1; el resto de las moléculas de E1 podrían existir libres o interactuar como homodímeros de E1-E1.

Las cuatro proteínas descritas para el virus rubéola (E1, E2a, E2b y C) son codificadas por tres genes, de forma monocistronica y luego clivadas proteolíticamente. La estructura y estrategia general de la expresión de los genes es similar a la de los alphavirus de la familia *Togaviridae*. El RNA mensajero subgenómico 24 S transcribe un precursor de 110 KD que da origen por clivaje a las proteínas C, E2 y E1. El extremo proximal 5' codifica para una poliproteína (P200) que por clivaje da origen a dos proteínas no estructurales P150 y P90 involucradas en la replicación del RNA (Figura 18.1).

1.3 COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA Y GENOTIPOS

Existen tres componentes antigénicos principales; dos asociados a la envoltura y uno a la proteína de la nucleocápside. No se ha encontrado relación antigénica entre el virus rubéola y los otros virus de la familia *Togaviridae*. Se conoce un solo serotipo de rubéola y –aunque se han encontrado pequeñas variaciones biológicas entre cepas– aún no se ha demostrado que tengan relación con variaciones antigénicas. La existencia de un único serotipo es importante en la epidemiología y la preparación de vacunas.

Se han descrito dos genotipos de rubéola que tienen una distribución global. El genoma del virus contiene aproximadamente 10.000 nucleótidos y codifica 5 proteínas, 2 utilizadas en el ciclo de replicación y las 3 proteínas estructurales del virión antes mencionadas: la proteína C de la cápside y las 2 glicoproteínas (E1 y E2 de la envoltura). La secuencia del gen E1 ha sido utilizada para genotipificar y realizar el análisis filogenético de los aislamientos del virus rubéola. Las cepas aisladas en Europa, Asia y Norte América han sido agrupadas en el genotipo 1, el que presenta la mayor distribución mundial. En China, India y algunos casos de Italia, aparece el genotipo 2, formando un brazo filogenético distante que difiere entre un 8 y 10% y cuya circulación es limitada.

Un aislamiento de nuestro laboratorio (cepa Córdoba) fue tipificado como genotipo 1 (Frey T., CDC, Atlanta, EE.UU.). Actualmente, se están tipificando los aislamientos de virus rubéola de Argentina y de otros países para clasificarlos como genotipos o sub-genotipos.

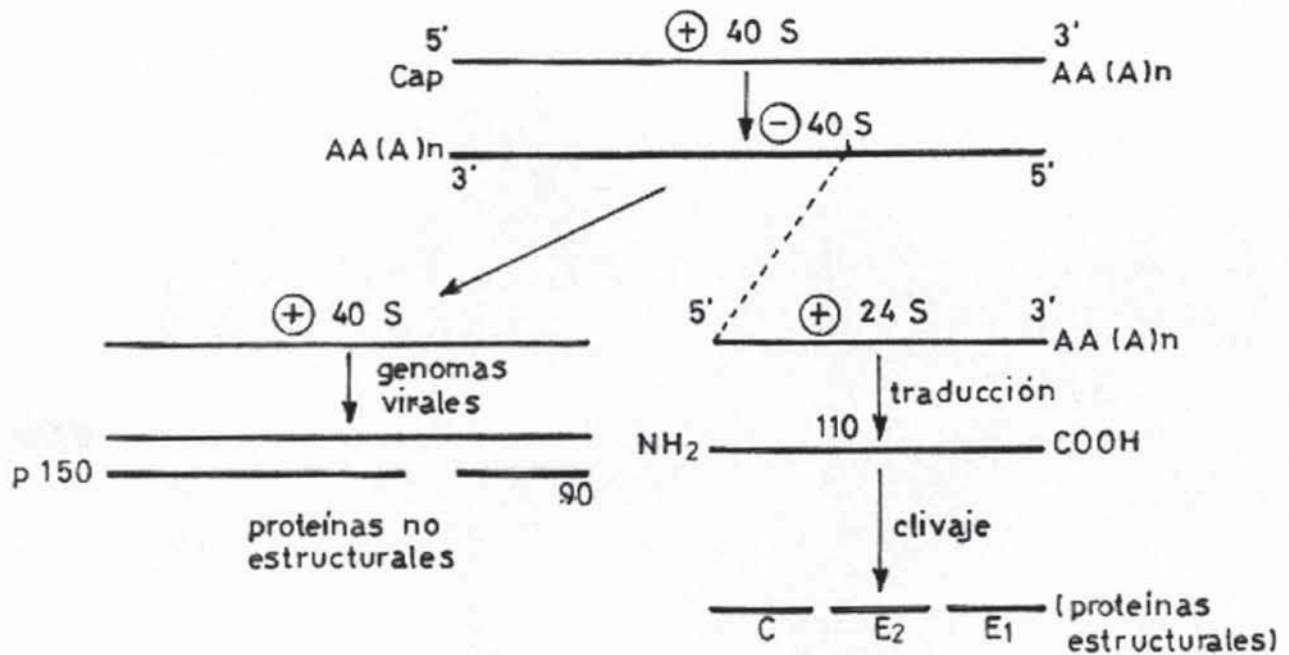


Figura 18.1. Esquema de la estrategia de replicación del virus rubéola.

En forma similar a otros virus envueltos, las glicoproteínas (E1 y E2) parecen contener los antígenos responsables de la inducción de la respuesta inmune protectora. E1 está asociada a la actividad hemaglutinina y parcialmente a la inducción de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación e inhibidores de la hemólisis. Utilizando anticuerpos monoclonales obtenidos en nuestro laboratorio y por otros autores, fue posible localizar epítopes responsables de la hemaglutinación y neutralización sobre la glicoproteína E1, que también existirían en la E2. La función de E2 aún no ha sido totalmente dilucidada aunque el antígeno específico de cepa estaría en esta proteína. De los datos estructurales y funcionales, E1 es la molécula dominante de la superficie de la partícula viral y, probablemente, es el principal sitio para la detección y posterior eliminación del virus rubéola por el sistema inmune.

Durante la replicación del virus *in vitro* también se codifican proteínas que no se incorporan al virión. Estas proteínas, que también inducen una respuesta de anticuerpos, se denominan *antígenos solubles*. En nuestro laboratorio, y coincidiendo con trabajos de Le Bouvier, se aislaron dos antígenos solubles denominados A y B. La caracterización bioquímica e inmunológica demostró que el antígeno A es el responsable de la inducción de anticuerpos precipitantes y es posible evidenciarlos en suero de convalecientes. Por el contrario, el antígeno B induce anticuerpos precipitantes que caen a niveles indetectables al poco tiempo de transcurrida la infección. Los antígenos solubles son utilizados en las pruebas diagnósticas de aglutinación en partículas de látex.

2. CUADROS CLÍNICOS Y ETIOPATOGENIA

2.1 RUBÉOLA POST-NATAL

El virus ingresa por vía respiratoria. El período de incubación de la enfermedad es de 14 a 21 días (Figura 18.2). Las manifestaciones clásicas de la rubéola post-natal comprenden una erupción que habitualmente comienza en la cara y cuello y luego se disemina hacia el tronco. La erupción aparece 1-2 días luego del inicio de los síntomas y consiste en máculas rosadas, menores a 3 mm de diámetro. También puede presentarse eritema en paladar. Las adenopatías son de localización post-auricular, sub-occipital y látero-

cervical, aparecen antes de la erupción y perduran por algo más de una semana. El paciente presenta escasa fiebre y, ocasionalmente, alguna manifestación respiratoria alta. La erupción —que no siempre está presente— no es diagnóstica, ya que puede ser similar a la que presentan otras infecciones virales.

En adultos son frecuentes las manifestaciones articulares que se presentan como poliartalgias y a veces como poliartrosis. Las articulaciones metacarpo-falángicas proximales son las más afectadas, pero también suelen participar las rodillas y los tobillos. El dolor puede ser leve o intenso y por lo general desaparece en menos de dos semanas. Estas manifestaciones articulares se atribuyen a depósitos de complejos inmunes al nivel sinovial. Raramente, puede presentarse hepatitis, encefalitis y púrpura trombocitopénica. No hay acuerdo entre diferentes autores con respecto al papel que el virus rubéola pueda tener como potencial agente causal de algunas formas de artritis juvenil y artritis reumatoidea, aunque existen algunas evidencias indirectas que lo asocian.

El diagnóstico clínico contiene un gran margen de error, especialmente en tiempos inter-epidémicos. Sin embargo, no sucede lo mismo durante las épocas epidémicas.

La complicación más seria de la infección post-natal por rubéola es la encefalitis post-infecciosa. Su frecuencia es de un caso cada 6 000 infecciones. Los síntomas aparecen en forma explosiva 1 a 6 días después de la erupción (cefalea, vómitos, rigidez de nuca, letargo y convulsiones generalizadas). El LCR es claro, con 50 células por mm³. El electroencefalograma está alterado. El tratamiento es sintomático y el enfermo habitualmente se recupera completamente a los pocos días, si bien se ha observado un 20% de mortalidad.

2.1.1 Patogenia

La puerta de entrada es respiratoria. El virus rubéola replica inicialmente en el epitelio respiratorio y ganglios linfáticos locales. Esto es seguido de una viremia y de la diseminación del virus a través del tracto respiratorio alto. El virus puede recuperarse de secreciones faríngeas y de sangre desde una semana antes de la aparición del exantema y durante éste; también se lo ha aislado de leucocitos e hisopados conjuntivales. La inmunidad que sigue a la infección dura de por vida y es demostrable por pruebas serológicas (Figura 18.2).

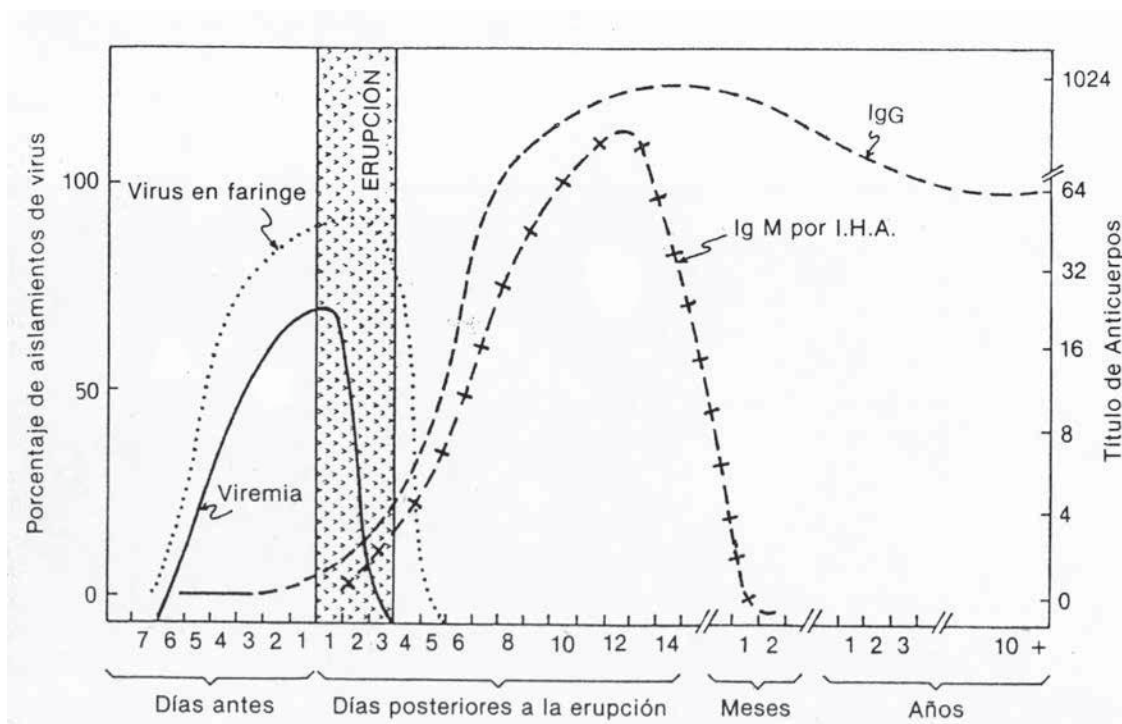


Figura 18.2. Rubéola post-natal: excreción del virus y repuesta de anticuerpos.

La primera respuesta de anticuerpos específicos que se detecta después de la erupción es del tipo IgM. A la semana del comienzo de la erupción están presentes todos los tipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgD e IgE). Las primeras IgG específicas que aparecen son subclase IgG1. Por pruebas de inmunoprecipitación, realizadas en nuestro laboratorio, se han detectado anticuerpos anti-E1, anti-E2 y anti-C en sueros de pacientes convalecientes y sólo anti-E1 y anti-E2 en sueros obtenidos de períodos alejados de la infección. También ha sido demostrada la inmunidad mediada por células como respuesta proliferativa, citotoxicidad mediada por linfocitos y secreción de linfocinas. La inmunidad celular persiste indefinidamente después de la infección, así como la IgG específica.

2.2 RUBÉOLA CONGÉNITA

La infección congénita se produce en un organismo totalmente inmaduro y presenta el comportamiento característico de las infecciones virales *persistentes crónicas*. La infección fetal se produce por pasaje de los virus presentes en la circulación materna (viremia) a través de la placenta. El virus coloniza la placenta y se ha sugerido que la infección fetal ocurre a consecuencia de la descamación de células coriónicas infectadas que ingresan en su circulación a manera de émbolos infecciosos. Si aceptamos que la infección fetal ocurre en casi todos los casos de infección rubeólica primaria durante el primer trimestre del embarazo y comparamos su incidencia con la menor incidencia de malformaciones congénitas, es posible afirmar que la infección intrauterina no siempre conduce a la malformación congénita. A veces, ni siquiera da origen a manifestaciones clínicas en el niño infectado. Podría decirse que la gravedad de los síntomas de la rubéola congénita estaría más bien relacionada con la gravedad de la infección fetal que con su mera presencia.

Numerosos trabajos han confirmado los hallazgos preliminares de Gregg. Sin embargo, hay diferentes valores en el porcentaje de defectos congénitos asignables a la infección rubeólica materna. Los primeros estudios retrospectivos adjudicaban a la rubéola materna una elevada capacidad teratogénica, mientras que estudios prospectivos posteriores mostraron una frecuencia inferior. El riesgo de rubéola congénita depende del mes del embarazo en el que

se adquiere la infección primaria. En general, el 16% de los niños tienen defectos al nacer cuando la madre adquirió la infección durante los tres primeros meses del embarazo. En un análisis de 15 estudios prospectivos, Linstrom en 1962 estimó que el riesgo de daño fetal fue del 33% cuando la infección materna ocurrió en el primer mes de embarazo; 25% cuando ocurrió en el segundo mes; 9% en el tercero y 4% en el cuarto mes. No se ha demostrado que las reinfecciones maternas causen daño fetal.

En los años 1976 y 1988 (Figura 18.3) se registraron epidemias de rubéola en la provincia de Córdoba (Argentina). En 1976, se documentaron virológicamente aspectos importantes de la rubéola durante el embarazo. En 83 de las embarazadas que padecieron rubéola, comprobada serológicamente, se pudo conocer el destino final del embarazo y se comprobó que el aborto provocado (40%) constituyó el mayor daño ocasionado por la epidemia. Entre los niños nacidos de madres que padecieron la enfermedad durante el primer trimestre se observó un 21% de defectos evidentes en el período neonatal; sin embargo, la infección congénita se demostró serológicamente en sólo dos de los cuatro niños con malformaciones características de rubéola congénita (catarata bilateral y cardiopatía).

Durante la epidemia de la primavera y principios del verano de 1988, se efectuó el diagnóstico de 529 mujeres embarazadas expuestas al contagio. Estudiando 33 mujeres que llevaron a término su embarazo y que habían padecido primoinfección en el primer trimestre, 2 (6%) sufrieron abortos espontáneos; 22 (66%) tuvieron niños con defectos congénitos atribuibles a la rubéola y, 9 (27%) fueron niños normales hasta el año de edad. De los 22 niños con algún defecto, sólo en 3 (9%) se presentó la sintomatología típica de rubéola congénita. Estos valores son más elevados que los observados en la epidemia de 1976.

2.2.1 Manifestaciones clínicas de la rubéola congénita

Las consecuencias de la infección fetal con virus rubéola pueden ser: 1) aborto espontáneo o niño prematuro; 2) recién nacido normal, que puede continuar normal o mostrar defectos tardíos en la niñez; 3) enfermedad congénita; 4) malformaciones congénitas.

La rubéola congénita puede expresarse con un amplio espectro de manifestaciones clínicas: 1) en la visión: cataratas, microftalmia,

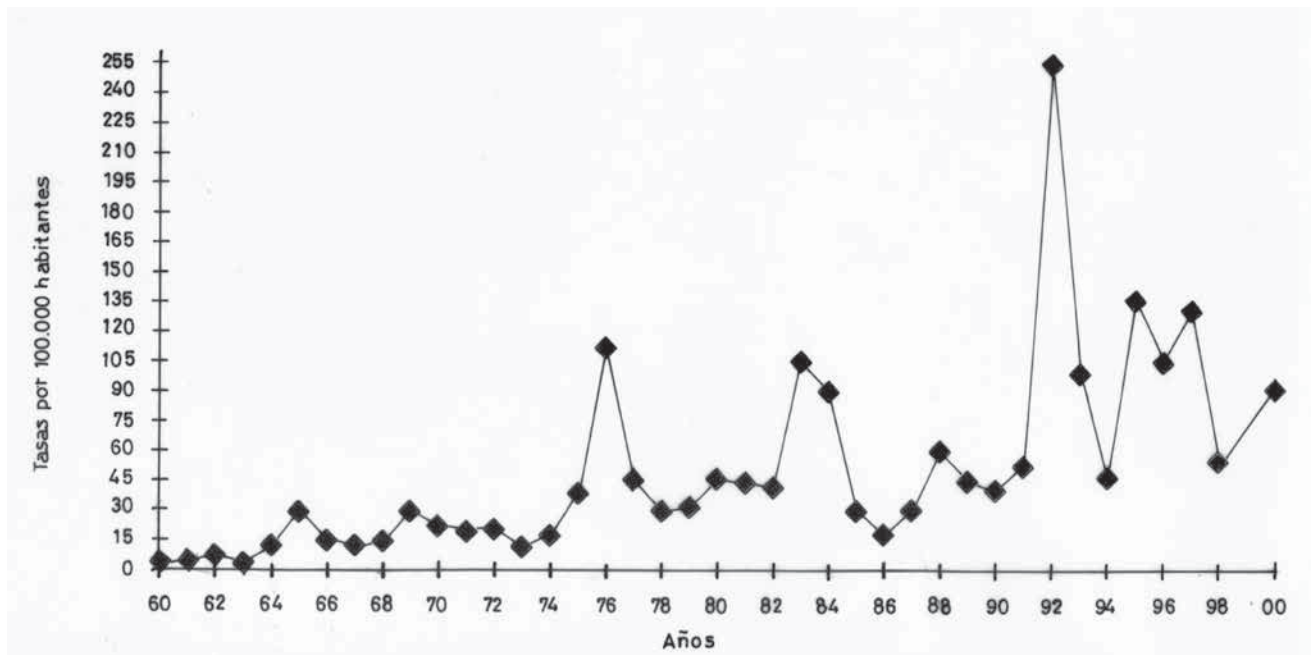


Figura 18.3. Incidencia de rubéola en Argentina, según registro de notificaciones 1960-2000, excluida Capital Federal hasta el año 1977.

retinopatía pigmentaria, opacidad corneana, glaucoma, hipoplasia del iris; 2) en el sistema cardiovascular: ductus arterioso, estrechez de arteria pulmonar o sus ramas, estenosis aórtica y/o renal, comunicación interventricular, miocarditis; 3) en el oído y sistema nervioso central: sordera sensorineural o imperceptiva, autismo, microcefalia, meningoencefalitis, hipotonía, hipertensión endocraneana; 4) otros síntomas: púrpura trombocitopénica, hepato-esplenomegalia, hepatitis y osteopatía.

Durante el primer año de vida los niños con rubéola congénita manifiesta tienen mayor probabilidad de morir que los niños normales. Además, dado que se trata de una infección crónica persistente, sus consecuencias pueden aparecer hasta varios años después del nacimiento como, por ejemplo, ocurre con los defectos en la audición con o sin algún grado de retardo mental.

2.2.2 Patogenia del daño fetal

Diversos factores pueden intervenir en la producción de daño fetal. Las lesiones histopatológicas de la placenta disminuirían el flujo sanguíneo fetal y retardarían su crecimiento. La vasculitis y necrosis endotelial en vasos fetales podrían ser causa de las anomalías vasculares. También se han descrito alteraciones cromosómicas. La demostrada actividad anti-mitótica del virus (*in vitro*), daría origen al retardo de crecimiento intrauterino, a las malformaciones y al menor peso al nacer. La acción citopática del virus, aunque moderada, explicaría el daño de miocardio, oído y otros órganos. La persistencia de la infección viral durante toda la vida intrauterina y parte del primer año de vida mantendría una agresión continua capaz de conducir a meningo-encefalopatía, sordera y otras expresiones tardías de la rubéola congénita.

La infección congénita con rubéola se caracteriza por su prolongada persistencia y eliminación de virus en diversas secreciones. En porcentajes decrecientes desde el nacimiento hasta el primer año de vida, el virus ha sido aislado de mucosa nasal, fauces, líquido cefalorraquídeo, heces, orina y de la mayoría de los tejidos de niños infectados *in utero*. La persistencia viral no ha podido ser explicada por mecanismos inmunológicos; la hipótesis más atractiva sigue siendo la elaborada por Simons en 1968, que postula que la infección intrauterina ocurriría en un número limitado de células fetales, muy inferior al de células no infectadas. Por la acción antimitótica del virus, los clones celulares derivados de estas células infectadas

tendrían una velocidad de duplicación muy inferior a la de las células no infectadas y por lo tanto, durante la maduración fetal y el crecimiento del niño, tales clones irían desapareciendo poco a poco hasta su extinción total. Con la eliminación de los clones infectados, cesaría la persistencia viral. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que parte del daño en el útero es mediado por la respuesta inmune. Se desconoce si los complejos inmunes circulantes, que se detectan en el suero de niños con rubéola congénita, pueden tener algún significado inmunopatogénico. La persistencia viral en tejidos fetales sugiere que ni la respuesta inmune de la madre, ni la respuesta inmune fetal pueden eliminar al virus durante la vida intrauterina. La respuesta inmune humoral de los niños con síndrome de rubéola congénita difiere cualitativamente de la observada en la infección post-natal o en vacunados.

El mecanismo de persistencia del virus rubéola aún no se conoce; sin embargo, la asociación de persistencia viral con la infección *in útero*, pero no con la infección post-natal sugiere una reacción única del hospedero al virus rubéola en las etapas tempranas del desarrollo del embrión. Estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que el virus rubéola induce muerte celular programada (**apoptosis**) en varias líneas celulares. Muchos autores consideran que esta respuesta celular a la infección viral es un mecanismo de defensa innato, autónomo de la célula, destinado a cortar el ciclo de replicación del virus y a evitar la producción de la progenie viral. Por lo tanto, la falta de activación del mecanismo apoptótico podría intervenir en el establecimiento de la infección persistente por virus rubéola en el embrión o feto.

El patrón de expresión de c-oncogenes durante el desarrollo embrionario promueve o inhibe la proliferación celular en momentos determinados. Estos oncogenes celulares que se expresan durante la embriogénesis pueden, al mismo tiempo, estar mediando la conversión de una infección viral aguda en una infección viral persistente. Las células embrionarias o fetales que están proliferando activamente no serían capaces de responder a la infección por virus rubéola poniendo en marcha sus mecanismos de apoptosis; las vías apoptóticas en estas células estarían bloqueadas por los genes promotores de la progresión en el ciclo celular y la proliferación. Así, el virus podría sobrevivir por más tiempo en el feto infectado congénitamente, en comparación con la infección post-natal. Hemos observado que el virus rubéola no induce apoptosis en cultivos primarios de células embrionarias humanas con alto potencial proli-

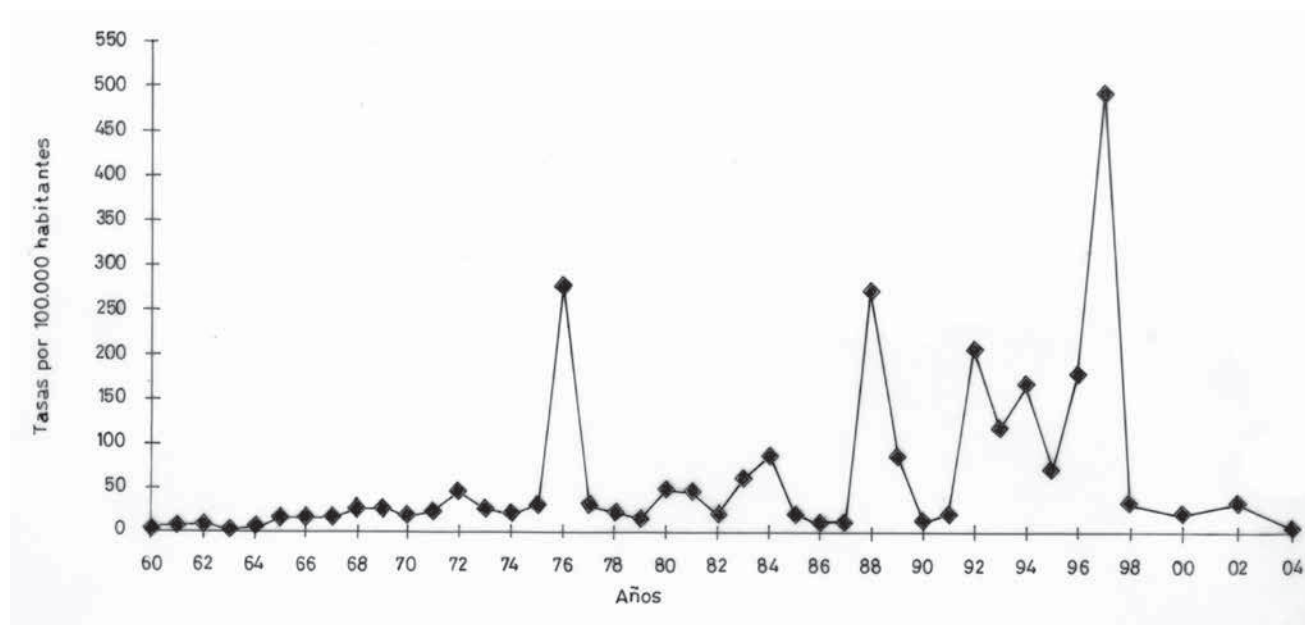


Figura 18.4. Incidencia de rubéola en la provincia de Córdoba, según registro de notificaciones 1960-2004.

ferativo (HEF), a diferencia de lo observado en células de placenta. Es posible que el virus rubéola sea capaz de activar los mecanismos apoptóticos en células de origen embrionario no proliferantes, mientras que para las células en proliferación del embrión, el virus no sería un estímulo suficiente para accionar las vías de muerte celular programada.

Otros estudios *in vitro* demostraron cambios mitocondriales, asociados a la deformación estructural de dichas organelas con presencia de zonas electrón-densas cuya composición se desconoce. Se ignora si estas alteraciones son causa o consecuencia de eventos apoptóticos. Asimismo, se han documentado en diversas líneas celulares alteraciones en el ensamblaje de los filamentos de actina. Ello podría conducir a la inhibición de la mitosis de las células infectadas. Es posible que la eventual afectación de la función mitocondrial, esté asociada a una disminución de su actividad respiratoria, con merma en la producción de ATP, lo que a su vez promovería la desagregación de actina afectando el proceso mitótico.

3. EPIDEMIOLOGÍA

La rubéola es de distribución universal y puede adoptar dos comportamientos diferentes: una forma endemo-epidémica observada en los países con ubicación geográfica continental y otra forma, exclusivamente epidémica, documentada en ciertas islas alejadas del ecuador. En la forma endemo-epidémica, la enfermedad está presente durante todo el año, todos los años, mostrando brotes estacionales en primavera y comienzo del verano y brotes periódicos de mayor magnitud cada 4, 6 ó 9 años.

La principal fuente de contagio la constituyen los niños en edad escolar, ya que en ellos la infección rubeólica post-natal (clínica o subclínica) alcanza su mayor incidencia. Otra posible fuente de contagio es el recién nacido con rubéola congénita que puede excretar altos títulos de virus durante su primer año de vida. Sólo los contactos directos y más o menos continuos son efectivos transmisores. Raramente, un contacto casual o indirecto se concreta en contagio.

La rubéola tiene un período de incubación de 14 a 21 días y el virus está presente en las secreciones orofaríngeas desde 7 días antes hasta 3 días después de la erupción. Sin embargo, el período de máxima transmisibilidad transcurre entre los 2 ó 3 días previos y el día posterior al exantema (Figura 18.1). La rubéola, a diferencia del sarampión, cursa a menudo en forma subclínica, entendiéndose por tal a las formas anéruptivas o inaparentes, sean o no asintomáticas

por completo. Durante un brote ocurrido en una institución cerrada con niños menores de 15 años y donde la tasa de infección fue 100% en los susceptibles, Horstman y col. observaron una relación de 1:1 entre infecciones aparentes e inaparentes. Sin embargo, otros autores postulan que en mayores de 15 años habría una relación 9:1, es decir, que sólo el 10% de esas infecciones serían inaparentes.

Si bien la infección rubeólica natural, como la mayoría de las infecciones virales exantemáticas, confiere inmunidad permanente, los individuos con títulos bajos de anticuerpos suelen presentar reinfecciones. La frecuencia de reinfecciones es más alta en vacunados.

Dados los riesgos de infección fetal, es importante conocer el estado inmune de las mujeres en edad fértil. En todo el mundo, la prevalencia de anticuerpos anti-rubéola en esa población es de aproximadamente el 70%, si bien en algunas áreas, en especial rurales, puede ser menor.

En los países desarrollados, los programas de vacunación sistemática han aumentado la seroprevalencia de anticuerpos y por ello la rubéola es de muy escasa frecuencia. En EE.UU., la epidemiología de rubéola ha cambiado sustancialmente a partir de los años 90 debido a la vacunación. El mayor número de casos se presenta en población adulta (15 a 45 años), con preferencia en el sexo masculino. En nuestro país también se ha observado este fenómeno.

3.1 EPIDEMIOLOGÍA EN ARGENTINA

En Argentina, al igual que en otros países de ubicación continental, la rubéola es endemo-epidémica. Desde que existen registros de notificación (1961), se comprueba la presencia continua de esta enfermedad en todos los meses de todos los años. Sobre esta línea de base que define la endemia, se observan los ciclos de mayor incidencia, uno anual, que define los brotes estacionales, y otro periódico, que coincide con los brotes estacionales pero que sucede en diferentes años. Dichos brotes se inician en julio o agosto y alcanzan su pico entre octubre y diciembre y declinan en febrero o marzo.

La Figura 18.3 muestra la incidencia de rubéola en Argentina desde 1960 hasta diciembre de 2000. Desde 1960 a 1991 se han registrado ondas endémicas en los años 1965, 1969, 1976, 1983-84, 1988, 1992, 1995, 1997 y 2000. La Figura 18.4 muestra la incidencia para la provincia de Córdoba hasta diciembre de 2004. En Córdoba, a partir de 1972, estas epidemias han sido confirmadas en nuestro laboratorio por serología y por aislamiento. Resulta llamativa la epidemia

de 1997 en la que se observaron 18 casos de síndrome de rubéola congénita (Dra. L. Asis, Hospital Neonatal, comunicación personal).

3.2 DISTRIBUCIÓN ETARIA Y PREVALENCIA

La distribución etaria en años inter-epidémicos muestra un predominio en la edad pre-escolar, mientras que en años epidémicos el predominio se registra en edad escolar. Para explicar la ocurrencia de ciclos epidémicos periódicos, podría postularse que para circular libremente, el virus rubéola necesita disponer de suficientes niños susceptibles en un ambiente propicio de contacto interhumano, como la escuela. Cuando el número de susceptibles disminuye, como consecuencia de una epidemia, el virus circularía en una forma controlada hasta que existan nuevamente suficientes individuos susceptibles para crear otra vez las condiciones para una epidemia.

La rubéola es una enfermedad de la niñez y su máxima incidencia se observa en los grupos de 1 a 9 años y de 10 a 14 años. Sin embargo, cierto porcentaje de la población alcanza la edad adulta no habiendo sido infectado. En diferentes lugares del mundo han demostrado que ese porcentaje es cercano al 20% en mujeres en edad gestacional.

En Córdoba, Argentina, la seroprevalencia en 712 mujeres durante 1972-73 (años no epidémicos) mostró 86% de positividad y, durante un año epidémico (1976-77) 91% de positividad. En el 2004, otro estudio sobre estado inmune para rubéola de 100 embarazadas de una clínica privada de la Ciudad de Córdoba, demostró 100% de seroprevalencia de IgG. Esta cifra puede deberse a la vacunación de esa población, previo al embarazo.

En un estudio epidemiológico realizado en Sudamérica por investigadores del ECLAM (*Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations, WHO Collaborative Centre for the Prevention of Birth Defects*) se propone un sistema de vigilancia del síndrome de rubéola congénita basado exclusivamente en datos clínicos del recién nacido. Se registraron dichos datos de 43 niños con síndrome de rubéola congénita sobre 19 184 recién nacidos malformados de un total de 3 883 165 nacimientos (período 1982-2003) en 10 países de Latinoamérica. Los resultados

de ese estudio determinaron que la díada que comprende anomalías oculares más defectos cardíacos era el mejor marcador centinela, dentro de todos los marcadores estudiados, para detectar síndrome de rubéola congénita. Se propone este método como centinela para monitorear la eficacia de las políticas de vacunación en países en desarrollo.

4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico virológico de rubéola ha sido desarrollado para cuatro situaciones:

1. Determinación del estado inmune previo al embarazo
2. Diagnóstico de rubéola post-natal
3. Diagnóstico de rubéola congénita
4. Diagnóstico pre-natal

4.1 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

El virus rubéola es de difícil cultivo, por ello el diagnóstico de la enfermedad se determina habitualmente por serología (Figura 18.1). El aislamiento del virus en cultivo se utilizaba anteriormente para confirmar epidemias y, en la actualidad se emplea sólo para obtener cepas con el objeto de realizar la genotipificación de los aislamientos.

Los anticuerpos IgM aparecen pocos días después del exantema, alcanzan su pico a los 10 días de la aparición de los síntomas y luego disminuyen a niveles indetectables en semanas o meses. Esta rápida aparición de la IgM tiene un enorme valor en el diagnóstico. Los anticuerpos IgG alcanzan su pico a los 10-15 días y permanecen detectables durante décadas y hasta por vida.

Numerosos métodos se han desarrollado para el diagnóstico serológico:

- 1) Inhibición de la hemaglutinación (IHA). Fue el primer método utilizado y es el considerado estándar por la Organización Mundial de la Salud. Este método dosa IgG e IgM totales específicas. Se basa en la detección de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, que fueron inducidos por antígenos glicoproteicos de la

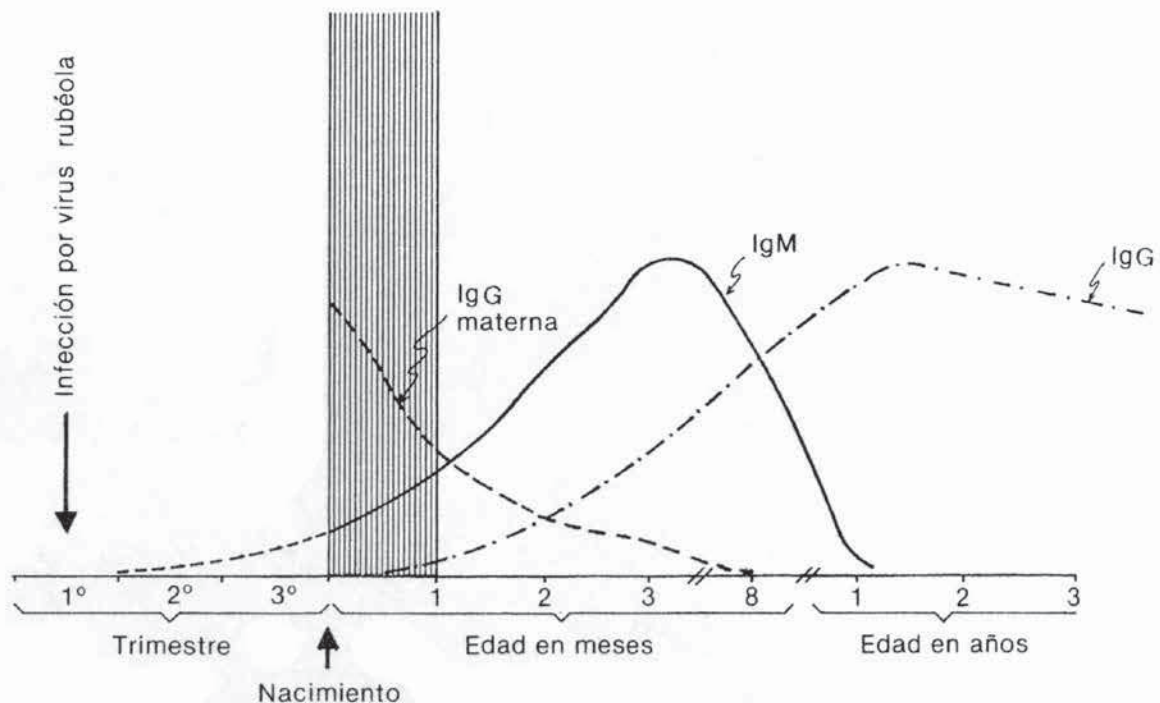


Figura 18.5. Rubéola congénita: excreción de virus y respuesta de anticuerpos.

envoltura viral (Capítulo 3). Estos anticuerpos se correlacionan con los anticuerpos neutralizantes y su presencia indica protección contra una nueva infección con el virus. Los títulos iguales o mayores a 8 (el título corresponde a la inversa de la máxima dilución que da positiva la reacción), se consideran protectores. Previo a la realización de esta prueba deben tratarse los sueros para eliminar inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación (beta lipoproteínas que compiten con los anticuerpos específicos). La incorrecta eliminación de estos inhibidores puede dar resultados falsamente positivos; por esta razón este procedimiento se realiza en laboratorios especializados.

2) Enzimoinmunoanálisis (ELISA). A partir de 1983 se desarrollaron numerosas técnicas de ELISA para detectar IgM o IgG específicas para rubéola. Existen reactivos comerciales, lo que permite que laboratorios no especializados puedan realizar esta serología. Sin embargo, es necesario resaltar que los resultados deben ser correctamente interpretados, en el marco de la historia clínica y los datos epidemiológicos. Estas pruebas se informan como positivas (inmune), si es mayor a 15 UI/ml, o negativas (no inmune).

La determinación de IgM por ELISA debe estar muy bien controlada, ya que la presencia de los factores reumatoideos en la muestra interfiere en la prueba dando valores falsos positivos. Por ello, estos factores deben eliminarse del suero antes de la realización de esta prueba. Asimismo, la IgG específica en altas concentraciones, compite con la IgM por el antígeno, pudiendo dar resultados falsos negativos (Ver Capítulo 9 *Diagnóstico Viroológico*).

3) Hemaglutinación pasiva. Es una prueba más rápida y menos compleja que la IHA. Se utiliza para realizar tamizajes o pruebas de *screening*, con el objeto de determinar el estado inmune a rubéola, pero no se la recomienda para cuantificar anticuerpos o confirmar enfermedad. Los resultados son expresados como positivos (inmune) o negativos (no inmune). No se requiere tratamiento previo del suero, pero los títulos positivos bajos son de muy difícil lectura.

4.2 SITUACIONES DIAGNÓSTICAS

4.2.1 Determinación del estado inmune

Esta serología debe ser solicitada por el médico de familia o por el ginecólogo en toda mujer en edad gestacional y en la embarazada en la primera consulta.

Para la determinación de estado inmune es necesaria sólo una muestra de suero, en la que un título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IHA) igual o mayor a 8, o valores que se correlacionen –si se emplean otras técnicas– indica protección. Si la detección de anticuerpos se realiza por ELISA, el valor de corte para determinar protección varía de acuerdo al equipo comercial utilizado expresándose los resultados como un índice.

En las mujeres en edad fértil no embarazadas y con serología negativa deberá indicarse la vacunación anti-rubéola. Esta vacunación está absolutamente contraindicada si la paciente está embarazada, ya que la vacuna anti-rubéólica contiene virus vivo y atenuado. Las embarazadas con serología negativa deben evitar el contacto con pacientes con rubéola y realizar controles serológicos durante el embarazo.

Tanto la infección natural como la vacunación inducen anticuerpos protectores contra una nueva infección por rubéola.

4.2.2 Diagnóstico de rubéola post-natal

Embarazadas sin conocimiento de su estado inmune:

a) Embarazadas con diagnóstico clínico de rubéola

La presencia de IgM específica a cualquier título indica primoinfección con rubéola. En nuestra experiencia, en muestras únicas obtenidas entre los 3 y 30 días posteriores al exantema, es posible diagnosticar la primoinfección en el 100% de los casos mediante dosaje de IgM específica.

Anteriormente, cuando las pruebas de IgM no estaban disponibles, el diagnóstico de certeza se realizaba mediante detección de la conversión serológica en dos muestras pareadas de suero, la

primera obtenida durante el exantema y la segunda a los 15-20 días posteriores. El diagnóstico de primoinfección se confirmaba si la primera muestra era negativa y la segunda positiva, o si se detectaba un aumento de cuatro o más veces en el título de anticuerpos entre ambas muestras.

b) Embarazadas en contacto con pacientes con rubéola

Si la embarazada es inmune no debe preocuparse frente al contacto con pacientes cursando la infección. Por el contrario, si no conoce su estado inmune se recomienda que concurra de inmediato al laboratorio dentro de los primeros siete días de ocurrido el contacto. Así, el laboratorio tiene la posibilidad de determinar la presencia de anticuerpos IgG anteriores a dicho contacto en esa única muestra de suero. Recordamos que desde siete días antes de la erupción el contacto elimina virus, los que sumados a los siete días de plazo máximo para concurrir al laboratorio completan el tiempo teórico mínimo de 14 días del periodo de incubación de la enfermedad. Por lo tanto, los anticuerpos determinados en esta única muestra de suero corresponden a anticuerpos anteriores al contacto.

Si la embarazada concurre al laboratorio después de los siete días del contacto, y su suero resulta positivo deberá realizarse la detección de IgM específica para confirmar o descartar una infección reciente.

4.2.3 Rubéola congénita

Si se sospecha una infección congénita por rubéola en el recién nacido (con o sin clínica compatible) debe solicitarse la determinación de IgM específica en sangre de cordón umbilical. Si el resultado es positivo quedará confirmada la infección congénita. Cuando este método no estaba disponible se realizaba el estudio de la cinética de anticuerpos totales, con sueros obtenidos en el primer, tercer y séptimo mes posteriores al nacimiento (Figura 5). Dada la transferencia pasiva de IgG anti-rubéola de la madre al feto por vía transplacentaria, se podría observar un alto título de anticuerpos en el suero del niño durante el primer mes de vida extrauterina, y luego un descenso del título hasta negativizarse en sucesivas muestras.

Otros procedimientos que pueden emplearse son el aislamiento del virus en cultivo de células VERO o RK 13 o bien la RT-PCR para detectar el genoma viral en hisopados nasofaríngeos y sangre del cordón umbilical.

4.2.4 Diagnóstico prenatal

El diagnóstico pre-natal puede intentarse mediante una RT-PCR para detección del genoma viral en muestras de líquido amniótico (obtenido por amniocentesis) o de vellosidades coriónicas entre las semanas 17 y 21 de gestación. En estos procedimientos, además del riesgo por la obtención de la muestra, no siempre se logran resultados verdaderos de infección del feto, ya que puede llegarse a un resultado positivo en líquido amniótico y vellosidades coriónicas y no estar infectado el feto.

También puede detectarse IgM específica en sangre fetal obtenida por cordocentesis entre las semanas 21 y 23 de gestación.

5. PROFILAXIS Y VACUNACIÓN

Actualmente, existen vacunas seguras y efectivas para rubéola. Estas vacunas son a virus vivo y atenuado y pueden contener las cepas RA 27/3 o la cepa Cendehill. Ambas cepas inducen anticuerpos circulantes protectores y también IgA en mucosas, lo que permite bloquear la puerta de entrada. La respuesta serológica y el título de anticuerpos que ambas vacunas inducen es similar al de la infección natural, aunque la frecuencia de reinfecciones es más alta en vacunados que en aquellos que padecieron la infección natural.

Existen dos estrategias de vacunación. Una consiste en vacunar a todos los niños para evitar la circulación del virus en la población; es la metodología empleada en EE.UU. La otra estrategia, que requiere realizar previamente la detección del estado inmune, es vacunar sólo a las mujeres en edad fértil no inmunes y en contacto con niños (maestras, personal de salud); es la usada en Inglaterra.

Las últimas normas nacionales de vacunación para la República Argentina (2013) indican aplicar la vacuna Triple Viral (SRP: Sarampión-Rubéola-Parotiditis – MMR: *Measles, Mumps, Rubella*) en tres dosis: 1ª dosis a los 12 meses de edad; 2ª dosis a los 5-6 años y la 3ª dosis (refuerzo) a los 11 años de edad, si el niño no recibió previamente dos dosis de Triple Viral, o bien una dosis de Triple Viral más una dosis de Doble Viral.

Se destaca que, si por razones epidemiológicas se hiciera necesario administrar refuerzos de vacuna anti-sarampión, debe emplearse una vacuna monovalente –para sarampión solamente– ya que las excesivas dosis de SRP pueden generar artropatías inespecíficas por dosis excesivas de virus rubéola.

Debido a que la vacuna es a virus vivo y atenuado y produce viremia, está contraindicada durante el embarazo. Además, la mujer vacunada debe evitar la concepción en los tres meses siguientes a

la vacunación, ya que se han detectado casos de infección fetal por cepas vacunales.

Varios estudios sobre la utilización de gammaglobulina humana han demostrado que no evita la viremia y, en muchos casos, puede enmascarar o retrasar la aparición del exantema.

La autora quiere expresar su reconocimiento al Dr. Américo Márquez, quien inició el estudio de la rubéola en Argentina y trabajó en este tema hasta enero de 1989, fecha de su fallecimiento, brindándonos toda su experiencia y el apoyo que hace posible que continúe en esta línea de trabajo.

NOTA

Este capítulo se terminó de escribir en el año 2008, habiendo actualizado los compiladores de la obra, el plan de vacunación vigente en Argentina al año 2013.

Bibliografía

- Adamo P, Asís L, Silveyra P, Cuffini C, Pedranti M, Zapata M. "Rubella virus does not induce apoptosis in primary human embryo fibroblasts cultures: a possible way of viral persistence in congenital infection". *Viral Immunol* 2004; 17: 87-10.
- Andrews JJ. "Diagnosis of fetal infections". *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; 16: 163-6.
- Best JM. "Laboratory diagnosis of intrauterine and perinatal virus infections". *Clin Diagn Virol* 1996; 5: 121-9.
- Best JM, O'Shea S, Tipples G, Davies N, Al-Khusaiby SM, Krause A, et al. "Interpretation of Rubella serology in pregnancy: pitfalls and problems". *BMJ* 2002; 325: 147-8.
- Burke JP, Hinman AR, et al. "International Symposium on prevention of Congenital rubella infection" Washington, D.C., March 13-15, 1984. *Rev Infect Dis* 1985; 7 S 1-S 212.
- Frey TK. "Molecular biology of rubella virus". *Adv Virus Res* 1994; 44: 69-160.
- Márquez A, Zapata MT. "Comportamiento epidemiológico de la rubéola en la provincia de Córdoba, Argentina". *Bol Oficina Sanit Panam* 1984;97(1):14-15.
- Márquez A, Zapata MT. "Rubéola y embarazo: control serológico en la determinación de riesgos y daños". *Bol Oficina Sanit Panam* 1984;97:95-109.
- Rittler M, López Camelo J, Castilla EE. "Monitoring congenital rubella embriopathy". *Birth Def Res* 2004; 70: 939-43.
- Wolinsky JS. "Rubella". En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al.(ed), *Fields Virology*, 3ª ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996; 899-929.

Parvovirus

Guadalupe Carballal - José Raúl Oubiña

La familia *Parvoviridae* (del latín *parvus* = pequeño) está compuesta por virus pequeños, con DNA de cadena única. Esta familia incluye dos subfamilias: *Parvovirinae* (cuyos miembros infectan a vertebrados) y *Densovirinae* (que infectan exclusivamente a insectos, siendo la especie tipo el virus de la densonucleosis y cuyo nombre refiere los característicos cambios que produce en el núcleo celular).

La subfamilia *Parvovirinae* se subdivide en cinco géneros *Erythrovirus*, *Bocavirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* y *Parvovirus*. Hasta el presente sólo se han detectado parvovirus patógenos humanos entre los dos primeros géneros, el erythrovirus B19 humano (y otras variantes relacionadas) y el bocavirus humano. El término *Erythrovirus* hace referencia a que estos virus replican en células progenitoras eritroides. Los miembros del género *Bocavirus* se incluyen con esta denominación teniendo en consideración las letras iniciales de los parvovirus bovino y canino, respectivamente [*Bovine parvovirus*; *Canine parvovirus*]. Los miembros del género *Dependovirus* exhiben la necesidad de replicar con la colaboración de un virus ayudador. Este género incluye virus asociados a infecciones asintomáticas en el ser humano y en primates. Son los parvovirus adeno-asociados o herpes-asociados. Estos virus han sido empleados como vectores para la transducción de genes y en terapia génica. Los *Amdovirus* deben su nombre a las iniciales del virus de la enfermedad del visón aleutiano [*Aleutian mink disease*]. Finalmente, el género *Parvovirus* incluye numerosos virus de animales domésticos (parvovirus felino, parvovirus canino, parvovirus porcino, etc.).

1. EL DESCUBRIMIENTO DE ERYTHROVIRUS Y BOCAVIRUS HUMANOS

Los parvovirus han despertado el interés de distintas áreas de la ciencia. Dado que muchos parvovirus producen enfermedades en animales, estos virus fueron estudiados en Medicina Veterinaria. Algunas de estas enfermedades –como la enfermedad del visón aleutiano– han servido como modelo para estudiar enfermedades humanas, ya que su patogenia está asociada a complejos inmunes. Antes del descubrimiento del erythrovirus humano B19, en Microbiología ya se estudiaban los parvovirus como causantes de contaminación en cultivos celulares y, finalmente, en Biología Molecular estos virus han resultado interesantes para estudiar mecanismos de regulación genética dado el pequeño tamaño de su genoma. A diferencia de otros virus a DNA, los parvovirus no codifican genes que inducen la entrada de las células en fase S y por lo tanto, sólo pueden replicar en células que estén en multiplicación activa.

El erythrovirus B19 (Parvovirus B19 hasta su reclasificación por el Comité Internacional de Virus en 1995) fue descubierto en 1974 por Yvonne Cossart, una viróloga australiana que se desempeñaba en un laboratorio de Londres, durante una evaluación de pruebas diagnósticas para hepatitis B, en la cual comparaba sensibilidad y especificidad para detección del antígeno de superficie del virus homónimo (HBsAg) por contrainmunolectroforesis (CIE), hemaglutinación reversa pasiva (HRP) y radioinmunoensayo (RIA). Esta investigadora observó que 3 sueros de los 3.000 estudiados resultaron positivos para HBsAg por CIE, pero no por técnicas más sensibles como HRP o RIA. Uno de estos sueros fue

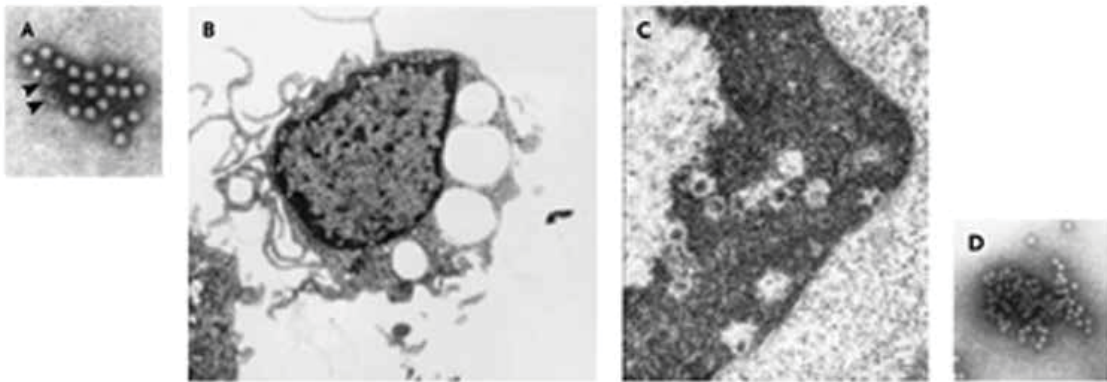


Figura 19.1. Microfotografía electrónica de transmisión mostrando partículas del erithrovirus B19 en suero y células, y cápsides recombinantes. (El panel A se reproduce con permiso de Y. Cossart; los paneles B, C y D se reproducen con autorización del *New England Journal of Medicine*). **Panel A:** partículas icosaédricas de aproximadamente 25 nm de diámetro y cápsides vacías, indicadas con el "extremo de flechas" (x 189.000). Cortesía de la Dra. Ivonne Cossart. **Panel B:** células progenitoras eritroides infectadas *in vitro* con B19. Obsérvese la presencia de vacuolas y pseudópodos citoplasmáticos (x 10.000). **Panel C:** Parte del panel B, observado a mayor aumento. La cromatina marginada contiene cápsides ensambladas (x 100.000). **Panel D:** partículas vacías del virus B19 producidas mediante ingeniería genética en un sistema eucariótico de expresión, basado en la utilización de baculovirus (un virus que infecta insectos). Este virus posee un promotor –con significativa actividad– que regula la expresión de la proteína poliedrina. Bajo su regulación –y luego de manipulaciones *in vitro* para la transferencia de genes– puede producirse en células de insecto gran cantidad de proteína codificada por un gen de interés, en este caso correspondiente a la cápside del B19. Fotos publicadas en *N Eng J Med* 2004, 350: 586-97. Autorizadas para la publicación en este libro.

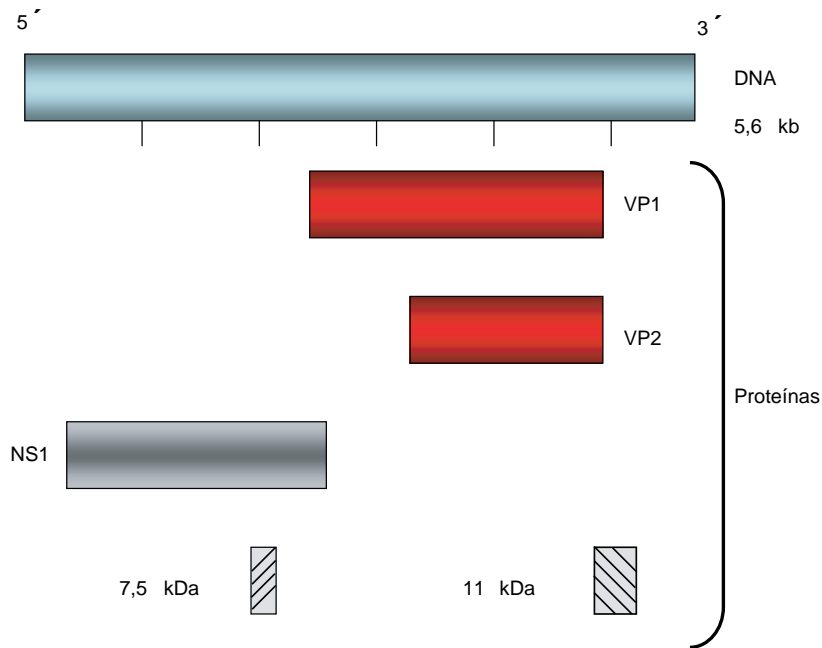


Figura 19.2. Representación esquemática del genoma del erythrovirus B19 y su correlación con las proteínas codificadas en él.

incluido en un panel de control rotulado con el número B19 (ubicación 19 en la placa B). Cossart descubrió que ese suero contenía el antígeno de un virus desconocido ya que el anticuerpo empleado en la CIE era de origen humano, mientras que el anticuerpo usado en las técnicas de HRP y RIA se había obtenido de animales hiperrinmunizados con HBsAg purificado. La ausencia de identidad del nuevo antígeno viral con respecto al HBsAg se demostró mediante pruebas de inmunodifusión en gel de agar (Ouchterlony).

Posteriormente, los estudios de microscopía electrónica revelaron que el suero que contenía el nuevo antígeno presentaba unas partículas esféricas (y algunas también vacías) de muy pequeño tamaño, características de la familia *Parvoviridae*; (véase la Figura 19.1, panel A). Este antígeno fue identificado en los sueros de un hemodante, de un caso de hepatitis B y de otro con trasplante renal. Además, los sueros de convalecencia de esos individuos demostraron ausencia de las partículas virales y la aparición de seroconversión.

El nuevo virus fue denominado B19 y durante muchos años fue "un virus en busca de una enfermedad". Recién en 1981 se pudo asociar al erythrovirus B19 con crisis de anemia aplásica en niños que padecían, además, de anemia falciforme. Luego, se determinó fehacientemente que este virus es el agente etiológico del eritema infeccioso, también denominado megalocitosis, quinta enfermedad exantemática o enfermedad de Tschermer-Escherich. El B19 fue el primer miembro de la familia *Parvoviridae* asociado a una enfermedad humana.

En 1999 Quan Tri Nguyen y otros investigadores franceses detectaron una nueva variante de parvovirus (**V9**) asociada a crisis de anemia aplásica en un niño cuyos estudios virológicos para B19 eran negativos (Ig M no detectable y productos de DNA amplificados por PCR que no hibridaban con una sonda específica para B19). Este mismo investigador descubrió en 2002 otra variante viral (**A6**) de *Erythrovirus* en un paciente anémico con serología positiva para HIV. Tanto el V9 como el A6 exhiben una similitud de apenas un 88% con secuencias nucleotídicas del genoma completo de B19, comparada con un 99% detectada entre cepas de B19. El análisis filogenético de secuencias nucleotídicas clasifica al B19 en el genotipo 1 y a las de V9 y A6 en los genotipos 2 y 3, respectivamente.

En 2005, mediante SISPA (*sequence independent single primer amplification*) PCR –una técnica de Biología molecular para

detectar genomas desconocidos– Tobias Allander trabajando en el laboratorio de Björn Andersson descubrió un nuevo parvovirus, provisionalmente designado **bocavirus humano (HBoV)**, en aspirados nasofaríngeos de niños afectados por infecciones respiratorias bajas cuyas muestras clínicas habían sido derivadas al Hospital Universitario Karolinska de Suecia. El espectro real de enfermedades respiratorias asociadas a este nuevo agente, así como la prevalencia de la infección, están aún en evaluación, aunque es frecuente la observación de tos, rinorrea y fiebre. Se ha detectado el HBoV en casos de rinitis, bronquitis, bronquiolitis y neumonías. Se ha documentado que HBoV afecta especialmente la población pediátrica comprendida entre 6 y 24 meses, siendo su incidencia en patología del tracto inferior sólo superada por el virus respiratorio sincicial y por adenovirus. Es frecuente la coinfección con dichos agentes. Se investiga la asociación del HBoV en casos de infección respiratoria con tos paroxística semejante a la observada en infectados con *Bordetella pertussis*, así como con diarrea.

También en 2005, Morris S. Jones y cols. en San Francisco, EE.UU., detectaron –mediante la misma técnica utilizada por Allander para detectar genomas desconocidos– el DNA de un nuevo parvovirus humano en un paciente con síndrome viral agudo, al que designaron **Parvovirus 4**. Hasta el presente no se ha establecido su patogenicidad para humanos.

A continuación –dado lo reciente del descubrimiento del HBoV y la consiguiente escasez de información– se hará especial énfasis en la infección causada por el Erythrovirus B19. El lector observará que aún en la bibliografía actual, se hace referencia todavía a este agente bajo la denominación (anterior) de Parvovirus humano B19.

2. ESTRUCTURA

El erythrovirus B19 es un virus desnudo, de simetría icosaédrica y su tamaño es de 20-25 nm (Figura 19.1 A); su peso molecular es de $5-6 \times 10^6$ Da. Su DNA es monocatenario. El virión contiene dos proteínas de la cápside: VP1 (80 kDa) y VP2 (60 kDa). La proteína VP2 es un producto truncado en el extremo amino-terminal de la VP1. Por su abundancia, VP2 es la proteína principal de la cápside constituyendo un 90-96 % de su estructura (Figura 19.1 C y D, y Figura 19.2).

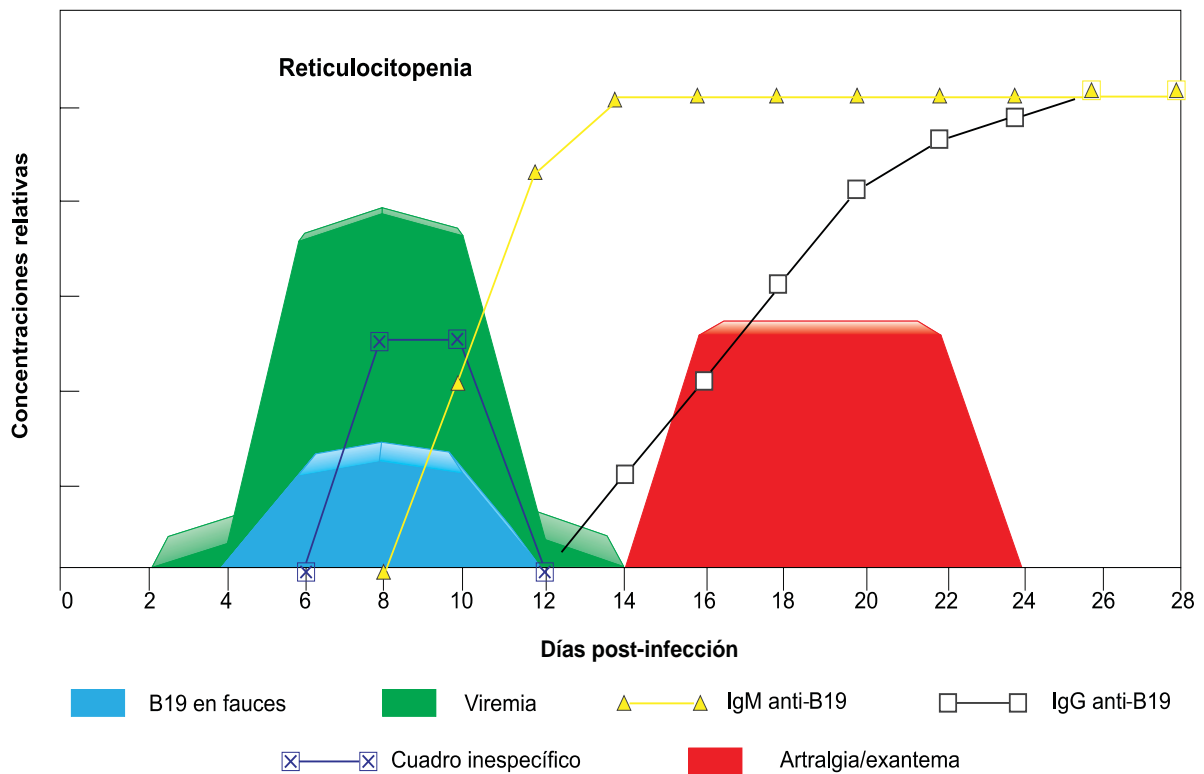


Figura 19.3. Diagrama del curso de la infección por el virus B19.

La proteína VP1 contiene una región única de 227 aa que se expone por fuera de la superficie de la cápside y que se presume interacciona con el receptor celular. La actividad de fosfolipasa de VP1 sugiere que esta proteína participa en el ingreso a la célula. Un tercer producto génico corresponde a la proteína denominada "no estructural" NS1 (aunque una copia está unida al DNA en el virión), cuya función no es totalmente conocida, pero que regula el promotor viral y parece participar de la replicación de B19. NS1 actúa también como ATPasa, helicasa y endonucleasa sitio-específica. Esta proteína ha cobrado relevancia en los últimos años por estar asociada a la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y al disparo de eventos de apoptosis celular mediados por TNF α , así como también por la vía intrínseca mediada por caspasa 9, lo que podría proveer un mecanismo alternativo al de la infección lítica para algunas de las manifestaciones clínicas. La proteína NS p11 participa en la producción de viriones y el tráfico intracelular. Se desconoce aún el rol de NS p7,5.

El genoma del B19 está constituido por una molécula lineal de 5,6 kb de DNA con estructuras tipo asa o rulo bicatenarias en sus dos extremos 5' y 3'. El erythrovirus B19 encapsida cantidades equivalentes de DNA de polaridad positiva y negativa, a diferencia de la mayoría de los parvovirus de replicación autónoma que empaquetan habitualmente cadenas de polaridad negativa. El empaquetamiento indistinto de una u otra cadena es característica de los dependovirus.

En el B19 existen secuencias nucleotídicas palindrómicas (del griego *palin* = volver y *dromos* = carrera: "desandar camino"); secuencias que son idénticas –leídas en uno u otro sentido– que abarcan más de 300 nucleótidos y permiten la formación de las asas mencionadas mediante apareamiento de bases complementarias que se estabilizan por puentes de hidrógeno. El extremo 5' es evidentemente una secuencia repetitiva terminal que podría hibridar también con el extremo 3'. Hasta el presente se han descrito tres genotipos de B19.

3. REPLICACIÓN

El receptor celular del erythrovirus B19 es el antígeno P (un globósido, es decir un glucoesfingolípido neutro que funciona como antígeno

de grupo sanguíneo) de los eritrocitos, presente en la membrana de las células eritroides de pacientes, lo que explica la selectividad del virus por infectar la serie roja.

El erythrovirus B19 no replica en líneas celulares convencionales en cultivo, si bien se ha logrado su replicación en cultivos de médula ósea suplementados con eritropoyetina. En las células progenitoras eritroides infectadas *in vitro* con B19 se observan vacuolas y pseudópodos citoplasmáticos (Figura 19.1B).

El genoma del B19 contiene un marco abierto de lectura principal hacia el extremo izquierdo que codifica una proteína no estructural (NS1) y hacia el extremo derecho otro marco abierto de lectura para las proteínas estructurales VP1 y VP2. NS1 interactúa directamente con el promotor viral p6 y con factores de transcripción celulares.

El modelo de replicación del B19 establece que: 1) no existe una síntesis discontinua ni retrasada de las cadenas; 2) en ambos estadios de la síntesis de DNA, las secuencias terminales de las asas son utilizadas como cebadores; una o más DNA polimerasas celulares han sido implicadas en dicha síntesis, ignorándose si son requeridas ciertas enzimas similares a las topoisomerasas; y 3) el modelo predice sitios específicos de clivaje de intermediarios de replicación; el intermediario replicativo consiste obligatoriamente en una estructura dimérica.

Existen múltiples transcritos producidos por uniones tipo "*splicing*" (corte y empalme) del RNA. Los eventos durante la síntesis de proteínas son poco conocidos, aunque parecería que la de las proteínas no estructurales precede a la de las VP1 y VP2, ya que es necesaria su presencia para activar el promotor de estas últimas.

Llamativamente, se ha demostrado que el genoma a DNA monocatenario de B19 exhibe una tasa de sustitución nucleotídica muy superior (1×10^{-4} sustituciones por sitio por año) a la observada en virus a DNA bicatenarios, ya sea con genomas grandes (herpesvirus) o pequeños (papilomavirus). Esta alta tasa de mutación del B19 es semejante a la de virus a RNA, proveyéndole una conformación poblacional compatible con el concepto de cuasiespecies virales.

Cuadro	Temporalidad (aguda o crónica)	Hospedador
Eritema infeccioso (5 ^{ta} enfermedad) o megalocitopenia	Aguda	Niños normales
Crisis de anemia aplásica	Aguda	Individuos con eritropoyesis aumentada debido a anemias hemolíticas crónicas
Artralgia y artritis	Aguda o crónica	Adultos normales
Aborto Anemia congénita <i>Hydrops fetalis</i>	Aguda o crónica	Feto
Infección persistente con anemia	Crónica	Inmunosuprimidos o inmunodeprimidos (etiología congénita o adquirida: por ej. inmunodeficiencias primarias; HIV, medicación)

Tabla 19.1. Manifestaciones clínicas de la infección con erythrovirus B19.

4. PATOGÉNESIS

El erythrovirus B19 afecta exclusivamente al ser humano. Raramente, algunos individuos (1:200.000) carecen del receptor P, por lo que aparentemente no pueden infectarse con este agente. La expresión del receptor P exhibe niveles máximos en el primer trimestre del embarazo en las células de las vellosidades trofoblásticas, declinando subsiguientemente para ser indetectable hacia el final de la gestación. Las $\alpha 5 \beta 1$ integrinas pueden funcionar como correceptores que son esenciales para el ingreso viral. También se ha demostrado recientemente el ingreso viral a células de linaje no eritroide a través de la interacción con anticuerpos y receptores Fc (proceso conocido como potenciación viral o *viral enhancement*) un evento conocido en la patogénesis de la infección por virus dengue. El receptor P está también presente en plaquetas, hígado, miocardio fetal, pulmón, riñón, endotelio, sinovia y en células de las vellosidades trofoblásticas del tejido placentario.

Sin embargo, la mera presencia del receptor P en dichas células/tejidos (no permisiva/os) es insuficiente para permitir la replicación del B19 que conduzca a la muerte celular, como ocurre en las progenitoras eritroides por la apoptosis inducida por p11 y mediada por la caspasa 10.

El erythrovirus B19 penetra por mucosa respiratoria y replica solamente en las células que están en mitosis. La replicación ocurre en el núcleo celular y depende de la expresión de funciones celulares que ocurren durante la fase tardía S o temprana G2 de la mitosis. Por ello, la replicación será más eficiente en aquellos tejidos de división celular rápida (sistema hematopoyético). La infección viral productiva sólo ocurre en células progenitoras de estirpe eritroide, próximas al estado de pronormoblasto. La viremia alcanza niveles elevados (10^6 a 10^{11} partículas por ml); ocurre habitualmente al cabo de una semana de infección y persiste habitualmente alrededor de 5 días (Figura 19.3).

La eritroblastopenia transitoria es la característica saliente de la infección por B19 en la médula ósea. El examen de ésta revela hipoplasia de la serie eritroide y detención de la maduración celular, observándose frecuentemente pronormoblastos gigantes con inclusiones virales intranucleares.

La reticulocitopenia ocurre alrededor de 7 a 10 días desde el comienzo de la viremia. La anemia es sólo observada en pacientes con hemólisis, ya que es necesaria una vida media acortada de los eritrocitos para poner en evidencia la disminución en la eritropoyesis. Esto ocurre por ejemplo, en las anemias hemolíticas como la anemia falciforme, etc.

La infección por el B19 puede conducir a una crisis hipoproliferativa en aquellos pacientes que padecen esferocitosis u otras afecciones que alteran la viabilidad de los eritrocitos.

La infección por el virus B19 provoca disminución de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, seguida por neutropenia y/o plaquetopenia a las 24-48 hrs. La depleción linfocitaria podría impedir la regulación de la respuesta humoral frente a la infección viral, lo cual podría, a su vez, conducir a la fagocitosis y consecuente pancitopenia.

La patogénesis de la neutropenia y de la plaquetopenia no está dilucidada. Sin embargo, se ha comprobado *in vitro* que el virus causa inhibición de la megacariocitopoyesis sin replicación viral o lisis celular. La recuperación espontánea del nivel de neutrófilos y plaquetas puede tardar hasta 14 días, lo cual incrementa las posibilidades de infección en los pacientes con esferocitosis.

La proteína VP1 de la cápside contiene los principales epítopos para la respuesta B asociada a la inducción de anticuerpos neutralizantes, mientras que VP2 exhibe los principales determinantes para promover una respuesta de linfocitos T ayudadores mediada por IL-10 e interferón gama aun al cabo de tiempos prolongados luego de la infección aguda. La formación de anticuerpos neutralizantes IgM e IgG conduce a la finalización de la etapa virémica.

Una segunda fase de enfermedad se desarrolla al cabo de los días 17-18 post-infección con exantema y artralgias pero sin fiebre y con normalidad de los índices hematológicos.

Se postula que el exantema observado en pacientes inmunocompetentes se debe al depósito de inmunocomplejos específicos, mientras que dicha erupción cutánea ocurre en inmunosuprimidos como resultado de un efecto viral directo, como lo sugiere el hallazgo de DNA viral en biopsia de piel, en pacientes trasplantados que no desarrollan anticuerpos anti-B19. Se postula que la proteína VP2 desempeña un rol patogénico en la artropatía, ya que péptidos derivados de ella promueven reacciones cruzadas con queratina, colágeno y cardioplipina celulares.

5. CUADROS CLÍNICOS

El espectro de la infección por B19 es múltiple: desde infecciones asintomáticas, hasta alteraciones leves con cuadros respiratorios indistinguibles de otras infecciones por virus respiratorios, o bien cuadros graves, potencialmente fatales en algunos pacientes particularmente susceptibles (por ejemplo: portadores de anemias hemolíticas).

Lo cuadros clínicos de infección por el virus B19 son los siguientes:

- 1) Eritema infeccioso (5^{ta} enfermedad o megalocitopenia);
- 2) Crisis de anemia aplásica;
- 3) Exantemas diversos;
- 4) Artropatía similar a la artritis reumatoidea, en algunos casos;
- 5) Enfermedad aguda del tracto respiratorio superior;
- 6) Cuadros rubeoliformes;
- 7) Disfunción hepática;
- 8) Miocarditis;
- 9) Síndrome papular purpúrico petequeal de manos y pies (*gloves and socks syndrome*) asociado a lesiones orales y fiebre;
- 10) Abortos o alteraciones y/o muerte fetal (*hydrops fetalis*).

El eritema infeccioso es común en niños entre 4 y 11 años. Luego de un período de incubación de 4-14 días, habitualmente comienza en la cara un intenso eritema (**signo de la cachetada**; Figura 19.4A) que evoluciona en 1-4 días hacia el tronco y extremidades con un aspecto reticular. Ocasionalmente, este exantema máculo-papulo-eritematoso es pruriginoso. Se exacerba con el calor, pudiendo presentarse en ondas, con una aparente desaparición de los síntomas y luego un rebrote luego de exposición al sol, baños calientes o actividad física. Existe, simultáneamente un enantema eritematoso y petequeal en paladar blando, pilares anteriores y pared posterior de faringe. Las adenopatías pueden ser únicas o múltiples.

El eritema infeccioso también puede observarse en adultos no inmunes. En ellos, el exantema suele ser más leve y el "signo de la cachetada" estar ausente.

En pacientes sintomáticos con enfermedad aguda se han detectado elevados niveles de IL-4, IL-6, IL-8, TNF α , IFN- γ , MCP-1, GM-CSF (*granulocyte monocyte-colony stimulating factor*), TGF- β 1 y endotelina 1. Por el contrario, pacientes con artritis asociada a B19 exhiben menores niveles de IL-6, TNF- α , y GM-CSF que los pacientes sin artritis. Los pacientes con exantema exhiben menores niveles de TGF- β 1. En conclusión, la variabilidad genéticamente determinada para la producción de citoquinas puede estar relacionada con la posibilidad de desarrollar determinadas manifestaciones clínicas en la infección por B19.

En adultos es frecuente el compromiso articular (80 % de los casos), no así en niños (8 %), siendo la enfermedad más grave en

el primer caso. Entre las complicaciones frecuentes se observan: 1) sinovitis y artritis de rodilla y codo, así como de las articulaciones interfalángicas; 2) anemia hemolítica transitoria; 3) encefalitis.

Las artritis pueden preceder la aparición del megalocitopenia, pueden presentarse simultáneamente a la enfermedad exantemática o bien ser la única manifestación de la infección viral.

Esta poli-artropatía aguda suele durar no más de dos semanas, aunque en algunos casos los síntomas persisten más de dos meses y existen casos descritos en los cuales persistieron cuatro años. La distribución simétrica y las articulaciones afectadas pueden sugerir un diagnóstico de artritis reumatoidea; inclusive algunos pacientes pueden presentar en forma transitoria auto-anticuerpos (factor reumatoideo, anticuerpos anti-DNA y anti-linfocitarios).

Dado que el erythrovirus B19 puede producir un cuadro poliarticular, se lo ha responsabilizado de inducir algunos autoanticuerpos. Así, la artropatía debida al B19 puede simular al lupus eritematoso sistémico o a la artritis reumatoidea y existen algunas publicaciones que sugieren que este virus podría inducir o exacerbar a esas enfermedades. Sin embargo, en un trabajo reciente realizado en nuestro país donde se analizó una población de 47 pacientes con infección aguda por B19 se detectaron varios autoanticuerpos (anti-nucleares, anti-fosfolípidos, anti-DNA de cadena simple y factor reumatoideo) pero en títulos bajos similares a los que pueden observarse en la población sana. En la mitad de esos pacientes se realizó un seguimiento que demostró que la frecuencia de los autoanticuerpos inducidos por la infección aguda tiende a disminuir con el tiempo (Perandones C., Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, UBA, 2005).

Las crisis de anemia aplásica se producen en pacientes con anemia hemolítica crónica (esferocitosis, drepanocitosis, talasemia, déficit de piruvato quinasa) o bien anemias hemolíticas adquiridas, como consecuencia de la corta vida media de los eritrocitos (15-20 días) que, sumada a la reticulocitopenia inducida por el virus, se traduce en niveles críticos de hemoglobinemia. Estos pacientes suelen requerir transfusiones de sangre.

La infección de pacientes inmunosuprimidos con el virus B19 puede conducir a una infección persistente. Ello se ha observado en pacientes con leucemia linfocítica aguda, en pacientes con síndrome de Nezelof y en aquellos infectados con el virus HIV. En inmunosuprimidos, la enfermedad se caracteriza por anemia persistente o bien por anemia que remite y recurre nuevamente. La viremia está presente durante los períodos de anemia y sólo se detecta una débil respuesta inmune humoral.

En años recientes se ha establecido fehacientemente que el B19 puede ser un importante agente causal de miocarditis tanto en adultos como en el producto de la concepción, a través de la infección de células endoteliales de las pequeñas arteriolas y vénulas, lo cual –a su vez– puede asociarse a la disfunción endotelial, a una alteración de la microcirculación miocárdica y a la extravasación de células inflamatorias en el miocardio.

El síndrome papular purpúrico petequeal de manos y pies (*gloves and socks syndrome*) corresponde a una acrodermatosis (de allí la denominación en inglés de "síndrome de guantes y medias", indicando la afectación distal de miembros) asociada a lesiones orales y fiebre.

La infección materna durante el curso del embarazo puede originar una infección del feto. La infección por B19 puede tener mayor impacto que la rubéola en la morbi-mortalidad. El riesgo de infección vertical a partir de madres infectadas es del 30%. Según el momento de la infección se han observado abortos (1er. trimestre), mortinatos (2do. y 3er. trimestre, entre 1 a 10 semanas de la infección materna), fallo miocárdico, hepatitis, anemia e *Hydrops fetalis*. La infección del hígado fetal afecta al principal órgano de eritropoyesis temprana, lo cual asociado a la miocarditis viral coadyuva a la génesis del cuadro de fallo congestivo cardíaco (*Hydrops fetalis*; Figura 19.4B).

El feto se comporta de modo similar a un individuo con anemia hemolítica crónica en el hecho de que la sobrevivencia de los eritrocitos oscila entre 45-70 días y la masa de eritrocitos fetales aumenta 34 veces durante el 2do. trimestre.



Figura 19.4. Manifestaciones clínicas. Los paneles A y B se producen con autorización del *New England Journal of Medicine*. **Panel A:** Signo de la "cachetada". Obsérvese también el carácter reticular extendido del exantema. **Panel B:** *Hydrops fetalis* debido a la infección intrauterina por B19 en el segundo trimestre del embarazo. Cortesía del Dr. O. Caul. Fotos publicadas en *N Eng J Med* 2004, 350: 586-97.

El feto infectado desarrolla una crisis de anemia aplásica, lo que resulta en una falla cardíaca. Por ello, desarrolla ascitis, derrame pleural, edema de tejidos blandos y a veces poli-hidramnios.

Teniendo en cuenta que el virus B19 destruye las células que se dividen activamente, es preferentemente embrionizada antes que teratogénico. Existe un 5-9% de riesgo de pérdida del producto de la concepción entre embarazadas, siendo máximo dicho riesgo en el segundo trimestre. Hasta 1992 no se habían demostrado casos de neonatos con IgM específica para B19, habiéndose atribuido ello a la creencia generalizada de que toda infección trasplacentaria culminaba con la muerte fetal. Sin embargo, posteriormente se ha logrado detectar IgM específica en sangre fetal de infectados que nacieron vivos con *hydrops fetalis* y/o anemia. Aún restan estudios prospectivos de mayor duración para dilucidar posibles efectos teratogénicos tardíos.

6. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico de la infección por B19 es relativamente fácil en el caso de una epidemia de eritema infeccioso. Por el contrario, en casos aislados o cuadros inespecíficos de enfermedad exantemática es difícil de diferenciar de otras patologías.

El trípede habitual del diagnóstico (epidemiológico, clínico y de laboratorio) conduce hacia la certeza en el diagnóstico etiológico. Existen habitualmente antecedentes de contacto con personas con enfermedad exantemática, especialmente en invierno y primavera.

El laboratorio clínico revela reticulocitopenia, normo- o leucopenia con neutropenia y plaquetopenia, discreto aumento de eosinófilos y proplasmocitos y de la velocidad de eritrosedimentación.

El diagnóstico de certeza se realiza por métodos directos o indirectos de diagnóstico virológico.

6.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En las crisis de anemia aplásica pueden detectarse partículas virales en suero, médula ósea, líquido ascítico y órganos. Pueden emplearse la inmunoelectro-microscopia (incubación de la muestra con anticuerpos específicos), lo que facilita la observación de agregados de partículas virales. Estas técnicas no son utilizadas habitualmente en el diagnóstico.

6.2 AISLAMIENTO DEL B19

El virus no es cultivable *in vitro* en las líneas celulares convencionales. Por ello, el aislamiento no se emplea de rutina. Se ha logrado replicación *in vitro* en cultivo primario de médula ósea, y en una línea continua (de una paciente con leucemia megaloblástica) en ambos casos con el agregado de eritropoyetina. Estos métodos no se emplean para diagnóstico pero sí para la producción de reactivos diagnósticos, por ejemplo para inmunofluorescencia indirecta.

6.3 DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Tanto la viremia como la excreción faucial del virus son de muy corta duración, lo que limita el valor de estos métodos.

La detección de ácidos nucleicos puede realizarse mediante hibridación con sondas marcadas o por PCR. La PCR ofrece una exquisita sensibilidad para detectar el DNA de B19 en suero, orina, líquido amniótico o pleural, ascitis, leucocitos y tejidos fetales o adultos. Los *primers* diseñados reconocen secuencias de genes de proteínas no estructurales y de la cápside viral. Su aplicación ha permitido el diagnóstico prenatal de la infección intrauterina por B19.

La técnica de doble (*nested*) PCR es 10.000 veces más sensible que la hibridación por *dot blot*.

Es menester una interpretación cautelosa de los resultados de PCR, dado que la exquisita sensibilidad de esta técnica (especialmente la *Nested* PCR) puede evidenciar DNA detectable aún tiempo después de superada la etapa aguda. Durante la infección

aguda la carga viral puede alcanzar $\sim 10^{12}$ equivalentes genómicos (copias genómicas) por ml, pudiendo detectarse en individuos inmunocompetentes el DNA viral por al menos un mes post-infección, y a veces por períodos prolongados (se han observado 95 equivalentes genómicos / ml a la semana 164 post-infección). Han sido reportados casos de persistencia del DNA viral en infecciones crónicas aún en ausencia de IgM e IgG específicas. Si bien la detección del genoma viral por períodos prolongados podría ser un obstáculo para la utilización de la PCR cualitativa como método para distinguir una infección aguda de otra pasada, la utilización de la PCR cuantitativa en tiempo real ha superado esta dificultad. Más aún, esta tecnología está siendo empleada para el tamizaje de mini-pools de plasma y de derivados de sangre con el objeto de aumentar la seguridad de su uso. La detección del genoma del B19 puede ser la única herramienta diagnóstica en la infección crónica, ya que la producción de anticuerpos puede ser indetectable o estar ausente en inmunodeprimidos.

6.4 SEROLOGÍA

El diagnóstico indirecto se basa en la detección de IgM específica o en la demostración de seroconversión para IgG en dos muestras pareadas. En la mayoría de los casos, la IgM es detectable durante el exantema (hacia al final del período virémico, días 7-12 post-infección) o la artritis y puede persistir por 2 a 3 meses.

Para la detección de IgM específica se utilizan ELISAs de captura o IFI. Como fuente de antígeno viral se emplea para los ELISAs suero proveniente de pacientes con crisis de anemia aplásica (que poseen gran cantidad de partículas virales y no de anticuerpos anti-B19) ó bien antígeno recombinante, habitualmente VP2; para la IFI se emplean como sustrato cultivos celulares infectados. Los anticuerpos IgG anti-VP2 persisten en el tiempo, aunque los desarrollados contra VP1 pueden desaparecer. Se ha observado que la IgM anti-NS1 puede ser utilizada también como marcador de infección reciente.

El seguimiento de una probable infección viral por B19 en el feto se realiza por determinación de alfa fetoproteínas y monitoreo ecográfico. Ante una imagen de aumento del líquido amniótico u observación de hidropesía fetal se impone la realización de estudios serológicos para B19 a la madre.

7. EPIDEMIOLOGÍA

La infección por erythrovirus B19 sigue un patrón estacional en el hemisferio norte, siendo mayor la incidencia en primavera, fines de invierno y comienzo del verano. En los lugares de clima templado el B19 es endémico todo el año. El virus tiene un comportamiento cíclico, presentándose brotes cada cuatro o cinco años. La mayoría de las infecciones se transmiten por vía respiratoria, y debido a la intensa viremia también es transmisible por vía hemática o por sus productos.

La infección es común en la infancia y los anticuerpos anti-B19 son habitualmente adquiridos entre los 5 y 10 años de edad. Aproximadamente el 60 % de la población adulta tiene anticuerpos contra el virus B19. Se han demostrado reinfecciones por este virus.

Al presente, no se dispone de datos epidemiológicos publicados sobre infección por B19 en Argentina, si bien se ha detectado su presencia en diversas poblaciones.

8. TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

No existen terapias antivirales específicas ni se dispone de vacunas para humanos.

La eficacia de una vacuna recombinante conteniendo las proteínas de la cápside VP1 y VP2 (MEDI-491; MedImmune) ha superado la fase I de evaluación clínica, habiéndose demostrado que puede inducir la formación de anticuerpos neutralizantes que persisten por períodos prolongados en voluntarios adultos. Esta va-

cuna a cápsides vacías –también denominada a VLPs [*viral like particles*] ha encontrado hasta el momento una falta de interés comercial de la industria, lo que demora el avance de este desarrollo promisorio.

En la enfermedad exantemática el tratamiento es sintomático (anti-pruriginosos, anti-inflamatorios en los casos de artritis, transfusiones en las crisis graves de anemia aplásica).

En pacientes inmunosuprimidos con infección persistente por B19 la anemia responde por tiempos variables a la terapia con IgG humana conteniendo anticuerpos anti-B19.

En la infección fetal con anemia grave se utiliza, en centros especializados, la transfusión del feto *in utero*.

Dado que el erythrovirus B19 es ubicuo, es difícil prevenir la exposición. Además, los contactos en la comunidad suelen ser asinto-

máticos. Se recomienda evitar el contacto con individuos potencialmente virémicos a aquellos pacientes con riesgo de complicaciones (anemias hemolíticas, embarazo, inmunodeprimidos, etc.).

Dado que se han observado brotes de infección con B19 en personal de salud, se recomienda el aislamiento de pacientes con 5^{ta} enfermedad.

ADENDUM

Mientras este libro se encontraba en prensa, se descubrieron 2 nuevos bocavirus (bocavirus humano 2 y bocavirus humano 3), habiéndose detectado el primero en heces de pacientes con enfermedad gastrointestinal. Asimismo, se descubrió un genotipo relacionado al parvovirus 4 (genotipo 2, también denominado parvovirus 5).

Bibliografía

- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. "Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples". *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102:12891-6. Erratum en: *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:15712.
- Brown KE. "Human Parvoviruses". En: "Principles and Practice of Clinical Virology". 5th Edition. Editado por Zuckerman AJ, Bammatvala JE y col. PJM Wiley and Sons Ltd, 2004; 703-720.
- Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. "Parvovirus-like particles in human sera". *Lancet* 1975; 1: 72-3.
- Chen AY, Zhang EY, Guan W, Cheng F, Kleiboeker S, Yankee TM, et al. "The small 11kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 infection of primary erythroid progenitor cells". *Blood* 2010; 115: 1070-80.
- Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, DeLwart E. "New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome". *J Virol* 2005; 79:8230-6.
- Kurtzman GJ, Cohen, BJ, Field AM, Oseas R, Blaese RM, Young NS. "Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection". *J Clin Invest* 1989; 84: 1114-23.
- Lehmann HW, von Landerberg P, Modrow S. "Parvovirus B19 infection and autoimmune disease". *Autoimmun Rev* 2003; 2:218-23.
- Luzzi GA, Kurtz JB, Chapel H. "Human parvovirus arthropathy and rheumatoid factor". *Lancet* 1985; 1: 12-18.
- Moore TL. "Parvovirus –associated arthritis". *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 289-94.
- Nguyen QT, Sifer C, Schneider V, Allaume X, Servant A, Bernaudin F, et al. "Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia". *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2483-7.
- Nguyen QT, Wong S, Heegaard ED, Brown KE. "Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6". *Virology* 2002; 301:374-80.
- Perandones CE, Colmegna I, Arana RM. "Parvovirus B19: another agent associated with remitting seronegative symmetrical synovitis with pitting edema". *J Rheumatol* 2005; 32: 389-90.
- Shade RO, Blundell MC, Cotmore SF, Tattersall P, Astell CR. "Nucleotide sequence and genome organization of human Parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis". *J Virol* 1986; 58: 921-36.
- Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N Engl J Med* 2004; 350:586-97.

Enterovirus

María Cecilia Freire

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los enterovirus (EVs) humanos constituyen un género de la familia *Picornaviridae*. El nombre de esta familia se refiere al pequeño tamaño de los virus que la conforman (del latín: pico, pequeño) y al RNA en su genoma. Son virus desnudos cuyo RNA está formado por una cadena única de RNA de polaridad positiva (+). Los miembros de esta familia son importantes patógenos tanto para el ser humano como para los animales. Dicha familia incluye varios géneros, 4 de los cuales infectan habitualmente al hombre: *Enterovirus*, *Parechovirus*, *Hepatovirus* y *Kobuvirus*. Además, existen otros dos géneros que incluyen virus que infectan a animales, algunos de cuyos miembros (raramente) pueden infectar al ser humano: *Aphthovirus* (virus de la fiebre aftosa); y *Cardiovirus* (incluye al virus de la encefalomiocarditis, a los mengovirus y los virus de la encefalomiocarditis murina de Theiler). Se han documentado infecciones humanas por los virus de la fiebre aftosa y por el de la encefalomiocarditis.

El género *Enterovirus* se clasifica en 12 especies: a) enterovirus A (EV-A) que incluye 24 serotipos; b) enterovirus B (EV-B), que comprende 61 serotipos; c) enterovirus C (EV-C), con 23 serotipos, entre los cuales se encuentran los 3 poliovirus; d) enterovirus D (EV-D), con 5 serotipos; e) enterovirus E (EV-E), con 4 serotipos; f) enterovirus F (EV-F), con 6 serotipos; g) enterovirus G (EV-G), con 7 serotipos; h) enterovirus H (EV-H) que incluye 1 único serotipo; i) enterovirus J (EV-J), con 6 serotipos; j) rinovirus A, con 77 serotipos; k) rinovirus B, con 30 serotipos y l) rinovirus C, con 51 serotipos (Tabla 20.1).

Dentro de la Flia. *Picornaviridae* se incluyen -entre otros- los géneros *Hepatovirus*, con un único serotipo -el virus hepatitis A- y *Parechovirus* que comprende 16 tipos; ambos géneros son importantes en salud humana debido a las patologías que producen.

Los rinovirus se clasificaban anteriormente como género; en la actualidad se ubican como especie dentro del género *Enterovirus*. Incluyen más de 110 serotipos y son agentes frecuentes del resfriado común y también de infecciones respiratorias del tracto inferior (Véase el Capítulo 58).

2. ESTRUCTURA

Los enterovirus son desnudos, con cápside de simetría icosaédrica y miden entre 20 y 30 nm de diámetro. La ausencia de envoltura los hace relativamente resistentes a muchos desinfectantes comunes (etanol al 70%, isopropanol, y compuestos de amonio cuaternario). Son también resistentes a solventes lipídicos como el cloroformo y el éter. Son estables frente a varios detergentes y a la temperatura ambiente. Son inactivados por formaldehído, glutaraldehído e hipoclorito de sodio. El grado de inactivación depende de la concentración, del pH, de los materiales orgánicos externos y el tiempo de contacto. Además, son resistentes al bajo pH, lo que les permite atravesar la barrera ácida del estómago. Su genoma está formado por una sola molécula de RNA de cadena única y polaridad (+), con aproximadamente 7 500 nucleótidos. En la región 5' se encuentran 750 nucleótidos que constituyen la región 5' no codificante (NC). Las mutaciones puntuales en esta región afectan la virulencia. A continuación de la región 5'NC poseen un marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína de 2 100 aminoácidos, la cual es clivada para dar cuatro proteínas estructurales, VP4, VP1, VP2 y VP3 (que forman la cápside) y siete proteínas no estructurales. Las proteínas 2A y 3A son proteinasas, mientras la 3D es la RNA polimerasa-RNA dependiente. Por último, poseen una región 3' de 70 a 100 nucleótidos que es otra región no codificante, seguida por una cola de poli-(A) con una longitud media de 75 nucleótidos (Figura 20.1).

Género	Especie	Serotipo
<i>Enterovirus</i>	EV-A	24 serotipos: 11 Coxsackie A, EV-A71, EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EVA92, EV-A114, EV-A119, EV-A120 y 3 enterovirus simianos y 1 enterovirus de mandril
	EV-B	61 serotipos: 6 Coxsackie (B1-B6), incluye al enterovirus de la enfermedad vesicular porcina y echovirus 1 (incluye E-8), E2-9 (incluye al CA-23), E11-21, E20-21, E24-27, E29-33, EV-B69, EV-B73-75, EV-B77-88, EV-B93, EV-B97-98, EV-B97-98, EV-B100-101, EV-B106-107, EV-B110 (de chimpancé), EV-B111y enterovirus simiano SA5
	EV-C	23 serotipos: poliovirus 1, 2 y 3, CVA11, 13, 17, CVA19-22, CAV24, EV-C95-96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116-118
	EV-D	5 serotipos: EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111, EV-D120 (de gorilas)
	EV-E	4 serotipos: EV-E1-4
	EV-F	6 serotipos: EV-F1-6
	EV-G	7 serotipos: EV-G1-7
	EV-H	1 serotipo: EV-H1
	EV-J	6 serotipos simianos: SV6, EV-J103, EV-J108, EV-J112, EV-J115, EV-J121
	Rinovirus A	77 serotipos
	Rinovirus B	30 serotipos
	Rinovirus C	51 serotipos

Tabla 20.1. Género *Enterovirus* (Flia. *Picornaviridae*). Texto adaptado de la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía Viral (2012).

De manera análoga a lo observado con otros virus RNA, los enterovirus exhiben un grado alto de variabilidad genómica, que no es homogénea y varía de acuerdo con la región observada. Las regiones NC son las más conservadas. Por ejemplo, las tres cepas de vacuna anti-poliomielítica tipo Sabin tienen 85% de identidad de nucleótidos en la región 5'NC y aproximadamente 90% de identidad en la 3'NC. En las regiones codificantes, las proteínas no estructurales muestran considerablemente menos variación que las proteínas estructurales. En general, la similitud de aminoácidos en proteínas no estructurales es alta, normalmente más del 90% dentro de un grupo. Por último, la variación nucleotídica observada en las regiones que codifican para proteínas estructurales es la más alta, observándose en la región que codifica para VP1 hasta un 25% de divergencia de nucleótidos y sólo un 17% en aminoácidos. La comparación de las secuencias nucleotídicas y la reconstrucción filogenética demuestran que la región de VP1 contiene la información específica de serotipo y puede ser usada para la identificación de los enterovirus.

3. PATOGENIA

Los virus polio son los más estudiados y sirven como modelo para entender el proceso patogénico de los enterovirus. Son ubicuos; el hombre es el único reservorio conocido. Su diseminación ocurre de persona a persona a través de la vía fecal-oral y –posiblemente– de la vía oral-oral (vía respiratoria). La transmisión a través del agua puede presentarse como una extensión de la vía fecal-oral en la cual el vector es el agua en lugar de las manos o los fomites. De todas maneras, los enterovirus pueden ingresar al organismo por otras vías y esto se relaciona con el serotipo; por ejemplo, el enterovirus 70 (agente etiológico de la conjuntivitis hemorrágica aguda) se disemina directamente desde secreciones oculares o respiratorias, o indirectamente a través de materiales contaminados (toallas, sábanas etc.). Otra vía posible de infección, si bien menos frecuente, es a través de alimentos lavados con aguas contaminadas con enterovirus. Finalmente, la infección puede ocurrir también por el contacto con sangre infectada, en especial en el momento del parto (infección connatal) y a través de la placenta (infección congénita). Una muy pequeña dosis infectiva es suficiente para establecer la infección luego del ingreso por vía oral.

Una vez ingresados al organismo estos virus hacen una primera replicación en las amígdalas; la resistencia al bajo pH les permite atravesar la barrera ácida estomacal, replicar en las placas de Peyer del intestino delgado y eliminarse por materia fecal. Posteriormente, multiplican en los ganglios linfáticos cervicales y mesentéricos profundos produciendo la *viremia menor*, con posterior invasión del sistema retículo endotelial que incluye ganglios linfáticos, hígado,

bazo y médula ósea. Luego ocurre la *viremia mayor* durante la que se produce la invasión del SNC (Figura 20.2).

La eliminación por materia fecal (virucopria) es intermitente y prolongada, pudiendo eliminarse hasta 6 semanas, luego de ocurrida la infección. Tanto la cantidad de virus eliminada como su duración se ven influidas por la inmunidad del paciente, ya sea por la infección natural o como efecto de la vacunación anti-poliomielítica. La eliminación de un serotipo está condicionada además por la infección simultánea con otro serotipo de enterovirus, ya que compiten en la luz intestinal por los mismos *loci* de replicación. Si bien el virus puede ser recuperado de hisopados faríngeos o secreciones respiratorias en el período agudo de la enfermedad, la duración de la eliminación por esta vía es mucho más fugaz que a través de la materia fecal. En muchas circunstancias la infección es controlada por el sistema inmune del paciente y, como consecuencia, no se produce la *viremia mayor* y el individuo cursa una infección asintomática. En el caso de los virus polio, la *viremia menor* ocurre en la mayoría de los infectados y el virus se disemina al sistema retículo-endotelial sin manifestaciones clínicas. En aproximadamente el 4 al 8% de los infectados ocurre una segunda *viremia* o *viremia mayor* produciendo síntomas de enfermedad menor. Una porción de aquellos que desarrollan la *viremia mayor* padecen síntomas neurológicos. Éstos son una complicación infrecuente de la infección por virus polio y afectan al 1% de los individuos infectados. Como consecuencia de la replicación del virus polio en las neuronas se produce la destrucción de las mismas, con la consecuente pérdida de la función de los músculos inervados por ellas (polio parálisis). Si las neuronas afectadas se ubican en la médula espinal la enfermedad resultante será la poliomielitis con parálisis de miembros; si se afecta el encéfalo, el cuadro resultante será el de la polioencefalitis. La infección de neuronas bulbares puede producir la muerte por parálisis del centro respiratorio. La enfermedad es consecuencia de la inhibición traduccional promovida por la infección celular por virus polio y la consiguiente destrucción de neuronas motoras del SNC, lo que se manifiesta como parálisis. Teniendo en cuenta que existen 3 serotipos de poliovirus, la infección con uno de ellos no confiere protección contra los otros dos.

La forma en que estos virus alcanzan el SNC se explica mediante dos hipótesis; la primera establece que el virus puede acceder al SNC atravesando la barrera hematoencefálica, independientemente de su receptor, siendo ésta la vía más común durante la *viremia*. La segunda, sostiene que los virus podrían infectar al SNC a través de la vía axonal retrógrada, transportándose por los axones desde los músculos hasta la médula espinal y el cerebro. En la región 5'NC, se encuentra el sitio de entrada interna al ribosoma (acrónimo en inglés: IRES) que afecta la eficiencia de la iniciación de la traducción, lo que puede influir en el tropismo y la virulencia.

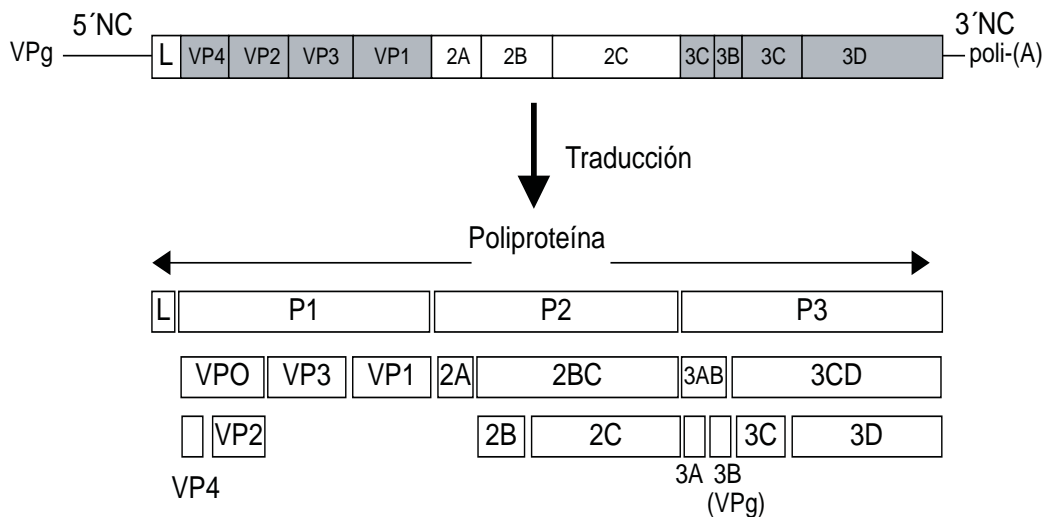


Figura 20.1. Esquema del genoma viral. Adaptado de: Fields, *Virology* by Lippincott: Williams & Wilkins (2001).

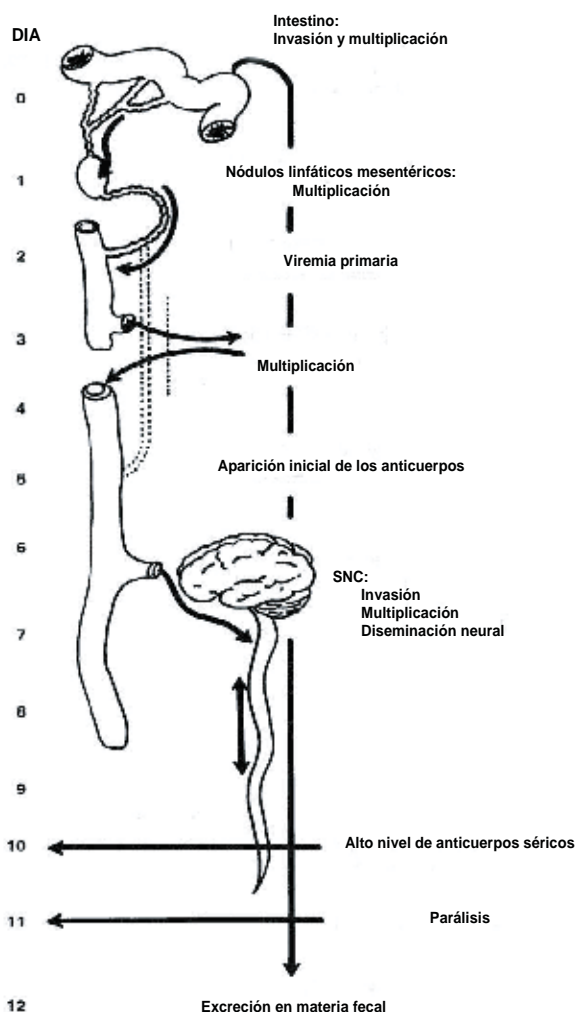


Figura 20.2. Patogénesis de la infección enteroviral. Adaptado de: Fields, Virology, Lippincott: Williams & Wilkins (2001).

La respuesta inmune en la infección por enterovirus, resulta de la producción de anticuerpos IgM e IgG específicos. La IgM persiste por menos de 6 meses, mientras que la IgG e IgA secretoria persisten por años. La producción de IgA es estimulada por la replicación viral en las mucosas faríngea e intestinal. La infección enteroviral produce una respuesta inmune humoral, tipo-específica, de larga duración. **Los anticuerpos neutralizantes protegen contra la enfermedad, pero no contra la infección.** La protección conferida por la IgA secretoria, limita la diseminación sistémica, así como la cantidad y duración de la eliminación viral desde las mucosas. Se ha demostrado la respuesta heterotípica frente a la infección, lo que ocurriría como respuesta a un grupo común de epítopes, produciéndose reacciones cruzadas durante el transcurso de los años. Esta reacción cruzada para IgG ocurre sólo con epítopes de la proteína de cápside VP1. La reacción cruzada para IgM ocurre con epítopes de VP1, VP2 y VP3.

Los enterovirus generalmente causan infecciones agudas; sin embargo, pueden ocurrir infecciones persistentes en pacientes con inmunodeficiencias humorales (hipogammaglobulinemia ligada al X) debido al fallo de la eliminación viral por carecer de anticuerpos que neutralicen al virus. Estos pacientes pueden desarrollar meningitis o encefalitis crónicas, o enfermedades degenerativas con evidencia de inflamación crónica de la médula espinal y el cerebro. En contraste con los estudios realizados sobre la inmunidad humoral para enterovirus, se ha prestado poca atención al posible rol de

la inmunidad celular. Estudios realizados en humanos y en ratones mostraron la localización de los epítopes para las células T en las 4 proteínas de la cápside viral (VP1-VP4). El rol de la respuesta de los linfocitos T citotóxicos ha sido definido parcialmente con respecto a la eliminación y la diseminación viral y al desarrollo de la enfermedad.

Los mecanismos involucrados en la génesis de la miocarditis aguda y de la miocardiopatía dilatada adquirida asociadas al CBV merecen una mención especial. Diversos estudios experimentales apoyan la hipótesis de que en las miocarditis agudas se producen eventos de daño mediados tanto por linfocitos T $\gamma\delta$ como por los CD8⁺ citotóxicos. La miocardiopatía dilatada adquirida es promovida por la actividad de una proteinasa (2A) del CBV, que promueve el clivaje de la distrofina. Esta proteína del citoesqueleto está involucrada en el normal funcionamiento del aparato contráctil del miocardiocito.

4. CUADROS CLÍNICOS

La clínica de la infección por enterovirus es heterogénea, y puede producir desde infecciones asintomáticas hasta cuadros paralíticos graves, además de meningitis, encefalitis, exantemas, enfermedades cardíacas, conjuntivitis, enfermedad mano-pie-boca, síndromes febriles inespecíficos, pleurodinia, diabetes, infecciones respiratorias y herpangina, entre otros (Tabla 20.2).

Sin embargo, la gran mayoría de las infecciones por estos virus son asintomáticas. Todos los serotipos de enterovirus son capaces de producir variados cuadros clínicos, pero algunos de ellos se relacionan a enfermedades específicas, por ejemplo: la conjuntivitis hemorrágica aguda es causada por una variante del virus Coxsackie A 24 ó por el EV 70. Los serotipos aislados ocasionalmente de diabetes son usualmente virus Coxsackie B. La enfermedad paralítica aguda es producida en general por los 3 serotipos de virus polio y por el EV 71.

4.1 POLIOMIELITIS

En modo análogo a los EnP, la mayoría de las infecciones por virus polio son asintomáticas. Cuando ocurre la infección sintomática se puede presentar como poliomiелitis abortiva (la más común), que es una enfermedad febril leve con síntomas gastrointestinales que ocurre en el 4-8% de los infectados. Con menos frecuencia puede cursar como una meningitis aséptica, que no se diferencia de las producidas por otros enterovirus. Sólo una en 200 infecciones por virus polio resulta en un cuadro de poliomiелitis, que es una enfermedad paralítica grave con compromiso del bulbo o del asta anterior de la médula espinal que resulta en la destrucción de la sustancia gris dejando secuelas permanentes.

4.2 SÍNDROME POST-POLIO

Este cuadro ocurre muchos años después de padecida la poliomiелitis. Se caracteriza por dolor, debilidad, fatiga y dolor muscular. Posiblemente esté producido por la persistencia del virus polio en el SNC; sin embargo aún no hay datos convincentes que puedan demostrarlo de modo fehaciente.

4.3 MENINGITIS Y ENCEFALITIS

La meningitis es la enfermedad neurológica más frecuente; se debe a la inflamación de las meninges y se caracteriza por fiebre, cefalea, fotofobia, rigidez de nuca y vómitos. Las meningitis se clasifican según las características del LCR en purulentas o mal denominadas *asépticas* (a líquido claro) siendo los enterovirus los principales agentes etiológicos de éstas (85 a 95% de los casos), tanto en niños como en adultos. Los serotipos que con mayor frecuencia producen meningitis son los Coxsackie B5 y los echovirus 4, 6, 9, 11 y 30. En algunas circunstancias la meningitis puede asociarse a otros síntomas como exantema, y esto se relaciona a algunos serotipos

específicos como Coxsackie A5, A9, y A16, y echovirus 4, 6, 9, y 16. Las meningitis por enterovirus son leves y autolimitadas. La encefalitis es la enfermedad producida por la inflamación del parénquima cerebral y se caracteriza por la alteración del estado de conciencia con signos focales y convulsiones. Las encefalitis por enterovirus suelen ser generalizadas aunque en algunas ocasiones son focalizadas remediando una encefalitis herpética. Algunos serotipos como los de poliovirus, echovirus 6, 9 y coxsackievirus A2 y A9 se asocian a ataxia cerebelar aguda.

4.4 ENFERMEDAD CARDÍACA

La miocarditis es la inflamación del miocardio; es generalmente autolimitada curando con pocas o ninguna secuela. En algunos casos, la inflamación del miocardio puede persistir produciendo miocarditis crónica, que puede progresar a la cardiomiopatía dilatada. Los pacientes que padecen esta dolencia posiblemente requieran de trasplante cardíaco. Los EnP (1,5% de las infecciones enterovirales) son los que con más frecuencia producen enfermedad cardíaca y en especial los coxsackievirus B (3,2% de las infecciones). La miocarditis aguda es más común en adultos jóvenes, en especial entre los 20 y los 39 años, y más frecuente en hombres que en mujeres. En contraste con lo que ocurre con la miocarditis aguda, no hay información sobre el aislamiento de enterovirus de casos de cardiomiopatía crónica dilatada, sugiriendo que el virus puede tener una expresión restringida o que luego de la infección aguda es eliminado. Los EnP son causantes también de pericarditis.

4.5 ENFERMEDAD MUSCULAR Y PLEURODINIA

La pleurodinia (o enfermedad de Bornholm) es una enfermedad aguda febril con mialgia, que compromete de modo especial los músculos del tórax y el abdomen. Los agentes etiológicos asociados con mayor frecuencia son los CBV. La inflamación muscular puede ser de curso agudo o crónico y se caracteriza por fiebre, mialgias, elevación de enzimas musculares y en algunas circunstancias mioglobulinuria.

4.6 DIABETES

Factores genéticos y del medio ambiente, incluida la infección por enterovirus han sido implicados en la patogenia de la diabetes mellitus insulino-dependiente. En el período pre-diabético se detectó la presencia de anticuerpos contra diferentes serotipos de enterovirus incluyendo a los CAV9, CBV1, B2, B3 y B5. Se aisló Coxsackie B4 de muestras de páncreas de pacientes con comienzo agudo de su diabetes y de casos fatales de diabetes mellitus insulino-dependiente. Algunos de dichos aislamientos fueron diabetogénicos en ciertas cepas de ratón y de primates no humanos. Sin embargo, no se ha dilucidado aún el mecanismo por el que los enterovirus son capaces de causar diabetes mellitus tanto en animales como en humanos.

4.7 INFECCIONES OCULARES

La conjuntivitis hemorrágica aguda se caracteriza por un período corto de incubación (24 a 48 horas) que precede a un rápido co-

mienzo de los síntomas con compromiso de uno o ambos ojos. La principal manifestación es el lagrimeo profuso, el dolor, la inflamación periorbital y el enrojecimiento de la conjuntiva. Se puede acompañar de síntomas extraoculares como alteraciones neurológicas y problemas respiratorios y gastrointestinales. Pueden ocurrir casos esporádicos o grandes brotes epidémicos. Los serotipos implicados son el E70 y el CAV24.

4.8 INFECCIONES RESPIRATORIAS, HERPANGINA, ENFERMEDAD MANO-PIE-BOCA

Son agentes causales frecuentes de infecciones del tracto respiratorio alto. Los virus asociados más a menudo son los CAV, los CVB, y los echovirus.

Herpangina. Es una enfermedad febril que cursa con odinofagia (dolor a la deglución), asociada a lesiones vesiculares características en las amígdalas, paladar blando, úvula y faringe posterior. Los serotipos que la producen son los que comprenden los CAV y CVB, y los echovirus 6, 9, 11, 16, 17, 22, y 25 y EV 71.

Enfermedad mano-pie-boca. Se manifiesta por lesiones vesiculares en las manos, pies y boca. Sus principales agentes causales son el CAV10, A16 y EV 71.

4.9 ENFERMEDAD NEONATAL

La infección materna (en etapas tempranas de la gestación) se ha asociado con el aumento del riesgo de aborto, y con fetos muertos o prematuros. Los EnP son una causa relevante de infección en neonatos y niños. Los serotipos que con mayor frecuencia se asocian a este tipo de infecciones en menores de 2 meses de edad incluyen echovirus 4, 9, 11, 17-20, 22, y 31, y los comprendidos entre los CBV y CAV. La presentación más habitual en neonatos infectados con EnP es la infección asintomática. La clínica puede variar desde un cuadro febril autolimitado, hasta una sepsis grave generalizada, frecuentemente mortal.

5. DIAGNÓSTICO

La confirmación etiológica de una infección por enterovirus es, en muchos casos, compleja. Ello se debe, en parte, al comportamiento biológico de estos virus, a su epidemiología y a la limitación de los métodos diagnósticos. Si bien se puede demostrar que una persona ha sido infectada con un enterovirus, no siempre se puede concluir que ese virus sea el agente causal de la enfermedad actual. Sin embargo, en muchas circunstancias y en cierto contexto epidemiológico y clínico se puede realizar un diagnóstico etiológico presuntivo. Esta dificultad radica básicamente en que los sitios de replicación de los enterovirus son la faringe y el tracto gastrointestinal; esas infecciones son a menudo asintomáticas con poca o ninguna manifestación clínica. Por lo tanto, la presencia de enterovirus en determinado tipo de muestras no implica un diagnóstico de certeza, siendo en muchas oportunidades un hallazgo casual. Además, como los síntomas producidos por estos virus son con frecuencia muy poco especifi-



Poliovirus	Coxsackie A	Coxsackie B	Echovirus	Enterovirus 68-71
Parálisis Meningitis aséptica	Herpangina Meningitis aséptica Enfermedad mano-pie-boca Parálisis Conjuntivitis hemorrágica aguda Exantemas	Pleurodinia Meningitis aséptica Pericarditis, miocarditis Enfermedad respiratoria Sepsis neonatal	Parálisis Meningitis aséptica Exantemas	Parálisis Meningo-encefalitis Enfermedad mano-pie-boca Conjuntivitis hemorrágica aguda

Tabla 20.2. Cuadros clínicos más frecuentes asociados a enterovirus. Adaptado de: Fields, Virology by Lippincott: Williams & Wilkins (2001).

cos, el diagnóstico inicial de enterovirus queda relegado hasta que se excluyen otras etiologías; por lo expuesto, las muestras enviadas al laboratorio son inadecuadas ya sea por su incorrecta conservación o por el tiempo transcurrido hasta obtenerlas. La toma de muestras clínicas para el aislamiento viral u otras técnicas para la confirmación de enterovirus es crítica.

5.1 TOMA DE LA MUESTRA

Teniendo en cuenta las limitaciones mencionadas, la realización de un diagnóstico adecuado depende fundamentalmente de la muestra adecuada que es aquella tomada en tiempo y forma, con respecto al inicio de los síntomas, conservada en frío hasta el envío al laboratorio y enviada refrigerada y con la información clínica epidemiológica necesaria. La conservación de la muestra clínica a estudiar debe hacerse a 4°C, evitando el congelamiento y, por ende, el subsiguiente proceso de descongelación que altera la viabilidad viral. Las muestras adecuadas se relacionan con el cuadro clínico, por ejemplo: en los casos de patologías neurológicas la muestra de elección es el LCR; en las conjuntivitis, los hisopados conjuntivales (HC); en las enfermedades respiratorias, los aspirados nasofaríngeos, o los hisopados faríngeos (HF); en las pericarditis con derrame (y siempre que el volumen del mismo lo permita), el líquido pericárdico; en los cuadros exantemáticos con lesiones vesiculares, el hisopado vesicular, etc. Como axioma general "cuando la infección es localizada y afecta piel (no en las lesiones máculo-papulares) o mucosas, es suficiente obtener la muestra de la superficie lesionada". Si la infección es sistémica es conveniente obtener muestras múltiples (HF, materia fecal –MF– y LCR). La excreción por materia fecal (virucopria) siempre es más prolongada (hasta 30 días) y exhibe mayor carga viral que la excreción faríngea (7 días). De todas maneras, para lograr una mejor aproximación diagnóstica, todas las muestras se deben recolectar y enviar al laboratorio dentro de la primera semana de enfermedad.

5.2 MÉTODOS DIRECTOS

Hasta el momento, el aislamiento viral es considerado el *método de referencia* para la identificación de enterovirus. Sin embargo, estos métodos requieren personal altamente entrenado, tiempo y una infraestructura especial. En algunas circunstancias, cuando la carga viral de la muestra es alta, se puede obtener el resultado en 2 a 3 días, pero en general este tiempo se extiende a 14 días o más. El procedimiento para el aislamiento viral comprende la inoculación de la muestra en células permisivas. Ninguna línea celular permite el crecimiento de todos los serotipos de enterovirus conocidos. Por consiguiente, para asegurar una máxima eficacia de aislamiento, en general se utilizan combinaciones de líneas celulares de origen humano y de mono. Por otra parte, los serotipos de CAV son difíciles de aislar en cultivos celulares. Estos virus pueden propagarse en ratones recién nacidos. Antes de su inoculación, las muestras deben ser tratadas con antibióticos y antimicóticos, y centrifugadas a alta velocidad, para evitar contaminaciones. Para el aislamiento específico de virus de polio, y dentro del contexto del Programa Mundial de Erradicación, se utiliza la línea celular L20B de origen murino, que tiene transfectado el receptor específico para virus polio. Luego del aislamiento, la identidad del serotipo puede ser determinada por neutralización de la infectividad con antisueros serotipo-específicos. En el caso de polio la identificación del virus se realiza mediante neutralización, enfrentando al aislamiento a mezclas de los 3 antisueros específicos. La tipificación individual por neutralización con antisueros de referencia para los 80 serotipos existentes es muy poco práctica. Para superar este problema, se produjeron antisueros de caballo que contienen combinaciones diferentes de antisueros individuales para enterovirus. Estos antisueros son distribuidos por la Organización Mundial de la Salud y no están al alcance de todos los laboratorios. Los aislamientos de enterovirus se incuban con cada mezcla de antisueros y luego se reinoculan en células susceptibles. Después de la incubación durante varios días, se registra el patrón

de neutralización. De éste puede inferirse el serotipo de enterovirus, ya que las mezclas están diseñadas para que los patrones de la neutralización sean distintos para cada serotipo individual. Finalmente, el tipo de enterovirus sospechoso puede ser confirmado por neutralización con el antisuero específico. Otra forma de identificación es mediante el uso del sistema de Lim Benyesh Melnick (LBM), que consiste en ocho mezclas designadas A-H, que contienen antisueros para identificar 42 serotipos de enterovirus. Existe además un panel adicional (J-P) que permite identificar 19 serotipos de CAV. El uso de estos antisueros constituye la base de un método que exhibe varios inconvenientes, tales como la significativa laboriosidad y el elevado costo, así como la eventual detección de enterovirus *no tipificables* que puede ocurrir como consecuencia de la presencia de una mezcla de enterovirus en la muestra clínica. En los trópicos, más del 50% de las muestras de materia fecal de los niños pueden contener enterovirus y la frecuencia de infecciones mixtas es elevada. No todos los serotipos de enterovirus pueden identificarse con los sueros de LBM (CAV 3, 11, 15, 17, y 24 y los EV 68 a 71). El aislamiento puede corresponder a una cepa *primo*. Éstas son variantes del serotipo antigénico reconocido, con la particularidad de ser poco o nada neutralizadas por el antisuero específico para el prototipo homólogo.

5.2.1 Técnicas moleculares

El desarrollo de técnicas moleculares ha producido un cambio muy importante en el diagnóstico de estas infecciones. Por su rapidez y sensibilidad muchos de estas técnicas están reemplazando a los procedimientos clásicos de detección y tipificación. De esta manera, se han desarrollado técnicas de reacción en cadena de la polimerasa acopladas a transcripción inversa (RT-PCR y PCR en tiempo real), que permiten detectar el genoma viral en cultivos celulares, en muestras clínicas, en biopsias o aun en necropsias. Existen además técnicas de hibridación mediante el uso de sondas, que permiten detectar genoma viral y caracterizar virus, pero cuya sensibilidad es menor a la de la RT-PCR.

De todas las técnicas moleculares, la más usada es la RT-PCR, para el diagnóstico directo en muestras clínicas. Se trata de una RT-PCR genérica que detecta todos los serotipos de enterovirus; esta característica se debe a que los iniciadores (cebadores) de la amplificación están diseñados para amplificar la región 5'NC, que es la más conservada del genoma. Muchas de estas técnicas están diseñadas en formato anidado (*nested*) que aumenta la sensibilidad. La mayor ventaja de este tipo de RT-PCR es que permite la detección rápida de enterovirus, aunque su concentración en la muestra clínica sea muy baja (LCR) y, además, permite diagnosticar enterovirus difíciles de aislar. La hibridación con sondas fue ampliamente reemplazada por la RT-PCR. Las sondas se desarrollaron inicialmente para realizar la diferenciación intratípica de los aislamientos de virus de polio (diferenciar entre cepas salvajes o vacunales) y para la hibridación *in situ* en tejido miocárdico, en especial para el estudio de CBV.

La mejor y más precisa información para la identificación de un virus se obtiene de la secuenciación genómica, ya que en ella se encuentran codificados los determinantes de las propiedades biológicas del virus. En la actualidad los métodos de secuenciación permiten determinar el serotipo de un aislamiento, su origen y su evolución en la naturaleza. El sistema de tipificación molecular se realiza mediante una RT-PCR y la posterior secuenciación nucleotídica del extremo 3' de la región del genoma que codifica para la proteína VP1.

El serotipo de un aislamiento se determina comparando la secuencia parcial de VP1, con las secuencias disponibles en una base de datos que contiene todas las secuencias de VP1 de los prototipos y las variantes de las cepas de todos los serotipos de enterovirus humanos. Este método reduce el tiempo requerido para tipificar un aislamiento, y puede ser usado para identificar aislamientos que no pudieron ser serotificados por los métodos inmunológicos convencionales. Es muy útil, además, para determinar con rapidez las relaciones epidemiológico-moleculares de un virus durante un brote.

5.3 MÉTODOS INDIRECTOS

El diagnóstico serológico para enterovirus se realiza comparando los títulos de anticuerpos de la fase aguda y la fase de convalecencia de la enfermedad. Se utilizan pares de sueros en un mismo ensayo. Esta determinación se puede hacer enfrentando diluciones crecientes de los sueros del paciente, a una determinada dilución de una cepa de referencia, o al enterovirus aislado del mismo paciente. En general, el serodiagnóstico para enterovirus tiene más valor para estudios epidemiológicos que para el diagnóstico clínico. Las técnicas habitualmente empleadas son la neutralización, la fijación de complemento y la inmunofluorescencia. El aumento de 4 o más veces en el título del segundo suero con respecto al primero (conversión serológica) indica infección aguda reciente. También se han desarrollado métodos de ELISA para la detección de anticuerpos IgM específicos, que se han utilizado con éxito en el estudio de brotes epidémicos. El inconveniente que presentan es que no son completamente serotipo-específicos. Según la configuración y la sensibilidad del método, del 10 al 70% de los sueros pueden presentar respuestas heterotípicas, causadas por infecciones producidas por otros serotipos. El serotipo detectado por ELISA puede no ser el mismo que el detectado por neutralización. Por estas razones, la serología para enterovirus no es de uso corriente para el diagnóstico clínico.

6. TRATAMIENTO

El pleconaril (3-13,5-dimetil-4-((3-metil-5-isoxazol) propilfenil)-5-(trifluorometil)-1,2,4-oxadiazol) es una droga potencialmente valiosa para el tratamiento de enfermedades producidas por enterovirus. Su mecanismo de acción es la inhibición de la replicación viral, ya que bloquea al receptor celular, impidiendo la unión del virus a la célula del hospedador evitando la transmisión de viriones infectivos. Se ha demostrado su actividad antiviral para un amplio espectro de enterovirus y rinovirus humanos. Los ensayos clínicos han probado su eficacia en el tratamiento de infecciones respiratorias y meningitis asépticas producidas por picornavirus. Algunos estudios indican que el tratamiento con esta droga disminuye la duración del cuadro clínico de las meningitis tanto en niños como en adultos. Otros estudios sugieren su utilidad en infecciones graves como por ejemplo las meningo-encefalitis crónicas en pacientes inmunocomprometidos y en casos de encefalitis graves. Se está estudiando su utilidad para sepsis neonatales. La vía de administración es oral o intravenosa para los tratamientos de pacientes inmunocomprometidos o en neonatos con cuadros de sepsis. El tratamiento con este antiviral puede ser promisorio para las infecciones producidas por picornavirus en pacientes de alto riesgo como los inmunocomprometidos, que desarrollan infecciones pulmonares y neurológicas o en los extremos de la vida (neonatos y ancianos).

7. PROFILAXIS

La profilaxis para evitar la infección por enterovirus, existe sólo para los 3 serotipos de virus polio. Desde mediados del siglo pasado hay disponibles dos excelentes vacunas. Una es la desarrollada por el Dr. Jonas Salk a virus inactivado (IPV) y la otra es la vacuna oral a virus vivo atenuado (OPV) desarrollada por el Dr. Albert Sabin. Las dos contienen los 3 serotipos de virus polio y ambas estimulan la producción de anticuerpos específicos, con la consecuente protección contra la enfermedad.

La OPV es una suspensión acuosa de cepas de virus poliomiélticos vivos y atenuados obtenidas en cultivos de tejidos de riñón de mono o de células diploides humanas. Se administra por vía oral y se elimina por materia fecal, al igual que el virus salvaje, produciendo la diseminación del virus vacunal en la población susceptible (en la comunidad). Además, genera el desarrollo de anticuerpos IgA secretorios en la mucosa intestinal. La respuesta inmunitaria (inmunogenicidad) de la OPV, medida por anticuerpos específicos, es mayor del 90% y la eficacia estimada oscila entre el 95 y el 98%

para los tres serotipos, después de la tercera dosis. La duración de la inmunidad conferida por la vacuna se estima igual o mayor a 15 años, después de completado el esquema básico de inmunización. La OPV es la vacuna utilizada en el programa oficial de vacunación, mediante el que se debe inmunizar a todos los niños a partir de los 2 meses de vida. No hay un límite máximo de edad para su aplicación, pero de acuerdo con la situación epidemiológica que existe actualmente en el país, se fijan como límite los 7 años de edad. Es, además, la vacuna recomendada para la erradicación del virus polio salvaje (manteniendo coberturas con 3 dosis de OPV > 95%). Esta vacuna se utiliza también para las acciones de bloqueo, esto es, ante la existencia de un caso de *parálisis aguda fláccida* (probable poliomiéltitis hasta que se demuestre lo contrario) se recomienda iniciar, dentro de las 48 horas, en el área de ocurrencia, el control de la vacunación de todos los niños menores de 7 años con el fin de completar esquemas. El esquema habitual comprende la aplicación de 5 dosis, las 3 primeras con un intervalo de 6 a 8 semanas, comenzando a partir de los 2 meses de vida; la cuarta dosis o primer refuerzo al año de la tercera dosis (esquema básico); y se aplicará a los 6 años (o ingreso escolar a primer grado) un segundo refuerzo (esquema completo). Los efectos adversos que puede producir son: fiebre, diarrea, cefalea y mialgias (< 1%), también parálisis asociada a vacuna (PAV) en vacunados y en personas que han estado en contacto con ellos. No todas las cepas son estables y, en especial el serotipo 3 puede revertir a la virulencia, dando lugar a la aparición de cepas neurovirulentas que pueden producir PAV. El riesgo es mayor con la primera dosis (1 caso por 1 400 000-3 400 000 dosis) y menor para las subsiguientes (1 caso por 5 900 000 dosis), y para los contactos (1 caso por 6 700 000 dosis).

En inmunodeficientes el riesgo es 3 200 a 6 800 veces más alto que en inmunocompetentes. En Argentina, en el trienio 1997-1999 se registró un riesgo asociado a la primera dosis de un caso cada 2 050 000 dosis aplicadas y, con las subsiguientes, de un caso cada 8 515 000 dosis aplicadas. Este efecto adverso no invalida su utilización para el control y erradicación de la enfermedad. Su uso está especialmente contraindicado en pacientes inmunocomprometidos y sus convivientes.

La IPV se administra por vía parenteral produciendo altos títulos de anticuerpos neutralizantes, que impiden el acceso del virus al SNC pero, a diferencia de la OPV, la protección que genera es individual ya que no hay diseminación del virus vacunal. La vacuna anti-poliomiéltica inactivada (IPV) es una suspensión acuosa de cepas (Salk o Lepine) de los 3 serotipos obtenidas en cultivos de células de riñón de mono y luego inactivados con formaldehído. La vacuna en uso desde 1987 es de potencia incrementada con respecto a las preparaciones utilizadas con anterioridad. La IPV está indicada en particular en pacientes con inmunodeficiencia primaria o secundaria y sus contactos familiares, y en personas mayores de 18 años que requieren completar esquemas o reforzarlos ante situaciones de riesgo (viajeros, epidemias). Se vacunará a partir del segundo mes de vida, sin límite de edad. Cuando razones de orden epidemiológico lo aconsejen, aunque no en forma rutinaria, se puede utilizar en la mujer embarazada que no haya sido vacunada antes. La vacunación anterior con vacuna oral no es contraindicación; puede utilizarse un esquema secuencial (IPV seguida de la OPV). No está indicado el uso de la vacuna IPV para las *acciones de bloqueo* del Programa de Erradicación de la Poliomiéltitis ya que no induce respuesta local intestinal y, por lo tanto, no impide la infección con cepas salvajes. A partir de la segunda dosis se logran títulos protectores con una seroconversión en los vacunados del 98 al 100%. Hay respuesta de IgA al nivel faríngeo pero no intestinal (diferencia con el virus de la Sabin) lo que no impide la infección con cepas salvajes. Se estima que la duración de la inmunidad conferida por la vacuna es de 10 años. El efecto adverso que puede producir la administración de la vacuna Salk es dolor en el sitio de la inoculación. Las contraindicaciones son: reacción alérgica grave posterior a una dosis previa o a componentes de la vacuna (estreptomocina, neomicina).

La presentación como vacuna puede contener la IPV sola o combinada con otras vacunas bacterianas o virales. Se la administra



sola, para inmunizar a convivientes de inmunosuprimidos y en esos casos la provee el Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. Su gran ventaja frente a OPV es que no produce PAV, por lo que será la vacuna que reemplace a la OPV una vez que se logre la erradicación del virus polio salvaje del mundo. Algunos países ya utilizan de rutina los esquemas secuenciales o la vacunación sólo con IPV. En nuestro país se vacuna con OPV a nivel nacional por el programa regular de inmunizaciones y en el sistema privado de salud se vacuna con esquemas secuenciales o sólo con IPV.

8. EPIDEMIOLOGÍA

La tasa de ataque de los EVs es mayor en los niños y las infecciones ocurren con mayor frecuencia en grupos socio-económicos bajos (por existir hacinamiento) y en las áreas tropicales con malas condiciones higiénicas. No existe reservorio animal para estos virus, siendo el hombre el único conocido. La fuente de infección, por lo tanto, es el hombre que en general se infecta de manera asintomática, y excreta el virus por materia fecal o por la vía aérea, contaminando a otros individuos, aguas u otros materiales.

La incidencia de la infección con uno o más serotipos de enterovirus puede exceder el 50%, siendo comunes las infecciones con más de un serotipo. Los enterovirus presentan un comportamiento estacional: en los países con clima templado, las infecciones aumentan su frecuencia en el verano y el otoño. En los países de clima tropical la circulación es igual a lo largo de todo el año, con picos de mayor circulación en las estaciones lluviosas.

La actividad enteroviral puede presentarse en forma endémica o epidémica. Este concepto se reveló en estudios de vigilancia de infecciones por EnP realizados en EE.UU. a lo largo de 18 años, que demostraron el comportamiento epidémico de echovirus 11 (E11) y echovirus 30 (E30), caracterizado por picos de aislamientos, seguidos de años con muy pocos aislamientos de ambos serotipos. Durante ese período se pudieron detectar grandes brotes de E30. En contraste, los virus endémicos como CBV3 fueron aislados casi todos los años, manteniendo aproximadamente el mismo número de aislamientos cada año. En ocasiones, los virus endémicos pueden producir grandes brotes epidémicos, tal como sucedió en EE.UU. con CBV3 en 1980. Además, es posible encontrar la co-circulación de distintos serotipos. La variación geográfica es también una importante característica de estos virus. Los brotes pueden producirse en pequeñas comunidades cerradas o diseminarse en forma regional, nacional y aun internacional. Además, la circulación natural de los EnP presenta un patrón que varía de acuerdo con el área geográfica, mientras que los virus polio atenuados de la vacuna se aíslan a lo largo de todo el año, lo que refleja su administración rutinaria.

8.1 EPIDEMIOLOGÍA EN ARGENTINA

Un estudio retrospectivo realizado en el Servicio de Neurovirosis del Instituto Malbrán (enero 1990 a diciembre de 1997) documentó en 1 177 casos esporádicos de meningitis aséptica (n = 536) y encefalitis (n = 641) que los enterovirus eran los principales agentes etiológicos de meningitis, con el 63,6% de los casos, representando además el 17% de los agentes causales de encefalitis.

Durante el período 1995-2004 se estudiaron 18 brotes ocurridos en el país, 16 de meningitis, uno de un síndrome febril y otro de una enfermedad exantemática. En todos los casos se detectó un enterovirus como el agente etiológico. El agente causal del síndrome febril fue el echo 12 y el del exantema, el echo 13. En este último caso se demostró una presentación inusual de dicho virus, ya que suele producir brotes de meningitis.

Los estudios de epidemiología molecular mostraron que los aislamientos de E13 del brote exantemático segregaron en un único linaje, que parece circular simultáneamente en Alemania y Argentina y que, en apariencia desplazó a los encontrados con anterioridad en Argentina y Chile en 1992. Los serotipos hallados en los brotes de meningitis, echovirus tipo 9, 30 y 4 son los más neurovirulentos y los que se relacionan más a menudo con este tipo de cuadros.

A partir de septiembre de 2005 y hasta febrero de 2006 se produjo una epidemia nacional de meningitis viral, con la ocurrencia de brotes en todo el territorio. En esa oportunidad se detectó al echovirus 4 como el agente causal. Es importante destacar que este serotipo había producido un importante brote de meningitis en el año 1996, en la provincia de Tucumán, no detectándose su circulación con posterioridad. En dicho brote se detectó además la cocirculación de echovirus 7, 9, 19 y 29. En otro de los brotes de meningitis producido por echo 9, y ocurrido en la ciudad de Gral. Güemes, provincia de Salta, se encontró el mismo serotipo en muestras de agua, tomadas de distintas fuentes del lugar. En todos los brotes de meningitis el grupo etario más comprometido fue el de 0-15 años y los casos fueron más frecuentes en hombres que en mujeres. En el verano de 2003, se detectó en las provincias de Salta y Formosa un brote de conjuntivitis hemorrágica aguda, que afectó a un gran número de personas, aunque no fue posible estimar su impacto real. Se identificó al CAV24 como su agente causal, siendo ésta la primera notificación de la circulación de CAV24 en Argentina, aunque se habían diagnosticado con anterioridad brotes de conjuntivitis hemorrágica aguda producidos por EV70. Estos resultados señalan que las cepas de CAV24 argentinas son idénticas a las causantes del brote de la misma enfermedad ocurrido en Corea en 2002. De la tipificación molecular de 153 aislamientos de EnP, obtenidos de casos de cuadros paralíticos procedentes de Argentina, Chile, Paraguay y Uruguay notificados entre 1991-1998 se identificaron 32 serotipos diferentes de EnP con la siguiente distribución: 94 del grupo echovirus (61,5%), 44 Cocksackie B (28,7%), 10 Cocksackie A (6,6%) y 5 enterovirus 71 (3,2%). Los 10 serotipos encontrados con mayor frecuencia fueron: CB1, E13, E20, CB3, E11, E6, E7, CB5, E2, E3, representando el 68,2% del total de los aislamientos. Cocksackie B1 fue el serotipo de mayor presencia en Argentina (17,7%), E13 lo fue en Chile (14,9%), y CB3 y E6 en Paraguay (16,7%, respectivamente). Algunos serotipos mostraron un marcado comportamiento epidémico: CB1 en Argentina, E13 y E7 en Argentina y Chile, mientras que otros como E11, E20 y CB3 se detectaron en la región durante todo el período analizado. El enterovirus 71 sólo se identificó en 5 casos (3,2%), tres de ellos en Argentina en 1993 proveniente de la provincia de Chaco. No se observaron serotipos de EnP predominantes en los casos analizados. La distribución, frecuencia y comportamiento de los mismos podría significar que su hallazgo es el resultado de la libre circulación de los enterovirus.

Desde que en 1994 se certificó la ausencia de circulación del virus polio salvaje de las Américas, el continente se hallaba libre del virus salvaje. Sin embargo, en el laboratorio de Neurovirosis del Instituto Malbrán se diagnosticó un caso de polio asociado a un virus vacunal Sabin derivado (VDPV) tipo 1 en un niño inmunosuprimido de Argentina. En esa oportunidad, el virus no se diseminó porque el paciente habitaba en un área con más del 90% de cobertura con 3 dosis de Sabin.

También se ha identificado la circulación de EV71 en casos de síndrome mano-pie-boca, así como la presencia de enterovirus en cuadros de miocarditis grave. Del estudio de 7 pacientes con hipogammaglobulinemias primarias (todos con patologías neurológicas) se detectaron en el laboratorio mencionado enterovirus en todos ellos. En uno se identificó el mismo echo 7 en 8 muestras consecutivas; en los demás casos se detectó: VDPV1 (poliovirus 1 derivado de la vacuna) (n=2), echo 7 (n=1), CVA16 (n=1) y polio 2 (n=2).

9. PROGRAMA DE ERRADICACIÓN DEL VIRUS POLIO SALVAJE

En el año 1985 la Organización Panamericana de la Salud tomó la decisión de erradicar la circulación del virus polio salvaje de las Américas. Esta decisión se basó en dos hechos, la existencia de un solo reservorio para el virus y la disponibilidad de una vacuna eficaz (OPV). Para ello, se fijó una estrategia que consistió en:

- Crear, en todos los países del continente americano, un sistema de vigilancia del síndrome de parálisis aguda flácida (PAF) en niños menores de 15 años.

- Mantener altas coberturas con tres dosis de vacuna Sabin (> 95%).
- Crear una red de laboratorios regionales para la vigilancia de la circulación del virus polio salvaje.

Mediante este programa se logró el objetivo planteado, detectándose el último caso de poliomielitis por virus salvaje en el continente en el año 1991. Éste fue producido por un polio tipo 1 en un niño de Perú. En el año 1994, se certificó la ausencia de circulación del virus en las Américas. Posteriormente el programa se extendió al resto del mundo, declarándose varias regiones libres de la circulación del polio salvaje. En la actualidad quedan algunos países donde se registra circulación endémica del virus y brotes de poliomielitis. Estos países están ubicados en África, sudeste asiático y Medio Oriente. Una vez alcanzado el objetivo de la erradicación global se propone vacunar con IPV, para finalmente suspender la vacunación. En la actualidad se plantea el problema de los virus derivados de la vacuna Sabin (VDPV), los que se definen por presentar una diferencia nucleotídica en la región de VP1 mayor al 0,5% con respecto a la vacuna de origen, a diferencia de los virus de Sabin que provocan PAV cuya diferencia nucleotídica con la vacuna

en VP1 es < 0,5%. Estos virus VDPV recuperan la capacidad de transmisión continua de persona a persona y de producir enfermedad parálítica. Los pacientes que padecen de **agammaglobulinemias** primarias, infectados con un virus Sabin derivado pueden excretarlos por tiempo prolongado durante muchos años. Se han detectado varios brotes por VDPV en distintas regiones (Isla La Española, Haití, 2001). Esto, junto a la posibilidad de la importación de virus salvajes de regiones endémicas, obliga a mantener la vigilancia y las altas coberturas en todo el mundo hasta después de detectado el último caso por virus salvaje.

El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante un algoritmo de trabajo diseñado para este programa, que implica el estudio de materia fecal proveniente de todos los casos de parálisis aguda flácida en niños menores de 15 años. Estas muestras se estudiaban por aislamiento viral con identificación de los aislamientos por neutralización. Actualmente se estudian por PCR en tiempo real específica para poliovirus que permite detectar virus Sabin 1,2,3 y posibles VDPVs. Estos análisis se realizan en el Departamento de Neurovirosis de Virología del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina, Centro de Referencia Regional para el Cono Sur OPS/OMS.

Bibliografía

- Cacace Linares N, Domeniconi G, Freire MC. "Miopericarditis por enterovirus asociada con raddomiolisis e insuficiencia renal". *Medicina* (Buenos Aires) 2001; 61:849-61.
- Cello J. "Studies on group-common B- and T-cell epitopes of enterovirus." Department of Clinical Virology, University of Goteborg, Goteborg, Sweden, 1996.
- Cisterna D, Lema C, Bonaventura R, Freire MC, Rico O. "Extensa distribución geográfica de brotes de meningitis viral en el período 2005-2006, en Argentina". VI Congreso Argentino SADI. 2006.
- Cisterna D, Lema C, Girard D, Rivero K, Freire MC. "Conjuntivitis hemorrágica aguda causada por coxsackievirus A24 en Argentina". XII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Buenos Aires. 2004.
- Cisterna D, Rivero K, Freire MC. "Epidemiología de los Enterovirus No Polio aislados de casos de Parálisis Flácida Aguda". VII Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires. 2002.
- Grenón SL, Robledo ML, von Specht MH, Cisterna DM, Lema CL, Freire MC. "Brote epidemiológico de meningitis viral causada por Echo tipo 4 en la Pcia. de Misiones". *Rev Arg Microbiol* 40:41-8.
- Freire MC, Cisterna D, Rivero K, Palacios G, Casas I, Tenorio A, et al. "Análisis de un brote de meningitis viral en la provincia de Tucumán, Argentina". *Pan Am J Public Health* 2003; 13: 246-51.
- Harley A, Rotbart MD. "Picornavirus antivirals". *Curr Treatment Options Infect Dis* 2003; 433-36.
- Hidalgo S, García Erro M, Cisterna D, Freire MC. "Paralytic poliomyelitis due to a vaccine-derived polio virus in a primary antibody deficient Argentinean child". *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 570-2.
- Horstmann DM. "Enterovirus infections of the central nervous system. The present and future of poliomyelitis". *Med Clin North Am* 1967; 51: 681-92.
- Liberatore D, Marcó del Pont J, Agosta G, Cisterna D, Freire MC, Bustos D, et al. "Poliomielitis parálítica vaccinal en un niño con agammaglobulinemia". *Arch Arg Pediatr* 2002; 100: 70-2.
- Mueller S, Wimmer E, Cello J. "Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains, and accidental event". *Virus Res* 2005; 111: 175-93.
- Normas Nacionales de Vacunación. Edición Ministerio de Salud Secretaría de Programas Sanitarios Subsecretaría de Programas de Prevención y Promoción Dirección Nacional de Programas Sanitarios Dirección de Epidemiología Departamento de Inmunizaciones; 2003- 2004.
- Novillo, A. "Familia Picornaviridae" En: Carballal G, Oubiña J. *Virología Médica*. 3ª ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1998; Capítulo 11.
- Oberste MS, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junntila N, et al. "Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75". *J Gen Virol* 2004; 85: 3205-12.
- Palacios G, Cisterna D, Freire MC, Cello J. "RT-Nested PCR for the detection of enterovirus in biological samples from patients with suspected enteroviral infections". *Rev Arg Microbiol* 2000; 32: 165-72.
- Palacios G, Casas I, Cisterna D, Trallero G, Tenorio A, Freire C. "Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages". *J Virol* 2002; 76: 4940-9. En: Pallansch MA and Roos RP, Section Two: *Specific Virus Families* Chapter 24: Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. Fields Virology. 4th ed New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- Palmenberg AC. "Sequence alignments of picornaviral capsids protein". En: Semler BI and Ehrenfeld E (ed): *Molecular aspects of picornavirus infections and detection*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1989; 221-41.
- Stanway G. "Structure, functional evolution of picornaviruses". *J Gen Virol* 1990; 171: 2483-501.
- Wimmer E. "Enterovirus genetics". En: Harley A, Rotbart *Human Enterovirus Infections*. Washington ASM Press. 1995; 25-72.



Virus productores de diarrea

Silvia V. Nates

1. IMPACTO DE LAS DIARREAS VIRALES EN SALUD

A pesar de que la enfermedad diarreica es reconocida desde la antigüedad como una de las causas de morbi-mortalidad más frecuente en humanos en todo el mundo, sólo recientemente los avances en el desarrollo de técnicas diagnósticas e implementación de programas de educación sanitaria, permiten albergar esperanzas de un control más efectivo de la enfermedad. Según la Organización Mundial de la Salud, la diarrea es responsable del 15 al 34% del total de muertes reportadas en los países en desarrollo, teniendo su mayor impacto en niños menores de 5 años de edad. Se estima que en este grupo etario se registran anualmente en Asia, África y América Latina 450 millones de episodios de diarrea, siendo fatales el 1 al 4% de estos episodios.

El espectro clínico de la enfermedad diarreica es muy amplio, abarcando desde infecciones asintomáticas hasta deshidratación grave y muerte. Los países en vías de desarrollo son el escenario más fértil para la enfermedad grave, ya que desde el punto de vista ecológico, las diarreas son consecuencia de la infección con un agente patógeno, más la concurrencia de un conjunto de factores cuya relación múltiple de causalidad es tan fuerte y determinante como para considerarlos también factores etiológicos. Los más importantes son: las condiciones sanitarias, la fuente de suministro y calidad del agua, el nivel de alfabetización del grupo familiar, el evidente sinergismo con la desnutrición, las pautas culturales y el estado inmunitario del hospedador. En este marco, las enfermedades diarreicas son consecuencia de la interacción de un organismo infeccioso con un hospedador susceptible, en un ambiente que facilita la transmisión y la expresión de la patogenicidad del agente. En países desarrollados, donde hay altas coberturas sanitarias y mejores condiciones socioeconómicas, la diarrea registra significativamente menor incidencia de enfermedad grave y fatalidad, lo que señala que su impacto en salud está íntimamente ligado a los escenarios donde transcurre la interacción agente-hospedador.

Los avances en Bacteriología y Parasitología de los últimos 100 años permitieron identificar la etiología de algunas enfermedades diarreicas. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos el agente causal permaneció desconocido y el rol etiológico fue asignado empíricamente a los virus, ya que a través de filtrados fecales libres de bacterias y parásitos pudo reproducirse y transmitirse la enfermedad en humanos. La identificación de virus asociados a la enfermedad diarreica llegó junto al desarrollo de técnicas diagnósticas en virología. Sin embargo, la sola presencia del virus en materia fecal no es suficiente para asignar al agente detectado el rol etiológico de virus productor de diarrea, ya que muchos virus no relacionados a la enfermedad diarreica utilizan las células del tracto gastrointestinal en alguna parte de su ruta patogénica. Esto se debe a que la renovación continua de la enorme cantidad de células que conforman el epitelio intestinal provee un territorio celular fértil para la replicación viral. Así, para muchos virus, la replicación en el epitelio intestinal es sólo una ruta de paso para alcanzar su órgano blanco (virus de la hepatitis A, poliovirus, Cocksakie A y B y echovirus, entre otros). Por el contrario, cuando el tracto gastrointestinal es el órgano blanco de la replicación viral, ésta puede llevar al daño y/o alteración de la función celular, provocando así un cuadro de gastroenteritis.

1.1 VIRUS PRODUCTORES DE DIARREAS EN HUMANOS

Para que un virus sea considerado agente etiológico de diarrea se debe demostrar la consistencia de la asociación entre el virus y el cuadro clínico a través de estudios epidemiológicos que documenten la detección del agente con frecuencia significativamente mayor en los casos de diarrea respecto a los controles; estudios inmunológicos que pongan en evidencia la respuesta inmune inducida en el hospedador; y, estudios biológicos en modelos animales y humanos que demuestren la transmisibilidad y temporalidad de la infección. A partir de la década del 70, en estudios por microscopía electrónica en heces diarreicas, emerge la certeza de la participación de los virus en la etiología de la diarrea. En 1972, fue identificado el agente *Norwalk* como el primer virus productor de diarrea en humanos. Desde entonces, diferentes virus han sido identificados en heces humanas diarreicas; algunos de ellos son hoy reconocidos como agentes productores de diarrea, mientras que aún no hay certeza del rol patogénico de otros (Tabla 21.1).

El conocimiento de la epidemiología e impacto de los virus en salud está íntimamente relacionado al desarrollo de nuevas metodologías en el diagnóstico virológico. Así, en las últimas décadas, los astrovirus y el grupo de los norovirus han emergido como agentes productores de gastroenteritis humana. Si bien esto podría estar ligado a un cambio en la ecología viral, en realidad es más bien consecuencia del desarrollo reciente de técnicas sensibles, específicos y accesibles que permiten su detección.

1.2 VIRUS DEL ESCENARIO ENDÉMICO Y EPIDÉMICO

Es posible asignar a las diarreas virales dos escenarios epidemiológicos diferentes, uno endémico y otro epidémico, según el mayor impacto en salud de los virus en uno y otro escenario. Sin embargo, hay que tener en cuenta que virus del escenario endémico también transitan el escenario epidémico, cuando las condiciones del ambiente y del hospedador generan situaciones que favorecen que la infección viral se instale y se propague.

En el escenario endémico transcurre la diarrea viral de la infancia, que afecta a niños menores de 5 años de edad y los virus involucrados son: rotavirus grupo A, astrovirus, adenovirus entéricos serotipos 40/41 y el grupo de los norovirus y sapovirus, también denominados *Norwalk like virus*, calicivirus o *small round structured virus*. En general, la infección primaria es sintomática y su transmisión es por gotitas de saliva y/o por vía fecal-oral.

La incidencia de la enfermedad declina con el aumento de la edad del hospedador y la tasa de re-infecciones sintomáticas es baja, hechos que sugieren que la infección primaria genera inmunidad específica.

En el escenario epidémico está involucrado principalmente el grupo de los norovirus, responsables del 80-90% de los brotes no bacterianos de diarrea de origen alimentario. La alta variabilidad antigénica de los virus de este grupo y la corta inmunidad que induce la primo-infección, hace que la población permanezca susceptible a diferentes serotipos, produciéndose brotes circunscriptos en población expuesta a la fuente infecciosa. La transmisión está íntimamente relacionada al consumo de alimentos y aguas contaminadas, lo que hace que los brotes por norovirus involucren a individuos de diferentes grupos etarios. Los rotavirus grupo B son también virus identificados como epidémicos, que producen brotes

CLASIFICACIÓN		CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES			EPIDEMIOLOGÍA
FAMILIA	VIRUS	TAMAÑO	ÁCIDO NUCLEICO	MORFOLOGÍA	
VIRUS PRODUCTORES DE DIARREA					
<i>Reoviridae</i>	Rotavirus Grupo A	70 nm	RNA doble cadena segmentado (11 segmentos génicos)	Apariencia de rueda	Distribución mundial; causa diarrea grave en niños menores de 3 años de edad; picos estacionales en invierno; brotes en guarderías
<i>Reoviridae</i>	Rotavirus Grupo B	70 nm	RNA doble cadena segmentado (11 segmentos génicos)	Apariencia de rueda	Brotos de diarrea grave en mayores de 15 años de edad, sólo en China
<i>Reoviridae</i>	Rotavirus Grupo C	70 nm	RNA doble cadena segmentado (11 segmentos génicos)	Apariencia de rueda	Distribución mundial; casos esporádicos de diarrea y brotes en niños y adultos
<i>Astroviridae</i>	Astrovirus	27-30 nm	RNA cadena única polaridad positiva	10% de viriones forma de estrella de 5-6 puntas	Distribución mundial; causa diarrea leve en niños menores de 3 años de edad; picos estacionales en invierno; brotes en guarderías
<i>Adenoviridae</i>	Ad serotipos 40/41	80-90 nm	DNA doble cadena	Capsómeros ordenados en triángulos equiláteros y fibra en los vértices	Distribución mundial; causa diarrea grave en niños; sin picos estacionales
<i>Caliciviridae</i>	Norovirus	27-32 nm	RNA cadena única polaridad positiva	Viriones con forma de estrella de 6 puntas	Distribución mundial; causa diarrea en niños; principal etiología de brotes no-bacterianos de origen alimentario en población general
VIRUS ASOCIADOS A DIARREA EN HUMANOS					
<i>Coronaviridae</i>	Torovirus	100-150 nm	RNA cadena única polaridad positiva	Pleomórfico, espiculado, apariencia arriñonada	¿Diarrea en niños?
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus	200 nm	RNA cadena única polaridad positiva	Pleomórfico, espiculado	¿Diarrea?
<i>Reoviridae</i>	Reovirus	70-75 nm	RNA doble cadena segmentado (10 segmentos génicos)	Apariencia de rueda	¿Diarrea?
<i>Picobirnaviridae</i>	Picobirnavirus	35 nm	RNA doble cadena segmentado (2 segmentos génicos)	Redondo	Asociado a diarrea en inmunocomprometidos.

Tabla 21.1. Virus productores de diarrea y asociados a diarrea.

de diarrea en población adulta, solamente en China. La mayor tasa de infección se registra en mayores de 30 años de edad.

Por último, los rotavirus grupo A son también responsables de brotes, cuando la infección se instala en núcleos cerrados y altamente susceptibles, como es el caso de guarderías infantiles.

2. VIRUS DEL ESCENARIO ENDÉMICO

La diarrea viral de la infancia, también llamada gastroenteritis viral aguda, es una entidad clínica que se define como un cuadro de diarrea (presentación de tres o más deposiciones blandas o acuosas en un período de 24 h.), de 1 a 5 días de duración, acompañado por náuseas y/o vómitos. La infección se adquiere por contacto directo con heces contaminadas o indirectamente a través de agua, alimentos, utensilios, suelo o por transmisión mecánica por insectos. Se estima que a la edad de 5 años prácticamente la totalidad de los niños se han infectado con uno o varios serotipos de rotavirus grupo A y astrovirus, y una alta proporción con adenovirus entéricos 40/41, Norovirus y Sapovirus. Esto hace que la incidencia de la infección viral sea comparable en diferentes regiones del mundo; sin embargo,

en los países en desarrollo se registran tasas significativamente mayores de enfermedad diarreica grave y letalidad respecto a la de los países desarrollados. Esto se debe, a que, una vez instalada la infección, cobra especial relevancia el estado inmunológico y nutricional del niño para limitar su curso y la posibilidad de acceder a la terapia de rehidratación oral para evitar la deshidratación. Cuando estos factores se conjugan negativamente, favorecen que la infección viral progrese a una enfermedad diarreica de gravedad suficiente para requerir hospitalización y aún así, muchas veces lleva a la muerte. Se estima que en los países en desarrollo mueren anualmente por diarrea viral aproximadamente quinientos mil menores de 5 años de edad mientras que en los desarrollados esta cifra es entre mil y diez mil veces menor.

Los virus del escenario endémico tienen diferente potencial patogénico y virulencia, lo que se traduce en diferente participación etiológica en la enfermedad diarreica grave. La Tabla 21.2 resume el tiempo de incubación y excreción viral y las características clínicas de las infecciones por rotavirus grupo A, astrovirus, adenovirus entérico y Norovirus; y la Tabla 3 muestra una recopilación de datos, tomados de trabajos realizados en diferentes partes del mundo

Virus	Características de la enfermedad diarreaica			
	Incubación	Duración del cuadro clínico	Excreción viral promedio	Clínica
Rotavirus	1-3 días	5-8 días	Hasta 5 días de iniciada la clínica	Diarrea grave, vómitos, fiebre, deshidratación
Astrovirus	3-4 días	1-4 días	Hasta 7 días de iniciada la clínica	Diarrea leve, ocasionalmente vómitos y fiebre
Adenovirus	8-10 días	5-12 días	Hasta 14 días de iniciada la clínica	Diarrea acuosa y vómitos ocasionalmente deshidratación
Norovirus	12-48 horas	1-3 días	Hasta 15 días de iniciada la clínica	Diarrea, náuseas, vómitos

Tabla 21.2. Características de la enfermedad diarreaica producida por virus del escenario endémico.

en los últimos años, utilizando técnicas diagnósticas comparables, que revelan la participación etiológica de los virus endémicos en la diarrea grave.

Los resultados indican que la infección por rotavirus grupo A es la causa más frecuente de diarrea severa en niños menores de 5 años de edad en todo el mundo y se estima que es responsable de la etiología infecciosa en el 40 al 80% de los casos de diarrea viral grave. Probablemente, los segundos agentes etiológicos en importancia sean los Norovirus. En la actualidad su frecuencia en la diarrea aguda podría estar subestimada debido a la alta variabilidad antigénica de este grupo de virus que hace que algunas variantes no sean detectadas con los ensayos utilizados. A esto se suma la falta de reactivos comercialmente disponibles, lo que limita los estudios de Norovirus a centros de investigación.

Los astrovirus emergieron como agentes de gastroenteritis aguda hace aproximadamente 15 años, como consecuencia del desarrollo de técnicas de ELISA y PCR previa transcripción inversa (RT-PCR), dirigidas contra el antígeno de grupo y secuencias genómicas conservadas, respectivamente. Los estudios epidemiológicos realizados en distintas partes del mundo coinciden en que este virus está asociado a cuadros de diarrea leve. Por ello, los astrovirus se detectan con mayor frecuencia entre pacientes ambulatorios con diarrea que entre los internados.

Los adenovirus serotipos 40 y 41 son responsables de una enfermedad diarreaica de severidad comparable a los rotavirus grupo A; sin embargo su frecuencia en la diarrea grave es baja (2-6%).

En este capítulo se prestará especial atención a los rotavirus grupo A debido a su mayor impacto en la salud humana.

3. ROTAVIRUS

En el año 1973, Bishop y col. observaron, por microscopía electrónica en biopsias duodenales de niños con diarrea, virus de aproximadamente 70-75 nm a los que, por su morfología similar a una rueda con rayos cortos y borde externo liso, se los denominó rotavirus (*rota*, del latín, rueda). Esta morfología característica de la partícula completa se visualiza cuando el eje de simetría viral está 5 veces desplazado respecto a su posición natural. (Figura 21.1) Numerosos estudios posteriores confirmaron la presencia del virus en heces diarreaicas, estableciendo a través de estudios epidemiológicos e inmunológicos, la relación causal entre los rotavirus y la diarrea aguda.

3.1 CLASIFICACIÓN

Los rotavirus están clasificados dentro de la Familia *Reoviridae*, e integran uno de los 12 géneros que la conforman, que incluye patógenos humanos, animales (mamíferos, aves y peces) y de plantas (géneros *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Seadornavirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Oryzavirus*, *Idnoreovirus* y *Mycoreovirus*). El género *Rotavirus*, a su vez, incluye 7 grupos virales, designados con letra mayúscula de la A a la G, clasificados en base a diferencias antigénicas en la proteína más abundante del virus (proteína VP6). Los virus de los grupos A,

B y C infectan humanos, siendo los rotavirus grupo A los agentes etiológicos más importantes de diarrea aguda en niños menores de 5 años de edad en todo el mundo, responsables de un tercio de los casos de diarrea severa que requieren hospitalización. Los rotavirus grupo B producen brotes epidémicos de diarrea en adultos en China, e infecciones esporádicas en países asiáticos; mientras que los del grupo C rara vez están implicados en la etiología de la diarrea. A su vez, los rotavirus del grupo A se clasifican en subgrupos I, II, I y II y no I no II, en base a la presencia o ausencia de los epitopes I y II en la proteína VP6, desconociéndose aún la implicancia de estas variantes antigénicas en la patogenicidad del virus. Por último, los rotavirus grupo A se clasifican en serotipos, definidos por ensayos de neutralización en base a diferencias antigénicas y en genotipos en base a divergencias nucleotídicas de las proteínas VP7 y VP4. La proteína VP7 define G tipos y la VP4 P tipos. Para la proteína VP7 se identificaron 15 G tipos, en los que se correlaciona la clasificación serológica y genómica. Del total de G tipos, 11 han sido aislados en humanos. La clasificación en base a la proteína VP4 es más compleja, ya que por ensayos de neutralización se han identificado 7 serotipos y por análisis geonómico 11 P tipos que infectan humanos, pero se desconoce la correlación entre serotipos y genotipos.

De este modo, la clasificación de los rotavirus grupo A en base a las proteínas estructurales VP6, VP7 y VP4 define un criptograma en el que se consignan: Grupo/Subgrupo (definidos por la proteína VP6) / Genotipo G (definido por la proteína VP7) / Serotipo P, Subtipo P y Genotipo P entre corchetes (definidos por la proteína VP4). Por ejemplo, A/II/G4/P1A[8].

3.2 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

La partícula viral completa es relativamente estable en el ambiente. Son resistentes a fluorocarbonos, éter, cloroformo y detergentes no iónicos, como consecuencia de la ausencia de lípidos en la estructura del virus; pero sensibles a etanol al 95%, fenoles, formalina y duodecil sulfato de sodio. La infectividad se mantiene entre pH 3 y 9; a pHs más alcalinos la proteína VP4 se pierde selectivamente de la estructura viral y pHs menores de 3 resultan en la disociación completa de la partícula.

3.3 ESTRUCTURA DE LOS ROTAVIRUS GRUPO A

Los rotavirus son virus desnudos, de simetría icosaédrica. La estructura viral es una cápside formada por 3 capas proteicas concéntricas (Figura 21.2).

La capa interna, denominada core, está constituida por 60 dímeros de la proteína VP2 y alberga el genoma viral y las proteínas VP1 y VP3, involucradas en la replicación del virus. La capa proteica de VP2 a su vez, está rodeada por moléculas de la proteína VP6 dispuestas en trimeros, que forman la segunda cubierta proteica. La VP6 es la proteína más abundante en la estructura del virus y es la que le imparte homogeneidad morfológica. La tercera capa proteica (capa externa viral) está formada por trimeros de la glicoproteína

Referencia bibliográfica	Período de estudio	País	Rotavirus (técnica: EIA)	Astrovirus (técnica: EIA)	Adenovirus 40/41 (técnica: EIA)	Norovirus (técnica: RT-PCR)	Sapovirus (técnica: RT-PCR)
<i>J Infect Dis</i> 1999; 179:1139-44	1997-1995	Perú	52%	4%	4%		
<i>J Med Virol</i> 1999; 57: 390-6	1994-1996	China	56%	8,50%	2,50%	7,60%	
<i>J Clin Microbiol</i> 2000; 38: 1058-62	1995-1998	Australia	65,50%	3%	4,10%		
<i>Pediatr Infect Dis J</i> 2001; 20: 849-53	2000	Japón	47%			18%	
<i>Rev Inst Med Trop Sao Paulo</i> 2001; 43:193-7	1997-1998	Argentina	35,30%	4,50%	1,50%		
<i>Indian J Pathol Microbiol</i> 2003; 46: 274-8	1999-2000	India	23,20%				
<i>Rev Panam Salud Pública</i> 2004; 16:317-7	1998-2003	América Latina	38%				
<i>Inf Genet Evol</i> 2005; 5:281-90	2002-2004	USA				7,10%	1,40%
<i>J Clin Microbiol</i> 2005; 43: 4064-9	1999-2002	Brasil	32%				
<i>J Infect Dis</i> 2005; 1:192 Suppl 1:5 44-8	2001-2003	Taiwan	43%		2,50%		

Tabla 21.3. Frecuencia de virus endémicos en niños menores de 5 años de edad hospitalizados por diarrea. EIA: Enzimo inmunoensayo. RT-PCR: Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa.

VP7, que se ensamblan con los extremos de la VP6 subyacente. A su vez, desde la capa externa se extienden 60 espículas, constituidas por la proteína VP4, que interacciona con 2 moléculas de VP7 y hacia el interior con 6 moléculas de VP6. Las tres capas proteicas están interconectadas a través de 132 canales, que se extienden desde la capa externa al core. La proteína VP6 es la responsable de la integridad estructural de las partículas de rotavirus ya que establece interacciones inter-VP6, que estabilizan la capa proteica intermedia y a su vez interacciona con las proteínas VP2 y VP7/VP4, haciendo el soporte de unión entre las capas proteicas media e interna y media y externa. La estructura de tres capas proteicas concéntricas corresponde a una partícula viral completa. La pérdida de la capa externa determina partículas virales de doble cubierta proteica, no infectivas y no serotificables por ausencia de VP7 y VP4. A su vez, la capa proteica VP6 puede ser removida con agentes caotrópicos, quedando solo el core. Las tres formas estructurales de rotavirus coexisten y pueden ser observadas por microscopía electrónica en muestras fecales.

3.4 GENOMA VIRAL

El genoma de los rotavirus está constituido por RNA de doble cadena, segmentado en 11 porciones genómicas, que codifican seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y seis no estructurales (NSP1-NSP6). Cada segmento codifica para una proteína estructural o no estructural, excepto el segmento 11 que lleva la información genética de 2 proteínas no estructurales.

El genoma viral segmentado posibilita la reasociación de los segmentos durante la replicación del virus. Así, las co-infecciones con dos o más cepas de rotavirus pueden originar una progenie viral cuyo material genómico contenga segmentos de cepas parentales. Se postula que esta sería la vía de evolución de los rotavirus en la naturaleza.

La disposición de los marcos de lectura de los 11 segmentos es similar en los diferentes serotipos virales. La hebra positiva de RNA siempre tiene en su inicio una 5' guanidina, seguida de una porción nucleotídica conservada no codificante, una región codificante y otro grupo de secuencias no codificantes que invariablemente ter-

minan en dos citidinas en el extremo 3'. Dentro de la región codificante, los primeros 10 nucleótidos del extremo 5' y los últimos 8 nucleótidos del extremo 3' están altamente conservados en todos los segmentos; esta secuencia consenso codifica señales para la replicación y ensamble viral.

La resolución de los 11 segmentos del genoma por electroforesis en geles de poliacrilamida define un perfil de migración característico, denominado **electroferotipo**, en el que los 11 segmentos de RNA se distribuyen en 4 grupos: el primero contiene los 4 segmentos de mayor peso molecular (segmentos 1, 2, 3 y 4); el segundo dos segmentos medianos (segmentos 5 y 6); el tercero tres (segmentos 7, 8 y 9); y el cuarto los 2 segmentos menores (10 y 11) (*Figura 21.3*). Esta distribución 4,2,3,2 en una matriz de poliacrilamida es la huella genómica que distingue los rotavirus grupo A (excepto los aislados de pollo). Dentro de este perfil característico de migración, se han descrito variables electroferotípicas, que corresponden a mayores o menores migraciones de los segmentos genómicos dentro de uno o varios grupos. Estas variantes electroferotípicas en general, no se corresponden con variantes serotípicas, ya que cepas de igual serotipo pueden presentar diferente electroferotipo y a su vez, electroferotipos iguales pueden corresponder a serotipos diferentes. Por lo tanto, el patrón de migración genómico no es un criterio de clasificación, sino de diferenciación de cepas de rotavirus (*Figura 21.3*).

3.5 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS VIRALES

Las principales proteínas antigénicas de los rotavirus son las proteínas estructurales VP6 (contiene determinantes antigénicos de grupo y sub-grupo) y VP7 y VP4 (contienen determinantes antigénicos de serotipo). Los anticuerpos neutralizantes sero-específicos, inducidos por las proteínas VP7 y VP4 durante una primo-infección, son los que confieren inmunidad protectora en las sucesivas re-exposiciones al virus.

VP6

La proteína VP6 contiene el determinante antigénico de reactividad de grupo y subgrupo. Los epitopes grupo específicos se localizan en cuatro regiones aminoácidas (residuos peptídicos 32-64, 155-167, 208-294 y 380-397), mientras que la reactividad de sub-grupo está

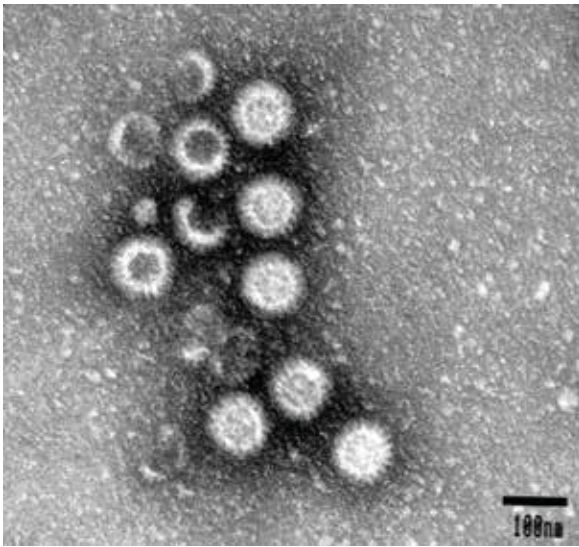


Figura 21.1. Microscopía electrónica de rotavirus. Tinción negativa con acetato de uranilo. Referencia de tamaño: Barra 100 nm. *Lab. Gastroenteritis Virales, Instituto de Virología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.*

determinada por aminoácidos ubicados en las posiciones 172, 305 y 315 y un residuo aminoácido 296-299. Los anticuerpos sub-grupo específicos reconocen epitopes conformacionales, formados por trímeros de VP6. La sola mutación de aminoácidos en las posiciones 172 y 305 genera un cambio conformacional en la estructura del trímero que afecta la unión de anticuerpos dirigidos contra el sub-grupo I, mientras que mutaciones en las posiciones 305, 306 y 315 inciden en el reconocimiento de anticuerpos dirigidos contra el sub-grupo II. También se han localizado en esta proteína epitopes que inducen la activación de linfocitos T con actividad citotóxica y cooperadora.

La estructura antigénica de grupo está altamente conservada en los rotavirus grupo A, independientemente del origen animal o humano de la cepa. Esto hace que la respuesta inmune inducida contra la proteína VP6 en el curso de una infección por rotavirus grupo A tenga reactividad cruzada con virus heterólogos del grupo A (cepas de diferentes especies animales) y virus heterotípicos (cepas de diferente serotipo).

VP7

La proteína VP7, también denominada proteína G, contiene determinantes antigénicos de serotipo G, que inducen en el hospedador anticuerpos neutralizantes. Se han identificado por ensayos de neutralización 15 serotipos de la proteína VP7, de los cuales 11 G tipos han sido aislados de humanos. Estudios de la secuencia aminoacídica deducida de los 15 serotipos señalan nueve regiones, denominadas VR1-VR9, altamente divergentes entre serotipos distintos, pero conservadas dentro de un mismo serotipo. Esto permite predecir el serotipo a partir de la secuencia de estas regiones, ya que muestran entre un 91 y 100% de identidad nucleotídica intragenotípica entre cepas del grupo A aisladas de diferentes especies animales y un porcentaje de identidad mayor al 95% entre cepas homólogas de igual serotipo.

Utilizando como presión de selección anticuerpos monoclonales, se obtuvieron mutantes de escape a la neutralización, que resultaron en cepas con sustituciones de aminoácidos en las regiones variables VR5, VR7 y VR9. Esto permitió identificar en estas regiones genómicas de la proteína VP7 a los principales determinantes antigénicos de neutralización.

También se ha demostrado que la proteína VP7 es blanco importante de actividad citotóxica sero-específica y heterotípica.

La estructura general de VP7 es similar en los rotavirus grupo A, B y C que infectan humanos, pero difiere considerablemente en su composición aminoacídica, mostrando las cepas de referencia de rotavirus grupo B y C homología del 38% y 30%, respectivamente con la del grupo A. Esto se traduce en que la inmunidad inducida por la proteína VP7 del grupo A no protege en infecciones con virus del grupo B y C.

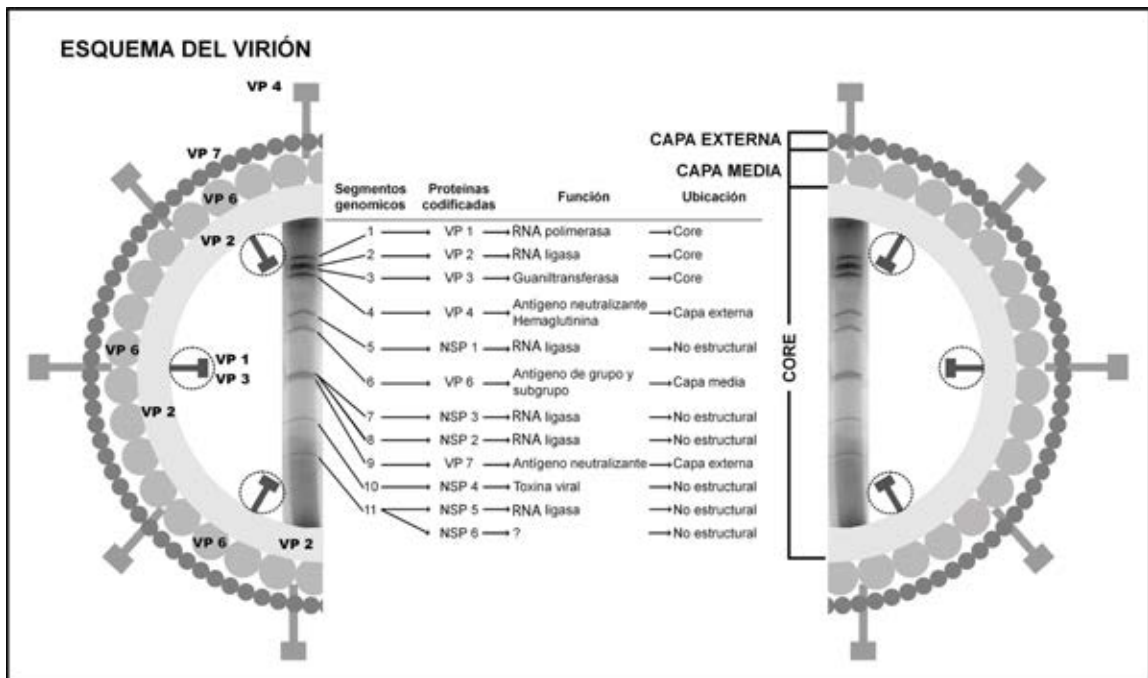


Figura 21.2. Esquema del virión. En el diagrama se muestran las 3 capas concéntricas de proteínas que forman la cápside viral (capa interna o core, capa media y capa externa), la localización de las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 y el genoma viral resuelto en un gel de poliacrilamida. Se indica la/las proteínas codificadas por cada uno de los 11 segmentos genómicos y la función de cada proteína. Nates S., Instituto de Virología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

VP4

La proteína VP4, también denominada proteína de clivaje o proteína P, contiene determinantes antigénicos de serotipo P, que inducen en el hospedador infectado anticuerpos neutralizantes. Por ensayos de neutralización, se han identificado 7 serotipos (1-6 y 11) y dos subtipos (A y B) que infectan humanos, de cuya combinación resultan 9 variantes antigénicas (P1A, P1B, P2A, P3A, P3B, P4, P5A, P6 y P11).

3.6 REPLICACIÓN VIRAL

La replicación de los rotavirus ha sido estudiada en cultivos celulares. Las características generales del ciclo replicativo son:

- El tratamiento con tripsina de las partículas de rotavirus genera el clivaje de la proteína VP4, dando como producto las fracciones VP5 y VP8, que permanecen asociadas al virión. El proceso de clivaje aumenta la infectividad viral, probablemente facilitando la penetración del virus a la célula.
- El ciclo replicativo es citoplasmático.
- Sólo las partículas virales completas tienen la capacidad de unirse a células susceptibles, pero esta unión no requiere del clivaje de VP4 ni de la glicosilación de VP7.
- Al presente se desconoce la identidad del receptor celular, pero se postula que el receptor funcional sería un complejo de varias proteínas celulares inmersas en microdominios lipídicos de membrana, ricos en colesterol y glicoesfingolípidos.
- Luego de la unión, entre los 60 y 90 minutos siguientes, el virus es internalizado en un proceso que requiere de actividad celular, ya que se inhibe entre 0° C y 4° C.
- El mecanismo de penetración del virus a la célula es motivo de controversia. Se postula como probable mecanismo la endocitosis, seguida por el transporte de las partículas virales a lisosomas y el posterior desnudamiento en los mismos, en condiciones de baja concentración de calcio y/o la penetración directa del genoma viral, similar al mecanismo descrito para bacteriófagos, facilitado por la permeabilización de la membrana celular mediada por VP4.
- Se desconoce el mecanismo y el sitio citoplasmático de activación transcripcional, pero se conoce que la transcripción es mediada por la proteína VP1 y es asimétrica, ya que inicialmente sólo se sintetizan hebras de RNA de polaridad positiva. Estas hebras positivas actúan como RNA mensajero para la síntesis de proteínas, utilizando ribosomas celulares y como moldes para la síntesis de las hebras genómicas de polaridad negativa. Recientemente se identificó a la proteína no estructural NSP2 como el *motor molecular* del ciclo replicativo. La NSP2 sería la pieza central alrededor de la que se *construye* la maquinaria replicativa del virus.
- Las hebras RNA negativas sintetizadas se asocian inmediatamente con las positivas complementarias, formando RNAs de dobles cadenas. Estos genomas virales hijos, a su vez, se asocian con las proteínas NSP1, NSP2, VP1, VP2, VP3 y VP6, generando partículas nacientes sub-virales, denominadas partículas replicativas. La formación de estas estructuras sub-virales ocurre en zonas citoplasmáticas electrodensas, denominadas viroplasmatas.
- Desde los viroplasmatas, las partículas sub-virales brotan hacia el interior del retículo endoplásmico, adquiriendo en este proceso una envoltura transitoria. Esta envoltura transitoria, en el tránsito al interior del retículo endoplásmico, será reemplazada por una capa de proteínas, que posteriormente conformará la cápside del virión maduro. La VP7 sería sintetizada en ribosomas asociados al retículo endoplásmico, glicosiladas e insertadas en la membrana reticular. Las partículas en formación brotarían a través del retículo endoplásmico, incorporando la proteína VP7 a la estructura viral.
- La progenie viral es liberada al lumen intestinal por lisis celular. A pesar de que en los estadios avanzados de la infección ocurre una extensa lisis celular, muchas partículas de doble y triple cubierta permanecen unidas a detritos celulares, sugiriendo

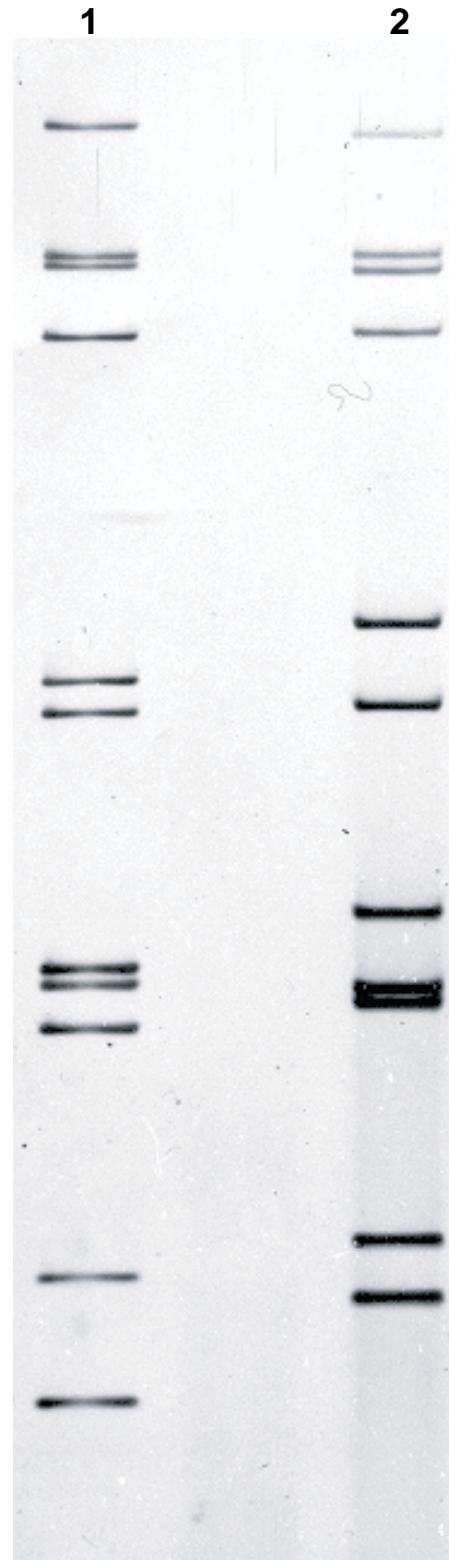


Figura 21.3. Electroferotipos de rotavirus. Corrida electroforética en matriz de poliacrilamida; revelado con tinción argéntica. **Calle 1:** electroferotipo largo; **Calle 2:** electroferotipo corto. En ambos se observan los 11 segmentos genómicos, distribuidos en 4 grupos: grupo 1, 4 segmentos; grupo 2, 2 segmentos; grupo 3, 3 segmentos y grupo 4, 2 segmentos. La diferencia de migración de los segmentos del grupo 4 son los que determinan electroferotipos largos y cortos. Lab. Gastroenteritis Virales. Instituto de Virología "Dr J.M.Vanella". Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

una interacción de éstas proteínas con la membrana y el citoesqueleto celular. Estas estructuras celulares estarían asociadas a funciones de transporte intracelular de partículas virales.

3.6.1 Efectos de la replicación viral en la célula hospedadora

El tropismo celular de los rotavirus está restringido casi exclusivamente a las células epiteliales del intestino delgado. La replicación viral inhibe en los enterocitos la síntesis de DNA, RNA y proteínas celulares y aumenta la permeabilidad de la membrana celular al calcio, sodio y potasio. Se observan tempranamente vacuolas e inclusiones citoplasmáticas celulares y alteraciones en la organización del citoesqueleto. El ciclo replicativo lleva finalmente a la lisis celular.

En cultivos celulares infectados se observa apertura en las uniones intercelulares anteriores al efecto citopático y a la liberación de la progenie viral. Por lo tanto, sería posible que las células epiteliales del intestino se descamaran tempranamente durante el ciclo replicativo viral, antes de que se visualicen alteraciones celulares.

3.7 PATOGENESIS VIRAL

Los rotavirus replican en el tracto gastrointestinal sólo en enterocitos maduros y los cambios histopatológicos se limitan exclusivamente al intestino delgado, pudiéndose observar acortamiento de las vellosidades intestinales, infiltrado de células mononucleadas en la lámina propia y elongación de las criptas. Los enterocitos infectados se desprenden de la porción apical de las vellosidades y se observan vacuolas en sus citoplasmas. Funcionalmente, hay mala absorción de d-xylosa, motilidad gástrica anormal y niveles disminuidos de disacaridasas.

Sin embargo, el mecanismo de inducción de la diarrea pareciera ser múltiple ya que la mala absorción, como consecuencia del daño y lisis de la célula epitelial, y el acortamiento del vello intestinal, no justifican la diarrea que se produce en estados muy tempranos de la infección, inclusive antes de que las alteraciones morfológicas sean manifiestas. Este hecho fue comprobado en animales y humanos infectados por rotavirus, observándose en biopsias intestinales cambios histopatológicos en menos del 5% de los casos. Esto sugiere que otros mecanismos también participarían en la patogénesis viral. En el año 1996 se demostró que la proteína no estructural NSP4, por sí sola, es capaz de inducir diarrea en ratones de manera similar al cuadro clínico causado por el virus. A partir de este hallazgo se postuló a la NSP4 como **enterotoxina viral**. Esta proteína sería capaz de inducir en las células intestinales una señal que desencadena la movilización del calcio intracelular y la secreción de cloruros, además de reducir la absorción de glucosa y afectar el citoesqueleto de las células epiteliales polarizadas. Se postula que los receptores celulares para NSP4 son edad dependiente, disminuyendo significativamente con el aumento de edad. Esto explicaría que el cuadro clínico de diarrea sea mucho más frecuente en individuos de corta edad. Por otra parte, hay evidencias en modelos animales de la participación del sistema nervioso entérico en la inducción de la secreción de electrolitos y agua en el intestino delgado, ya que su inhibición atenúa la respuesta secretoria de fluidos. De este modo, la patogénesis de la diarrea por rotavirus podría ser multifactorial, participando el daño y alteración de la función celular generada por la replicación viral y el desequilibrio electrolítico celular inducido por la proteína no estructural NSP4 y la estimulación del sistema nervioso entérico.

El tropismo tisular es un aspecto crítico de la patogénesis de los rotavirus. El epitelio del intestino delgado es el órgano blanco de la infección por estos virus, y el cuadro clínico resultante es la diarrea. Sin embargo, en un número importante de reportes clínicos se ha demostrado rotavirus en diferentes sitios extra-intestinales, señalando que la historia natural de la primo-infección por rotavirus tiene una fase virémica, durante la cual el virus puede acceder a tejidos periféricos. Los estudios en modelos animales sugieren que hay determinantes virales que identifican *cepas con fenotipo de*

diseminación y que una vez que estas cepas alcanzan el tejido extra-intestinal, deben interactuar con factores del hospedador para que se instale una infección productiva. Esto explicaría que en niños con inmunodeficiencias primarias, la infección por rotavirus puede producir una diarrea prolongada, con diseminación viral a hígado y riñón. Ocasionalmente, se han demostrado antígenos de rotavirus en el tracto respiratorio superior y síntomas respiratorios en algunos individuos que cursan la infección.

3.8 HISTORIA NATURAL Y CURSO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS

Las infecciones por rotavirus son en general asintomáticas en neonatos y adultos, tal vez debido a la inmunidad adquirida en forma pasiva y activa, respectivamente. Estas poblaciones son reservorios importantes para la transmisión del virus a hospedadores susceptibles que, en su mayoría, son niños de muy corta edad, en los que la infección es, en general, sintomática. La resistencia a las condiciones ambientales de los rotavirus, su capacidad para permanecer infectivos sobre superficies bajo diferentes condiciones y el gran número de viriones excretados en heces por los individuos infectados, contribuyen a la diseminación del virus en la naturaleza y a la alta transmisibilidad de la infección.

Vía de transmisión: En la gran mayoría de los casos es fecal-oral; pero se postula que la vía respiratoria también puede ser puerta de ingreso del virus al hospedador, debido a que hay registro de brotes por rotavirus en los que la vía fecal-oral no pudo ser documentada y detección de antígeno viral en las vías respiratorias altas.

Período de incubación: De uno a tres días.

Manifestaciones de la enfermedad: La infección por rotavirus se traduce en un amplio espectro de manifestaciones que abarca desde infecciones subclínicas a la diarrea severa, deshidratación grave y muerte. En las infecciones sintomáticas el periodo de incubación es seguido por fiebre, vómito y diarrea acuosa. La fiebre y vómitos por lo general remiten dentro de los tres días de iniciado el cuadro clínico, mientras que la diarrea persiste durante 3 a 8 días. La pérdida de líquido y electrolitos puede llevar a la deshidratación y muerte del individuo. Las heces acuosas, en general, no contienen glóbulos rojos ni blancos.

La fase virémica de la primo-infección por rotavirus permitiría que el virus acceda a diferentes tejidos extra-intestinales; pero al presente se desconocen los factores del virus y del hospedador que deberían conjugarse para que, una vez alcanzado el tejido (hígado, riñón e incluso sistema nervioso central), se instale la infección y progrese a un cuadro clínico.

3.9 EPIDEMIOLOGÍA

Los rotavirus son virus ubicuos; entre los 3 y 5 años de edad, el 95% de los niños del mundo han adquirido la infección y desarrollado anticuerpos anti-rotavirus. La mayor incidencia de gastroenteritis por rotavirus es en el grupo etario entre los 4 y 36 meses de edad, siendo ésta la franja poblacional de mayor riesgo de desarrollar la enfermedad severa. En los países desarrollados, los rotavirus son responsables del 60 al 70% de las hospitalizaciones por diarrea aguda, pero con registros de muy baja letalidad. La situación es opuesta en los países en desarrollo, en los que el porcentaje de internación por rotavirus es menor (entre 12 y 50%) debido a la mayor participación de parásitos y bacterias en la etiología de la diarrea, pero con tasas de enfermedad grave y letalidad entre 100 y 1000 veces mayores que en los países desarrollados. Esto señala que la severidad de la enfermedad diarreica está íntimamente ligada a la interacción del agente infeccioso con factores del hospedador y del medio. Así, las condiciones socioeconómicas deficientes, el acceso limitado a la atención médica y al tratamiento con sales de rehidratación oral y las malas condiciones nutricionales e inmunológicas del hospedador, son factores que facilitan que la infección se manifieste como enfermedad grave y muerte. Esto se refleja en los datos publicados por Parashar y col. (*Emerging Infectious Disease*, 2003;9:5) quienes, a través de la revisión de estudios publicados desde 1986 al año 2000, estimaron el

impacto de la enfermedad diarreica por rotavirus, en niños menores de cinco años de edad, según condición socioeconómica. (Tabla 21.4)

La infección por rotavirus es endémica y en regiones con clima templado se registra un pico de incidencia durante los meses fríos del año. Este patrón estacional es mucho menos marcado en regiones tropicales. Se desconocen las causas que determinan el patrón de circulación del virus en la naturaleza, pero es posible que la temperatura y la humedad tengan una influencia importante, ya que los rotavirus pierden rápidamente la infectividad en ambientes de alta humedad relativa (aprox. 80%).

A pesar de la diversidad de serotipos de rotavirus aislados en humanos, el 95% de ellos corresponden a los tipos G1, G2, G3 y G4 en combinación con P4 y P8, siendo G1P8 el más prevalente en el mundo. Recientemente, se ha determinado la emergencia del serotipo G9 en diferentes regiones, siendo en algunas ya más prevalente que G1. No hay un patrón definido de circulación de serotipos. En general co-circulan 2 ó más diferentes y a menudo uno de ellos predomina sobre los otros durante 1 ó 2 años, para ser reemplazado después por otro serotipo, posiblemente como consecuencia de una selección inmunológica.

3.9.1. Epidemiología de la infección por rotavirus en Argentina

En 1995, la Sociedad Argentina de Virología convocó a grupos de trabajo en el área a un taller de gastroenteritis virales con el objeto de organizar estudios colaborativos en el tema. De este taller y con el apoyo de la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación, surgió en 1996 un grupo de trabajo, al que se le dio el nombre de Grupo para el Estudio de las Diarreas Virales, formado por laboratorios y unidades centinelas en las ciudades de Buenos Aires, La Plata, Mar del Plata, Córdoba, Tucumán, Rosario y Mendoza; y el Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán", como laboratorio de referencia. Los objetivos de este grupo fueron examinar la información publicada e inédita de la epidemiología de los rotavirus en la Argentina y realizar un relevamiento nacional de diarreas por rotavirus en niños menores de tres años hospitalizados por gastroenteritis aguda, utilizando un protocolo de trabajo común. Los estudios analizados indicaron que en Argentina, los rotavirus son la causa más frecuente de diarrea en los niños, en general, asociados a la enfermedad diarreica severa. Se estimó que en la población de menores de dos años de edad, uno de cada ocho niños requirió de atención médica; y uno de cada treinta y uno fue hospitalizado por diarrea de etiología rotaviral. Los resultados del primer año de relevamiento en los hospitales centinelas indicaron que el 9% de la internación pediátrica es debida a diarrea aguda, detectándose rotavirus en el 42,1% de los casos estudiados. Se estimó que los rotavirus son responsables del 3,8% de las hospitalizaciones pediátricas. La internación por diarrea (62%) y la internación asociada a diarrea por rotavirus (71,3%) fue mayor durante el primer año de vida. Se determinó un patrón de circulación endémica de rotavirus, con picos de mayor incidencia entre los meses de abril y junio. Los resultados señalaron a los rotavirus como el principal agente etiológico de gastroenteritis aguda infantil en nuestro país. La serotipificación de las cepas circulantes determinó que el 96% correspondió a los G tipos comunes 1-4, en su mayoría asociados al P tipo P1A[8]. Los serotipos G5 y G9 también fueron detectados pero con frecuencias menores al 1%.

Los datos citados fueron publicados en la *Revista Panamericana de Salud Pública* 1998;3(2)69-77; *Revista Argentina de Microbiología* 1999;31:1-12 y en el *J Medical Virology* 2001;1-9.

3.10 INMUNIDAD Y RESISTENCIA DEL HOSPEDADOR

La respuesta inmune inducida por la infección natural y experimental con rotavirus ha sido extensamente estudiada en humanos y animales; y si bien cada modelo mostró características propias, se pudieron establecer las siguientes generalidades sobre los mecanismos inductores y efectores de la respuesta inmune frente a la infección por rotavirus:

- La primo-infección por rotavirus protege contra la enfermedad diarreica severa en las re-exposiciones subsecuentes. Los estudios prospectivos de niños que cursaron primo-infección natural por rotavirus permitieron establecer que la primo-infección provoca un cuadro clínico importante, que en la mayoría de los casos requiere atención médica y muchas veces hospitalización; mientras que la clínica de las re-infecciones es moderada, leve o asintomática. Este mecanismo es determinante en la inmunidad anti-rotavirus y es el criterio utilizado para evaluar la eficacia de las vacunas anti-rotavirus.
- La infección por rotavirus induce respuesta inmune local en intestino y respuesta inmune sistémica. La inmunidad inducida es celular y humoral, homotípica y heterotípica, debido a que algunos serotipos comparten epítopes neutralizantes. Así, la infección primaria por rotavirus induce anticuerpos neutralizantes serotipos G y P específicos (respuesta homotípica) y en menor medida contra otros serotipos (respuesta heterotípica). Esto hace que si la re-infección es con una cepa de igual serotipo que la primera, tendrá un curso subclínico o muy leve; si por el contrario es con un serotipo diferente al primero, la enfermedad diarreica será moderada o leve y muchas veces subclínica, dependiendo del tiempo transcurrido entre la primo-infección y la re-exposición al virus. Las infecciones repetidas tienden a ampliar el rango de serotipos contra los que se adquiere inmunidad protectora, llegando así a la situación en la que las re-infecciones son asintomáticas.
- Se requiere un umbral mínimo de anticuerpos IgA secretores e IgA / IgG séricos para la protección en la re-exposición al virus. Así, la inmunidad local y sistémica se complementan. La inmunidad local es la responsable del bloqueo del ciclo del virus en el intestino, por lo tanto es imprescindible para la protección. La inmunidad sistémica es el respaldo de la inmunidad local, ya que por trasudación, los anticuerpos séricos llegan al lumen intestinal. Mientras más alto sea el título de anticuerpos séricos, mayor concentración llegará al lumen intestinal, alcanzando el umbral que se requiere para la respuesta protectora.
- La inmunidad celular T CD8⁺ desempeña un rol importante en la resolución de la infección primaria, confiriendo protección total durante las 2 semanas posteriores a la infección y parcial en los 3 meses subsecuentes. La respuesta humoral es tiempo dependiente, ya que los linfocitos CD4⁺ están involucrados en el desarrollo de una respuesta humoral eficiente a nivel local y sistémico.
- El amantamiento protege contra la infección por rotavirus porque disminuye la exposición al virus y transfiere anticuerpos y factores inespecíficos protectores. La mayor parte de la inmunoglobulina en la leche materna es de isotipo IgA, la que cubre la superficie mucosa intestinal del lactante, confiriendo protección. También se ha identificado en la leche materna un complejo de mucinas, libre de inmunoglobulina, que tiene la potencialidad de unirse a los rotavirus e inhibir la replicación viral.

3.11 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS

Muestra clínica: se requiere una muestra de materia fecal, obtenida dentro de los 5 días de iniciados los síntomas, sin ningún agregado de conservantes ni medio de transporte. Si se va a demorar el procesamiento, la muestra se debe conservar a 4° C; si el tiempo se prolonga más de 3 días, se recomienda congelarla. En casos en que no sea posible obtener heces del paciente, se debe recortar un trozo del pañal embebido en materia fecal y obtener la muestra por elusión, preferentemente con el buffer del equipo diagnóstico a utilizar o un buffer TRIS-CIH.

La detección de rotavirus en muestras fecales se puede realizar por diferentes técnicas, según se quiera poner en evidencia la partícula viral, el ácido nucleico o proteínas virales (Tabla 21.5).

Técnicas diagnósticas. La microscopia electrónica fue el procedimiento que permitió el descubrimiento de los rotavirus. Hoy es utilizado sólo en laboratorios de investigación ya que no es práctico a los fines diagnósticos por requerir un operador entrenado y un microscopio electrónico. A partir de la década del 80, y por muchos

Condición socio-económica	Total (x1000)		% medio de muertes totales por diarrea (rango)	% medio de hospitalizaciones por rotavirus (x 1000 rango)	Media de muertes por rotavirus (x 1000 rango)	Riesgo de muerte por rotavirus
	Nacimientos	Muertes				
Baja	70 447	8 595	21 (17-30)	20 (16-27)	361 (289-487)	1 en 205
Media-Baja	37 402	1 609	17 (11-23)	25 (20-33)	69 (55-90)	1 en 542
Media-Alta	11 520	366	9 (5-17)	31 (25-42)	10 (8-14)	1 en 1 152
Alta	9 931	60	1	34 (28-38)	<1	1 en 48 680

Tabla 21.4. Estimación global de la enfermedad diarreica y muerte por rotavirus en niños menores de 5 años de edad, según condición socio-económica. Tomado de Parashar y col., *Emerging Infectious Diseases*, Vol 9, 2003.

años, la electroforesis en geles de poliacrilamida fue la técnica más utilizada, permitiendo la identificación inequívoca de los rotavirus grupo A, debido al patrón característico de migración de los segmentos del genoma viral. Esta técnica, si bien es la de referencia, es laboriosa y requiere de personal entrenado, por lo que su uso no es corriente en laboratorios de diagnóstico virológico.

Desde hace aproximadamente 20 años, están disponibles técnicas inmunológicas de tamizaje, basadas en la detección del antígeno del grupo A. Entre éstos se cuentan los ELISAs de diferentes marcas comerciales, cuya utilización se ha difundido a laboratorios de mediana complejidad, lo que ha permitido disponer del diagnóstico para rotavirus en ámbitos asistenciales. Otras técnicas inmunológicas son la inmunocromatografía y la aglutinación de partículas de látex, que técnicamente son muy simples de realizar, se obtiene el resultado en pocos minutos y no requieren de equipamiento especial, por lo que son de gran utilidad en laboratorios de baja complejidad. Por último, la genotipificación de los rotavirus se realiza por RT-PCR. Este procedimiento está restringido a laboratorios de investigación ya que a los fines diagnósticos no se requiere la determinación de serotipo.

La elección del técnica diagnóstica dependerá del nivel de complejidad del laboratorio, del volumen de muestras a procesar y de la información que se requiera obtener.

3.12 TRATAMIENTO

El único tratamiento para la diarrea por rotavirus es el de soporte, esto es, la reposición del líquido y los electrolitos perdidos para evitar la deshidratación del paciente. "Reponer los líquidos perdidos" ha sido durante siglos el tratamiento habitual para la diarrea en muchas culturas del mundo. Una de las primeras referencias, que prescribe "cantidades profusas de agua con melaza y sal" se encuentra en un documento del médico indio Sushruta, escrito aproximadamente 1.500 años antes de Cristo. También se encuentra referencia a este tipo de terapia casera en la tradición occidental. En 1793, Benjamin Franklin publicó una edición del libro de William Park *Cada hombre es su propio médico*, en el que recomienda que una persona con *purgación* (diarrea) prepare inmediatamente dos galones de caldo ligero (de pollo hervido) y lo beba todo en el espacio de dos horas. Advierte que "Algo saldrá por arriba. Algo se irá por abajo y limpiará tu estómago de tal manera que te hará sentir bien antes de lo que esperas". Desde entonces se han utilizado empíricamente en el mundo bebidas saladas y/o azucaradas, infusiones de hierbas variadas y formulaciones diferentes para sopas y caldos. Hacia finales de los años 70 las prácticas antiguas encontraron sustento científico con el descubrimiento de que en el intestino delgado, el transporte de sodio y de glucosa son dependientes, de manera que la glucosa acelera la absorción de agua y electrolitos. Éste fue quizás el avance médico más importante del siglo XX, ya que a partir de él, se formularon las sales de rehidratación oral. La solución estándar de sales de rehidratación oral contiene 3,5 g de cloruro de sodio, 2,5 g de bicarbonato de sodio, 1,5 g de cloruro de potasio y 20 g de glucosa, disueltos en 1 litro de agua. En la actualidad, la terapia de rehidratación oral es el pilar del tratamiento de la

diarrea aguda. Este método barato, seguro y sencillo de suministrar, ha probado sin duda su eficacia, salvando alrededor de un millón de vidas de niños cada año en el mundo, según informes de la Organización Mundial de la Salud.

3.13 PROFILAXIS

La prevención de la enfermedad diarreica por rotavirus supone dos vertientes de acciones. Una orientada a mejorar las condiciones sanitarias del medio y socioeconómicas de la población y a realizar campañas sistemáticas de educación sanitaria. La población debe recibir información en cuanto a la urgencia de administrar al paciente sales de rehidratación oral para evitar la deshidratación y el uso de soluciones desinfectantes como el hipoclorito de sodio, para evitar la diseminación de la infección. (Ver Capítulo de Virus transmitidos por agua y alimentos.)

La otra vertiente de acción preventiva supone acceder a vacunas efectivas y seguras, hoy disponibles en el mercado.

3.13.1 Vacunas

El desarrollo de vacunas anti-rotavirus ha tenido como objetivo la obtención de una vacuna de administración oral, a virus vivo atenuado, capaz de replicar en forma limitada en el intestino para no causar el cuadro clínico, pero de manera suficiente como para inducir una respuesta inmune protectora de la diarrea severa ante la re-exposición al virus.

Las estrategias de desarrollo de vacunas han sido fundamentalmente dos. La primera, basada en el uso de una sola cepa de rotavirus, de origen animal o humana (denominadas vacunas monovalentes); y la segunda basada en el uso de más de una cepa de rotavirus (vacunas multivalentes). Estas últimas incluyen varios serotipos virales y son producto de reordenamientos génicos entre virus de origen animal y humanos.

Fórmulas Vacunales

Vacunas monovalentes. La observación de que los rotavirus animales y humanos, grupo A, comparten el antígeno de grupo, estimuló el desarrollo de vacunas *tipo Jenneriana*, utilizando una cepa animal para inmunizar humanos. Las vacunas *Jennerianas* desarrolladas utilizan cepas de origen bovino, ovino y simiano. Los estudios de eficacia de estas vacunas no han dado resultados concluyentes, sugiriendo que la inmunidad heteróloga sería transitoria y menos efectiva que la homóloga. La protección conferida por estas vacunas mostró un rango muy amplio de eficacia, con valores entre 0 y 76% para la protección contra la diarrea por rotavirus y entre 0 y 100% contra la diarrea severa en la re-exposición al virus. El mayor porcentaje de eficacia se obtuvo en los estudios de campo realizados en Venezuela, donde el serotipo circulante en la comunidad, G3, fue el mismo que el contenido en la fórmula vacunal. Esto hizo suponer que la inducción de la inmunidad debería ser serotipo-específica para alcanzar una mayor protección.

El desarrollo de vacunas heterólogas monovalentes fue abandonado y reemplazado por el uso de virus de origen humano. Esta estrategia es la base de la vacuna Rotarix®, licenciada para su

Técnica	Detección basada en:	Fundamento	Información obtenida	Sensibilidad	Especificidad
Microscopia Electrónica	Partícula viral completa	Tinción negativa con ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo	Virus de la Familia <i>Reoviridae</i>	70-80%	100%
Electroforesis en geles de poliacrilamida	Ácido nucleico viral	Separación electroforética en matriz de poliacrilamida de los 11 segmentos del genoma viral	Rotavirus grupo A	85-95%	100%
Enzimoimmuno ensayo	Proteína VP6	Anticuerpo anti-VP6 grupo A + rotavirus + anticuerpo anti-rotavirus marcado con enzima	Rotavirus grupo A	95-100%	90-95%
Reacción de aglutinación de partículas de látex	Proteína VP6	Anticuerpo anti-VP6 grupo A recubriendo partículas de látex + rotavirus	Rotavirus grupo A	80-90%	80-90%
Transcripción inversa - Reacción en cadena de la polimerasa	Ácido nucleico viral	Amplificación de los segmentos genómicos codificantes para VP7 y VP4 con <i>primers</i> serotipo-específicos	G tipos y P tipos	90-95%	
Inmunocromatografía	Proteína VP6	Anticuerpo anti-VP6 grupo A unido a microesferas de poliestireno; migración en membrana de cromatografía	Rotavirus grupo A	84-99%	78-100%

Tabla 21.5. Técnicas diagnósticas para la detección de rotavirus grupo A.

comercialización y en el mercado argentino desde marzo 2006. La cepa de la fórmula vacunal es P1A[8]G1, que corresponde al serotipo más prevalente a nivel mundial. Esta vacuna induce una alta inmunidad homotípica, pero también, por reacción cruzada, inmunidad heterotípica contra otros serotipos de rotavirus no presentes en la vacuna. Los estudios de eficacia de esta vacuna demostraron una protección global del 70% contra la diarrea por rotavirus y del 86% contra la diarrea grave; y un 85% de reducción de hospitalización por rotavirus. Los porcentajes expresados corresponden al valor medio de los estudios realizados.

Vacunas reasociadas multivalentes. Con base en la capacidad de los rotavirus para reasociar segmentos genómicos frente a presiones inmunológicas durante una co-infección, se formularon vacunas conteniendo una cepa de rotavirus de origen animal recombinada con cepas de origen humano de diferentes serotipos, generando vacunas multivalentes que contienen proteínas VP7 de los serotipos humanos prevalentes. La vacuna tetravalente recombinante simio-humana fue la primera vacuna anti-rotavirus licenciada en el mundo (año 1998, vacuna Rotashield®). En estudios clínicos demostró ser eficaz para la protección contra la enfermedad severa en la re-exposición al virus, pero un año después de su aplicación se detectó una tendencia al desarrollo de invaginación intestinal en niños vacunados, por lo que fue retirada del mercado. Pocos años más tarde, otra vacuna multivalente (Rotateq®), de formulación G1, G2, G3, G4, P[8] fue licenciada y está disponible en el mercado argentino desde noviembre de 2006. Esta vacuna demostró no tener asociación con invaginación intestinal y los estudios de eficacia determinaron que la protección conferida por esta vacuna se reflejó en la reducción del 96% de hospitalización por rotavirus y del 98% de casos de diarrea severa en comparación con el grupo placebo.

El camino para el desarrollo de vacunas anti-rotavirus ha sido largo, pero finalmente ha resultado en la obtención de dos vacunas que confieren protección significativa contra la diarrea grave por rotavirus. La incorporación de estas vacunas en los programas ampliados de inmunización deberá acompañarse de una vigilancia centinela para evaluar su impacto local en la disminución de enfermedad por rotavirus y en la dinámica de circulación de serotipos.

Esto permite identificar eventos no esperados así como cambios en la epidemiología y circulación de serotipos de rotavirus. Ante la identificación de cambios en la ecología de rotavirus se podría requerir a futuro de modificaciones en las fórmulas y/o esquemas vacunales

4. VIRUS DEL ESCENARIO EPIDÉMICO

El escenario epidémico de la gastroenteritis por rotavirus grupo A y Norovirus se instala cuando individuos susceptibles se exponen a una fuente común de infección. Una vez instalada la infección, los casos primarios pueden transmitir el virus a sus contactos, y de esta manera amplificar el brote. Esto va a depender fundamentalmente de la estabilidad del virus en el medio, del grupo etario susceptible a ese virus y del período de excreción viral de los individuos infectados. De esta manera, un brote epidémico puede quedar circunscrito al grupo de primoinfectados o propagarse la enfermedad a los contactos. El mejor ejemplo de brotes circunscritos es el de los producidos por los rotavirus grupo A en guarderías, debido a que los contactos de los lactantes infectados son en su mayoría individuos adultos inmunes a rotavirus, en los que la re-infección es asintomática. Por el contrario, los brotes por Norovirus, tienen una alta tasa de ataque secundario, como consecuencia de que bajas dosis infectivas son suficientes para infectar contactos, que los individuos infectados pueden excretar virus hasta dos semanas de iniciado el cuadro clínico, que el virus puede transmitirse por alimentos o agua contaminada, pero también persona a persona por vía fecal-oral o por fomites y que el virus es muy estable en el medio. A esto se agregan la alta variabilidad antigénica entre cepas de Norovirus y la corta inmunidad que genera la primoinfección, que hacen que una alta proporción de individuos de todos los grupos etarios sea susceptible de infectarse. Se estima que del total de individuos expuestos, el 80% se infectan y de éstos, el 70% enferman. Los Norovirus son hoy reconocidos como los agentes etiológicos más frecuentes de gastroenteritis epidémica y de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Se los ha identificado en el 95% de las epidemias

de diarrea no bacterianas y entre el 45 y 80% de brotes de origen alimentario. El diagnóstico puede realizarse por ELISAs y por RT-PCR. Sin embargo, debido a la alta diversidad antigénica de los norovirus, estas técnicas están limitadas a la detección de algunas cepas, lo que resulta en la sub-estimación de la participación de estos virus en la etiología de brotes de diarrea.

Finalmente, los rotavirus grupo B son también virus del escenario epidémico, que tienen la particularidad de producir epidemias de diarrea en China. La mayor se registró entre los años 1982 y 1983, afectando a alrededor de un millón de individuos, en su mayoría adultos. Se desconocen las causas que limitan la diseminación de los rotavirus grupo B a otras regiones del mundo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ariel Depetris, quien nos ha legado las herramientas para la investigación en virus productores de diarrea y ha acompañado sostenidamente este proceso con apoyo técnico y emocional.

Al Dr. Roger Glass, por su estímulo y apoyo a nuestro trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Gastroenteritis Virales del Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella": Dra. Laura Martínez, Téc. de Lab. Miguel Giordano, Mag. Esp. en Virología María Beatriz Isa, Dr. Leonardo Ferreyra, Biol. Gisela Masachessi y Lic. en Biotecnología Patricia Barril, por compartir el trabajo diario y los aportes a este manuscrito.

Bibliografía

- Blaser MJ, Smith FD, Ravdin JI, Greenberg HB, RL Guerrant (eds.) *Virus Infections of the gastrointestinal tract*. Raven Press, Ltd, Nueva York, 1995.
- Estes MK. "Rotaviruses and their replication". En Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed.). *Fields Virology* 2001; 4th ed., vol. 2, p. 1747-86. Lippincott-Williams-Wilkins. Philadelphia, Pa.
- Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. En: Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields Virology* 2001; 4th ed., vol. 2, p. 1787-1833. Lippincott-Williams-Wilkins. Philadelphia, Pa.
- Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodríguez Z, et al. "Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine". *N Engl J Med* 2006; 354:23-33.
- Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, et al. "Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion". *EMBO J* 2001; 20: 1485-97.
- Ramig RF. "Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. Minireview". *J Virol* 2004; 19: 10213-20.
- Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. "Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm". *Virology* 2004; 78: 7763-74.
- Tauxe RV. "Emerging foodborne pathogens". *Intern J Food Microbiol* 2002;78:31-41.
- Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breur T, Clemens SC. "Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis". *N Eng J Med* 2006; 354:11-22.

RETROVIRUS

María Mercedes Ávila - Mirna Biglione - María Belén Bouzas - Manuel Gómez Carrillo
Guillermina Dolcini - María de los Ángeles Pando - Liliana Martínez Peralta - Luisa Sen

Virus de la Inmunodeficiencia Humana

(HIV - *Human Immunodeficiency virus*): Aspectos Viroológicos

Manuel Gómez Carrillo

Entre octubre de 1980 y mayo de 1981 se denunciaron al Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos, *Centers for Disease Control* (CDC), cinco casos de neumonías por *Pneumocystis carinii* (conocido en la actualidad como *Pneumocystis jirovecii*) provenientes de distintos hospitales de la ciudad de Los Angeles, EE.UU. Los casos fueron descriptos en varones homosexuales jóvenes y algunos de ellos presentaban –además– candidiasis oral y/o esofágica y manifestaciones clínicas de infección por citomegalovirus (CMV). Las descripciones del inusual síndrome permitían especular acerca de una grave inmunodeficiencia relacionada con las células T. Al poco tiempo de informados estos casos comenzaron a revelarse casos similares en otras ciudades de EE.UU. y Europa. Dadas las características clínicas y epidemiológicas de este síndrome se propuso denominar Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) a esta enfermedad, mientras cobraba fuerza la hipótesis de que la misma era transmisible a través de un contacto íntimo que involucrara la superficie de mucosas, como ocurre en el contacto sexual. La descripción de casos de SIDA en usuarios de drogas inyectables, hemofílicos y transfundidos indicaba la importancia de su transmisión parenteral. Posteriormente se determinó la transmisión vertical del agente involucrado.

En 1983 surgieron los primeros trabajos vinculando al SIDA con un retrovirus de características similares al virus Linfotrópico T Humano (HTLV). El virus aislado en Francia por Barré-Sinoussi y col. de un paciente con SIDA fue denominado LAV (*Lymphadenopathy associated virus*) mientras que el aislado en los Estados Unidos por Gallo y col. se designó HTLV-III por su similitud con los dos retrovirus linfotrópicos humanos descriptos previamente. La secuenciación nucleotídica demostró, años más tarde, que ambos aislamientos correspondían al mismo virus.

En 1986 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus designó con la sigla HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) al virus involucrado en el desarrollo del SIDA. Desde entonces la infección por HIV y el SIDA se han constituido en uno de los problemas sanitarios más graves que haya enfrentado la humanidad desde el siglo XX. Desde el inicio de la epidemia, casi 60 millones de personas se han infectado con el HIV y 25 millones de personas han fallecido por causas relacionadas a su infección. A fines del 2009 el Programa para el SIDA de las Naciones Unidas ha estimado más de 33 millones de personas infectadas, distribuidas en más de 150 países. Durante el 2008 se produjeron alrededor de 2,7 millones de nuevas infecciones y 2 millones de defunciones relacionadas con HIV. Durante ese mismo año nacieron 430.000 niños con infección por HIV, con lo que se elevó a 2,1 millones el número total de menores de 15 años infectados.

1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Actualmente el HIV es agrupado dentro del género *Lentivirus* al cual pertenecen diversos retrovirus animales, entre los que se encuentran –entre otros– los virus de la inmunodeficiencia simiana y felina (SIV y FIV) y el de la anemia infecciosa equina (EIAV). Hasta el momento han sido descriptos dos tipos del virus de la inmunodeficiencia humana, el HIV-1 y el HIV-2. Ambos se asocian al SIDA, pero las infecciones por el HIV-1 se encuentran ampliamente difundidas a nivel mundial, mientras que las infecciones por

el HIV-2, descubierto en 1985, se encuentran circunscriptas a la región de África Occidental, al sur del Sahara, presentando sólo casos esporádicos en el resto del mundo. En virtud de su importancia epidemiológica en este capítulo se describirán únicamente las características virológicas del HIV-1.

1.1 ESTRUCTURA VIRAL

La partícula viral madura, posee simetría icosaédrica con un diámetro aproximado de 100 nm y una envoltura externa formada por la membrana plasmática de la célula en que ha replicado, que contiene proteínas del hospedador y espículas constituidas por las glicoproteínas virales gp120 y gp41 (Fig.22.1.1). Por debajo de la envoltura viral se conforma una cápside externa compuesta por la proteína p17 y hacia el interior una cápside interna denominada *core* con forma cónica y compuesta por la proteína p24. Dentro de este *core* se alojan las dos hebras no complementarias de RNA del genoma viral, proteínas asociadas a funciones reguladoras y varias moléculas de la enzima transcriptasa inversa (TR).

El genoma del HIV-1 está compuesto por dos cadenas de RNA de polaridad positiva y contiene alrededor de 9,8 Kilobases (Kb) con marcos de lectura abiertos que codifican para varias proteínas virales. En su organización genómica (Figura 22.1.2) se reconocen nueve genes, tres de los cuales son comunes a todos los retrovirus. Estos son el gen *gag* (codifica proteínas de la cápside viral), *pol* (codifica para las enzimas virales transcriptasa inversa, proteasa e integrasa) y *env* (codifica para las proteínas de la envoltura). Los genes *gag* y *pol* se traducen ambos en poliproteínas precursoras que posteriormente se clivan por la acción de la proteasa viral, (producto del gen *pol*) en proteínas estructurales y enzimas maduras, respectivamente.

Las dos proteínas de la envoltura, gp120 y gp41 son clivadas a partir de un precursor mayor, gp160, por la acción de una enzima celular. Los otros productos genómicos del HIV son Tat, Rev, Nef, Vpu y Vpr que intervienen en procesos regulatorios en distintos eventos de la replicación viral y en procesos asociados a la patogénesis. Un ejemplo de ello es el producto respectivo de los genes

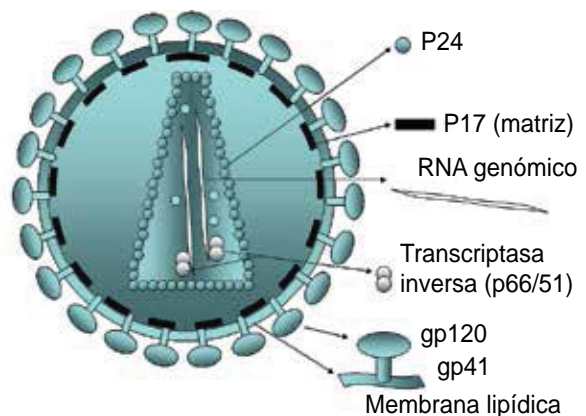


Figura 22.1.1. Esquema del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1).

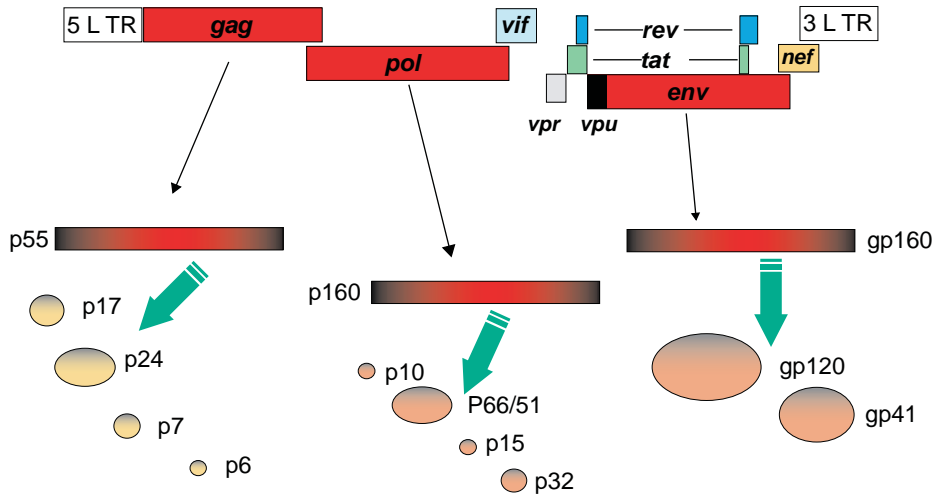


Figura 22.1.2. Genoma proviral del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y representación esquemática de los productos de los genes estructurales.

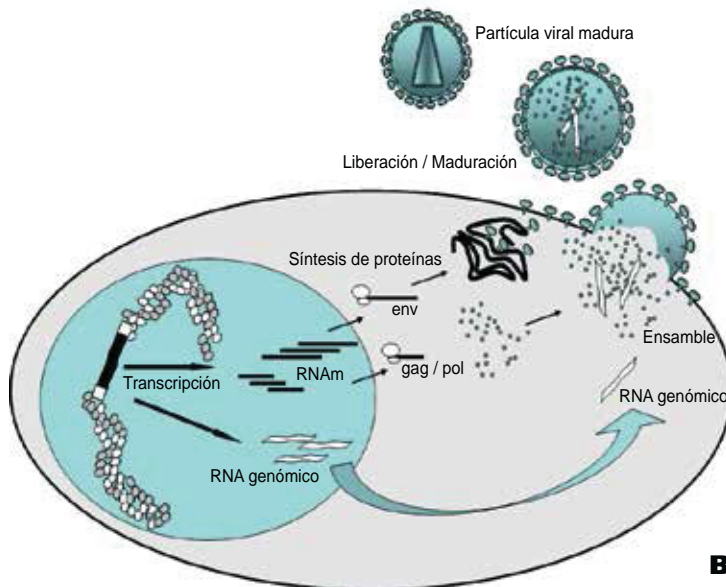
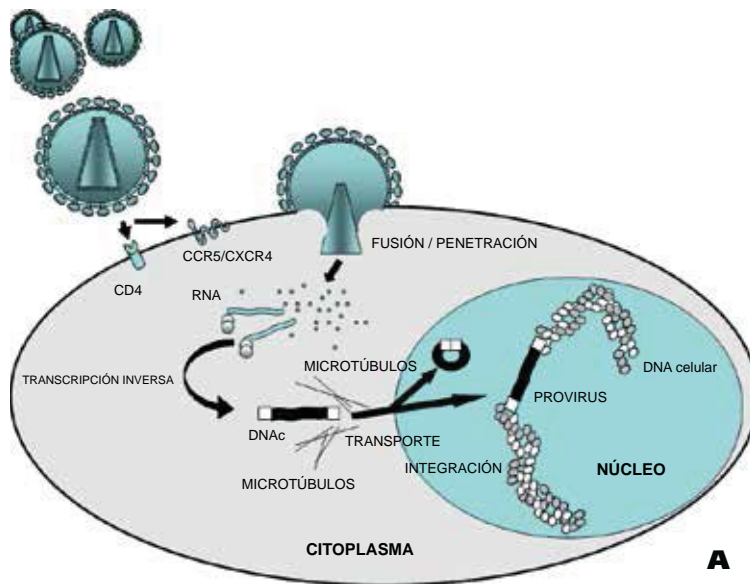


Figura 22.1.3A y 22.1.3B. Ciclo replicativo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.

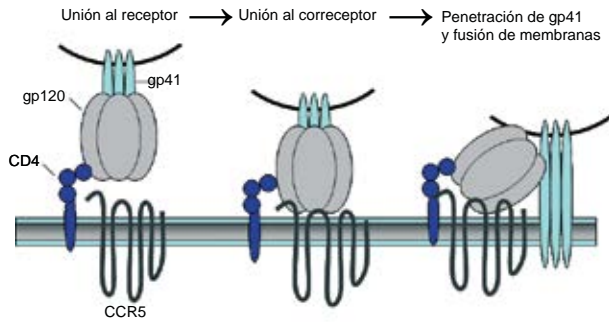


Figura 22.1.4. Representación esquemática de la interacción entre las glicoproteínas de envoltura del HIV-1 y los receptores y correceptores celulares.

vif y *vpu* que intervienen en la infectividad y maduración de la partícula viral y por otro lado la proteína codificada por el gen *nef* que se asocia a procesos de regulación negativa de la replicación viral y de funciones celulares como la expresión de moléculas CD4 y de histocompatibilidad de clase I (CMH-I). Los nueve genes del HIV-1 pueden agruparse en categorías de acuerdo a la función de los productos para los que codifican (Tabla 22.1.1).

Además de los genes descritos, el genoma viral está flanqueado a cada lado por secuencias repetitivas denominadas LTR (*long terminal repeats* o repeticiones terminales largas) que contienen sitios de interacción con proteínas celulares que pueden activar la transcripción viral y que también están bajo el control de señales virales. En virtud de una compleja regulación, el HIV puede establecer latencia a nivel celular o responder a varias señales y sintetizar altos niveles de proteínas virales para completar el ciclo de replicación.

1.2 REPLICACIÓN

La replicación del HIV abarca varias etapas (Figura 22.1.3):

- Adsorción y penetración
- Síntesis de DNA proviral por transcripción inversa
- Integración
- Expresión y transporte de RNA viral
- Ensamblaje, egreso y maduración

1.3 ENTRADA

La adsorción del HIV a las células blanco está mediada por la molécula CD4, a través de interacciones de alta afinidad con la glicoproteína gp120. El receptor CD4 está presente en abundancia sobre la superficie de linfocitos T inmaduros y linfocitos T de ayuda (*hel-*

per) CD4+, mientras que se encuentra en menores concentraciones sobre monocitos, macrófagos y células dendríticas presentadoras de antígeno.

1.3.1 Ciclo replicativo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1)

La unión virus-célula, lleva al proceso de fusión de membranas, el cual es facilitado por la glicoproteína de envoltura gp41 y por los receptores para quimioquinas CXCR4 y CCR5 que actúan como correceptores (Figura 22.1.4).

Las células de estirpe macrofágica generalmente expresan correceptores del tipo CCR5, mientras que muchas poblaciones de linfocitos pueden expresar ambos tipos de correceptores o únicamente del tipo CXCR4, dependiendo de su estadio ontogénico, activación, reposo o memoria. Por esta razón la diferenciación de cepas del HIV en base al tropismo (macrófagotrópicas vs linfotrópicas) resulta poco adecuada, más aún cuando se han identificado otros receptores que favorecerían una expansión del tropismo celular.

Una vez que la gp120 interactúa con la molécula CD4 y algún correceptor, se establecen cambios conformacionales que permiten a la gp41 quedar expuesta a la membrana celular y perforarla. La entrada del virus a la célula ocurre como consecuencia de la fusión de membranas virales y celulares, fenómeno en el cual la glicoproteína de transmembrana (gp41) posee un papel activo. Como resultado de la fusión, el complejo nucleoproteico viral ingresa al citoplasma y posteriormente se disgrega liberando el genoma.

Además de estas interacciones moleculares, estudios desarrollados en los últimos años han permitido establecer con más detalle las interacciones entre el virus y las células dendríticas (CDs). Estas células expresan en su superficie moléculas denominadas "DC-SIGN" que interactúan naturalmente como ligandos de moléculas de adhesión presentes en linfocitos, siendo esta interacción necesaria en los procesos de presentación antigénica en la región para-cortical ganglionar. El HIV-1 puede interactuar, a través de ciertos dominios de la gp120 con moléculas DC-SIGN expresadas en la superficie de las células dendríticas, internalizándose mediante endocitosis, aunque sin infectar a la célula y manteniendo su infectividad. Por medio de este mecanismo el HIV puede infectar en *trans* (trans-infección) a linfocitos que interactúan con la célula dendrítica en la región para-cortical y diseminarse a través de ellos al resto del organismo. Este fenómeno parece ser crucial en el establecimiento de la infección a través de las mucosas.

1.4 SÍNTESIS DE DNA PROVIRAL

Después de la entrada del RNA viral a la célula ocurre la transcripción inversa, mayormente en el citoplasma, la que es catalizada por la enzima transcriptasa inversa que tiene al menos tres funciones: polimerasa de DNA dependiente de RNA, polimerasa de DNA dependiente de DNA y ribonucleasa (RNAsa H).

Tipos de genes	Denominación	Función
Estructurales	<i>gag</i>	Codifica para las proteínas de la cápside viral: p24, p17, p7 y p6
	<i>pol</i>	Codifica para p10 (proteasa), p66/51 (transcriptasa inversa) y p32 (integrasa)
	<i>env</i>	Codifica para las glicoproteínas de la envoltura gp120 y gp41
Auxiliares regulatorios	<i>tat</i>	Codifica para p14: aumenta la transcripción del RNA viral
	<i>rev</i>	Codifica para p19: regula la expresión del RNA viral
Accesorios	<i>nef</i>	Codifica para p27: aumenta la infectividad, disminuye la expresión de CD4 y CMH-I en la superficie celular
	<i>vpr</i>	Codifica para p15: favorece infección de células en reposo
	<i>vpu</i>	Codifica para p15: favorece la liberación viral
	<i>vif</i>	Codifica para p23: aumenta la infectividad de las partículas virales

Tabla 22.1.1. Tipos y funciones de los genes del HIV-1.

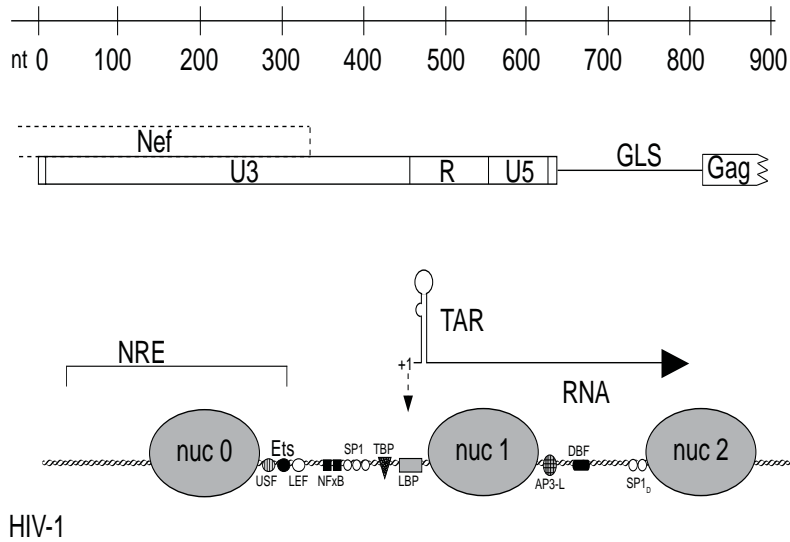


Figura 22.1.5. Representación esquemática de la estructura del LTR 5' del DNA proviral del HIV-1. (Adaptado de Fields Virology, 4ª edición, 2001).

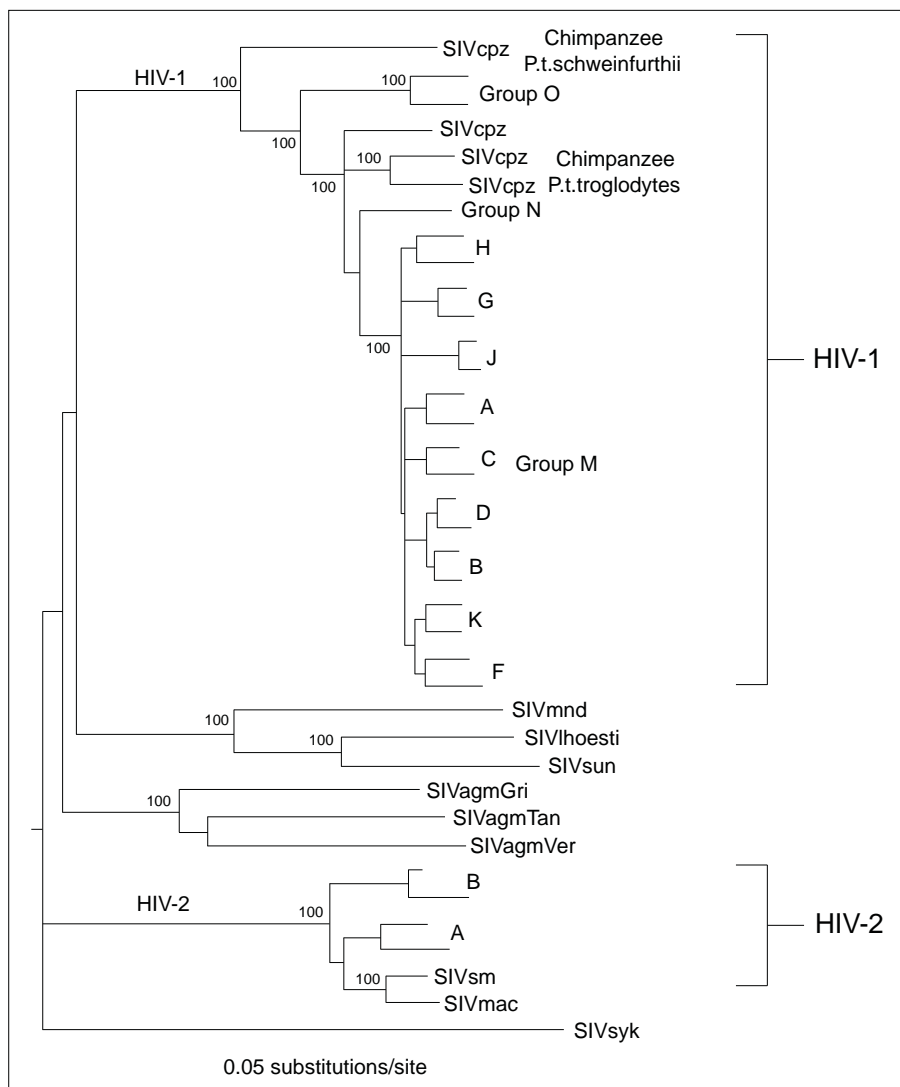


Figura 22.1.6. Relaciones filogenéticas entre grupos y subtipos del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, basadas en secuencias del genoma completo.

Tipo	Grupo	Subtipos	Distribución
HIV-1	M	A-K	Universal y endémicos en África
	O		Camerún Gabón Congo Guinea ecuatorial
	N		Camerún
HIV-2		A-F	Todos endémicos en África

Tabla 22.1.2. Grupos, subtipos y distribución del virus de la inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2.

La polimerasa de DNA (RNA-dependiente) genera una hebra negativa de DNA y luego la actividad de DNA polimerasa DNA-dependiente genera una cadena positiva, que –a su vez– hibrida con la anterior para formar un DNA de doble cadena. Los productos finales de la transcripción inversa son moléculas de DNA de doble cadena que son más largas en cada extremo que el RNA viral, debido a la duplicación del LTR, promovida por un "salto" de la transcripta inversa sobre el templado de RNA. A estas moléculas de DNA se las denomina "provirus".

1.5 INTEGRACIÓN

EL DNA proviral de doble cadena se transporta al núcleo de la célula, donde el primero se integra al DNA cromosómico del hospedador. La proteína p17 de matriz tiene un papel importante para dirigir el complejo de integración hacia dentro del núcleo de la célula hospedadora.

La reacción de integración es catalizada por la integrasa viral que se encuentra asociada al complejo nucleoproteína. La integrasa primero separa dos nucleótidos del extremo 3' del DNA proviral y luego cliva el DNA del hospedador. Esto se continúa con la inserción del provirus dentro del DNA de la célula hospedadora. Una vez integrado, el provirus permanece asociado con el material genético del hospedador durante toda la vida de la célula. En esta etapa la replicación viral puede quedar interrumpida o pueden transcribirse activamente los genomas virales. Esto dependerá fundamentalmente del tipo celular y su estado de reposo o activación.

1.6 EXPRESIÓN Y TRANSPORTE DE RNA

La transcripción del genoma viral requiere una serie de mecanismos complejos que involucran tanto factores virales como celulares. Las señales de activación y proliferación celular resultan en la unión de factores de transcripción al LTR correspondiente al extremo 5' del RNA viral y llevan a la iniciación de la transcripción viral (Figura 22.1.5). Como se ha mencionado anteriormente, los genes *tat* y *rev* codifican para proteínas claves que regulan la expresión de genes virales estructurales y la replicación, mientras que *nef*, *vif*, *vpu* y *vpr* son determinantes de virulencia viral.

El LTR está dividido en 3 sub-regiones funcionales denominadas R (*repeat*), U5 y U3. El LTR correspondiente al extremo 5' es adyacente a la secuencia *líder* del gen *gag* (GLS). El dominio potenciador de la transcripción (*enhancer*) contiene 3 sitios de unión para los factores de transcripción Sp1 y dos para NF-κB. El inicio de la transcripción está localizado entre las regiones U3 y R. El transcrito de RNA de HIV-1 se inicia en la región R y contiene el elemento TAR que interactúa con la proteína transactivadora Tat y ciclinas celulares (ciclina T1).

Los transcritos primarios de RNA sintetizados a partir del provirus por acción de la enzima celular RNA polimerasa II constituyen por un lado los mensajeros para la síntesis de poliproteínas virales y por otro los genomas de HIV que serán incorporados en los viriones nuevos. Todas las proteínas virales estructurales se sintetizan como poliproteínas. Las proteínas reguladoras se transcriben de RNAm procesados.

1.7 ENSAMBLE, EGRESO Y MADURACIÓN

El ensamble incluye el procesamiento y la glucosilación de las proteínas de la envoltura y la miristilación del extremo N-terminal del elemento p17 en las poliproteínas Gag y Gag-Pol. Las proteínas derivadas del gen *gag* tienen un papel fundamental para reclutar proteínas tanto virales como de la célula hospedadora dentro de las partículas virales. Se cree que el RNAm viral no procesado es reclutado para el proceso de ensamble por el precursor de Gag. Sin embargo, la localización y la naturaleza de la señal de empaquetamiento en el RNA viral no procesado no se han dilucidado aún. Se sabe que el dominio p7 del precursor Gag (p55) es indispensable para la interacción específica con el RNA viral.

En general, todos los componentes virales así como los elementos derivados de la célula hospedadora –como por ejemplo el complejo mayor de histocompatibilidad– están concentrados en el área de la membrana celular donde ocurre la liberación viral. Algunas proteínas virales permiten optimizar los procesos de ensamblaje y liberación viral. Un ejemplo de ello es la proteína Vpu que promueve la degradación de moléculas CD4 en el proteasoma, mecanismo por el cual se evitan interacciones entre las moléculas gp120 y CD4 dentro de la célula, lo que afectaría el ensamblaje y la infectividad viral. Por otra parte, otra proteína viral derivada del gen *vif*, ha demostrado ser un factor de infectividad esencial para el HIV-1. Esta proteína se asocia a las partículas virales en el ensamblaje limitando la actividad de enzimas celulares que otorgan "resistencia" natural a la infección. Un ejemplo de este tipo de enzimas es la "APOBEC" (con actividad citidina-deaminasa) que interfiere en el proceso de transcripción inversa, alterando la composición nucleotídica del RNA y DNA, y favoreciendo la acumulación de adeninas (por hipermutación G/A) resultando en la generación de genomas provirales defectivos. *Vif* es esencial para la degradación de estas enzimas aumentando la permisividad celular al HIV.

La liberación de los viriones puede producirse rápidamente provocando la lisis celular, o bien en forma más lenta manteniendo la integridad de la célula. Al igual que otros retrovirus, la maduración de la partícula ensamblada ocurre una vez liberada y por acción de la proteasa viral.

2. ORIGEN, VARIABILIDAD Y DIVERSIDAD DEL HIV

Desde el descubrimiento de los dos lentivirus humanos (HIV-1 y HIV-2) comenzaron a formularse diversas hipótesis acerca del origen de ambos y de la emergencia de la pandemia. Diversos estudios virológicos y la biología molecular han permitido establecer relaciones entre el HIV y otros lentivirus animales, especialmente los simianos. Los lentivirus, en general, han demostrado poseer un alto grado de diversificación. Como consecuencia de esta extraordinaria *plasticidad genética*, no resultaría extraña la generación de *nexos* interespecies con capacidad adaptativa a un nuevo hospedero a corto plazo.

En estudios más recientes se identificaron los reservorios primates de los ancestros virales del HIV-1 y del HIV-2. En primates de la especie *sooty mangabey* (*Cercocebus atys*) se identificó un virus de la inmunodeficiencia simiana denominado SIVsm que corresponde al linaje del cual deriva el HIV-2. Por otro lado, en chimpancés (*Pan troglodytes troglodytes*) se ha identificado al virus SIVcpz que

Denominación	Distribución
CRF01_AE	Tailandia, África, China
CRF02_AG	África, EE.UU.
CRF03_AB	Rusia
CRF04_cpx	Grecia, Chipre
CRF05_FD	RDC
CRF06_cpx	Mali, Burkina Faso
CRF07_BC	China
CRF08_BC	China
CRF09_cpx	Senegal
CRF10_CD	Tanzania
CRF11_cpx	RDC
CRF12_BF	Argentina, Uruguay
CRF13_cpx	Camerún
CRF14_BG	España
CRF15_01B	Tailandia
CRF16_A2D	Kenia, Corea, Argentina

Tabla 22.1.3. Formas recombinantes circulantes del HIV-1, grupo M. Se mencionan las primeras 16 CRFs descritas desde 1996 hasta 2004. En junio de 2013 el número de CRFs identificadas ascendía a 55.

se relaciona con el HIV-1. La frecuente caza y captura masiva de estas especies simianas con fines alimenticios en ciertas regiones del continente africano son una fuerte evidencia epidemiológica de que ambos virus han pasado al hombre en eventos de transmisión zoonótica independientes. Estudios filogenéticos y epidemiológicos han permitido establecer que probablemente estos saltos de retrovirus simianos al humano ocurrieron aproximadamente entre los años 1930 y 1940.

2.1 VARIABILIDAD

El HIV es reconocido en la actualidad como uno de los ejemplos más paradigmáticos de variabilidad y diversidad genética viral. La variabilidad tiene origen en distintos eventos que, en su conjunto, determinan la generación de *cuasiespecies* de gran impacto a nivel del control inmunológico, el curso o evolución de la infección y el éxito de la terapéutica antiviral. Se ha definido como cuasiespecie a una unidad replicativa dentro de una población de genomas heterogéneos, relacionados pero no idénticos. Este concepto ha sido utilizado principalmente en el estudio de virus a RNA y se suele aplicar a la estructura de la población viral de HIV. Varios hechos están asociados a la generación de variabilidad genética en la población viral de un individuo infectado. Entre los mecanismos de generación de variantes en el curso de una infección puede mencionarse la carencia de lectura de prueba o *proof-reading* de la transcriptasa inversa, lo que lleva a que la tasa de error de $3,4 \times 10^{-5}$ cobre envergadura en virtud de la elevada replicación viral que caracteriza al HIV. Por otra parte, las variantes generadas desde la infección temprana se acumulan pudiendo perdurar en diferentes poblaciones celulares. Las poblaciones de HIV-1 emergentes durante una infección poseen gran plasticidad genética como consecuencia de estas mutaciones y del fenómeno de recombinación. En los últimos años se ha determinado que la tasa de recombinación en el HIV puede ser más alta aún que la tasa de mutación, fenómeno que constituye un gran aporte a su extraordinaria variabilidad.

2.2 TIPOS, SUBTIPOS Y RECOMBINANTES

En la actualidad se reconoce que los dos tipos virales (HIV-1 y HIV-2) presentan distinta distribución en el mundo. Mientras el HIV-2 es endémico en África Occidental y es esporádicamente detectado en Europa, EE. UU. y otros países fuera del continente africano, el HIV-1 se ha distribuido extensamente en el planeta. Estos dos tipos virales no sólo presentan diversidad en su distribución geográfica,

sino que poseen diferencias en su estructura genómica, diferencias antigénicas e inclusive patogénicas.

Dentro del HIV-1 y a partir de estudios filogenéticos desarrollados en los últimos años, se han determinado tres grupos: el grupo M (*main*), el O (*outlier*) y el N (*new*) (Figura 22.1.6).

Los miembros del grupo M se han diseminado ampliamente en el mundo. Incluye, hasta el momento, al menos nueve subtipos o clados (A, B, C, D, F, G, H, J, K) (Tabla 22.1.2).

Más recientemente se caracterizaron variantes del HIV-1 que contienen secuencias derivadas de dos o más subtipos, originadas como consecuencia del fenómeno de recombinación entre genomas heterogéneos. El proceso de generación de recombinantes intersubtipo comienza cuando una célula es co-infectada o sobreinfectada con variantes virales diferentes. Luego de un ciclo de replicación, la progenie resultante puede contener viriones con las 2 moléculas de RNA diferentes (genoma pseudo-diploide) y estos virus, al infectar nuevas células, dar origen a genomas en *mosaico* como producto de la recombinación que ocurre durante las primeras etapas del ciclo de replicación subsiguiente. Este fenómeno es asociado a las actividades de *copy choice* (elección de copia) y *strand displacement* (desplazamiento de cadenas) de la transcriptasa inversa. Para que la recombinación sea un mecanismo importante en la generación de variabilidad, los virus deben ser infecciosos a pesar de las mutaciones o rearrreglos genéticos que ocurran. Esto parece ser lo que ocurre en HIV debido a su gran plasticidad genética que logra que aquellas variantes con mayor valor adaptativo sean una fuente constante de posibles nuevos genotipos.

Algunas de estas formas recombinantes se han diseminado en la comunidad dando origen a las denominadas CRF (*circulating recombinant form* o formas recombinantes circulantes). Al momento de escribir este capítulo ya se han descrito 55 CRFs cuya distribución se asocia a diferentes poblaciones y regiones del mundo (Tabla 22.1.3).

La complejidad de la pandemia del HIV-1 con 3 grupos, 9 subtipos y al menos 16 formas recombinantes circulantes es evidente y este alto grado de diversidad no sólo tiene efectos en el ámbito epidemiológico y taxonómico. Entre las principales problemáticas relacionadas con este tema, el diagnóstico molecular, la terapéutica del SIDA y el desarrollo de una vacuna serían las más relevantes.

3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL HIV-1

La clasificación del HIV-1 en subtipos es una herramienta molecular valiosa para el monitoreo de la epidemia a escala mundial. Globalmente, la población de HIV-1 predominante corresponde al subtipo C seguido por el A, el B y las formas recombinantes CRF01_AE y CRF02_AG.

La mayor diversidad de miembros del grupo M del HIV-1 se encuentra en África y esto es consistente con las evidencias del origen de la epidemia en ese continente (Figura 22.1.6). El subtipo C es el predominante en África del Sur y en la India. Dada la prevalencia de infección en estas regiones del mundo se considera que el subtipo C está involucrado en aproximadamente el 50% de las infecciones por HIV-1 en todo el mundo. En Tailandia se establecieron dos epidemias separadas, una donde el subtipo B se ha diseminado ampliamente en usuarios de drogas inyectables y otra donde la forma recombinante CRF01_AE prevalece en la población heterosexual.

Estos datos demuestran claramente que la distribución de diferentes formas del HIV-1 es un proceso dinámico y permiten especular sobre la mayor o menor capacidad de transmisión de algunas variantes.

En Europa, EE.UU. y Australia predomina el subtipo B, aunque se observa un incremento de infecciones por virus de otros subtipos **no B** en los últimos años, especialmente en Europa y EE.UU., fenómeno atribuible a las crecientes migraciones humanas.

La epidemiología molecular de HIV-1 en América del Sur muestra un perfil complejo. El subtipo B ha sido reconocido como predominante, aunque desde comienzos de la década del 90 se han identificado los subtipos F y C, y también recombi-

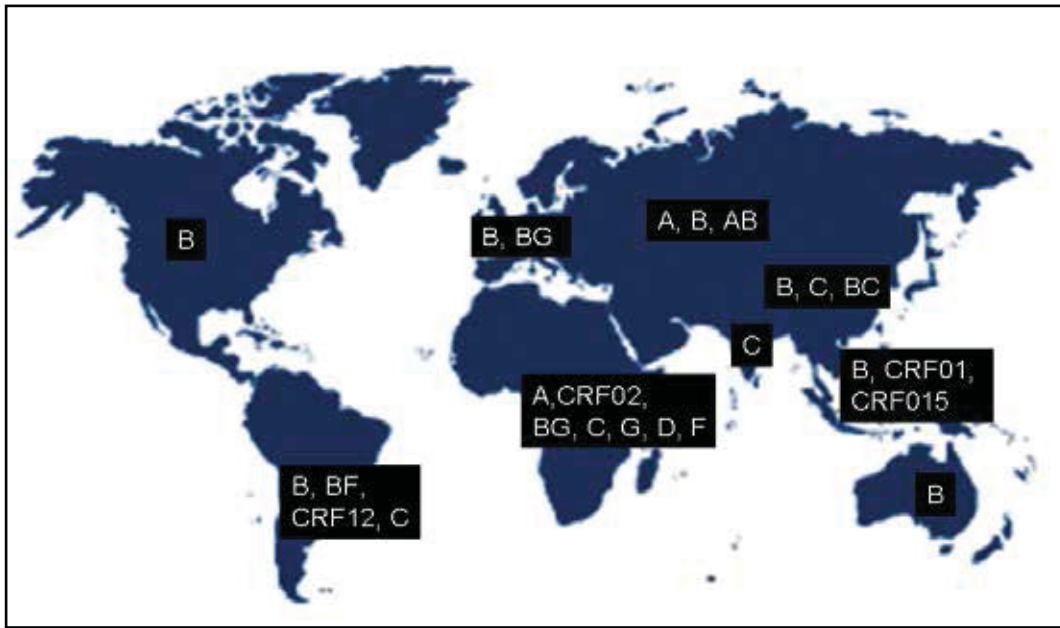


Figura 22.1.7. Distribución geográfica de los subtipos y algunas formas recombinantes del HIV-1.

nantes B/F en Brasil, Argentina y Uruguay. La Argentina es el país del continente americano que posee mayor proporción de infecciones producidas por recombinantes intersubtipo (B/F). Trabajos realizados en la Argentina a partir del año 2000 han permitido estimar una prevalencia cercana al 50% de infecciones por recombinantes BF en nuestro país. Sin embargo éstas se relacionan con una alta frecuencia en poblaciones de individuos heterosexuales y usuarios de drogas inyectables, mientras que

en homosexuales masculinos esta proporción parece ser mucho menor, predominando el subtipo B.

El conocimiento de la diversidad así como también de la distribución de los subtipos y formas recombinantes del HIV-1 en el mundo ha cobrado relevancia en los últimos años, principalmente ante las perspectivas del desarrollo de vacunas. El impacto de la diversidad en la eficacia de potenciales vacunas está en estudio y aún no ha sido dilucidado.



Bibliografía

- Centers for Disease Control. "Pneumocystis pneumonia. Los Angeles". *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981; 30:250-2.
- Centers for Disease Control. "Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), update United States". *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1983; 24: 309.
- Domingo E, Holland JJ, Beibricher C, Eigen M. "Quasispecies: the concept and the word". En: Gibbs A., Calisher C, Garcia Arenal F, eds. *Molecular Basis of Virus Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- Freed EO, Martin MA. "HIVs and their replication". En: David M. Knipe; Peter M. Howley; Diane E. Griffin; Robert A. Lamb; Malcolm A. Martin; Bernard Roizman; Stephen E. Straus – (editors). "Fields Virology"; Lippincott Williams & Wilkins (LWW). 4th edition . 2001.
- Harris RS, Liddament MT. "Retroviral restriction by APOBEC proteins". *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 868-77.
- Kijak GH, McCutchan FE. "HIV diversity, molecular epidemiology, and the role of recombination". *Curr Infect Dis Rep* 2005; 7: 480-8.
- Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, et al. "Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains". *Science* 2000; 288:1789-96.
- Stevenson, M. "HIV pathogenesis". *Nat Med* 2003; 9: 853 – 60.

Epidemiología de la Infección por HIV

María Mercedes Ávila - María de los Ángeles Pando

1. HIV/SIDA EN EL MUNDO

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) representa la última etapa clínica de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

Según estimaciones de ONUSIDA/OMS a fines del año 2009 (ONUSIDA, 2009), el virus ya había infectado a más de 60 millones de personas en el mundo (Tabla 22.2.1). En ese momento se estimaba que más de 25 millones de personas habían fallecido a causa del SIDA y 33,4 millones (31,1-35,8 millones) vivían con HIV/SIDA. La mayoría de estos 33 millones de personas que vivían con HIV/SIDA estaban en el mundo en desarrollo y el 75 % de todas estas infecciones se debían a la transmisión heterosexual del HIV. En el año 2008, la cifra estimada de nuevas infecciones por el HIV fue de 2,7 millones (2,4 millones-3,0 millones). Se estima que para ese año el número de defunciones en el mundo por enfermedades relacionadas con el SIDA fue de 2 millones (1,7-2,4 millones). Las mujeres representaban el 50 % de los adultos infectados. El virus se instaló firmemente entre las mujeres, para las que con mucha frecuencia el único comportamiento de riesgo es tener relaciones sexuales con su pareja estable. Si bien en 1991 las mujeres representaban el 41% del total de personas viviendo con el virus, esta cifra aumentó al 50%. La mortalidad anual relacionada con el HIV probablemente alcanzó su punto máximo en el 2004, año en el que se registraron 2,2 millones (1,9 millones-2,6 millones) de defunciones. El número estimado de defunciones relacionadas con el SIDA en 2008 es un 10% menor que en 2004.

Desde el inicio de la epidemia en 1981, la distribución geográfica del HIV/SIDA en las distintas áreas del mundo ha sido heterogénea. El impacto a nivel socio-económico y la vía de transmisión predominante han sido distintos en cada región.

En 2008, el número estimado de nuevas infecciones por el HIV en niños menores de 15 años fue de 430 000 (230 000-610 000). La mayoría de estas nuevas infecciones probablemente surjan de la transmisión vertical intrauterina, o durante el parto o como re-

sultado de la lactancia. El número de niños infectados por el HIV en 2008 fue aproximadamente un 13% menor que en 2001. África subsahariana sigue siendo la región más afectada en la epidemia mundial y representa el 71% de todas las nuevas infecciones por el HIV en 2008. Se estima que las dos terceras partes del total de personas que viven con HIV están en África subsahariana, así como el 77% del total de mujeres. Durante el 2005, en esta región fallecieron aproximadamente 2,4 millones de personas y unos 3,2 millones adquirieron la infección por HIV.

Como se mencionó precedentemente, en muchos países el número anual de nuevas infecciones por el HIV disminuyó y la prevalencia del HIV entre las personas jóvenes descendió (ONUSIDA, 2009). En el mundo, la cobertura de los servicios para la prevención de la transmisión materno- infantil del HIV aumentó del 10% en 2004 al 45% en 2008, y la disminución en las nuevas infecciones por el HIV en los niños, en 2008, sugiere que estos esfuerzos salvan vidas. El aumento del acceso al tratamiento alcanza resultados esperanzadores.

La cobertura del tratamiento antirretroviral aumentó del 7% en 2003 al 42% en 2008, con una cobertura especialmente amplia en África oriental y meridional (48%). Si bien la rápida expansión del acceso al tratamiento antirretroviral ayuda a disminuir las tasas de mortalidad relacionada con el SIDA en varios países y regiones, también contribuye a los incrementos en la prevalencia del HIV. (ONUSIDA, 2009).

En América Latina, se estima que el número de personas que viven con el HIV ha aumentado a 2,0 millones (1,8 millones-2,2 millones). Durante el 2008, aproximadamente unas 77.000 personas fallecieron de SIDA y se registraron unos 170 000 casos de nuevas infecciones por HIV. Brasil, Argentina y Colombia son los países sudamericanos que presentan las mayores epidemias de la región.

En Sudamérica, la epidemia se concentra generalmente en zonas urbanas y en determinadas subgrupos de la población con comportamientos de alto riesgo, como en hombres que tienen sexo con

Personas que vivían con HIV en 2008	Total Adultos Mujeres Menores de 15 años	33,4 millones 31,3 millones 16,7 millones 2,7 millones	(31,1-35,8 millones) (29,2-33,7 millones) (14,2-17,2 millones) (1,2-2,9 millones)
Nuevas infecciones por HIV en 2008	Total Adultos Menores de 15 años	2,7 millones 2,3 millones 450 000	(2,4-3,0 millones) (2,0-2,5 millones) (240 000-610 000)
Defunciones causadas por el SIDA en 2008	Total Adultos Menores de 15 años	2,0 millones 1,7 millones 260 000	(1,7-2,4 millones) (1,4-2,1 millones) (150 000-410 000)

Tabla 22.2.1. Resumen mundial de la epidemia de SIDA. Situación de la epidemia de SIDA ONUSIDA/OMS - Diciembre de 2009.

hombres y en usuarios de drogas inyectables. La propagación del HIV a través de equipos de inyección compartidos constituye una preocupación creciente en varios países, particularmente en Argentina, Brasil y Uruguay en Sudamérica, y Bermudas y Puerto Rico en el Caribe. El consumo de drogas inyectables es responsable del 40 % de los casos de SIDA notificados hasta la fecha en Argentina. Un número creciente de mujeres se infecta con el HIV, ya sea por compartir drogas inyectables, o en mayor número de casos, por ser parejas sexuales de consumidores masculinos. En toda la región la proporción de infecciones por vía heterosexual está aumentando con el consiguiente incremento de la prevalencia en mujeres y en la transmisión madre-hijo (si no se administra el tratamiento preventivo en forma adecuada).

La proporción de mujeres entre las personas infectadas está aumentando paulatinamente tanto en los países industrializados como en los que se encuentran en desarrollo. Ante las deficiencias en el acceso a estrategias adecuadas de prevención, un número creciente de niños sigue contrayendo el HIV en los países en desarrollo y no hay indicios de que las tasas de infección se vayan a reducir a corto plazo. Más del 90 % de las infecciones en los niños son el resultado de la transmisión del virus de la madre al niño, ya sea por vía intrauterina, en el momento del parto o durante la lactancia.

2. HIV/SIDA EN LA ARGENTINA

En Argentina, la vigilancia epidemiológica del HIV/SIDA se encuentra a cargo de la Dirección de SIDA y ETS del Ministerio de Salud de la Nación y bajo la regulación de la Ley Nacional de SIDA (Ley N°23.798/90). Este programa tiene como funciones principales, no sólo el registro de casos de SIDA y de HIV, sino también define y coordina las políticas de prevención y atención del HIV/SIDA y otras enfermedades de transmisión sexual en el ámbito nacional.

Desde que los primeros casos de SIDA fueron detectados en 1982, se han notificado un total de 75 009 casos de HIV o SIDA. Por otra parte, las estimaciones realizadas en forma conjunta entre ONUSIDA, OMS y la Dirección de SIDA y ETS muestran que aproximadamente 120 000 personas viven con HIV/SIDA en Argentina, de las cuales un 50% desconocerían su estado serológico (Boletín sobre el SIDA en la Argentina).

Estudios epidemiológicos realizados en Argentina muestran que la epidemia del HIV presenta un comportamiento similar al de la mayoría de los países de la región, con baja prevalencia en población general, pero con grupos de la población altamente afectados debido a diversos factores de vulnerabilidad. A este tipo de patrón epidemiológico, el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el HIV/SIDA lo define como epidemia concentrada (ONUSIDA, 2009).

El tipo de epidemia concentrada se caracteriza por prevalencias mayores al 5% en por lo menos un subgrupo de la población y por ser menor al 1% en embarazadas de zonas urbanas.

El análisis de la evolución de la epidemia del HIV/SIDA en Argentina, teniendo en cuenta los casos de SIDA notificados, muestra

una particular evolución (Figura 22.2.1). En el año 1996 se alcanza el valor máximo de enfermos notificados con 2.770 casos, coincidiendo este hecho con la incorporación de tres nuevas enfermedades marcadoras a la definición de SIDA (tuberculosis pulmonar, neumonía bacteriana a repetición y cáncer de cuello uterino invasivo). En los años siguientes, se observa una disminución constante en el número de casos de SIDA notificados, coincidiendo con la aplicación de la terapia antirretroviral de alto impacto.

Por otra parte, al analizar la evolución de la distribución de los casos de SIDA por sexo, se observa que hasta el año 1987 eran en su totalidad enfermos masculinos, produciéndose entonces el primer caso de SIDA femenino. La evolución de la razón hombre/mujer alcanza hoy en día un valor de 3/1. La situación actual del SIDA en Argentina se resume en la Tabla 22.2.2.

Analizando conjuntamente hombres y mujeres, se observa que entre los casos de SIDA, la vía de transmisión más frecuentemente reportada fue la heterosexual, seguida por el uso de drogas inyectables y luego por las relaciones entre hombres que tienen sexo con hombres. Según muestran los casos reportados de SIDA, la franja etaria más afectada se concentra en ambos sexos entre los 25 y 34 años de edad.

La República Argentina presenta una distribución irregular de la población. El Área Metropolitana de Buenos Aires, formada por la Ciudad de Buenos Aires y 24 partidos alejados pertenecientes a la Provincia de Buenos Aires, presentan la mayor concentración demográfica del país. Esta irregularidad también se hace presente en la distribución geográfica de la epidemia de HIV/SIDA, donde el mayor número de casos notificados es en la Ciudad de Buenos Aires y en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba.

Diversos estudios realizados en los últimos años en Argentina, han mostrado como grupos más afectados por la epidemia de HIV/SIDA a los "hombres que tienen sexo con hombres", los denominados *trans* (transexuales, travestis y transgénero), los "usuarios de drogas" y las/los "trabajadoras/es sexuales", entre otros grupos. La Tabla 22.2.3 muestra los valores de prevalencia e incidencia de HIV de los principales estudios realizados.

Si bien el desconocimiento del número de individuos pertenecientes a estos grupos hace que no se pueda establecer el impacto real que los mismos tienen en la epidemia nacional, las altas prevalencias e incidencias de HIV descritas han puesto en escena la urgencia de un enfoque integral en estos grupos para poder intervenir eficientemente en la lucha contra la epidemia.

Uno de los mayores desafíos que se presentan en materia epidemiológica de HIV/SIDA en Argentina, es el acceso a las poblaciones vulnerables en ciudades ubicadas fuera de Buenos Aires. En el caso de los hombres que tiene sexo con hombres, no existen estudios que reporten la prevalencia de infección por HIV fuera de Buenos Aires. Diversas causas, como la poca "visibilidad" de la población y la gran afluencia migratoria de dichos individuos a esta gran urbe debido a la discriminación, así como también la falta de organizaciones civiles que favorezcan su agrupación, atentarían contra la posibilidad de realizar este tipo de estudios en las



Población total de Argentina	Personas infectadas	Personas que conocen su condición	Personas en seguimiento
40 millones	120 mil	60 mil (50%)	56 mil 69% en el sector público 31% en seguridad social y prepagos)
Prevalencias:			
<ul style="list-style-type: none"> - 0,4% en la población general - 12% entre homosexuales y otros hombres que tienen sexo con hombres - 7% entre usuarios de drogas - 5% entre trabajadores/as sexuales - 34% entre personas travestis-transexuales 			

Tabla 22.2.2. Situación de la epidemia de SIDA en Argentina. Boletín sobre el SIDA en Argentina, noviembre de 2009.

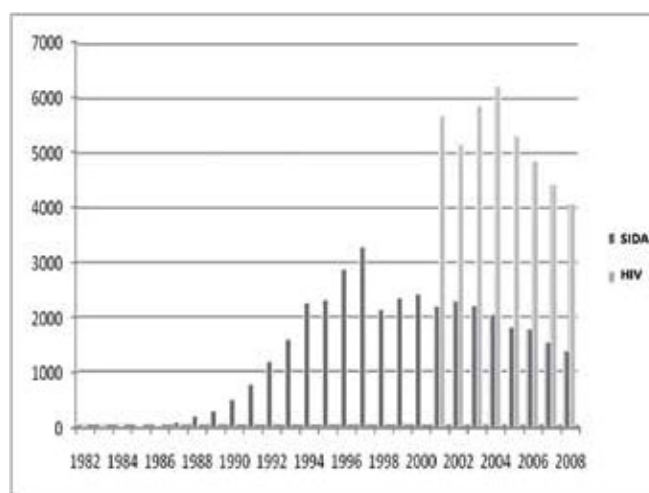


Figura 22.2.1. Tendencia anual de casos notificados de SIDA (1982-2008) y de infección por HIV (2001-2008). Datos extraídos del Boletín sobre el SIDA en Argentina, noviembre de 2009. Los años 2007 y 2008 son años con datos incompletos.

Grupo	Período de estudio	Total	Prevalencia HIV (%)	Incidencia HIV (100/personas año)	Referencias
HSH	2001-2002	694	13,8	6,7	Pando MA, 2003 Vignoles M, 2006
	2003-2004	877 ¹	7,5	4,8	Segura M, 2007
	2006-2008	1518 ¹	10,3	6,3	Pando MA, 2009
TS	Mujeres 2001-2002	625	3,2	1,3	Pando MA, 2006 Vignoles M, 2006
	Mujeres 2006-2008	1112 ¹	1,9	0,6	Pando MA, 2009
	Hombres 2006-2008	111	10,8	2,2	dos Ramos FS, 2009
	Trans 2002-2006	105	27,6	-	Toibaro J, 2009
	Trans 2006-2008	112 ¹	33,9	11,3	dos Ramos FS, 2009
UD	2000-2001	174	44,3	0,0	Weissenbacher M, 2003 Vignoles M, 2006
	2002-2003	504	6,3	3,1	Rossi D, 2008 Vignoles M, 2006
	2006-2008	738 ¹	4,2	2,1	Pando MA, 2009

Tabla 22.2.3. Prevalencia e incidencia de infecciones de transmisión sanguínea y sexual en poblaciones vulnerables al HIV. Argentina, 2000-2008. HSH (hombre que tiene sexo con hombre); TS (trabajadora sexual); UD (usuario de drogas), UDI (usuario de drogas inyectables); UCNi (usuario de cocaína no inyectable); TB (Paciente con tuberculosis); ITS (Consultante de servicios de infecciones de transmisión sexual). ¹Sólo se incluyeron los que se manifestaron como "HIV negativos".

condiciones actuales. Sin embargo, las trabajadoras sexuales mujeres, han logrado en los últimos años una gran representatividad en la mayoría de las provincias del país a través de la organización AMMAR. El establecimiento de sedes de la organización en diversas ciudades, así como el trabajo continuo que realizan en la comunidad, ha facilitado su acceso a la salud y en particular, al diagnóstico de HIV. En el caso de los usuarios de drogas, el acceso a los mismos fuera de la ciudad de Buenos Aires y sus alrededores, hasta el momento sólo se ha registrado en ámbitos relacionados con instituciones de tratamiento de dependencia de drogas.

La infección por HIV puede mantenerse oculta por varios años por no presentar síntomas específicos que faciliten su diagnóstico.

Estas infecciones no diagnosticadas constituyen una parte oculta de la epidemia que favorece las nuevas transmisiones y llevan a una peor evolución de la enfermedad ante la falta de tratamiento. Como se pudo observar, a partir del último de los estudios de incidencia citados, realizado a partir de individuos que se definían como "HIV negativos", sólo una porción de los nuevos diagnósticos correspondía –en realidad– a nuevas infecciones. Un gran número de individuos padecía la infección con una antigüedad mayor a 6 meses, sin que la misma hubiera sido diagnosticada. En este sentido, se puede observar cómo los estudios epidemiológicos enfocados a grupos más vulnerables constituyen muchas veces una oportunidad para el diagnóstico de individuos cuya infección habitualmente no se diagnostica.

Bibliografía

- "Boletín sobre el SIDA en la Argentina". Noviembre 2009. Ministerio de Salud. Unidad Coordinadora Ejecutora VIH/SIDA y ETS.
- dos Ramos Farías MS, Pando MA, Garcia MN, *et al.* "High prevalences of HIV, HCV, HBV and Treponema pallidum in male and trans sex workers from Argentina". AIDS Vaccine Conference. Paris. Francia. October 19 - October 22, 2009 (Abstract P 06-02).
- ONUSIDA. "Resumen Mundial de la Epidemia de VIH/SIDA". Diciembre de 2009.
- Pando MA, Maulen S, Weissenbacher M, Marone R, Duranti R, Peralta LM, *et al.* "High human immunodeficiency virus type 1 seroprevalence in men who have sex with men in Buenos Aires, Argentina: risk factors for infection". *Int J Epidemiol* 2003; 32: 735-40.
- Pando MA, Berini C, Bibini M, *et al.* "Prevalence of HIV and other sexually transmitted infections among female commercial sex workers in Argentina". *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 233-8.
- Pando MA, Berini C, Bibini M, Fernández M, Reinaga E, Maulen S, *et al.* "HIV incidence and molecular characterization of new diagnoses in Argentina. A Global Fund Project. 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention". Cape Town. South Africa. July 19- July 22, 2009 (Abstract MOPEC002).
- Rossi D, Radulich G, Muzzio E, Naveira J, Sosa-Estani S, Rey J, *et al.* "Multiple infections and associated risk factors among non-injecting cocaine users in Argentina". *Cad Saude Publica* 2008;24:965-74.
- Segura M, Sosa Estani S, Marone R, Bautista CT, Pando MA, Eyzaguirre L, *et al.* "Buenos Aires cohort of men who have sex with men: prevalence, incidence, risk factors, and molecular genotyping of HIV type 1". *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; 23: 1322-29.
- Toibaro JJ, Ebersztejin JE, Parlante A, Burgoa P, Freyre A, Romero M, *et al.* "Sexually transmitted infections among transgender individuals and other sexual identities". *Medicina (B Aires)* 2009; 69: 327-30.
- Vignoles M, Avila MM, Osimani ML, Pando MA, Rossi D, Shepard H, *et al.* "HIV seroincidence estimates among at-risk populations in Buenos Aires and Montevideo: use of the serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion". *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42: 494-500.
- Weissenbacher M, Rossi D, Radulich G, Sosa-Estani S, Vila M, Vivas E, *et al.* "High seroprevalence of bloodborne viruses among street-recruited injection drug users from Buenos Aires, Argentina". *Clin Infect Dis* 2003; 37: Suppl 5, S348-52.

Patogenia de la Infección por HIV-1

Luisa Sen - Andrea Mangano

1. CURSO DE LA INFECCIÓN POR EL HIV-1. HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN

A pesar de que el lapso de la infección por el HIV-1 tiene una gran variación inter-individual, desde meses a más de 10 años, el curso clínico de la infección puede dividirse en tres fases: 1) infección aguda primaria; 2) período de latencia clínica o fase crónica de la infección; y 3) fase sintomática del SIDA.

1.1 INFECCIÓN AGUDA PRIMARIA

Una vez que el HIV-1 atravesó la piel y/o las mucosas, las primeras células blanco que encuentra son las células dendríticas de la mucosa epitelial (células de Langerhans) que transportan el virus a la región ganglionar linfoide más próxima. En el ganglio se produce, como mecanismo defensivo, un reclutamiento de células T CD4⁺ activadas, que simultánea y potencialmente son blancos del virus, favoreciendo en forma local la diseminación viral. También en la superficie de las células dendríticas foliculares (CDF) del ganglio están atrapados los viriones infectantes, constituyendo una fuente de virus infecciosos listos para infectar a las células susceptibles circundantes. Luego surgen una serie de eventos virológicos e inmunológicos que reflejan la extensión de la diseminación viral. El período de la infección primaria abarca de 4 a 8 semanas, y en él se distinguen dos etapas. La primera corresponde a la diseminación viral, abarcando de 2 a 4 semanas con cargas virales plasmáticas muy elevadas, que culmina con un gran pico de viremia, indican-

do una intensa replicación viral. La segunda etapa corresponde al despeje del virus en sangre y ocurre alrededor de la etapa de seroconversión, con una rápida reducción de la carga viral arribando a un nivel estable de la replicación viral, que es variable de un individuo a otro.

Durante las primeras semanas de la infección no se detectan anticuerpos específicos contra el HIV-1 (período ventana). Precediendo a la detección de la respuesta inmune humoral específica anti-HIV-1, los virus del ganglio regional se diseminan hacia otros órganos linfoides. Durante la infección aguda primaria se produce una caída transitoria de 10 a 100 veces del número absoluto inicial de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica eliminando a las células infectadas de la circulación. Coincidiendo con el nadir de los linfocitos, tanto la carga viral plasmática como el número de células infectadas alcanzan el cenit. El curso de la infección por el HIV-1 se ilustra en la Figura 22.3.1. En general, con la seroconversión hay un drástico descenso del virus en sangre periférica acompañado con un ascenso de los linfocitos T CD4⁺. También hay una elevación en el número de linfocitos T CD8⁺ en sangre periférica. Todos los eventos inmunológicos demuestran que se desarrolla una respuesta inmune enérgica pero sin lograr erradicar al virus.

1.2 LATENCIA CLÍNICA ASINTOMÁTICA Y SIDA ENFERMEDAD

Después de la seroconversión comienza el período de latencia clínica, también denominado período asintomático, que antecede al inicio de la enfermedad o SIDA y puede variar entre 1 a 15 ó más

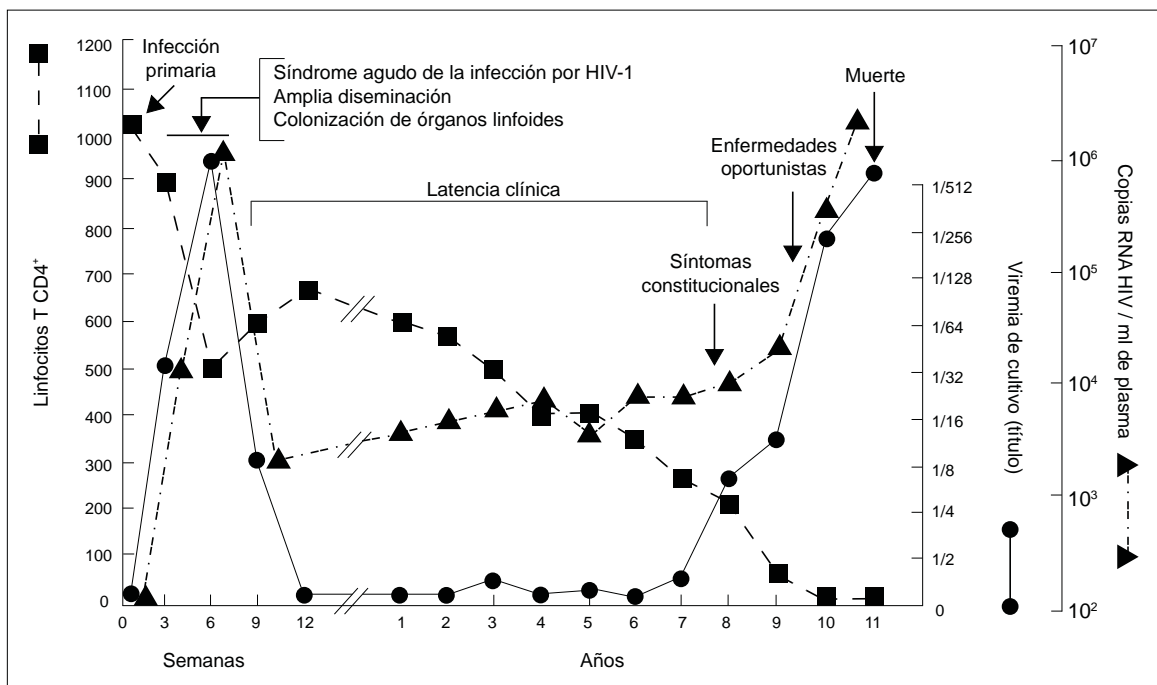


Figura 22.3.1. Curso natural de la infección por el HIV-1. Se muestra el perfil inmunológico y virológico según la fase clínica de la infección. Tomado de Pantaleo G & Fauci AS. 1994.

años. Durante todo este período, el sujeto infectado permanece libre de síntomas y signos marcadores del SIDA. Sin embargo, el curso de la infección prosigue inadvertidamente y se suceden una serie de fenómenos virológicos e inmunológicos con un gradual e inexorable deterioro del sistema inmunitario. Los eventos virales muestran una dicotomía entre la carga viral y la replicación viral en los ganglios linfáticos y la sangre periférica. Mientras la carga viral plasmática comienza a disminuir, logrando estabilizarse dentro de los primeros 6 meses de la infección, la replicación viral en los ganglios linfáticos persiste. El descenso de las células infectadas y los viriones atrapados en la trama de las células dendríticas foliculares serían los responsables de la dicotomía. Desde un punto de vista inmunológico predominan los mecanismos de activación celular. Tanto los linfocitos B como los T están estimulados. En los ganglios linfáticos se observa una hiperplasia folicular y expansión de la red que forman las CDF, indicadores de activación del tejido linfoide. Durante el período de latencia clínica se produce una reducción lenta y progresiva del número de linfocitos T CD4⁺, y la carga viral en sangre periférica se mantiene relativamente baja. Sin embargo, en algunos casos la reducción de las células es mucho más acelerada hasta el establecimiento del SIDA florido. Tanto la carga viral plasmática como el número de linfocitos T CD4⁺ son marcadores pronósticos de la enfermedad. La carga viral es un predictor muy importante en la progresión de la infección, en particular en las etapas tempranas. Las pautas actuales para el inicio y monitoreo del tratamiento anti-retroviral se han definido con base en la carga viral plasmática. El recuento de linfocitos T CD4⁺ en circulación es indicador del estado de inmunodeficiencia existente y se complementa con la carga viral. A medida que progresa la infección viral la arquitectura ganglionar se va alterando, y llega a liberar una mayor cantidad de virus al torrente circulatorio. Se ha calculado que el recambio diario de la carga viral total del organismo es del 30% y del total de las células T CD4⁺, entre el 6-7%.

Cuando se produce un incremento de la replicación viral con una marcada reducción de los linfocitos T CD4⁺ aparecen los síntomas y signos constitucionales pasando a la etapa clínicamente sintomática. Cuando el número de linfocitos T CD4⁺ es menor de 200/mm³ y con viremia alta se manifiestan las enfermedades infecciosas oportunistas, es decir, se instala el SIDA enfermedad. Las neoplasias oportunistas pueden surgir aun cuando la inmunodeficiencia no es tan acentuada.

2. CATEGORÍAS CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS

Aproximadamente el 50% (30-70%) de los individuos infectados con el HIV-1 presenta sintomatología clínica durante la infección aguda primaria, semejando una mononucleosis infecciosa con una duración media de 1 a 3 semanas que, cuando se prolonga, se asocia con un pronóstico desfavorable. Los síntomas más comunes son: fiebre, astenia, dolores musculares o articulares, adenopatías, faringitis, diarrea, cefalea, pérdida de peso, náuseas o vómitos, ulceraciones cutáneas y de mucosas. También pueden presentarse problemas neurológicos, casos en los que se ha podido aislar el virus directamente del LCR indicando el acceso del virus al SNC. Los síntomas y signos más frecuentes son fotofobia, meningo-encefalitis, neuropatía periférica, parálisis del nervio facial, neuritis braquial, radiculopatía, compromiso de las funciones cognitivas.

En un 40-70% de los pacientes se presenta un exantema (*rash*) cutáneo localizado en la parte superior del cuerpo. A pesar de la variabilidad sintomática que presenta, en la actualidad se la identifica como una entidad clínica distinta, que requiere como tal, un diagnóstico diferencial correcto. Para ello es importante recurrir a las pruebas de laboratorio para confirmar o desechar las sospechas clínicas de infección primaria con HIV-1. Lo más probable es que el paciente se encuentre en el período ventana inmunológica, requiriendo para su diagnóstico detectar el antígeno viral p24, o la identificación directa del provirus mediante PCR, y de modo complementario la medición de la carga viral plasmática.

En 1993, el Centro de Control de Enfermedades de EE.UU. (CDC) clasificó y categorizó clínica e inmunológicamente la infec-

Categoría A

- Infección por HIV-1 asintomática
- Linfadenopatía generalizada persistente
- Enfermedad HIV-1 aguda o primaria

Categoría B

- Síntomas de la enfermedad no incluidos en la categoría C
- Angiomatosis bacilar
- Candidiasis vulvo-vaginal persistente y resistente
- Candidiasis oro-faríngea
- Displasia cervical grave o carcinoma *in situ*
- Síndrome constitucional (fiebre, diarrea persistente)
- Neuropatía periférica

Categoría C

- Candidiasis traqueal, bronquial o pulmonar
- Candidiasis esofágica
- Infección por citomegalovirus de un órgano diferente al hígado, bazo o ganglios linfáticos
- Retinitis por citomegalovirus
- Encefalopatía por infección con HIV-1
- Herpes simplex causante de úlcera mucocutánea de más de un mes de evolución o bronquitis, neumonitis o esofagitis
- Tuberculosis pulmonar
- Tuberculosis extrapulmonar o diseminada
- Infección por *Mycobacterium avium-intracellulare* o *M. kansasii* diseminada o extrapulmonar
- Infección por otras micobacterias, diseminada o extrapulmonar
- Criptococosis con diarrea de más de un mes
- Sarcoma de Kaposi
- Criptococosis extrapulmonar
- Isosporidiasis crónica
- Linfoma de Burkitt o equivalente
- Linfoma inmunoblástico o equivalente
- Linfoma cerebral primario
- Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*
- Neumonía recurrente
- Leucoencefalopatía multifocal progresiva
- Sepsis recurrente por especies de *Salmonella* que no sean *S. typhi*
- Toxoplasmosis cerebral
- *Wasting syndrome* (síndrome de desgaste)
- Carcinoma de cérvix invasivo



Tabla 22.3.1. Categorías Clínicas según la Clasificación del CDC (1993).

Categoría 1: >500 células CD4⁺/μl

Categoría 2: entre 200 y 499 células CD4⁺/μl

Categoría 3: <200 células CD4⁺/μl

Tabla 22.3.2. Categorías Inmunológicas según la Clasificación del CDC.

ción por HIV-1, según la aparición de los signos clínicos (Tablas 22.3.1 y 22.3.2).

3. ENTRADA DEL HIV-1

La infección celular por el HIV-1 se produce mediante la interacción de la glicoproteína de envoltura gp120 con dos tipos de receptores: la molécula de CD4, que se comporta como un receptor específico y común a las distintas cepas de HIV-1, y un correceptor, perteneciente a la familia de receptores de quimioquinas.

3.1 EL RECEPTOR PRIMARIO CD4

La glicoproteína CD4 (58kDa) se localiza en la superficie celular de aproximadamente 60% de los linfocitos T, y también en las células precursoras T de médula ósea y timo, en monocitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas y células de la microglia del sistema nervioso central. Posee un dominio extracelular, uno de transmembrana hidrofóbico y una porción citoplasmática. La porción extracelular tiene 4 regiones (D1-D4) que representan dominios inmunoglobulina-símil.

El CD4 está pegado al complejo del receptor T sobre las células T CD4⁺ y se une a las moléculas HLA clase II presentes en las células presentadoras de antígenos. La gp120 del virus se une al CD4 induciendo cambios conformacionales a fin de ingresar el virus a la célula. Si bien para el HIV-1 el CD4 es un receptor primario y necesario para el ingreso a las células, requiere también de correceptores adicionales.

3.2 CORRECEPTORES Y QUIMIOQUINAS

3.2.1. Correceptores primarios del HIV-1

Los correceptores son receptores de quimioquinas con estructura en serpentina con siete dominios transmembrana (7M) y su región citoplasmática se acopla con la proteína G, que genera señales de transducción cuando los receptores se unen a sus ligandos. Las quimioquinas son un grupo de citoquinas de bajo peso molecular (8-10 kDa) capaces de atraer leucocitos hacia los sitios de inflamación. De acuerdo con las características estructurales, las quimioquinas se clasifican en 4 clases: CXC (α), CC (β), C (γ) y CX3C (δ), y esta misma propiedad es utilizada para la clasificación del HIV-1 según el correceptor empleado. Actualmente, se reconocen dos correceptores principales para el HIV-1 y HIV-2, las moléculas CCR5 y CXCR4 (al principio denominado fusina), utilizadas de forma alternativa por cepas virales que presentan características diferentes en su envoltura viral.

Las cepas de HIV-1 pueden clasificarse en dos grupos, las que tienen tropismo por macrófagos (M-trópicas) y las que tienen tropismo por células T y líneas celulares T (T-trópicas; Figura 22.3.2).

El fenotipo de estas cepas virales se identifica *in vitro* por su capacidad de inducir o no la formación de sincicios (células gigantes

multinucleadas) sobre la línea celular MT-2. Las cepas M-trópicas son no inductoras de sincicios (NSI), mientras que las cepas T-trópicas, inducen la formación de sincicios celulares (SI; Figura 22.3.3).

El tropismo celular depende sobre todo de la secuencia de aminoácidos con la que está constituida la envoltura viral y está directamente relacionado con la utilización de los correceptores. Las cepas M-trópicas NSI utilizan el correceptor CCR5, y las cepas T-trópicas SI utilizan el correceptor CXCR4. El receptor CXCR4 tiene como ligando natural a la CXC-quimioquina SDF-1 (factor derivado del estroma tipo 1). Los ligandos del CCR5 incluyen a las CC-quimioquinas MIP-1 α , -1 β y RANTES. En función del correceptor utilizado, el HIV-1 se clasifica en 3 tipos de variantes: R5, X4 y R5X4 (también denominadas dual-trópicas) que son las que pueden utilizar el correceptor CCR5 y/o CXCR4 para ingresar a la célula. (Figuras 22.3.2 y 22.3.4)

La transmisión del HIV-1 está asociada casi siempre con la replicación de cepas R5, que son las que predominan durante los primeros estadios de la infección en más del 95% de las personas infectadas. En la mitad de los pacientes infectados sucede un cambio del tropismo viral de R5 a X4 a medida que avanza la enfermedad, es decir, el virus que utilizaba el CCR5 cambia y utiliza el correceptor CXCR4 que está presente en un mayor número de células T. También se ha observado la aparición de variantes X4/R5 consideradas como un estado de transición de R5 a X4. Los virus X4 son considerados los más patogénicos, y su aparición es un factor predictor del descenso de linfocitos T CD4⁺ y de la progresión clínica de la enfermedad (Figura 22.3.4).

3.2.2 Correceptores secundarios del HIV-1

Además de los correceptores principales, se han descrito *in vitro* varios receptores de quimioquinas o receptores *huérfanos* pertenecientes a la familia de receptores de 7M que también son capaces de actuar como correceptores del HIV-1 (CCR1, CCR2, CX3CR1, etc.).

Otras moléculas presentes en la superficie celular también pueden participar en la adhesión del virus a la célula, facilitando la infección, en especial cuando hay un descenso en la expresión de los receptores del HIV-1, y la captación del HIV-1 por los macrófagos y células dendríticas. Entre ellas se encuentran el DC-SIGN, receptores de ma-

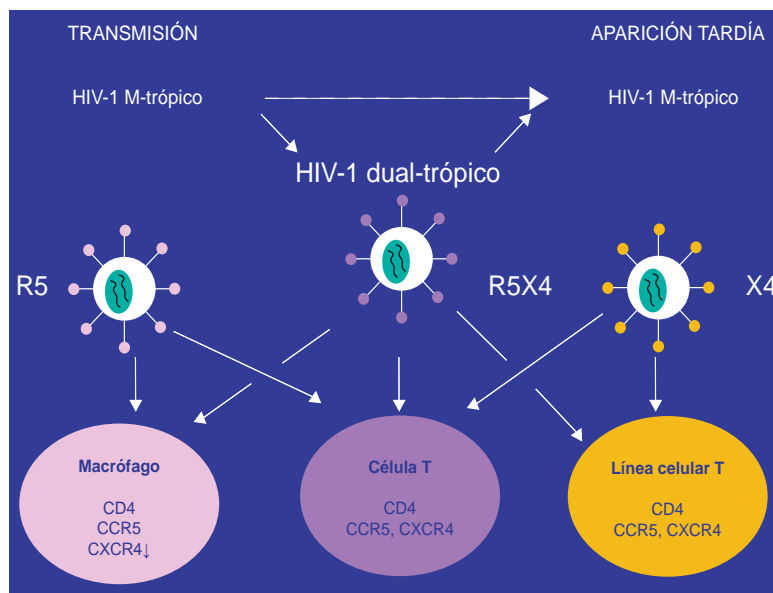


Figura 22.3.2. Tropismo celular del HIV-1. Las cepas de HIV-1 M-trópicas, R5 infectan macrófagos y constituyen las variantes transmisoras. A medida que avanza la infección, en la mitad de los pacientes infectados puede ocurrir un cambio de tropismo, con el surgimiento de cepas T-trópicas X4 que pueden infectar células y líneas celulares T. Las variantes dual-trópicas R5X4 son consideradas variantes de transición entre las R5 y las X4.

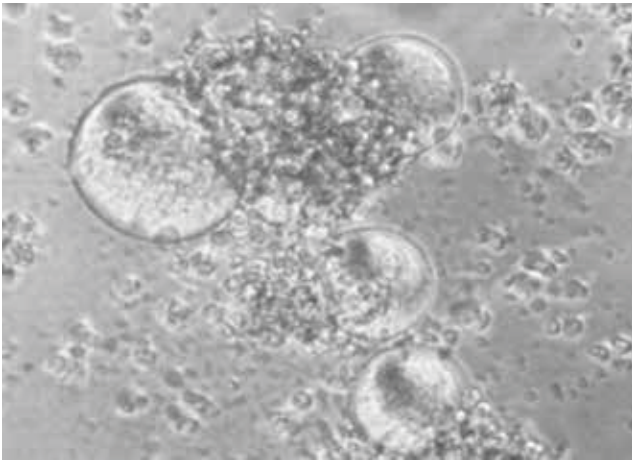


Figura 22.3.3. Formación de sincicios celulares producidos por el HIV-1 sobre la línea celular MT-2. Observación al microscopio óptico invertido con un aumento de 16 x.

nosa, sindecanos (que es un tipo de proteoglicano) y la molécula de adhesión LFA-1 que se une al ICAM-1 expresado por el virión.

3.2.3 Variaciones genéticas de los correceptores y quimioquinas en la susceptibilidad a la infección por el HIV-1

Alteraciones en los correceptores del HIV-1 como en sus ligandos pueden influir en la susceptibilidad a la infección por el HIV-1. En el año 1996, poco después del descubrimiento de los correceptores del HIV-1, se identificó una delección de 32 pares de bases ($\Delta 32$) en el gen del CCR5 que, cuando se encuentra en forma homocigota, evita la expresión del receptor en la superficie celular y, en consecuencia, no se produce infección por las cepas R5. Estudios epidemiológicos han demostrado que los individuos homocigotas $\Delta 32/\Delta 32$ (aproximadamente 1% de la población caucásica) presentan una resistencia natural a la infección por el HIV-1. Por otro lado, los individuos infectados heterocigotas $+/\Delta 32$ desarrollan SIDA en forma más lenta que los individuos sin alteración en el receptor (CCR5+/+). Estudios recientes han demostrado que variaciones genéticas en otros correceptores como el CCR2, CXCR4, y en la región regulatoria del CCR5, también podrían estar ligados a la susceptibilidad al HIV-1. El polimorfismo CCR2-V64I se asocia con un retraso significativo en el desarrollo de SIDA y una protección en la transmisión vertical del HIV-1. Por el contrario, ciertos polimorfismos en la región regulatoria del CCR5 determinan haplotipos que aumentan el riesgo de transmisión y aceleran el desarrollo de SIDA, como el haplotipo HHE en la población Argentina.

Las variaciones en los genes que codifican a las CC-quimioquinas también pueden influir en la infección por HIV-1. Un polimorfismo en la región regulatoria de RANTES se asoció con un aumento en el nivel de expresión de dicha quimioquina, y retraso en el desarrollo de la enfermedad. Recientemente, se demostró que una isoforma no alélica de MIP-1 α denominada MIP-1 α P o CCL3L1 tiene una potente actividad supresora anti-HIV-1 y su gen puede presentar un número de copias variable (duplicaciones génicas) que puede ser de 0 a más de 10 copias por genoma diploide. Dosis génicas mayores se correlacionan con mayores niveles de la quimioquina en plasma. Además, se observó que para cada grupo étnico existe un número promedio de copias de CCL3L1, y una dosis génica mayor que el promedio de la población se asocia con un fuerte efecto protector en la transmisión del HIV-1 y en el desarrollo de SIDA. Por ejemplo, en poblaciones de origen caucásico el promedio de copias es 2, mientras que en poblaciones africanas es 4, en ambos casos, en individuos con dosis génicas mayores que el promedio de la población se observa un fuerte efecto protector contra el HIV-1.

Es importante resaltar que no sólo las variaciones genéticas cualitativas (polimorfismos, mutaciones) sino también variaciones

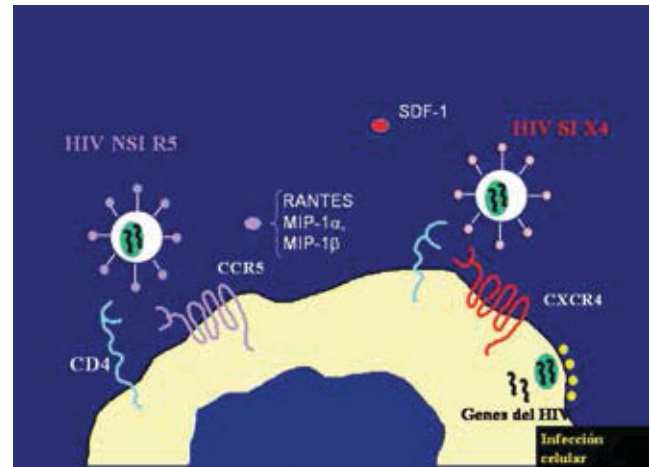


Figura 22.3.4. Entrada del HIV-1 a la célula. Interacción entre las variantes del HIV-1 según el tropismo celular SI y NSI con sus respectivos receptores y correceptores. Las cepas de HIV-1 NSI, M-trópicas, R5 utilizan el CD4 más el CCR5 cuyos ligandos naturales son MIP-1 α , MIP-1 β , y RANTES. Las cepas de HIV-1 SI, T-trópicas, X4 utilizan el CD4 junto con el CXCR4, cuyo ligando fisiológico es el SDF-1.

genéticas cuantitativas (dosis génica) influyen en la susceptibilidad a la infección por HIV-1 y pueden constituir la base genética a la variabilidad de las respuestas a enfermedades infecciosas. El escenario con baja expresión del correceptor CCR5 y alta producción de CC-quimioquinas es el más favorable para evitar la infección por las cepas de HIV-1 R5, que son las variantes involucradas en la mayoría de las transmisiones.

3.2.4 Nuevas perspectivas terapéuticas

Además de los antirretrovirales convencionales que actúan sobre la replicación viral, las nuevas perspectivas terapéuticas se enfocan a los receptores de quimioquinas o sus ligandos, es decir, tratan de impedir el ingreso del virus a las células. De hecho, en la naturaleza ya se observó que la modulación de la expresión del CCR5 por la mutación CCR5- $\Delta 32$ no produce alteraciones funcionales, y por lo tanto el bloqueo del CCR5 sería una estrategia efectiva para combatir la infección. Además, las quimioquinas, ligandos del CCR5, son potentes inhibidores de la replicación del HIV-1 a través de un mecanismo bimodal: pueden impedir directamente el contacto entre la gp120 y el receptor de quimioquina, o inducir la internalización del receptor (regulación negativa) evitando su disponibilidad en la superficie celular. En los últimos años se han iniciado estudios para evaluar quimioquinas como nuevos agentes terapéuticos y varios compuestos se encuentran en fase clínica I/II.

4. HIV-1 Y RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE

4.1 RESPUESTA ESPECÍFICA CELULAR

Las células dendríticas, macrófagos y células B son los principales presentadores de antígenos del sistema inmune. En los ganglios regionales se produce la estimulación de los linfocitos T CD8⁺ y la formación de células T citotóxicas antígeno-específicas siendo la presentación antigénica dependiente del complejo mayor de histocompatibilidad clase I.

La respuesta inmune HIV-1-específica es llevada a cabo, sobre todo, por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, capaces de contener la replicación viral, en especial durante las etapas tempranas de la infección. Existe una fuerte asociación temporal entre el descenso de la carga viral y la aparición de los linfocitos citotóxicos virus-específicos. En los pacientes no progresores a largo plazo se ha observado una fuerte respuesta citotóxica HIV-1-específica. Más

aún, pacientes con niveles elevados de linfocitos T citotóxicos se correlacionan con una progresión más lenta a SIDA.

4.2 RESPUESTA ESPECÍFICA HUMORAL

En general, la función de los anticuerpos en la infección por el HIV-1 es poco clara y contradictoria. Se acepta que son los principales responsables del despeje de los viriones de la circulación. El hecho de que un anticuerpo se pueda unir al virus no implica que sea neutralizante. Existen anticuerpos anti-HIV-1 con diferentes actividades biológicas: desde neutralizantes protectores hasta exacerbantes favorecedores de la infección. Estudios en simios indican que los anticuerpos fijadores de complemento, aparecen dentro de la segunda semana de la primoinfección y preceden al pico de los anticuerpos neutralizantes. Se postula que los inmunocomplejos de las partículas virales y las inmunoglobulinas podrían fijar complemento y luego unirse a los receptores para el complemento expresados por las CDF de los centros germinales de los ganglios linfáticos y permanecer atrapados en la superficie celular.

Los anticuerpos neutralizantes anti-HIV-1 aparecen después de haber disminuido la viremia. Es probable que el estado de glicosilación de ciertas regiones de la gp120 del HIV-1 pueda llegar a enmascarar epítomos capaces de generar anticuerpos neutralizantes. También se ha sugerido que los anticuerpos IgG anti-HIV-1 podrían estar asociados y/o colaborarían en la infección ejerciendo un efecto deletéreo y no protector. Recientemente, se planteó una acción protectora de la IgA secretoria presente en las secreciones vaginales y cervicales, incluso sérica, en mujeres seronegativas expuestas sexualmente al HIV-1.

4.3 RESPUESTA ANTIVIRAL DE LA INMUNIDAD INNATA

Dentro de los mecanismos de la inmunidad innata participan diferentes células efectoras guardianas contra el ingreso de microorganismos, entre ellas los granulocitos, macrófagos, células T $\gamma\delta$, células NK (asesinas naturales) que, aunque no reconocen específicamente al patógeno pueden identificar y destruir células infectadas.

Además, existe un conjunto de factores que naturalmente son capaces de suprimir la replicación viral. Entre ellos se encuentran factores solubles activos como el sistema del complemento, MBL (lectina ligadora de manosa), y los interferones. Si bien representan una barrera frente a la infección viral son insuficientes para controlarla. Los linfocitos CD8⁺ activados de pacientes infectados producen factores solubles capaces de inhibir la replicación del HIV-1, entre ellos las quimiocinas (ligandos naturales de CCR5 y CXCR4) y otros factores denominados genéricamente CAF (factor supresor no citotóxico anti-HIV-1). Además, se identificaron pequeños péptidos con actividad antiviral como los α - y β -defensinas. Las α -defensinas son una familia de proteínas producidas por neutrófilos, ciertas células epiteliales y linfocitos T y las β -defensinas son producidas principalmente por células epiteliales.

Un poderoso mecanismo de la inmunidad innata recientemente descubierto es a través de la enzima celular APOBEC3G (apolipoproteína B enzima editora de RNAm, péptido catalítico), que actúa al nivel de la transcripción inversa viral. Inhibe la replicación del HIV-1, a través de la desaminación de citocinas a uracilos durante la síntesis de la cadena naciente de DNA, con la consiguiente acumulación de mutaciones perjudiciales en el genoma viral (hipermutaciones G \rightarrow A). Para contrarrestar esta defensa celular, el virus posee la proteína Vif (factor de infectividad viral) que interacciona con APOBEC3G conduciendo a su degradación proteosómica y a su exclusión de los nuevos viriones.

5. INMUNOPATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR EL HIV-1

Desde el inicio de la infección por el HIV-1 la pregunta primordial fue y sigue siendo por qué y cómo el virus es capaz de provocar la grave inmunodepleción de las células CD4⁺ generando enfermedad en el hombre.

En 1996, David Ho y col. observaron que la rápida reducción de la carga viral plasmática se asociaba con un incremento significativo en las células CD4⁺ circulantes. Con esa base postularon un modelo de la patogénesis de la infección por el HIV-1 en el que el virus infecta y mata a las células CD4⁺, simultáneamente reemplazadas por una permanente producción de células nuevas. Sin embargo, como la producción celular no alcanza a compensar la destrucción, en 10 años o más la mayoría de las células CD4⁺ están perdidas. El modelo se denominó de canilla-y-drenaje, representando a las células CD4⁺ el agua en la pileta, el drenaje destapado, a la infección viral y el agua que fluye de la pileta, a la producción de células CD4⁺ nuevas que, por no ser suficiente para conservar el nivel del agua que permanentemente está drenando, representan al número de células CD4⁺ infectadas. Con el tiempo, la pileta se va quedando vacía; ése sería el momento en el que el individuo desarrolla el SIDA.

El modelo de la canilla-y-drenaje ha sido cuestionado en particular por los inmunólogos. Desde el inicio de la epidemia en los individuos infectados crónicamente con el HIV-1 se había observado la presencia de una notoria inmunoactivación que potenciaba la replicación viral junto con los mecanismos de muerte celular programada de las células CD4⁺. La pregunta en cuestión es si la destrucción masiva de las células CD4⁺ durante la infección viral se debe al ataque directo a las células (muerte celular mediada por el virus), o es una consecuencia natural por la generación de una inmunoactivación exacerbada y masiva inducida por el HIV-1.

Recientemente, Daniel Douek ha planteado que la inmunopatogénesis por el HIV-1 difiere según la infección sea aguda o crónica. Como habitualmente los estudios científicos estaban basados sólo en las observaciones de la infección viral durante la fase crónica, resulta difícil comprender integralmente el desarrollo de la infección. Douek postula que en la infección aguda del HIV-1 la célula blanco principal es la célula CD4⁺ memoria—la mayoritaria entre las células CD4⁺—, localizada principalmente a nivel de las mucosas. En la fase aguda, aproximadamente el 60% o más de las células CD4⁺ memoria están infectadas, superando de 100 a 1 000 veces a las células infectadas presentes en circulación durante la fase crónica. Alrededor del día 14 post-infección, 80% de las células infectadas del organismo desaparecen. La reposición de las células CD4⁺ memoria está limitada, dependiendo del aporte del timo y de las células CD4⁺ *naïve*. En la etapa crónica, surge una inmunoactivación, transformando la célula CD4⁺ *naïve* a memoria y conduciendo a la muerte celular programada. La inmunoactivación persistente asociada con la muerte celular hacen que lenta y preferentemente se depleción el *pool* de células CD4⁺. Al mismo tiempo, la inmunoactivación conduce a una mayor replicación del HIV-1. Finalmente, la falta de aporte por parte del timo reduce el número de células CD4⁺ *naïve* que son necesarias para sostener a las células CD4⁺ de memoria.

En conclusión, existe un número considerable de factores que contribuyen a la patogénesis de la infección por el HIV-1. En la fase aguda habría una pérdida masiva de las células CD4⁺ de memoria, principalmente por acción directa del virus; en cambio, en la fase crónica, la destrucción celular se debería a la muerte celular programada por la significativa inmunoactivación, favoreciendo además la replicación y la diseminación viral con perturbación de las funciones del sistema inmune (*Véase el Capítulo 8 "Mecanismos de evasión a la respuesta inmune del hospedador"*).

NOTA

Este capítulo se finalizó en el año 2008.

ADENDUM

Mientras *Virología Médica* se encontraba en la etapa de prueba de galera se demostró que los linfocitos T CD4⁺ activados e infectados productivamente por HIV (5% del total) mueren por apoptosis mediada por caspasa 3, mientras que los linfocitos T CD4⁺ quiescentes infectados en forma abortiva (el 95% restante) lo hacen mediante piroptosis, una muerte programada desencadenada por la caspasa 1, asociada a la liberación del contenido citoplasmático y de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β (Doitsh G, *et al. Nature*, 2014).

Bibliografía

- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. "Rapid turnover of plasma virions and CD4+ lymphocytes in HIV-1 infection". *Nature* 1995; 373: 123-6.
- Douek D. "Making sense of HIV pathogenesis". *PRN Notebook* 2005; 10: 9-12.
- Gonzalez E, Kulktnai H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catabano G, *et al.* "The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility". *Science* 2005; 307: 1434-40.
- Huthoff H, Malim MH. "Cytidine deamination and resistance to retroviral infection: towards a structural understanding of the APOBEC proteins". *Virology*. 2005; 334: 147-53.
- Koup RA, Safut JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, *et al.* "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome". *J Virol* 1994; 68: 4650-5.
- Levy JA. "The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF)". *Trends Immunol* 2003; 24: 628-32.
- Mangano A, Kopka J, Batalla M, Bologna R, Sen L. "Protective effect of CCR2-64I and not of CCR5-Δ32 and SDF-1 3'A in pediatric HIV-1 infection". *J AIDS* 2000; 23: 52-7.
- Michael NL. "Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis". *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 466-74.
- Pantaleo G, Fauci AS. "Tracking HIV during disease progression". *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 600-4.
- Pantaleo G, Fauci AS. "New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection". *Ann Rev Immunol* 1995; 13: 487-512.
- Siegal FP, Spear GT. "Innate Immunity and HIV". *AIDS* 2001; 15: S127-37.

Diagnóstico de Infección por HIV-1/2

María Belén Bouzas

1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de infección por retrovirus y, en particular el de HIV en adultos se basa en la detección de anticuerpos específicos en suero o plasma. Esto se debe al tipo de infección que este virus causan en el hospedador en la cual la presencia de anticuerpos específicos anti-HIV no implica protección o resolución de la infección sino por el contrario, infección presente.

El período comprendido entre el momento en que el individuo adquiere la infección y la aparición de la respuesta inmune humoral detectable se denomina **seroconversión**. La primoinfección se presenta en un 50-70% de los casos con sintomatología que aparece entre 2 y 6 semanas luego de adquirida la infección (**Síndrome Retroviral Agudo**) y resuelve en 1 a 2 semanas. Durante la primoinfección la replicación viral es, en la mayoría de los casos, importante y se acompaña de un descenso transitorio de las células CD4⁺, seguido de un aumento en los valores de las células CD8⁺ con una inversión de la relación de CD4/CD8. De manera que son varios los marcadores inmunológicos o virológicos que se pueden utilizar al momento de diagnosticar una primoinfección (Figura 22.4.1).

Conceptualmente, y dentro del contexto del diagnóstico virológico se denomina "**período de ventana**" a aquel en el cual los anticuerpos específicos no son evidentes a través de los ensayos serológicos. Como se verá a continuación, desde el inicio de la epidemia de HIV hasta la actualidad este período se ha ido acortando merced a al utilización de equipos cada vez más sensibles.

2. ENSAYOS DE TAMIZAJE

2.1 ENZIMOINMUNOENSAYOS (ELISAs)

El diagnóstico de HIV se realiza mediante ensayos de tamizaje ("**screening**"), seguido del estudio posterior por un ensayo "suple-

mentario" o "confirmatorio" para aquellas muestras reiteradamente reactivas.

Dentro de los ensayos de tamizaje los más utilizados son los enzimoimmunoensayos (ELISAs), los cuales han ido evolucionando desde los comienzos de la epidemia, mejorándose tanto su sensibilidad como su especificidad. El formato y la composición antigénica se han ido modificando desde los ELISAs de primera, segunda y tercera generación, mediante la incorporación de proteínas recombinantes y de péptidos sintéticos sustituyendo el empleo inicial de lisados virales (Tabla 22.4.1). Esto se tradujo en una mejora de la especificidad, además de permitir la detección de anticuerpos no sólo para HIV-1, sino también para HIV-2 y para HIV-1 grupo O. Los ELISAs de tercera generación significaron un gran avance por su diseño (antígeno "sandwich") ya que permitieron acortar el período de ventana a 20 días, debido a su capacidad de detectar otras inmunoglobulinas (IgM, IgA) que se encuentran presentes durante la seroconversión, además tener una mayor sensibilidad analítica para IgG.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre el análisis de los distintos ensayos comerciales disponibles, la sensibilidad de estos ELISAs oscila entre 99,6-100% y la especificidad entre el 98,5%-100%, con una reproducibilidad del 99,4%.

Los ensayos de cuarta generación, recientemente desarrollados, permiten detectar simultáneamente el antígeno de HIV (Ag p 24) y anticuerpos de tipo IgG, IgM e IgA. Presentan características similares a los ensayos de tercera generación añadiendo la ventaja de la detección del Ag p24. La incorporación de estos ensayos combinados permitiría reducir el período de ventana en cuatro días. La sensibilidad es del 100% (Tabla 22.4.1), si bien la misma no refleja en su totalidad la sensibilidad frente a la seroconversión. Muchos de estos ensayos se encuentran comercialmente disponibles en nuestro país.

Varias características deben considerarse sobre la *performance* de estos reactivos: la capacidad de poder detectar distintos subtipos

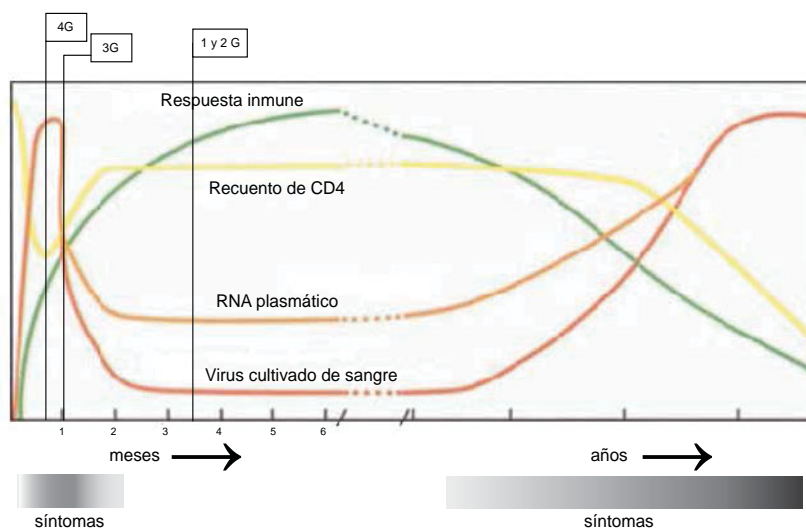


Figura 22.4.1. Curva natural de la infección por HIV-1: evolución de los anticuerpos (ELISA).

en muestras claramente positivas; la sensibilidad para la detección de Ag p24 versus un ensayo convencional para Ag p24 y la sensibilidad para detectar anticuerpos en el período de seroconversión.

Los equipos de cuarta generación, que permiten la detección de Ag p24 y de anticuerpos, se presentan en formatos desde enzimoimmunoensayos en microplaca totalmente manuales hasta en dispositivos totalmente automatizados basados en quimioluminiscencia como es el *Architect* (Abbott) o el de *Vidas Duo Ultra* (Biomerieux). En todos ellos la señal de detección para Ag y Ac es única, excepto para el de *Biomerieux*. El principio de este último en su primera versión (*Vidas Duo*), a diferencia de los otros ensayos de cuarta generación, consistía en un ensayo de segunda generación (no de tercera) al cual se le había sumado la detección de Ag p24. El mismo fue sucedido por la versión *DUO Ultra* que además de ser conceptualmente un ensayo de cuarta generación, posee la característica distintiva por sobre el resto de los equipos de diferenciar la señal producida a expensas de Ag p24 de aquella producida a expensas de los anticuerpos. Todos estos equipos automáticos permiten además la posibilidad de procesar un gran número de muestras. Desde su aparición en el mercado hasta la actualidad estos ensayos en el área de diagnóstico han ido desplazando al ELISA de Ag p24.

Ly y col., en un estudio realizado sobre siete equipos comerciales disponibles en Europa, encuentra que, si bien todos pudieron detectar anticuerpos anti-HIV-1 grupo M (subtipos A hasta G), formas recombinantes circulantes A/E, y HIV-1 grupo O, la sensibilidad analítica varía considerablemente para muestras positivas para HIV-2 y HIV-1 grupo O. En cuanto a la sensibilidad para la detección de Ag p24 cuando dichos ensayos son enfrentados a distintos aislamientos se observan diferencias en el límite inferior de detección que, según el ensayo, está o no asociado a subtipos diferentes. Otra característica muy importante a considerar es la especificidad. Existen publicaciones que sugieren que el uso de un ensayo antígeno-anticuerpo combinado resulta en una disminución de la especificidad. Sin embargo, datos preliminares en Banco de sangre para dos de los equipos comerciales disponibles, sobre más de 2 000 muestras estudiadas, sugerirían una especificidad del 99,85% y del 99,78 % para los dos equipos evaluados.

2.2 OTROS ENSAYOS DE TAMIZAJE

Existen otros ensayos de tamizaje (Tabla 22.4.1), de los cuales la "aglutinación de partículas de gelatina" ha tenido una amplia difusión en todo el mundo y en nuestro medio. El ensayo se encuentra disponible ya sea en forma combinada HIV-1/HIV-2 o como ensayo monoespecífico HIV-1. La aglutinación de partículas de gelatina es frecuentemente empleada debido a la ventaja de no requerir un equipamiento complejo, aunque su tiempo de realización es similar al de un ELISA (2-3 horas). La técnica consiste en partículas de gelatina recubiertas con antígeno viral purificado e inactivado que se ponen en contacto con diluciones del suero del paciente. La presencia de anticuerpos específicos se visualiza a través de una reacción de aglutinación, visible a simple vista.

La sensibilidad durante el período de seroconversión es similar a los ELISAs de tercera generación ya que la aglutinación de partículas detecta anticuerpos de tipo IgG e IgM.

2.2.1 Ensayos Simples / Rápidos

En los últimos años, los ensayos rápidos han adquirido importancia en el diagnóstico de la infección por HIV. Los avances en su desarrollo se deben a la necesidad de disponer de ensayos confiables y accesibles que puedan ser utilizados en laboratorios de muy baja complejidad.

Estos ensayos rápidos están basados en técnicas de "inmunodot", aglutinación, inmunocromatografía, o inmunofiltración, siendo variados los formatos de su presentación. Los antígenos que se usan son proteínas recombinantes y péptidos sintéticos. A diferencia de los ensayos anteriormente mencionados que emplean suero o plasma, la muestra para estos ensayos puede ser sangre entera. Estos

Detección de anticuerpos:

Ensayos de tamizaje o screening

Enzimoimmunoensayos

- Antígenos que contienen
- Lisado de partículas virales completas
- Proteínas recombinantes
- Péptidos sintéticos (antígenos sintetizados químicamente)

• Clase de Inmunoglobulinas que detectan

- | | |
|-----------------|---------------------------------|
| IgG | (Ensayos de 1ª y 2ª generación) |
| IgG, IgM, IgA | (Ensayos de 3ª generación) |
| IgG, IgM, IgA y | |
| Antígeno p24 | (Ensayos de 4ª generación) |

Otros tipos de ensayos

- Aglutinación de partículas de gelatina
- Aglutinación de partículas de látex
- Hemaglutinación
- Inmunoensayos en fase sólida
- Ensayos o "tests" rápidos

Ensayos Suplementarios

Detección de anticuerpos

Western blot

- Inmunofluorescencia
- LIA

Detección de virus o antígenos virales

- Enzimoimmunoensayo (captura de antígeno p24)
- Cultivo o aislamiento viral

Detección de ácidos nucleicos (RNA o DNA)

Para Diagnóstico

- Detección de DNA proviral de HIV en células mononucleares de sangre periférica
- Detección cualitativa plasmática de RNA de HIV

Para Seguimiento de la infección o monitoreo de la terapia antirretroviral

- Carga viral plasmática de HIV

Tabla 22.4.1. Tipo de ensayos para el diagnóstico de la infección por HIV.

métodos son simples y rápidos ya que en 10-40 min. es posible obtener un resultado; no requieren de un equipamiento especial y la lectura es visual. Si bien el operador no necesita ser experimentado, se requiere un mínimo entrenamiento para manejo de la técnica y la interpretación de los resultados. Los equipos pueden ser conservados en un amplio rango de temperaturas (2° C y 30° C).

La utilización de estos ensayos es muy valiosa en situaciones de posible intervención, y quizás una de las más importantes sea la prevención de la transmisión madre-hijo. En la actualidad, en nuestro medio, estos ensayos se utilizan cuando al momento de parto se desconoce el "status serológico" de la paciente, y también en los accidentes laborales para el estudio rápido del paciente fuente. En otros países se ha evaluado su empleo en el testeo voluntario.

En los últimos años se han realizado numerosas publicaciones sobre estos ensayos. Su sensibilidad es del 95,5% al 100%, y su especificidad es del 94,46% al 100%. La "performance" de estos ensayos se acerca a la del algoritmo convencional basado en ELI-



Ensayo	Sensibilidad	Especificidad
<i>Vidas Duo</i>	100%	99,5%
<i>Vidas Duo Ultra</i>	100%	99,5%
<i>Enzygnost HIV integral</i>	100%	99,8%
<i>Cobas core HIV combi</i>	100%	99,73 %
<i>Vironostika Uniform II Ag/Ab</i>	96,7%	99,9%
<i>Murex HIV combination</i>	100%	99,78%
<i>Genscreen Plus</i>	100%	100%

Tabla 22.4.2. Sensibilidad y especificidad de ELISAs de 4ta. generación.

SAs de 3ra. generación y *Western Blot*.

En nuestro país, la sensibilidad y especificidad observada para los equipos de *Capillus* y *Determine* fue similar a la reportada por la OMS y por otros autores. Sin embargo, existe muy poca evidencia sobre la *performance* de estos ensayos frente a la seroconversión. Si bien algunas publicaciones evalúan muestras provenientes de paneles de suero, en general analizan un muy escaso número de muestras. En nuestro país, las recomendaciones subrayan que el estudio a través de ensayos rápidos no excluye el posterior análisis por el algoritmo convencional.

El empleo de tests rápidos ha sido evaluado en otros países, en sitios directos de asesoramiento y testeo voluntario, para lo cual la OMS ha propuesto una serie de algoritmos donde se combinan dos test rápidos diferentes para su uso en serie. Este tipo de algoritmos son extensamente utilizados en la actualidad en Sudáfrica y otros países de África produciendo una mejora en la accesibilidad al diagnóstico. Recientemente se encuentra disponible el primer ensayo o test rápido que simultáneamente detecta y diferencia antígeno p24 de HIV y anticuerpos contra HIV-1/2 (*Determine HIV1/2 Combo, Abbott*), al igual que su predecesor es inmunocromatográfico. Este nuevo ensayo requiere pequeños volúmenes de suero, plasma o sangre entera, y puede utilizar también sangre capilar obtenida de un pinchazo en el dedo (lo cual es rápido, seguro y virtualmente indoloro). Como todo test rápido arroja resultados en 20 minutos, teniendo la ventaja de no necesitar refrigeración para su conservación ni equipamiento tecnológico para su realización. Las evaluaciones realizadas hasta el momento indican que la performance del mismo es similar a los EIE de cuarta generación, la especificidad en el diagnóstico fue del 99,23% para Ac y del 99,66% para el Ag p24. EL ensayo fue capaz de reducir la ventana serológica en 5 días (promedio, rango 2-20) al ser evaluado con paneles de muestras comerciales de seroconversión.

3. ENSAYOS SUPLEMENTARIOS

Los ensayos suplementarios se emplean para confirmar si una muestra que ha sido previamente positiva mediante un ensayo de tamizaje, presenta anticuerpos específicos para HIV y para descartar la posibilidad de falsos positivos. A pesar de que los ensayos de tamizaje actuales han mejorado su especificidad, siendo altamente sensibles, existe un porcentaje mínimo de falsos positivos.

La técnica más utilizada es la *Western blot* (WB) debido a que el uso combinado de un ELISA y un WB positivo tiene un valor predictivo positivo (VPP) superior al 99%. Dicho VPP es superior al del ELISA o del WB por separado. Por ello, una muestra que es ELISA negativa no es estudiada por WB, y sólo aquellas que son reiteradamente reactivas en el ELISA son estudiadas posteriormente por WB.

El principio del WB es un enzimoimmunoensayo en fase

Gen	Producto	Descripción
<i>env</i>	gp160	precursor
	gp120	envoltura externa
	gp41	transmembrana
<i>gag</i>	p55	precursor
	p40	precursor
	p24	core
	p17	matriz
<i>pol</i>	p66	transcriptasa inversa
	p51	transcriptasa inversa
	p32	endonucleasa

Tabla 22.4.3. Identificación por peso molecular de los principales productos de los genes estructurales del HIV-1 en el *Western blot*.

sólida realizado sobre papel de nitrocelulosa en el cual se encuentran inmovilizadas y distribuidas según su peso molecular las distintas proteínas del virus HIV. Esta técnica detecta anticuerpos de clase IgG.

Los criterios de positividad para la interpretación de los resultados del WB son cinco, considerándose como negativo si existe ausencia total de bandas específicas y no específicas, e indeterminado cualquier combinación de bandas que no cumpla con el criterio seleccionado. En nuestro país el criterio recomendado es el del CDC (Atlanta, EE. UU.; Tablas 22.4.3 y 22.4.4).

La sensibilidad y especificidad para el WB es del 100% en muestras de pacientes con infección establecida.

Otros ensayos suplementarios, son los conocidos como ensayos de línea (LIA), desarrollados con posterioridad al WB. El LIA también se trata de un enzimoimmunoensayo en fase sólida, con la diferencia de que contiene proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos del virus HIV seleccionados, no encontrándose representadas todas las proteínas del virus. Estos ensayos pueden detectar anticuerpos específicos anti-HIV-1 y anti-HIV-2 (ej: *InnoLia* y *Pepti-LAV*). La sensibilidad es del 99,3%-100%, y la especificidad del 100%. Estos ensayos tienen, por su diseño antigénico, un menor porcentaje de resultados indeterminados.

Finalmente, la técnica de inmunofluorescencia indirecta fue utilizada en nuestro país durante los primeros años de la epidemia como procedimiento de confirmación. Si bien se desarrolló un equipo diagnóstico en nuestro país, el mismo no se comercializó y con el tiempo cayó en desuso. Su utilización se circunscribió a los laboratorios de referencia que preparaban sus propias improntas, lo que requiere de un equipamiento de bioseguridad para mantener las líneas celulares infectadas con HIV-1.

La técnica presentaba una alta especificidad y sensibilidad, su costo era mucho menor al del WB, pero requería de operadores altamente entrenados en su lectura para diferenciar fluorescencia específica de inespecífica y de rigurosos controles de calidad con el fin de monitorear los lotes de producción para evitar variaciones en la sensibilidad y especificidad.

Brevemente, antes de finalizar con los ensayos de tamizaje y suplementarios sería importante hacer una referencia a otras estrategias serológicas que permiten detectar en forma retrospectiva una infección reciente (inferior a 180 días). Estas estrategias se han basado en la característica de discriminar la baja concentración y avidez de los anticuerpos anti HIV durante la etapa temprana de la infección a diferencia de aquellos de la infección crónica establecida. Dentro de este grupo de ensayos se encuentra el *Detuned*, el índice de avidez y el de *Bed-CEIA*. Algunas de estas técnicas comienzan

Organización	Criterio
ASTPHLD/CDC	Al menos dos de: p24 gp41 gp160/120
Cruz Roja Americana	Al menos tres bandas, una correspondiente a cada uno de los genes: <i>gag + pol + env</i>
Consortio para la Estandarización de Serología de retrovirus	Al menos dos bandas: p24 ó p32 + gp41 ó gp160/120
FDA	p24, p31 y gp41 ó gp120/ gp160
OMS	Al menos dos bandas de envoltura

Tabla 22.4.4. Criterio de positividad para la interpretación del Western Blot. OMS: Organización Mundial de la Salud; FDA: *Food and Drug Administration; Centers for Disease Control and Prevention, EE.UU.*

en la actualidad a estar disponibles en plataformas totalmente automáticas. Estas estrategias han tenido un valor importante a nivel poblacional, permitiendo reclasificar un porcentaje significativo de casos positivos pudiéndose estimar el número de infecciones recientes en distintas poblaciones. Es probable que en un futuro muy cercano se encuentren también incorporados en la práctica clínica.

4. ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

El algoritmo convencional de diagnóstico serológico de HIV-1 contemplaba originalmente un esquema similar al que puede observarse en la Figura 22.4.2, con algunas diferencias que comentaremos. Los ELISA de 1ra., y en menor medida los de 2da. generación presentaban un porcentaje de falsos positivos, por ende, toda muestra reiteradamente reactiva por ELISA era estudiada por WB. Si el resultado obtenido del WB era negativo se consideraba que el resultado obtenido en el tamizaje era un falso positivo. En cambio, si el resultado en el WB era indeterminado se consideraba la posibilidad de estudiar al individuo en un período de 3 meses.

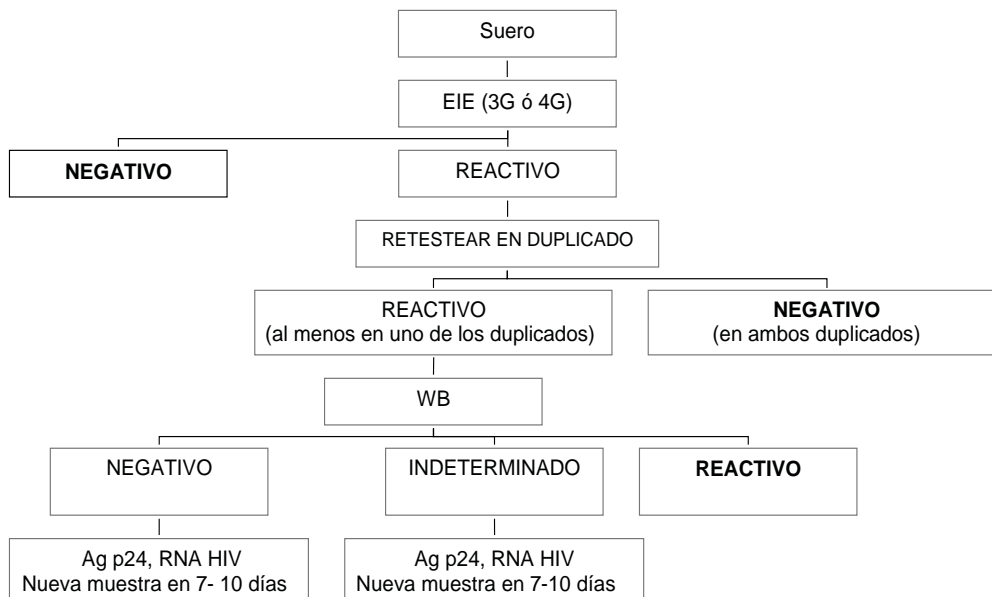


Figura 22.4.2. Algoritmo para el diagnóstico serológico de la infección por HIV-1. Véase la Adenda al final de este capítulo.

Los ensayos de 3ra. generación obligaron a cambiar el criterio de interpretación de ciertos resultados positivos. Es decir, resultados reactivos en ELISAs de 3ra. generación podían ir acompañados de resultados negativos en un ensayo suplementario como el WB ya que la sensibilidad de este último es inferior a la de los ELISAs de tercera porque el WB detecta solamente inmunoglobulina de clase Ig G. De manera que en el marco de estos nuevos ELISAs, estos no podían ser interpretados simplemente como falsos positivos, y resultaba indispensable distinguir entre un falso positivo y un paciente en período de seroconversión. El aumento de la absorbancia en un ELISA en sucesivas muestras del paciente y/o el incremento de bandas (es decir anticuerpos contra distintas proteínas virales) en el WB es lo que permite documentar la seroconversión.

Si en el tamizaje se emplean ELISAs de 4ta. generación, el criterio sigue siendo el mismo con la diferencia que debemos considerar, además, que en estos ensayos la positividad también puede deberse a la presencia de Ag p24. Por ello, en el algoritmo para definir esta situación debemos incluir la detección de Ag p24 o de ácidos nucleicos (RNA de HIV). Recordemos que durante la primoinfección la replicación viral es muy importante deteniéndose altos niveles de viremia. En estos casos es necesario el seguimiento a través de muestras sucesivas cada 7-10 días (Figura 22.4.2).

Por otra parte, es importante mencionar que debido que el alto costo del WB y al porcentaje no despreciable de resultados indeterminados, que pueden originarse en ciertas circunstancias no relacionado con seroconversiones, han motivado el diseño de algoritmos alternativos basados en la combinación de dos o más ensayos de tamizaje, sobre todo para países con limitados recursos. Al momento de diseñar estos algoritmos, es necesario considerar no sólo las sensibilidades y especificidades de los ensayos sino también los valores predictivos positivos y negativos, además de la prevalencia de HIV en la población sobre la cual van a ser empleados. La Figura 22.4.2 muestra el algoritmo para diagnóstico serológico de HIV-1 donde el criterio de positividad del WB recomendado es el del CDC. Finalmente, en aquellas áreas donde existe circulación de HIV-2 o de HIV grupo O, el algoritmo prosigue con el fin de discriminar a ambos tipos virales.

5. ANTÍGENO P24 Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5.1 ANTÍGENO P 24

El ELISA para la detección de antígeno p24 (Ag p24) fue desarrollado hace muchos años. Sin embargo, dada su baja sensibilidad

	<i>bDNA 3.0</i>	<i>AMPLICOR V 1.5</i>		<i>COBAS V 1.5</i>		<i>NucliSENSE</i>
		Standard	Ultra	Standard	Ultra	
Fabricante	<i>Bayer®</i>	<i>Roche®</i>		<i>Roche®</i>		<i>Biomerieux®</i>
Procesamiento	Semi-automatizado	Manual		Automatizado		Manual Semi-automatizado
Tipo de muestra	Plasma	Plasma		Plasma		Plasma, suero, LCR, leche materna, plasma seminal
Anticoagulante	EDTA	ACD o EDTA		ACD o EDTA		ACD, EDTA o heparina
Volumen de muestra	1000 µl	200 µl	500 µl	200 µl	500 µl	20 µl-2000 µl
Gen blanco	<i>pol</i>	<i>gag</i>		<i>gag</i>		<i>gag</i>
Rango dinámico	50-500 000 copias/ml	400-750 000 copias/ml	50-100 000 copias/ml	400-750 000 copias/ml	50-100 000 copias/ml	400-10 000 000 copias/ml
Nº de determinaciones	96 12 controles 84 muestras	4 controles 20 determinaciones		48 6 controles 42 determinaciones		50 determinaciones

Tabla 22.4.5. Características de las distintas técnicas para el dosaje de la carga viral plasmática del HIV-1.

(aproximadamente 30% en pacientes infectados asintomáticos) no resulta útil en el seguimiento de pacientes infectados. Sin embargo, este ensayo es de gran utilidad en el diagnóstico pediátrico y durante la primoinfección por HIV.

En el diagnóstico pediátrico de HIV la detección de Ag p24 ha sido útil debido a las características de la infección en recién nacidos y aún se emplea en la actualidad. El tratamiento previo de la muestra con el fin de disociar los inmunocomplejos se tradujo en un aumento significativo de la sensibilidad (hasta un 60%) en pacientes pediátricos, no así en adultos. Dicho tratamiento puede ser tanto ácido como básico, y permite que los inmunocomplejos antígeno-anticuerpo sean disociados, quedando el antígeno p24 libre para su detección. Se recomienda que todo resultado positivo sea confirmado mediante un ensayo de neutralización, teniendo en cuenta que si bien la disociación de inmunocomplejos aumenta la sensibilidad, también puede generar falsos positivos.

Durante la seroconversión, un pico de viremia precede, en la mayoría de los casos, a la producción de anticuerpos. Por ello, la detección de Ag p24 puede ayudar a diagnosticar pacientes en el período de seroconversión. Se ha documentado que la sensibilidad y la especificidad ascienden a un 88,7% y a un 100%, respectivamente durante la primoinfección. Si bien algunas publicaciones sugieren una sensibilidad menor (aproximadamente 50%) esto depende del equipo comercial empleado y del tiempo y perfil serológico del paciente al momento del estudio.

5.2 DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El empleo de técnicas moleculares para la detección de ácidos nucleicos ya sea RNA o DNA de HIV tiene dos aplicaciones muy definidas:

- 1) **En el seguimiento de la infección o bien en el monitoreo del tratamiento antirretroviral.**
- 2) **En el diagnóstico pediátrico y, en ciertas situaciones para el diagnóstico del adulto como puede ser durante la primoinfección.**

5.3 CUANTIFICACIÓN DE RNA DE HIV EN PLASMA

Se denomina "**carga viral**" a la cantidad de virus presente en un determinado fluido o tejido. La cuantificación de RNA de HIV en

plasma, se denomina "**carga viral plasmática**" y constituye un marcador predictivo en el seguimiento o monitoreo de la terapia antirretroviral. Su valor se expresa en copias de RNA por ml. de plasma y a su vez, este valor en logaritmo en base 10. Se considera un cambio significativo entre dos mediciones a aquel que supere una diferencia de 0,5 log , por ser superiores al error inherente al ensayo.

Existen tres técnicas comerciales y se las clasifica en dos grupos: las que se basan en la amplificación de la señal como es el caso de *bDNA* ("*branched DNA*", *Chiron*) y, las que se basan en la amplificación del genoma viral mediante una PCR cuantitativa (*Amplicor*, *Roche*) o una amplificación isotérmica (*NucliSENS*, *NASBA*, *BioMerieux*) (Tabla 5). Existen diferencias entre ellas en cuanto al requerimiento del volumen de muestra, su preparación y al rango dinámico de cuantificación que presentan. Algunos de estos ensayos presentan mayor versatilidad con otras muestras como el líquido cefalorraquídeo.

Las plataformas anteriormente descritas están siendo en la actualidad reemplazadas por nuevas basadas en amplificación genómica en tiempo real, como es el caso de *Easy Q* (*Biomerieux*), *Cobas TaqMan* (*Roche*) y el *Real Time HIV* (*Abbott*). El principio general de estos ensayos se basa en la amplificación y detección simultánea de una región de una región conservada del genoma de HIV. Estos ensayos tienen un amplio rango de cuantificación (en general entre 40 - 1x10⁷ copias/ml) y el tiempo de reacción se ha visto en horas significativamente reducido. Es de mencionar también, que los procesos de extracción de ácidos nucleicos también ha sido automatizado pudiéndose acoplar al sistema de amplificación y detección. Finalmente es importante remarcar que la diversidad genética puede influir en la cuantificación de RNA de HIV-1, especialmente en aquellos ensayos cuyo principio se basa en la amplificación genómica, habiéndose reportado subcuantificación en pacientes con subtipos no-B.

En cuanto al empleo de los ensayos de carga viral con fines de diagnóstico es importante recordar que los mismos no han sido diseñados para esa aplicación sino para el seguimiento o monitoreo. Durante la primoinfección, en la mayoría de los casos el nivel de RNA de HIV es alto, detectándose a partir de los 10 días de la infección y alcanzando el pico máximo entre los 20 y 30 días. Los ensayos de carga viral han mostrado tener una sensibilidad del 100%, pero una especificidad del 97,4%. La presencia de falsos



- Evaluación de aparición de bandas en WB seriados
- Monitoreo del título de anticuerpos: detección de anticuerpos de tipo IgM e IgA; producción *in vitro* de anticuerpos (IVAP o ELISPOT).
- Detección de antígeno p24 en suero previa disociación de inmunocomplejos
- Co-cultivo de HIV
- Detección de DNA proviral por PCR
- Detección de RNA plasmático.
- Detección de DNA proviral por PCR en tiempo real

Tabla 22.4.6. Técnicas empleadas en niños menores de 18 meses para el diagnóstico pediátrico de infección por HIV.

positivos ha sido reportada usualmente con valores de carga viral iguales o inferiores a las 2 000 copias/ml. De manera que pacientes con síntomas sugestivos de infección primaria por HIV, pero con resultados bajos de RNA de HIV, o relaciones CD4:CD8 normales y serología para HIV persistentemente negativa en el tiempo, deben ser considerados con precaución pudiendo corresponder a eventuales casos falsos positivos.

6. DIAGNÓSTICO PEDIÁTRICO

El diagnóstico de la infección por HIV en niños nacidos de madres infectadas es complejo debido a la presencia de anticuerpos maternos anti-HIV de tipo IgG, los que atraviesan en forma pasiva la placenta y llegan al feto. En todo niño nacido de madre infectada con HIV la presencia de anticuerpos contra el virus indica exposición al virus y no infección como en el caso de adultos. Estos anticuerpos maternos se vuelven indetectables entre los 9 y 10 meses de vida, aunque ocasionalmente pueden perdurar hasta los 18 meses. Por ello, la detección de anticuerpos específicos anti-HIV como herramienta de diagnóstico no es utilizada hasta después de los 18 meses de vida (Tabla 22.4.6). Para realizar un diagnóstico precoz de infección en el recién nacido deben utilizarse otras técnicas.

En las últimas décadas, numerosas estrategias han sido desarrolladas y evaluadas (Tabla 22.4.6), muchas de las cuales ya no se utilizan debido a su baja sensibilidad. Tal es el caso de la detección de anticuerpos de tipo IgA específicos, ya que su sensibilidad podría ser del 100% pero recién a los 6 meses de vida. La detección de anticuerpos de tipo IgM, de gran utilidad en otras infecciones virales perinatales, presenta menos sensibilidad que la detección de IgA para HIV.

La técnica de producción *in vitro* de anticuerpos implica la obtención de células mononucleares de sangre periférica, su mantenimiento en cultivo por un tiempo corto, y su estimulación para la producción de anticuerpos, los cuales posteriormente deben ser evaluados. Este ensayo dejó de utilizarse por ser muy laborioso, y con una sensibilidad muy baja en niños menores de 6 meses.

Por muchos años las técnicas más utilizadas fueron el co-cultivo o aislamiento viral, la detección de DNA proviral en células mononucleares de sangre periférica por PCR y la detección de Ag p24. Es importante recordar que si bien la detección de Ag p24 en suero, previa disociación ácida, aumenta la sensibilidad de esta técnica, la sensibilidad general del ensayo es menor que la de ensayos moleculares de detección de ácidos nucleicos, por lo que un resultado negativo de p24 no descarta la infección por HIV.

El aislamiento de HIV se basa en un co-cultivo de mononucleares de sangre periférica de un dador normal que se estimula previamente con fitohemaglutinina y se cultiva junto a mononucleares del paciente. Los cultivos deben ser mantenidos por 30 días en presencia de IL-2.

El co-cultivo con células del dador normal produce: 1) aumento de la presión de selección; 2) estimulación alogénea, que se traduce en una mayor expresión del receptor de IL-2. De esta manera, al estar las células en un medio de cultivo con IL-2 hay una

estimulación del crecimiento, habiendo mayor síntesis de DNA y por ende mayor replicación viral; 3) disminución del efecto inhibitorio de los linfocitos CD8⁺ por efecto de dilución.

Semanalmente, este cultivo debe ser alimentado con mononucleares de dador normal estimulados con fitohemaglutinina. El monitoreo se realiza a través del dosaje de Ag p24 como medida de la replicación viral. El cultivo es considerado negativo cuando todos los controles semanales son negativos en el ensayo de Ag p24. El cultivo es positivo cuando dos de esos controles consecutivos en el tiempo sean positivos para Ag p24. Una de las desventajas de esta técnica es lo laborioso de la misma, el tiempo de realización, y su limitación a laboratorios preparados en términos de bioseguridad y equipamiento. Su sensibilidad alcanza el 90-100% recién al 3er. mes de vida.

La técnica de PCR para DNA proviral alcanzó un uso generalizado por la rapidez en la obtención de un resultado y por su sensibilidad general, a pesar de que el mayor obstáculo sea el de su sensibilidad durante el primer mes de vida. Los casos positivos detectados dentro de las 72 h. del nacimiento corresponden a niños infectados tempranamente, es decir, es debido a la transmisión en útero. Esta técnica debe ser estandarizada en cada laboratorio, existiendo una variación entre los distintos laboratorios en términos de su eficiencia, a pesar del consenso existente en cuanto a los genes y áreas de los mismos a amplificar.

En la actualidad, la detección en forma cualitativa de RNA de HIV en plasma ha cobrado mayor importancia debido al hecho de que la producción viral inmediatamente posterior a la infección es elevada, tanto en adultos como en recién nacidos, y estos altos niveles de RNA tienden a persistir en los niños no tratados durante los dos primeros años de vida. De esta manera, la detección de RNA permite detectar precozmente la infección, habiéndose reportado una sensibilidad del 100 % dentro del primer mes de vida.

Las recomendaciones en nuestro país establecen un algoritmo que combina básicamente el uso de PCR para DNA proviral, Ag p24 y detección de RNA de HIV. De acuerdo con las normativas del CDC:

- 1) La infección por HIV es confirmada por dos ensayos virológicos positivos obtenidos en dos muestras de sangre distintas y consecutivas.
- 2) Se recomienda que el primer estudio sea realizado entre las 48 h. y los 30 días.
- 3) Para descartar la infección por HIV son necesarios tres resultados de DNA proviral de HIV por PCR, de los cuales el tercero deberá ser realizado después del cuarto mes y habiendo intervalos entre ellos de por lo menos un mes.
- 4) Si el niño ha sido amamantado, el algoritmo deberá ser reevaluado, comenzando un mes después de suspendida la lactancia y hasta los 6 meses de vida.
- 5) La infección por HIV puede ser descartada cuando -además de los estudios anteriormente mencionados- hubiera ausencia de síntomas clínicos por HIV.
- 6) La infección por HIV puede ser excluida definitivamente en niños a partir de los 18 meses de vida ante: a) serología negativa para HIV; b) ausencia de síntomas clínicos de infección por HIV; c) ausencia de hipogammaglobulinemia; d) ausencia de ensayos virológicos positivos.

7. CONCLUSIONES

El desarrollo de nuevas metodologías constituye un avance para el diagnóstico precoz y adecuado de la infección por HIV. El conocimiento de las características, la *performance* y las limitaciones de los distintos ensayos en el contexto de la población en la cual se aplican, incluyendo la prevalencia y la distribución de los diferentes subtipos de HIV, es indispensable a la hora de decidir las estrategias de diagnóstico. Es importante remarcar que todo resultado de laboratorio debe ser analizado siempre dentro del contexto clínico y epidemiológico del individuo que es el sujeto de nuestro estudio.

ADENDUM

Al momento de imprimirse esta 4ta. edición de Virología Médica, se está modificando el algoritmo de diagnóstico para HIV con el objeto de mejorar la sensibilidad de la detección de la infección durante el período de ventana (altamente contagioso). En diciembre de 2012 la Conferencia Nacional de HIV de EE.UU. recomendó que -además del recientemente implementado test inicial para detección simultánea de antígeno de HIV y anticuerpos específicos (test de 4ta. generación o combo IA)- los resultados reactivos deben ser confirmados con un test que detecte y diferencie la presencia de anticuerpos anti-HIV-1 y anti-HIV-2. Los resultados reactivos con este test suplementario confirman la presencia de anticuerpos específicos. Si el combo IA de tamizaje es reactivo y el test suplementario de anticuerpos es no reactivo o indeterminado, se recomienda

la detección de RNA viral para confirmar la infección, aun en ausencia de anticuerpos detectables durante esta fase aguda temprana de la misma. En 2013, se elaboró en Argentina una propuesta sobre nuevos algoritmos de diagnóstico del HIV (Bouzas *et al*, 2013) re-frendada por la Dirección de Sida y ETS del Ministerio de Salud de la Nación y la Organización Panamericana de la Salud. Entre los diversos algoritmos consignados, la propuesta propugna que -en los laboratorios clínicos- a los individuos que exhiben un enzimoimmunoensayo de 4ta. generación reactivo para HIV-1, se les realice el estudio de la carga viral del HIV-1. La positividad de ambas pruebas de laboratorio confirmará el diagnóstico, mientras que una carga viral indetectable, requerirá del estudio de los anticuerpos anti-HIV-1 por *Western blot*. Los algoritmos propuestos están disponibles en el sitio web http://www.msal.gov.ar/sida/images/stories/5-comunicacion/pdf/2013-11_algoritmos-diagnosticos-vih.pdf.

Bibliografía

- Benjamin DK Jr, Miller WC, Fiscus SA, Benjamin DK, Morse M, Valentine M, *et al*. "Rational testing of the HIV-exposed infant". *Pediatrics* 2001;108: E3.
- Brust S, Duttman H, Feldner J, Gürtler L, Thorstenson R, Simon F. "Shortening of the diagnostic window with the new combined HIV p24 antigen and anti-HIV-1/2/O screening test". *J Virol Methods* 2000;90:153-65.
- Daar ES, Little S, Pitt J, Santangelo J, Ho P, Harawa N, *et al*. "Diagnosis of primary HIV infection. Los Angeles County primary HIV recruitment network". *Ann Intern Med* 2001;134:25-29.
- Gallarda JL, Henrard DR, Liu D, Harrington S, Stramer SL, Valinsky JE, *et al*. "Early detection of antibody to human immunodeficiency virus type 1 by using an antigen conjugate immunoassay correlates with the presence of immunoglobulin M antibody". *J Clin Microbiol* 1992;30:2379-84.
- George JR, Schochetman G. "Detection of HIV infection using serologic techniques". En: George JR, Schochetman G, editores. AIDS TESTING. 2nd Edition, Springer-Verlag, New York, 1994, p. 92-102.
- "Global Programme on AIDS (World Health Organization). "Operational characteristics of commercially available assays to determine antibodies to HIV-1 and HIV-2". *WHO/BTS/99.1; UNAIDS/99.5*. Report 11, Jan 1999.
- Haley N, Reed BS. "HIV infection in children". En: George JR, Schochetman G, editores. AIDS TESTING. 2nd Edition, Springer-Verlag, New York, 1994, p. 266-83.
- Loschen S, Batzing-Feigenbaum J, Poggensee G, Cordes C, Hintsche B, Rausch M, *et al*. "Comparison of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 specific immunoglobulin G capture enzyme-linked immunosorbent assay and the avidity index method for identification of recent HIV infections". *J Clin Microbiol* 2008; 46: 341-5.
- "Interpretation and use of the Western blot for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1". *MMWR* 1989;38:1-7.
- Ly TD, Martin L, Daghfal D, Sandridge A, West D, Bristow R, *et al*. "Seven human immunodeficiency virus (HIV) antigen-antibody combination assays: Evaluation of HIV seroconversion, sensitivity and subtype detection". *J Clin Microbiol* 2001;39:3122-8.
- Saville RD, Constantine NT, Cleghorn FR, Jack N, Bartholomew C, Edwards J, *et al*. "Fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody". *J Clin Microbiol* 2001;39:2518-24.
- Secretaría de Salud, GCBA. "Recomendaciones para la prevención de la transmisión vertical". Actualizaciones 2004.
- WHO.INT/diagnostics_laboratory/Report 16. 2009.HIV Assays: Operational Characteristics.
- World Health Organization. "HIV simple/rapid assays: operational characteristics (Phase I)". WHO/BCT/02.07 Report 12. Jan 2002.
- Zapiola I, Baiges D, Lehman E, Luque L, Cañizal A.M, Gomez N *et al*. "Diferencias en el patrón de *western blot* y en los valores de CD4 entre seroconvertidores recientes y pacientes con status serológico indeterminado para HIV". *Actualizaciones en SIDA*, 2005; 50: 130-5.

Transmisión Madre-Hijo del HIV

Guillermina Dolcini - Liliana Martínez Peralta

1. INTRODUCCIÓN

La transmisión madre-hijo (TMH) es el origen de la infección en más del 90% de los casos de infección en los niños de menos de 15 años, y su prevención es una de las principales prioridades mundiales de intervención en el campo del HIV/SIDA.

Según un informe de 2009 de la Organización de las Naciones Unidas para el SIDA, la epidemia afecta hoy a 2,1 millones de niños; durante el año 2008, 280 000 niños murieron de SIDA y entre los 2,7 millones de nuevos casos de infección por el HIV-1, 430 000 fueron casos infantiles. Más del 90% de estos niños viven en África subsahariana donde la prevalencia de HIV es muy alta en mujeres gestantes (de 7 a 30%). Estos altos niveles de infección no se ven en el resto del mundo pero pueden ser asimismo preocupantes. La epidemia está afectando a un número creciente de mujeres jóvenes.

En América Latina durante los años 90, la relación entre varones y mujeres infectados con HIV se ha estrechado considerablemente, detectándose relaciones de 3:1 en América Latina y 2:1 en el Caribe. Es evidente que la infección está en aumento entre mujeres de América Central y entre las poblaciones indígenas. La prevalencia de infección varía mucho de una región a otra, pero es más elevada en Centroamérica y el Caribe donde la vía heterosexual es el principal mecanismo de transmisión. En 12 de estos países la prevalencia de infección en mujeres embarazadas es superior al 1%. En los países del Cono Sur (Argentina, Chile, Paraguay y Uruguay) los casos de SIDA perinatal notificados alcanzan el 7% del total acumulado (período 1983-2003), siendo el porcentaje mayor con respecto a todas las regiones de América. En Argentina, si bien no se dispone de datos sistematizados en todas las jurisdicciones, el análisis de los datos aportados por algunas de ellas muestra una tasa de TMH de 6,18% en el período 2006-2008. Del total de notificaciones durante 2008, 2,78% de los nuevos diagnósticos de HIV fueron debidos a TMH.

2. EMBARAZO Y PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR HIV

Se han realizado numerosos estudios de seguimiento con el objeto de observar y caracterizar la relación entre el embarazo y la progresión de la infección por HIV en mujeres. Las alteraciones transitorias en el número de linfocitos CD4/CD8 y de los niveles circulantes de inmunoglobulinas, descriptas en la mujer embarazada, dieron sustento a la hipótesis de una asociación morbida. Si se consideran los resultados de los estudios que involucraron un alto número de pacientes en forma controlada, puede concluirse que las mujeres embarazadas con HIV presentan una curva de recuperación más lenta de sus cifras basales de CD4/CD8, sin que se haya demostrado aún un riesgo aumentado de progresión de la infección. Se han observado efectos leves en la progresión de la infección en embarazadas asintomáticas o en etapas tempranas de la infección, pero una progresión más rápida en embarazadas que cursan etapas tardías de la infección por HIV.

3. MODOS DE TMH Y FACTORES DE RIESGO

La TMH del HIV puede ocurrir durante el embarazo (intrauterina), durante el parto (intraparto) o posterior al parto a través de la lactancia materna (postparto).

Sin considerar la lactancia materna, la transmisión intrauterina representa un 25-40% de las infecciones y un 60-75% de la transmisión ocurre durante el trabajo de parto y el parto. Entre las mujeres que amamantan, estos porcentajes disminuyen al 20-25% la intrauterina y 60-70% la intraparto por el factor lactancia materna que se calcula en un 10-15%.

Si bien se ha demostrado la presencia de antígenos del HIV en diferentes órganos fetales de 8-15 semanas de vida, la frecuencia de esta infección temprana durante el embarazo es relativamente baja y se calcula que dos tercios de los niños se contagian el día del parto. La transmisión intraparto puede ocurrir ya sea durante el trabajo de parto o el parto a través de intercambio materno-fetal de sangre u otras secreciones maternas. Evidencias indirectas de la importancia de la transmisión intraparto se obtuvieron por estudios en mellizos, mostrando que el primer bebé que nace tiene el doble de riesgo de contraer la infección que el segundo mellizo ya que éste que tiene menos contacto con los líquidos maternos.

La mayoría de las infecciones transmitidas por la lactancia materna probablemente ocurran durante las primeras semanas a meses de vida del niño, aunque cuanto más prolongada es la lactancia, mayor es el riesgo de transmisión del HIV. Los factores de riesgo durante la lactancia materna incluyen: una elevada carga viral en sangre y leche materna, la mastitis clínica o subclínica, los abscesos mamarios y la primoinfección materna durante la lactancia. Se ha observado que podría existir un riesgo mayor en aquellos niños alimentados con esquemas mixtos (biberón y pecho) que en aquellos alimentados exclusivamente con leche materna. En el tracto gastrointestinal del recién nacido hay una menor acidez, mucus y actividad de Ig A, así como una mucosa más delgada, todo lo cual favorecería la penetración viral.

Varios factores determinan el riesgo de TMH del HIV. Una alta carga viral, tanto a nivel sistémico (plasmática) como local (en secreciones cérvico-vaginales y en leche), y un bajo recuento de células T-CD4⁺ circulantes en la madre son factores de riesgo independientes para dicha transmisión. Otros factores de riesgo independientes asociados con TMH son el modo de nacimiento (parto natural o por cesárea), el estado clínico de la madre (si está en la etapa de SIDA o no) y el tiempo de gestación del neonato. Sin embargo, estos factores no se pueden utilizar como factores predictivos absolutos, si bien indican una tendencia.

Los factores obstétricos también actúan sobre la transmisión del HIV. El riesgo de transmisión perinatal aumenta por hora de duración de la ruptura de membranas si otros factores de riesgo están controlados. El parto producido más allá de 4 horas después de la ruptura de membranas fetales puede llevar al doble el riesgo de transmisión del HIV, probablemente debido al mayor tiempo de exposición del niño a los fluidos infectados de la madre.

La infección materna con otra enfermedad de transmisión sexual (sífilis, vaginosis bacteriana, candidiasis, gonorrea, clamidias, tricomoniasis o herpes simplex) durante el embarazo así como procedimientos obstétricos invasivos (uso de fórceps) puede también aumentar el riesgo. La corioamnionitis ha sido asociada con un mayor riesgo de transmisión del HIV al niño y su tratamiento antimicrobiano preventivo, así como también el de las infecciones de transmisión sexual, disminuye este riesgo.

Los factores del neonato predisponentes para la TMH del HIV son: menor peso al nacimiento, el nacimiento prematuro y el estado nutricional e inmunitario.

Con respecto a las características de los virus transmitidos, se ha demostrado una selección de variantes virales genotípicas que se transmiten de madre a hijo. Desde el punto de vista fenotípico, los virus que utilizan el correceptor CCR5 son preferentemente transmitidos; aparentemente, la TMH de virus que utilizan CXCR4 como correceptor es menos eficiente aunque ha sido documentada. Además, se ha demostrado que puede ocurrir la TMH de virus multitrópicos.

4. PUERTAS DE ENTRADA Y PREVENCIÓN

Una puerta de entrada importante para el HIV en el niño es ciertamente la superficie de la mucosa. El feto y el bebé luego ingieren gran volumen de fluidos contaminados, tales como líquido amniótico, secreciones vaginales, sangre y leche. Los linfocitos T, así como los macrófagos contenidos en la leche materna pueden adherirse y cruzar la mucosa intestinal. Asimismo, se ha demostrado el transporte selectivo de virus por transcitosis en enterocitos y células M del intestino a través de la unión con galactosil ceramida, y se postula el posible transporte por células dendríticas a través de las uniones de los enterocitos.

Otra puerta de entrada es posiblemente la placenta. Las posibles rutas de infección *in utero* incluyen el pasaje de virus o células infectadas de la circulación materna a la circulación fetal por pequeñas lesiones en la placenta (más frecuentemente al final del embarazo) y la infección progresiva de las distintas subpoblaciones celulares placentarias hasta la sangre fetal. Estas subpoblaciones tienen diferente susceptibilidad a la infección por el HIV pero, en general, la placenta con su microambiente placentario constituyen una barrera natural muy efectiva contra el virus ya que la tasa de transmisión *in utero* temprana es muy baja. La alteración de este microambiente, por ejemplo con otras infecciones, puede modificar la tasa de TMH del HIV.

La prevención de la TMH del HIV incluye como medida fundamental la prevención de la infección en jóvenes de ambos sexos. En el siguiente nivel de prevención encontramos el diagnóstico universal de la embarazada que, aun en países desarrollados, presenta problemas para realizarse en un 100% de los casos. Así, el diagnóstico tardío en la embarazada y la consiguiente ausencia de profilaxis prenatal aparecen como determinantes de la falta de disminución de la TMH del HIV.

En 1994, se demostró la eficacia del AZT en monoterapia sobre la disminución de la TMH del HIV. Luego de más de una década, se han hecho progresos considerables para la prevención de la TMH. Actualmente, una combinación de medidas obstétricas, nutricionales y médicas, y la instauración de la profilaxis antirretroviral (ARV) permiten reducir significativamente dicha transmisión.

Varios protocolos con una serie de drogas antirretrovirales (ARV) han demostrado su eficacia en la reducción de la TMH en diferentes grados: desde 38-50% de reducción cuando se administran tratamientos cortos durante las últimas semanas del embarazo y durante el parto, y hasta 98-100% con tratamientos largos a partir de la semana 14 de embarazo.

A partir del éxito de esos primeros protocolos, se suscitaron múltiples estudios tendientes principalmente a disminuir la carga viral plasmática en la madre, desde monodrogas hasta la terapia antirretroviral de alta eficiencia (HAART). Dichas estrategias fueron adaptadas a distintos escenarios regionales, principalmente en lo que respecta al nivel de ingresos de las poblaciones y a la estructura del sistema de salud. En varias regiones se ha puesto especial énfasis en la adaptación de protocolos preventivos de corta duración utilizando una o dos drogas ARV. Por otro lado, la administración de HAART a las mujeres embarazadas con serología positiva para el HIV-1 se ha ido generalizando progresivamente en varios países de Europa y América principalmente. A nivel mundial, el porcentaje de esas mujeres que recibieron tratamiento preventivo de la TMH se incrementó del 35% en 2007 al 45% en 2008. Pese a este progreso, el acceso al tratamiento no es equitativo en todas las regiones: en 2008, sólo recibía tratamiento el 38% de los niños que

La infección por HIV se establece:

En niños menores de 18 meses de edad:

- Con dos resultados positivos de PCR y/o aislamiento de virus y/o antigenemia p24 en dos muestras diferentes; o
- Enfermedad atribuible al HIV.

En niños mayores de 18 meses de edad:

- Con serología positiva por ensayos de tamizaje confirmados por *Western blot* (o sea por los mismos criterios que para el adulto); o
- Con alguno de los criterios mencionados para los niños menores de 18 meses.

La no infección por HIV (serorreversión) se establece:

- Después de una serología positiva, con la pérdida de anticuerpos en dos muestras consecutivas (ELISA) entre los 6 y los 18 meses de edad,
- Que no presenten síntomas atribuibles a la infección por HIV y
- Que no presenten dos resultados positivos por PCR y/o aislamiento de virus y/o antigenemia p24.

Tabla 22.5.1. Criterios para establecer la infección por HIV.

lo necesitaban en países de ingresos bajos y medianos. propuestas alternativas en la prevención de la TMH del HIV.

5. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN PEDIÁTRICA

Para realizar el diagnóstico de infección por HIV durante los primeros 12 meses de vida es necesario demostrar la presencia del virus en sangre por cualquiera de los ensayos utilizados para el período ventana: detección del genoma viral por PCR, aislamiento viral en cultivo con linfocitos, y/o detección del antígeno p24 por ELISA.

Debido a que las IgG maternas atraviesan la placenta y persisten en la sangre del niño en promedio hasta los 12 meses de vida (con extremos poco frecuentes de 6-22) no es posible utilizar los ensayos serológicos de detección de IgG, que son empleados en el adulto.

Otra posibilidad es demostrar la presencia de IgA específica en suero, dado que la IgA materna no atraviesa la placenta y alcanza su mayor sensibilidad a partir de los 6 meses de vida del niño. Las pruebas para detectar IgM específica no se utilizan por su escasa sensibilidad.

La prueba preferida por su alta sensibilidad y especificidad es la PCR. Se debe prestar atención a utilizar los cebadores (*primers*) correctos para detectar las posibles variantes virales circulantes en la población. La detección de antígeno p24 es más económica, pero presenta una menor sensibilidad.

El diagnóstico de infección por HIV en un niño nacido de una madre infectada se determina con los criterios propuestos por el CDC y detallados en la Tabla 22.5.1.

No hay pruebas fehacientes de que exista en los niños nacidos de madre infectada por HIV la llamada "infección transitoria", es decir niños que con detección temprana de virus, éste luego desaparezca.

El esquema que se recomienda para el diagnóstico pediátrico incluye:

- 1 muestra de sangre con EDTA desde la primera semana de vida para PCR, aislamiento o detección de antígeno.

- 1 muestra de sangre con EDTA posterior al primer mes del niño una vez terminado el tratamiento preventivo con ARV.
- Para mayor seguridad, se puede realizar una tercera muestra en el 3er. mes de vida.
- Si se obtienen dos resultados positivos, se indica la carga viral para evaluar tratamiento. En el caso de resultados discordantes, se realiza un tercer estudio y seguimiento posterior.

Si estas dos o tres muestras tempranas dan resultados negativos, es altamente probable que el niño no esté infectado, sin embargo, se debe realizar un seguimiento posterior (pasados los 10-12 meses) para demostrar la ausencia de los anticuerpos maternos por cualquier técnica de tamizaje. Aún luego de desaparecidos los anticuerpos, se debe realizar un acotado seguimiento clínico durante los primeros años de vida.

Bibliografía

- "AIDS epidemic update", 2009. Disponible en <http://www.unaids.org>.
- "Boletín sobre el VIH-sida en la Argentina". Noviembre 2009. Disponible en <http://www.msal.gov.ar/sida/boletines.asp>.
- CDC. "Revised Guidelines for HIV Counseling, Testing, and Referral" y "Revised Recommendations for HIV Screening of Pregnant Women". November 9, 2001/50(RR19); 1-58 y 59-86. Disponibles en <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5019a1.htm> y <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5019a2.htm>.
- Coutsooudis A, Pillay K, Kuhn L, Spooner E, Tsai W, Coovadia H. "Method of feeding and transmission of HIV-1 from mothers to children by 15 months of age: prospective cohort study from Durban, South Africa". *AIDS* 2001;15:379-87.
- Dolcini G. "Factores virales de riesgo para la transmisión madre-hijo del VIH-1". Actualizaciones en SIDA 2009; 17(66):123-128.
- Menu E, Scarlatti G, Barré Sinoussi F, Gray G, Bollinger B, Ioannidis JP, *et al.* "Mother-to-child transmission of HIV: developing integration of healthcare programs with clinical, social and basic research studies". Report of the International Workshop held at the Chobe Marina Lodge, Kasane, Botswana, 21-25 January 2003. *Acta Paediatr* 2003;92:1343-8.
- Mofenson L, McIntyre J. "Advances and research directions in the prevention of mother-to-child HIV-1 transmission" *Lancet* 2000;355:2237-44.
- ONUSIDA-OPS. "Vigilancia del SIDA en las Américas, 2004". Disponible en <http://www.unaids.org>.
- Scarlatti G. "Mother-to-child transmission of HIV-1: advances and controversies of the twentieth centuries". *AIDS Rev.* 2004;6:67-78.
- Thorne C, Newell M and European Collaborative Study. "Pregnancy outcome in ART-treated HIV-infected women in Europe". In: 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, 2004.
- WHO/UNAIDS. "HIV in pregnancy: a review, 1998". Disponible en <http://www.unaids.org>.

Vacunas para el HIV/SIDA

Liliana Martínez Peralta

1. DIFICULTADES PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA PREVENTIVA

La infección natural con el HIV no resulta en la eliminación total del virus por el sistema inmune y en el desarrollo de inmunidad natural a la reinfección. A pesar de respuestas sostenidas tanto humorales como celulares, el HIV es capaz de resistir la erradicación y continúa eliminando células T-CD4⁺, lo que eventualmente lleva a la progresión clínica al SIDA. Además, existen evidencias de que puede ocurrir sobreinfección con un segundo virus en personas ya infectadas, llevando a la aparición de variantes recombinantes y generando así una mayor diversidad viral.

Por otro lado, el HIV se integra como un provirus latente en el genoma de células de memoria de larga vida, lo que provee un reservorio del virus que escapa a la vigilancia inmune. Se ha calculado que llevaría 60 años erradicar un reservorio tan pequeño como de 10⁵ células infectadas en forma latente. La mejor oportunidad para una vacuna efectiva de HIV estaría limitada entonces, a los estadios más tempranos de la infección, antes de que el virus pueda invadir los órganos linfoides de los tejidos mucosos.

Hay que considerar, además, que el HIV ha desarrollado mecanismos múltiples para escapar a las respuestas inmunes del hospedador incluyendo su habilidad para inhibir la presentación del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I para así disminuir el reconocimiento antigénico por los linfocitos T citotóxicos (CTL). La gran variabilidad genética y evolución del virus le permite evadir la respuesta inmune a través de la emergencia de variantes de escape a los anticuerpos neutralizantes y a los CTL.

Otra dificultad para el desarrollo de una vacuna efectiva es el hecho de que la glicoproteína de la envoltura del virus esconde sus sitios de unión a receptor y correceptor bien conservados en criptas enmascaradas por las zonas hipervariables de la molécula y por residuos glicanos, que son variables. Los anticuerpos neutralizantes inducidos en respuesta a la gp120 son primariamente dirigidos al sitio de unión al receptor CD4, pero está altamente enmascarado. En los primeros ensayos clínicos de fase III de vacunas para el SIDA, se ha demostrado que las vacunas a gp120 monoméricas no fueron capaces de inducir una respuesta de anticuerpos eficaz.

El papel protector de los anticuerpos en los humanos infectados todavía es circunstancial. La mejor prueba del papel de la neutralización *in vivo* es la rápida y constante generación de variantes de escape a los anticuerpos durante el curso de la infección. Las cepas aisladas *in vivo* que usan CCR5 como correceptor son difíciles de neutralizar, lo que pone en duda la posibilidad de lograr proteger con una vacuna que induzca sólo anticuerpos.

Dados estos problemas, las estrategias de vacunas más recientes se han basado en la inducción de respuestas celulares. La evidencia para el rol de los CD8⁺ en el control de la replicación viral incluye: a) la correlación temporal entre la aparición de estas células y el descenso de la viremia primaria; b) la rápida aparición de mutantes de escape durante la infección primaria; c) el hecho de que varios alelos HLA clase I (HLA-B57, HLA B-27, HLA B-63) estén asociados con progresión lenta; y d) el rápido aumento de carga viral en macacos infectados con SIV (*simian immunodeficiency virus*) luego de la depleción experimental de CD8⁺.

La inducción de una respuesta celular contra el HIV, especialmente en CD8⁺, a pesar de no ser capaz de producir inmunidad esterilizante y protección contra la infección, debería poder capacitar a los vacunados a controlar la replicación viral, reducir la carga viral, retrasar la progresión a la enfermedad y reducir la transmisión secundaria del virus.

2. VACUNAS ATENUADAS

La observación de que mutantes con delección en el gen *nef* de SIV podían conferir protección contra el desafío con SIV patógeno en macacos, sirvió como modelo a favor de una estrategia de vacunas atenuadas. Sin embargo, la mutante SIV Δ *nef* establece una infección persistente de por vida, con muy baja replicación y no protege a los animales contra la sobreinfección con virus salvaje, a pesar de que protege a los animales para el desarrollo de SIDA. SIV Δ *nef* puede también causar SIDA, sobre todo administrado oralmente a monos infantes. Las delecciones o mutaciones adicionales del virus pueden resultar en mayor atenuación pero a expensas de su eficacia protectora. Dadas las preocupaciones sobre la seguridad de esta vacuna no se ha proseguido su desarrollo para uso humano, sin embargo se está estudiando la naturaleza de su acción protectora en el modelo del simio.

3. VACUNAS INACTIVADAS

La dificultad de inactivar HIV-1 con formol sin destruir o perder la antigenicidad ha hecho muy dificultoso el desarrollo de vacunas inactivadas con virus completo. El obstáculo se evitó usando dosis subletales de formol seguidas de inactivación por calor a 62° C. Con la preparación de virus resultante se pudo inducir en ratones y primates no humanos títulos modestos pero significativos de anticuerpos, capaces de neutralizar aislamientos heterólogos de HIV en una variedad de ensayos.

Otra forma de inactivar la infectividad de HIV o SIV ha sido atacar los dos dominios *zinc-finger* de las proteínas de nucleocápside, que son esenciales para la infectividad del virus. Estos complejos pueden romperse con una oxidación leve -que deja la estructura de las glicoproteínas totalmente funcional- inactivando la infectividad. En macacos esta vacuna no protegió contra la infección pero hizo descender la viremia luego del desafío y se demostró menor descenso de los CD4.

4. PARTICULAS VIRUS-SÍMIL

Las proteínas Gag y Env de HIV cuando se coexpresan en células, por ejemplo, usando un sistema de expresión de virus vaccinia o baculovirus, forman espontáneamente partículas virus-símil (PVS) que sólo contienen esas proteínas virales. Las PVS han sido testeadas como inmunógenos en primates no humanos ya sea con recombinantes de vaccinia o por la vía nasal utilizando la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) como adyuvante.

También se han utilizado PVS heterólogos como vehículo para entregar genes virales. La expresión de las proteínas estructurales del virus Kunjin (un arbovirus) fueron utilizadas para preparar PVS y encapsidar replicones de RNA recombinantes codificando el gen *gag* de HIV-1.

5. VACUNAS A SUBUNIDADES

5.1. BASADAS EN ENVOLTURA

Los ensayos iniciales de vacunas basadas en subunidades de envoltura demostraron que la gp120 ó gp140 (gp120 prolongada con el ectodominio de gp41) fueron bien toleradas e indujeron anticuerpos neutralizantes a la cepa vacunante homóloga, pero no a aislamientos primarios heterólogos.

Otras estrategias de vacunas a subunidades apuntando a despertar la respuesta neutralizante están en un estadio clínico de evaluación. Estos incluyen moléculas triméricas de gp140 estabilizadas por la adición de dominios C-terminales del ectodominio de gp41, y trímeros similares en los que la gp120 fue deletada en el *loop* V2, para exponer los epítopes de neutralización que se superponen con el sitio de unión del CD4.

También se han desarrollado trímeros de gp140 estabilizados internamente por un vínculo disulfuro entre gp120 y gp41 (SOS gp140), con la expectativa de inducir anticuerpos neutralizantes y bloqueadores de fusión.

Se ha reconocido que la extremada variabilidad del HIV y su continua evolución en el tiempo aún en cada individuo, así como entre distintos grupos de poblaciones y de regiones geográficas, representa un desafío mayor para el desarrollo de vacunas capaces de inducir una respuesta amplia de anticuerpos neutralizantes contra las cepas más prevalentes.

Para responder a este desafío se están explorando diversas estrategias tales como: a) el uso de *cocktails* de inmunógenos de envoltura derivados de las cepas más prevalentes a nivel mundial; b) el uso de DNA multivalente; c) vacunas a vectores incorporando genes de varias cepas, así como combinaciones de vacunas de vectores como primera vacuna seguidas de vacunación con una vacuna a subunidades recombinante como refuerzo; d) se ha intentado desarrollar genes sintéticos derivados de secuencias de envoltura de un consenso o ancestro de HIV definido teóricamente, que se han expresado en forma inmunogénica.

5.2. VACUNA A SUBUNIDADES DE PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

La esperanza de que, respuestas inmunes dirigidas contra antígenos que se expresan muy temprano en el ciclo vital del virus puedan llevar a la eliminación de células infectadas, ha estimulado el desarrollo de vacunas a subunidades basadas en el transactivador Tat. La combinación de la proteína de fusión Tat-Nef se está probando en humanos con resultados prometedores.

6. VACUNAS A DNA Y VECTORES VACUNALES

Se ha demostrado que las vacunas a DNA son muy útiles como **primera dosis (priming)** en estrategias de **primera dosis-refuerzo (prime-boost)**, usando vacunas recombinantes como refuerzo. Las vacunas a DNA se han mejorado añadiendo a genes virales la co-expresión de citoquinas como IL-12 o IL-15.

Las primeras vacunas a vectores desarrolladas estuvieron basadas en el virus vaccinia. Las preocupaciones por la seguridad de esta vacuna motivaron la búsqueda de otros vectores como la vacuna de vaccinia modificada Ankara (MVA), poxvirus de aves como *fowl pox* (FPV), *canarypox*; así como adenovirus 5, defectuoso para la replicación. Este último vector ha dado los mejores resultados en respuestas celulares. El único problema es la inmunidad previamente existente en la población contra este vector, lo que ha motivado el desarrollo de vacunas utilizando otros adenovirus menos prevalentes, así como adenovirus de chimpancé no replicativos.

La lista de los vectores probados incluye el virus de sarampión, virus de la estomatitis vesicular (VSV), Sendai, virus adenoasociados, el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), rinovirus, cepas atenuadas de la vacuna Sabin, la vacuna BCG, y ciertas cepas de *Salmonella*.

7. EL DESARROLLO DE LAS COMBINACIONES PRIMERA VACUNA-REFUERZO

La experiencia ganada con la primera generación de candidatas de vacunas para HIV ha sido que muchas eran sólo moderadamente inmunogénicas y que sólo inducen respuestas de vida corta. Una de las estrategias para aumentar la inmunogenicidad ha sido combinar estas vacunas en un régimen de primera vacuna-refuerzo.

Los regímenes que se han probado o se están probando son:

Primera Vacuna	Refuerzo	
DNA	Vectores	o dos vectores diferentes
Vector adenovirus	Vector poxvirus	o dos vectores de adenovirus
Adenovirus 11	Adenovirus 35 o dos poxvirus sucesivos	o dos poxvirus sucesivos
MVA*	FPV**	

* Vacuna de vaccinia modificada Ankara; ** *Fowl poxvirus*.

8. PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y PÉPTIDOS

Las combinaciones multi-epitópicas de péptidos, péptidos de fusión y largos lipopéptidos están en fase de desarrollo, ya sea solos o en combinaciones de primera vacuna-refuerzo con vacunas de vectores. Las construcciones de vacunas que expresan una serie de epítopes mínimos dispuestos en una cadena han sido exploradas para generar respuestas CTL y superar los problemas de las jerarquías de epítopes. Los inmunógenos de DNA a multi-epítopes pueden oficial de primera vacuna eficiente para respuestas CTL ampliamente reactivas, pero tienen el problema de las jerarquías de dominancia de epítopes.

Se ha demostrado que los lipopéptidos sintéticos que contienen epítopes restringidos por CMH clase I inducían fuertes respuestas de células T CD8⁺ específicas en ratones, primates no humanos y humanos sin adyuvantes adicionales. Los lipopéptidos con secuencias correspondientes a aquellas regiones de las proteínas Gag y Nef de HIV-1 fueron probadas en Fase I y despertaron respuestas de células T-CD4⁺ y CD8⁺ fuertes y multi-epitópicas. Los ensayos Fase II que se comenzaron paralelamente en Estados Unidos y en Francia debieron ser interrumpidos por la aparición de un efecto secundario neurológico en uno de los voluntarios en Estados Unidos y sólo se concluyeron en Francia.

9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La historia de la pandemia por HIV entró ahora en su tercera década. Se han realizado progresos impresionantes en la comprensión de la interacción entre HIV y el sistema inmune del hospedero que llevaron al desarrollo de muy potentes drogas antirretrovirales capaces de controlar la replicación viral. Sin embargo, muchas preguntas básicas que tienen que ver con la factibilidad de desarrollar una vacuna de HIV todavía permanecen sin respuesta, incluyendo:

- Identificación de los mecanismos inmunes de protección
- Alta variabilidad viral
- Habilidad del virus para evadir la respuesta inmune
- Capacidad para despertar respuesta de anticuerpos con una amplia reactividad contra aislamientos primarios.

La experiencia con las vacunas en uso en la actualidad sugiere que una vacuna o esquema vacunal efectivo contra la infección

por HIV probablemente tenga que desarrollar ambas respuestas: anticuerpos neutralizantes y CTL.

Una de las maneras de aumentar la respuesta al HIV sería colaborar con la presentación de los antígenos virales por parte de las células presentadoras, especialmente las células dendríticas (CD). La asociación del antígeno de elección a anticuerpos monoclonales específicos de CD ha dado resultados destacables en modelos experimentales en ratones, aumentando la eficiencia y cinética de la respuesta inmune, comparado a los antígenos solubles. Esta estrategia se está estudiando en primates no humanos.

Otro elemento de la respuesta inmune que todavía no ha recibido mucha atención son las células efectoras T-CD4⁺, que parecen tener un papel crítico en la protección de la vacuna viva atenuada SIV Δ *nef* en macacos, y que también fueron implicados como marcadores de protección en progresores lentos para el SIDA (LTNPs).

Asimismo, parece ser de suma importancia el desarrollo de vacunas para HIV que estimulen el sistema inmune de las mucosas para bloquear la principal puerta de entrada del virus.

Los principales blancos del virus son las células T CD4⁺CCR5⁺ de memoria, que se encuentran principalmente en el tejido linfóide

asociado al intestino donde se desarrollan la fase temprana de infección y la replicación del HIV. Es necesario, entonces, que una vacuna para HIV desarrolle una barrera inmune en las mucosas genitales, rectal e intestinal para prevenir eficientemente la infección por HIV. Se ha logrado el desarrollo de CTLs específicos en mucosa intestinal por inoculación intrarrectal de una vacuna a péptido sintético con toxoide de *E. coli* como adyuvante. Los animales vacunados ante el desafío con SHIV (*simian-human immunodeficiency virus*) eliminaron el virus a valores indetectables en sangre y en el intestino y no experimentaron depleción de T-CD4⁺. También se han explorado la vía nasal, oral y tonsilar, habiendo encontrado que la nasal es la más satisfactoria, desde el punto de vista de eficacia y de aceptación del público, pero falta aún hallar adyuvantes adecuados.

Hay pocas dudas sobre que el desarrollo de una vacuna segura, efectiva y asequible para HIV constituye una prioridad absoluta para la investigación sobre HIV/SIDA y un desafío formidable, tanto científico y como de Salud Pública en el comienzo de este siglo.

Es evidente que se está realizando un gran esfuerzo mundial y que este esfuerzo, que cada vez se coordina más habrá de lograr resultados útiles para el HIV y para otros agentes infecciosos.

Bibliografía

- Barouch DH, Korber B. "HIV-1 vaccine development after STEP". *Annu Rev Med* 2010;61:153-67.
- Garber DA, Silvestre G, Feinberg MB. "Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers". *Lancet Infect Dis* 2004; 4:397-413.
- Girard MP, Katz J, Pervikov Y, Palkonyay L, Kieny MP. Report of the 6th meeting on the evaluation of pandemic influenza vaccines in clinical trials World Health Organization, Geneva, Switzerland, 17-18 February 2010. *Vaccine* 2010; 28: 5811-20.
- Mascola JR, Montefiori DC. "The role of antibodies in HIV vaccines". *Annu Rev Immunol* 2010; 28:413-44.

Virus Linfotrópico T Humano tipo I y II (HTLV-I/II)

María E. Eirin - Carolina A. Berini - Mirna M. Biglione

1. HISTORIA Y CLASIFICACIÓN

La clasificación actual de los retrovirus se basa en el análisis de la estructura genómica y en las homologías (similitudes) de las secuencias nucleotídicas de los mismos, hallándose así varios géneros dentro de la familia *Retroviridae*. El virus linfotrópico T humano (HTLV) pertenece al género *Deltarretrovirus*, que agrupa a los virus que se caracterizan por la presencia de 2 genes reguladores (*tax* y *rex*) que codifican proteínas no estructurales y carecen de oncogenes pese a ser virus transformantes. Existen cuatro tipos hasta ahora descritos: HTLV-I, HTLV-II, HTLV-III y HTLV-IV, siendo los más estudiados los HTLV-I y II. En el año 1980 se descubrió el primer retrovirus humano denominado HTLV-I, aislado a partir de un paciente americano de raza negra que padecía un linfoma cutáneo T. Dos años más tarde, se descubrió el HTLV-II en un paciente con una leucemia T vellosa. En 1983 se aisló un tercer tipo de retrovirus humano, denominado en ese entonces HTLV-III; pero posteriormente, al observar que la patología que desarrollaban las personas infectadas era una inmunodeficiencia, fue denominado Virus de la Inmunodeficiencia Humana (en inglés HIV). En el año 2005, se descubrieron dos nuevos tipos virales: el HTLV-III y IV, ambos aislados en el sur de Camerún. El primero a partir de un pigmeo y el segundo a partir de cazadores de monos. Aún no se conocen sus implicancias clínicas. Los HTLVs se encuentran filogenéticamente emparentados con los virus linfotrópicos T simianos (STLVs) de los cuales existen tres tipos (I, II y III). Si bien se supone que todos los HTLVs tienen su contraparte en los STLVs, aún no se ha descubierto un hipotético STLV-IV. En conjunto, los HTLVs y STLVs se agrupan dentro de los virus linfotrópicos T de primates (PTLVs). Los HTLVs están estructuralmente relacionados y presentan vías de transmisión similares al HIV. Sin embargo, existen importantes diferencias en sus mecanismos patogénicos causando enfermedades muy distintas.

2. ORGANIZACIÓN DEL VIRIÓN

Las partículas de los HTLVs poseen un diámetro de 110 a 140 nm y están formadas por una nucleocápside icosaédrica. La envoltura es adquirida durante el proceso de brotación conteniendo un multímero de dos proteínas virales: la gp46 externa y la gp21 de transmembrana. La gp46 (análoga a la gp120 del HIV) se adhiere al receptor celular y tiene capacidad de producir la síntesis de anticuerpos neutralizantes en el hospedador infectado. La gp21 (análoga a la gp41 del HIV) mantiene el complejo gp21-gp46 en la superficie del virión y posiblemente participe en el proceso de fusión. Adherida a la cara interna de la envoltura, se encuentra la proteína p19 (fijada químicamente a los lípidos de membrana). La cápside está conformada por la proteína p24, hidrofóbica y componente del *core*, o núcleo interno del virión. A su vez, la cápside encierra al genoma viral de RNA y a varias enzimas tales como la transcriptasa inversa y la proteasa. La transcriptasa inversa actúa como DNA polimerasa-RNA dependiente-ribonucleasa H y también como integrasa. La proteasa viral procesa los precursores derivados de los genes *pol* y *gag*, posibilitando luego el ensamblaje del virión antes de la brotación.

2.1 ESTRUCTURA GENÓMICA

El genoma viral se compone de dos moléculas cuasi-idénticas de RNA monocatenario de 7 a 10 Kb de longitud, modificadas de la misma manera que los RNAm celulares (incluyendo la adición de 7-metil guanosina [*capping*] y la poliadenilación). Como todos los retrovirus, el genoma de los HTLVs presenta 3 genes estructurales codificadores de las proteínas de envoltura (*env*), cápside (*gag*) y polimerasa (*pol*). El orden de los genes estructurales es invariable: 5' *gag-pol-env* 3'. En el DNA proviral (luego del proceso de transcripción inversa) se observan dos secuencias flanqueantes idénticas orientadas hacia el 5' y 3' denominados LTR (del inglés *Long Terminal Repeat*). El gen *env* codifica el precursor proteico gp61 que al ser clivado y glicosilado origina las proteínas gp46 (superficie) y gp21 (transmembrana). El gen *gag*, codifica para una poliproteína precursora (p53) que es luego clivada por la proteasa viral dando origen a las proteínas p19 (matriz), p24 (cápside) y p15 (nucleoproteína). La p24 presenta mayor porcentaje de identidad (85%) en la secuencia aminoacídica entre el HTLV-I y II, y es responsable de la reactividad serológica cruzada entre ambos retrovirus. El gen *pol* codifica la enzima transcriptasa inversa y la integrasa, que están implicadas en la replicación e integración del provirus en el genoma del hospedador. Superpuesto a los genes *pol* y *gag* se encuentra el gen *pro*, que codifica la proteasa viral, la que luego de su autoclivaje participa en la proteólisis de los productos de los genes *gag*, *pol*, *env*. También está involucrada en la maduración de partículas virales con posterioridad a la brotación. Los LTR son esenciales para la replicación viral, ya que son blancos de la integrasa, contienen sitios de fijación para la RNA polimerasa y son promotores de la transcripción del RNA viral. Los HTLVs poseen una región regulatoria en su extremo 3' llamada pX, con al menos cinco marcos de lectura abiertos (ORFs) conteniendo genes que codifican proteínas no estructurales entre las que se encuentran p40^{tax}, p27^{rex}, p21^{rex}, importantes para la regulación de la replicación viral. La proteína p40^{tax} actúa sobre el promotor viral TRE y promotores celulares implicados en la activación, división y proliferación de células infectadas. Esta proteína constituye uno de los primeros factores virales involucrados en el proceso de leuquemogénesis atribuido a la infección por HTLV-I. La proteína p27^{rex} disminuye tanto su propia expresión como la de la proteína p40^{tax}. Además, del mismo modo que *rev* del HIV-1, induce el pasaje de RNAs no clivados hacia el citoplasma e inhibe la expresión de los RNAs doblemente clivados, favoreciendo la síntesis de proteínas virales estructurales.

3. VÍAS DE TRANSMISIÓN

Las principales vías de transmisión de los virus HTLV-I/II son: 1) *de madre a hijo*, principalmente a través de la lactancia; 2) por *contacto sexual*, siendo más eficiente de hombre a mujer y de hombre a hombre, que de mujer a hombre; y 3) *parenteral*, por transfusión de sangre entera, productos celulares sanguíneos o intercambio de jeringas. En este caso, ocurre con mayor eficiencia cuando se transfunden componentes celulares o sangre entera infectada, que por virus libre en plasma.

4. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

El HTLV-I infecta a nivel mundial de 15 a 25 millones de personas, hallándose regiones de alta (Sur de Japón, África Central, Melanesia, Islas Seychelles), mediana (Caribe y África Occidental) y baja endemicidad (Australia, Papua Nueva Guinea y países de Latinoamérica). El HTLV-II infecta entre 3 a 5 millones de personas y se halla en forma endémica en nativos de África y del continente americano como los Navajo y Pueblo en México; los Wayuu, Guahibo y Tunebo en Colombia; los Cayapo y Kraho en Brasil; los Pume de Venezuela, y los Tobas, Wichis y Pilagas en Argentina.

Se ha sugerido que los HTLV-I/II fueron introducidos al continente americano en dos etapas: 1) con las poblaciones mongoloides a través del estrecho de Behring; y 2) a partir de inmigrantes japoneses y africanos en la época post-colombina. El HTLV-I se encuentra en grupos étnicos de las tierras altas pre-cordilleranas de Colombia, Bolivia, Perú, Chile y Argentina; mientras que el HTLV-II está en grupos de las zonas bajas de Colombia, Amazonas de Brasil, Chile y la región del Gran Chaco.

El HTLV-I/II se detecta en donantes de sangre, con prevalencias en países no endémicos de 0,01 a 0,09%, siendo en su mayoría HTLV-I seropositivos aquellos individuos que son inmigrantes o descendientes de inmigrantes de áreas endémicas, o compañeros sexuales de personas infectadas. Estas cifras aumentan en áreas de infección endémica. Los donantes HTLV-II positivos presentan, en su mayoría, antecedentes de uso de drogas inyectables, contacto sexual con un usuario de drogas inyectables (UDI), historia de transfusión sanguínea o un origen étnico relacionado con Amerindios. Ambos virus se encuentran también presentes en grupos de riesgo para HIV tales como UDIs, trabajadoras sexuales y hombres que tienen sexo con hombres.

5. PATOGENIA

El HTLV-I infecta preferentemente linfocitos CD4+, mientras que el HTLV-II, linfocitos CD8+. Recientemente, se ha identificado el receptor del HTLV-I, un transportador de glucosa de expresión ubicua denominado GLUT 1. Aún no se conoce el receptor específico para el HTLV-II. La secuencia genómica del HTLV-I es muy estable no detectándose variabilidad intra-individuo como sucede con el HIV. Una vez que el virus se integra al genoma celular sin tener un sitio preferencial, la expresión de p40^{tax} media la desregulación del ciclo celular dando origen a una expansión monoclonal y estableciendo una infección crónica con mínima expresión viral. Así, la transmisión del virus se produce preferentemente desde una célula a otra mediante fusión de membranas celulares. Entre los eventos que promueven esta expansión, se encuentran la activación de promotores celulares tales como los de IL-2, IL2-R y TNF. El aumento de expresión de la IL-2 y su receptor favorecen un ciclo de retroalimentación positiva estimulando la división celular descontrolada. Además, p40^{tax} inhibe la apoptosis y modifica la expresión de genes involucrados en la proliferación y supervivencia celular. En cuanto a p37^{tax} del HTLV-II, se demostró que posee una localización celular preferentemente citoplasmática, al contrario de la ubicación nuclear y extracelular de p40^{tax} del HTLV-I, lo que estaría relacionado con la falta de asociación a alguna patología determinada. No hay evidencia de que existan variantes específicas que ocasionen alguna de las patologías asociadas a la infección por HTLV-I.

5.1. ENFERMEDADES ASOCIADAS AL HTLV-I

5.1.1 Mielopatía Asociada al HTLV-I (HAM) o Paraparesia Espástica Tropical (TSP)

La HAM/TSP es endémica en el sur de Japón, en países de Centroamérica y en el noroeste argentino, entre otros. En la isla de Martinica fue descrita por primera vez, en 1985, la asociación entre la presencia de anticuerpos anti-HTLV-I y esta enfermedad. La HAM/TSP es un síndrome neurológico desmielinizante que

afecta a individuos adultos siendo más prevalente en las mujeres. Se caracteriza por una pérdida progresiva y permanente de la marcha por incapacidad motora y debilidad de los miembros inferiores desencadenando una discapacidad motora invalidante. De este modo, se establece lentamente una paraparesia espástica con aumento de reflejos tendinosos de miembros inferiores (hiperreflexia), y alteraciones de esfínteres (vejiga neurogénica), así como alteraciones de la sensibilidad y temblor de miembros. A diferencia de la esclerosis múltiple, los nervios craneales no están involucrados y la función cognitiva no se encuentra afectada. El periodo de incubación de la HAM/TSP es de alrededor de 30 años si la vía de transmisión es madre-hijo o de tipo sexual, y de 6 meses a 3 años, si es por transfusión parenteral. En pacientes con HAM/TSP el título de anticuerpos es alto, pero la carga proviral es baja, controlada por una fuerte respuesta inmune de tipo celular con expansión clonal de linfocitos T CD8+ reactivos contra la proteína p40^{tax}.

Los criterios actuales de diagnóstico de la HAM/TSP han sido establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La confirmación del diagnóstico de pacientes con mielopatía progresiva crónica que no padecen inmunodeficiencia, debe incluir además de la clínica, la detección de anticuerpos específicos anti-HTLV-I en suero y líquido cefalorraquídeo, además de excluir cualquier otra patología que se presente con sintomatología similar. En cuanto al tratamiento, se utilizan drogas como el interferón-alfa, interferón-beta 1a o anti-retrovirales con efecto parcialmente favorable para estos pacientes.

5.1.2 Leucemia/linfoma a células T del Adulto (ATLL)

La Leucemia a células T del Adulto es una leucemia linfocitaria T CD4+, endémica en el sur de Japón donde fue descrita por primera vez en 1977. Tiene un periodo de incubación mínimo de 20 años, con una edad promedio de aparición de 50 años. La prevalencia de la ATLL es similar en ambos sexos y se desarrolla con más frecuencia en individuos infectados por transmisión madre-hijo, lo que resulta en una mayor incidencia intrafamiliar. En pacientes con ATLL el título de anticuerpos es moderado, pero la carga proviral es muy elevada. La ATLL presenta características clínicas semejantes a otras leucemias agudas tales como infiltrados de células malignas en médula ósea, ganglios linfáticos y piel, configurando un patrón clínico con afectación de vísceras, huesos, pulmón e infecciones oportunistas con alteración de la función hepática, lesiones osteolíticas y dermatológicas diversas. Son patognomónicos los linfocitos con núcleos en forma de trébol en sangre periférica y la hipercalcemia. Se manifiesta desde formas crónicas de lenta evolución hasta formas leucémicas agudas fatales en menos de un año. Hay estudios que proponen clasificar la enfermedad en cuatro tipos: 1) aguda; 2) tipo linfoma; 3) subcrónica y 4) crónica, similar a la leucemia linfocítica crónica T. El diagnóstico de ATLL se basa en la evidencia de signos clínicos y en la detección de anticuerpos anti-HTLV-I en suero y, de ser necesario, a través de una confirmación de integración monoclonal de HTLV-I al genoma de las células tumorales. La resistencia al tratamiento es frecuente con un promedio de supervivencia de 6 a 9 meses en pacientes con manifestaciones agudas.

5.1.3. Otras enfermedades asociadas

El HTLV-I ha sido implicado en el desarrollo de uveítis, dermatitis infecciosa, poliomiiositis y neumonitis infiltrativa. Además, se ha observado una asociación de la dermatitis infecciosa y HAM/TSP en niños HTLV-I seropositivos de áreas endémicas.

5.2 HTLV-II Y ENFERMEDAD

Si bien se han reportado patologías asociadas al HTLV-II, como es el caso de enfermedades neurológicas similares a la HAM/TSP, aún faltan evidencias para demostrar que este retrovirus sea el agente etiológico de una enfermedad definida.

6. ASPECTOS MOLECULARES Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La epidemiología del HTLV-I/II presenta características particulares en cuanto a su distribución geográfica ya que la misma depende del tipo viral y aspectos étnicos de la población infectada. El HTLV-I posee 4 subtipos: a (cosmopolita), b (en África Central), c (en Melanesia) y d (en África Central). A su vez, el subtipo a se divide en 5 subgrupos: A (transcontinental), B (japonés), C (África del oeste), D (África del norte) y E (peruanos negros). No se ha reportado hasta el momento asociación alguna entre subtipo y enfermedad. En tanto, el HTLV-II se divide en 4 subtipos: a, b, c y d. Se ha demostrado claramente que el subtipo b de HTLV-II (el descrito con mayor frecuencia en pueblos originarios de Sudamérica) se encuentra presente en la población de aborígenes de la región chaqueña de Argentina. Con respecto al subtipo a, se lo ha aislado en particular entre UDIs (dato también corroborado en Argentina).

7. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR HTLV-I/II

Dado que el HTLV-I y el HTLV-II comparten una alta similitud en sus secuencias genómicas (60%), presentan una significativa reacción serológica cruzada y, por lo tanto, se pueden detectar anticuerpos dirigidos contra proteínas de cualquiera de ellos a partir de lisados de un solo tipo viral. Actualmente, existen ELISAs de nueva generación con formato tipo sándwich que incluyen antígenos de péptidos recombinantes y/o sintéticos para ambos tipos virales.

Para el diagnóstico de HTLV-I/II en adultos se recomienda realizar una técnica de tamizaje que cuente con la mayor sen-

sibilidad y especificidad posible y, en los casos reactivos, confirmar con una técnica más específica como es el *Western blot*. En aquellos casos en que esta última prueba brinda un resultado indeterminado o se informa como HTLV (sin tipificar), puede realizarse una PCR anidada (*nested-PCR*) con el propósito de una caracterización/notificación final. Ésta debe tener alta sensibilidad para evitar falsos negativos y ser suficientemente específica para discriminar entre los distintos tipos virales. Una muestra es considerada positiva cuando la PCR anidada documenta al menos la presencia de dos fragmentos de genes virales distintos. En los casos indeterminados en que no es posible realizar una confirmación molecular, se puede efectuar un seguimiento durante un año, repitiendo la serología (tamizaje y confirmación) cada 4 meses, para verificar cambios en el patrón de *Western blot*. Si el patrón se mantuviera inalterado durante dicho período, se podría considerar al caso como negativo.

NOTA

Este capítulo se finalizó en el año 2008.

ADENDUM

Mientras *Virología Médica* estaba en la etapa de prueba de galera se estableció que el HTLV-1 interactúa inicialmente durante la adsorción con heparansulfatos y subsiguientemente con el transportador 1 de glucosa (GLUT-1) y con la neuropilina, diseminándose entre linfocitos mediante la formación de biopelículas inducidas por el virus.

Bibliografía

- Barmak K, Harhaj E, Grant C, Alefantis T, Wigdahl B. "Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration". *Virology* 2003; 308: 1-12.
- Biglione M, Gessain A, Quiruelas S, Fay O, Taborda MA, Fernandez E, et al. "Endemic HTLV-II infection among Tobas and Matacos Amerindians from north Argentina". *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6: 631-3.
- Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, et al. "Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa". *Retrovirology* 2005; 2: 30.
- Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. "A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia". *Science* 1982; 218: 571-3.
- Mahieux R, Gessain A. "HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma". *Rev Clin Exp Hematol* 2003; 7: 336-61.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma". *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7415-9.
- Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. "Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases". *Oncogene* 2005; 24: 6058-68.
- Slattery JP, Franchini G, Gessain A. "Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses". *Genome Res* 1999; 9: 525-40.
- Tuke P.W., Luton P., Garson J.A. "Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of 'nested' PCR products". *J Virol Methods* 1992; 40: 163-73.
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. "Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases". *Blood* 1977; 50: 481-92.
- Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, et al. "Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters". *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 7994-99.



23

HERPESVIRUS

Virginia Alonio - Guadalupe Carballal - Dolores Fellner - Marcela Ferrés
Beatriz Livellara - Celeste Pérez - Alejandra Piconi - Cristina M. Videla

23.1

Características de la Familia *Herpesviridae*

Marcela Ferrés

Los virus herpes humanos se encuentran ampliamente difundidos en la población y son causa de enfermedades generalmente autolimitadas y benignas. Sin embargo, pueden ser causa de importante morbilidad y mortalidad en la creciente población de inmunosuprimidos. El desarrollo de antivirales ha permitido el manejo y tratamiento de algunas infecciones como las producidas por herpes simplex, varicela-zóster y citomegalovirus. En la prevención sólo se cuenta con vacuna para varicela-zóster.

Las especies de la flia. *Herpesviridae* se agrupan en tres subfamilias de acuerdo a las características de su genoma, estructura, tropismo tisular, efecto citopático y células donde se mantienen en estado de infección latente. Estas subfamilias se denominan alfa, beta y gamma *Herpesvirinae*. Sus representantes y sus características clínicas se resumen en la Tabla 23.1.1. También se los puede clasificar con relación al ciclo patogénico y las manifestaciones clínicas que producen.

Los virus herpes que afectan al ser humano son el herpes simplex 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), el virus varicela-zóster (VZV), el virus de Epstein-Barr (EBV), el citomegalovirus humano (HCMV), el herpesvirus humano 6 o herpesvirus linfotrópico (HHV-6), el herpesvirus humano 7 (HHV-7) y el herpesvirus humano 8 (HHV-8), conocido como el virus herpes humano asociado al sarcoma de Kaposi.

Para una mejor comprensión de la patogenia y las manifestaciones clínicas de las infecciones por los virus de la familia *Herpesviridae* es importante considerar que todos ellos, tras iniciar una infección primaria, se replican activamente dentro de sus células blanco hasta que la respuesta inmune celular es capaz de controlar este proceso agudo. En ese momento los virus herpes son capaces de establecer una infección latente que se volverá a reactivar, preferentemente en situaciones clínicas asociadas a inmunosupresión celular del hospedador. El caso particular de la reactivación por HSV (no necesariamente asociado a inmunosupresión) se analiza en detalle el capítulo 23.2.

1. ESTRUCTURA

Los virus de esta familia son agentes infecciosos con un tamaño aproximado a 150 nm, con una envoltura lipídica que permite la expresión de glicoproteínas de superficie responsables de la adherencia a la célula hospedadora, la fusión y el escape a la respuesta inmune. Su cápside es de simetría icosaédrica (162 capsómeros). Entre la cápside y la envoltura existe un espacio llamado tegumento, donde se encuentran enzimas y proteínas que ayudan a iniciar la replicación viral. El genoma es DNA lineal de doble hebra. Por su envoltura lipídica son sensibles a los solventes de lípidos, a los ácidos y a la desecación.



Subfamilia	Patógenos humanos	Infección primaria	Infección recurrente
<i>Alfaherpesvirinae</i>	Herpes simplex 1 (HSV-1) o herpesvirus humano 1 (HHV-1)	Estomatitis herpética	Herpes labial
	Herpes simplex 2 (HSV-2) o HHV-2	Herpes genital	Herpes genital recurrente
	Varicela-zóster (VZV) o HHV-3	Varicela	Herpes zóster
<i>Betaherpesvirinae</i>	Citomegalovirus humano (HCMV) o HHV-5	Síndrome mononucleósico	Neumonitis, hepatitis, coriorretinitis
	Herpesvirus humano 6 (HHV-6)	Exantema súbito	Depresión de médula ósea, encefalitis, neumonitis, enfermedad trasplante vs. hospedador ¿Pitiriasis rosada de Gibert?
	Herpesvirus humano 7 (HHV-7)	Exantema súbito	
<i>Gammaherpesvirinae</i>	Epstein-Barr (EBV) o HHV-4	Mononucleosis infecciosa Manifestaciones neurológicas y hematológicas asociadas a la infección primaria	Infección crónica activa por EBV, síndrome linfoproliferativo hemofagocítico, linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo
	Herpesvirus humano 8 (HHV-8)	Asintomático en inmunocompetentes, o enfermedad febril aguda (con o sin <i>rash</i> localizado) con fatiga, linfadenopatías y eventual diarrea; sarcoma de Kaposi (en previamente infectados con HIV)	Sarcoma de Kaposi, enfermedad multicéntrica de Castleman, linfoma de efusión primaria (un linfoma B No Hodgkin)

Tabla 23.1.1. Clasificación los virus de la familia *Herpesviridae* y algunas de sus manifestaciones clínicas durante la infección primaria y en la recurrencia.

2. REPLICACIÓN

Las glicoproteínas virales son las encargadas de reconocer el receptor celular y adherirse a él para permitir la fusión de las membranas de envoltura viral y la membrana celular. Una vez que la nucleocápside llega hasta la membrana nuclear se inicia el proceso de transcripción de la información genética y la replicación viral. Ambos fenómenos ocurren en forma coordinada y, del equilibrio final entre ambas dependerá el tipo de infección que se establecerá en la célula hospedadora; ésta puede terminar en una infección aguda lítica, o en una de naturaleza persistente (crónica o latente). La latencia es una forma habitual de permanencia viral en el hospedador; es promovida por todos los miembros de la familia *Herpesviridae*. Dicha permanencia es temporalmente ilimitada.

La transcripción del mensaje genético y la síntesis proteica se produce en tres fases: una etapa *inmediatamente temprana* (alfa), donde se produce una unión de proteínas al DNA para regular la

transcripción; luego una fase de síntesis de *proteínas tempranas* (beta), entre ellas la DNA polimerasa y otras que intervienen en la transcripción; y posteriormente la síntesis de las *proteínas estructurales tardías* (gamma), que se producen luego de que la replicación haya comenzado.

Aquellos virus que realizan su ciclo replicativo en forma completa destruyen la célula hospedadora produciendo una infección lítica, mientras que aquellos que sólo transcriben la información genética sin replicarse quedarán en estado de infección latente en diversas estirpes celulares. Así, por ejemplo el HSV exhibe una sorprendente estrategia para permanecer en fase de latencia en neuronas sensoriales y minimizar así el reconocimiento por el sistema inmune. A su vez, el virus Epstein-Barr (EBV), establece una infección latente en los linfocitos B, aunque en un número limitado de individuos puede asociarse a infecciones crónicas de linfocitos T, como se observa en el síndrome linfoproliferativo hemofagocítico y en la infección crónica activa por EBV (en la que también se infectan las NK), o a eventos tumorigénicos.

Virus herpes simplex: herpesvirus humano (HHV) 1 y HHV-2

Marcela Ferrés

Existen dos especies de virus herpes simplex: el HSV-1 (HHV-1) y el HSV-2 (HHV-2), ambos pertenecientes al género *Simplexvirus*. Sus genomas tienen un alto grado de homología, razón por la cual la mayor parte de los polipéptidos sintetizados por un tipo viral se relacionan antigénicamente a los del otro tipo.

1. ESTRUCTURA

El genoma del HSV contiene información que permite la síntesis de importantes enzimas como la DNA polimerasa, la desoxirribonucleasa, la timidina quinasa, y la ribonucleótido reductasa. Esta última se encarga de convertir los ribonucleótidos en desoxinucleótidos que, a su vez, se fosforilan con la ayuda de la timidina quinasa quedando entonces disponibles para la síntesis del DNA viral. Todas estas enzimas son propias del virus y diferentes a las de origen celular, por lo que algunas de ellas representan el blanco de acción de las drogas antivirales. Esta especificidad es, sin duda, una garantía de la seguridad en el uso de estas drogas ya que no altera a la célula hospedadora sino sólo al virus.

Las glicoproteínas de superficie cumplen variadas funciones, entre las cuales deben destacarse la adherencia y penetración celular (gB, gC, gD, gH), la evasión a la respuesta inmune celular (gC, gE, gI), y la estimulación de la producción de anticuerpos neutralizantes (gD). La especificidad antigénica que diferencia entre HSV-1 y HSV-2 está dada por la gG.

Al menos cinco proteínas virales inmediato-tempranas (α) desempeñan un papel central para asegurar la expresión robusta de genes virales (Tabla 23.2.1). La primera es la denominada VP16 o α TIF (*trans inducing factor*), una proteína del tegumento que aumenta el nivel de expresión de los genes α , y que ingresa con el virus al iniciarse la infección celular. Cumple, por ende, la doble función como transactivadora de la transcripción y como proteína estructural del virión. VP16 actúa sobre secuencias TAATGARAT (R es un nucleótido

purínico) presentes en los promotores inmediato-tempranos virales. Dicha secuencia de DNA es reconocida por el factor de transcripción celular Oct-1. VP16 y otra proteína celular (HCF: *host cellular factor*) se unen al complejo TAATGARAT/Oct-1 activando la transcripción de los genes virales. La segunda es la proteína inmediato-temprana ICP4 (*Infected cell protein 4*) que se une al DNA viral en sitios por los que tiene alta y baja afinidad, actuando –respectivamente– como represor o transactivador sobre ellos. ICP0 actúa como un transactivador promiscuo, sin unirse al DNA sino a otras proteínas celulares, regulando el ciclo celular (estabiliza la ciclina D3) y manteniendo una vigorosa síntesis proteica. La proteína ICP27 controla el procesamiento del RNA, bloqueando el proceso de corte y empalme de los RNAm (*splicing*). Dado que la mayoría de los genes virales carece de intrones, dicho efecto se manifiesta fundamentalmente en una reducción de la síntesis de proteínas celulares. Asimismo, ICP27 actúa como transportador de RNAm tardíos desde el núcleo al citoplasma, regulando la expresión de proteínas virales tardías. ICP22 es una proteína α multifuncional.

Conjuntamente con VP16, otras dos proteínas tegumentarias potencian la capacidad del HSV de replicar eficientemente: vhs (*viral host shut off*) y una proteína-quinasa (UL13); vhs es una proteína con actividad de RNasa que degrada todos los RNAm. Dado que los genes virales se expresan a una tasa muy alta, la síntesis de proteínas virales está menos afectada que la de las proteínas celulares.

Otras dos proteínas virales tienen especial significación en la patogénesis de la infección: una es ICP47 y la otra γ 34.5. La primera es una proteína que a través de la unión con las proteínas de transporte TAP 1 / TAP 2 celulares bloquea la presentación de antígenos peptídicos en el contexto de moléculas del CMH-I, al impedir la translocación de péptido dentro del retículo endoplásmico. La proteína γ 34.5 (ICP 34.5) se une a la fosfatasa 1 celular y redirecciona su actividad hacia la defosforilación del factor eIF-2 α , permitiendo la síntesis de proteínas. Este efecto bloquea la actividad de la PKR (proteína-quinasa dependiente de RNA) celular que normalmente fosforila dicho factor eIF-2 α , y –como un intento de bloquear la infección viral– impide la síntesis de proteínas y promueve la apoptosis celular. En otros términos, el aumento de aproximadamente 3 000 veces que se observa en la actividad de la fosfatasa 1 de las células infectadas respecto de las que no lo están, evita la inhibición de la síntesis proteica promovida por la PKR (Tabla 23.2.1).

2. INFECCIÓN AGUDA, LATENCIA Y REACTIVACIÓN

Las células mucoepiteliales son las que permiten la entrada de ambos tipos virales, en forma preferente en la región orofacial para el HSV-1 y en la genital para HSV-2. La unión y el ingreso viral a las células es dependiente de factores virales (glicoproteínas de envoltura) y celulares. Un mediador celular de la entrada viral perteneciente a la familia de receptores para TNF es expresado primariamente en linfocitos T activados (HveA; *Herpes viral entry A*). En las células epiteliales y otras no linfocíticas el ingreso es mediado por una glicoproteína similar al receptor para poliovirus (HveB y HveC). HveC es abundantemente expresado en neuronas. En células epiteliales se promueve una infección productiva como resultado de la expresión de los genes α , β y γ , lo cual permite la

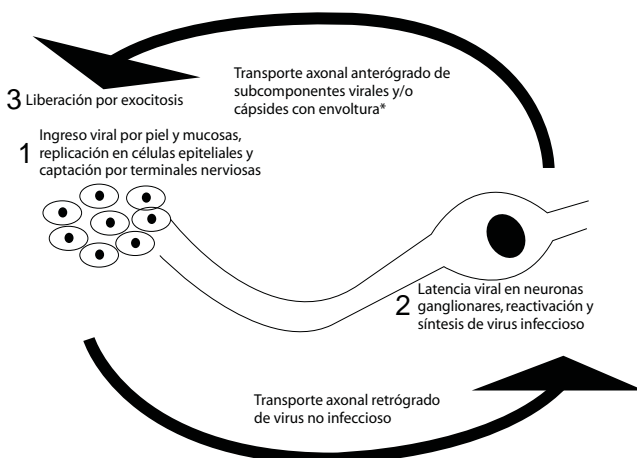


Figura 23.2.1. Transporte axonal retrógrado del virus herpes simplex desde el sitio de inoculación. El transporte anterógrado tiene lugar luego de la reactivación viral.

Molécula	Función
RNA	
LAT (<i>latency associated transcripts</i>)	Transcripto de RNA viral (no codificante de proteína) expresado en la latencia; inhibe la apoptosis. Inhibe ICP0.
L/STs	Transcriptos de RNA viral; inhibirían la síntesis de proteínas inmediato-tempranas (α) en neuronas.
Proteína	
VP16 (α TIF)	Transactivadora tegumentaria de genes inmediato-tempranos (α).
Vhs (<i>viral host shut off</i>)	RNAsa tegumentaria que afecta principalmente a los RNAm celulares.
U _s 3	Proteína quinasa viral que inhibe la apoptosis mediada por BAD.
ICP0	Se expresa durante la infección celular (ICP): transactivadora promiscua de genes α , β y γ ; inhibe la expresión de IRF-3; necesaria para la reactivación.
ICP4	Inhibe la expresión de transcriptos LATs y de transcriptos L/STs en las infecciones productivas. Promueve la transición entre la expresión de genes α hacia los β y γ interactuando con factores de transcripción de la RNA polimerasa II celular.
ICP22	Multifuncional; necesaria para la replicación viral, modifica la RNA polimerasa II celular.
ICP27	Promueve la transición entre la expresión de RNA de genes α hacia los β y γ . Inhibe la apoptosis en el proceso de establecimiento de la latencia; regula la longevidad del RNAm de ICP0; inhibe la síntesis de proteínas celulares mediante el bloqueo del <i>splicing</i> de RNA; regula la exportación nuclear de RNAm de proteínas virales tardías.
ICP34.5 (γ 34.5)	Aumenta la actividad de una fosfatasa celular, inhibiendo la PKR.
ICP47	Inhibe la presentación antigénica por MHC-I al inhibir las proteínas de transporte celular TAP-1 y TAP-2, lo que impide el transporte de péptidos virales al retículo endoplásmico.
ORF O ORF P	Inhibe ICP4. Inhibe ICP0 e ICP22.

Tabla 23.2.1. Funciones de algunas moléculas del HSV.

formación de nuevos viriones, proceso que culmina con la destrucción celular. Los virus herpes se replican en las células de la base de la lesión, infectan la neurona que inerva esa zona y se trasladan en forma retrógrada asociados a moléculas motoras de dineína hasta llegar a los cuerpos neuronales de los ganglios trigémino (HSV-1) o sacro (HSV-2) donde permanecen en estado de latencia (Figura 23.2.1).

Se define como latencia la retención de un genoma viral funcional (para el HSV en ganglios sensoriales) sin producción de virus infeccioso. En el humano, la latencia viral se mantiene durante toda la vida del individuo infectado, lo que sugiere una delicada

estrategia de persistencia viral, que a su vez permite la reactivación (Tabla 23.2.2).

Durante la latencia viral se observan dos cambios en el genoma viral que afectan su expresión: a) su circularización episomal; y b) su asociación con histonas celulares, existiendo como una estructura cromatínica en las neuronas infectadas.

El ciclo latencia-reactivación puede ser operativamente definido en tres etapas: el establecimiento de la latencia, la mantención de la misma y la reactivación viral desde la fase latente. En la transición entre la infección aguda y la fase de latencia (establecimiento de ésta en la neurona), el virus produce diversas proteínas potencialmente tóxicas (ICP0, U_s1.5, U_L13), que podrían dañar el DNA celular y disparar la apoptosis mitocondrial de la neurona. Sin embargo, el virus posee una maquinaria anti-apoptótica (proteínas U_s3, U_s5, gD, gI, ICP27 y transcriptos de RNA denominados LATs [*Latency associated transcripts*]) que promueve la sobrevida neuronal en esta fase inicial.

Al extinguirse la expresión de otros genes, la expresión de transcriptos LATs 1 y 2 durante la latencia bloquea la inducción de apoptosis neuronal. El gen *LAT* es el único transcripto activa y abundantemente sintetizado durante la fase de mantención de la latencia. En absoluto contraste con otros genes del HSV, el promotor del gen *LAT* es sólo activado en neuronas sensoriales. En dicho promotor existe una región de unión para ICP4, proteína que inhibe la expresión de los transcriptos LATs, lo que justifica que éstos no sean abundantes en las infecciones productivas de células epiteliales. El transcripto primario *LAT* consta de 8,3 kb de RNA y se yuxtapone con la expresión del gen inmediato temprano *ICP0* en dirección anti-sentido, por lo cual se ha postulado que podría inhibirlo (Figura 23.2.2). Sin embargo, las primeras 1,5 kb de los transcriptos LATs son suficientes para promover los niveles habituales de reactivación de cepas virales salvajes, sin yuxtaponerse con gen alguno del HSV. El gen *LAT* puede potenciar el establecimiento o la mantención de la latencia, incrementando el *pool* de neuronas latentemente infectadas, las que resultan en niveles aumentados de reactivación espontánea o inducida.

Se cree que mediante corte y empalme del transcripto primario *LAT* (inestable), se producen transcriptos estables de 2 kb, que pueden ser, a su vez, subsiguientemente procesados en moléculas de 1,5 y 1,4 kb. La capacidad anti-apoptótica del gen *LAT* reside en el exón 1, habiéndose demostrado que micro RNAs (miRNA; moléculas que regulan la estabilidad de los transcriptos o la eficiencia traduccional de éstos) correspondientes a esta región (miR-*LAT*) son capaces de inhibir la vía de señalización de un potente inhibidor del crecimiento celular (TGF β 1) regulando negativamente la expresión de dicho factor y de SMAD-3, un activador de la mencionada vía.

Se ha demostrado que la proteína celular HCF está secuestrada exclusivamente en el citoplasma de las neuronas sensoriales, en oposición a la distribución generalizada o nuclear que se observa en otras estirpes celulares. Dicho secuestro es promovido por la unión del HCF con factores de transcripción celulares, tales como los denominados Zhangfei y Luman (este último en neuronas sensoriales). Ello implica la imposibilidad para VP16 de ser transportada al núcleo y, por ende, poder iniciar la transcripción de genes inmediatos tempranos α . Por lo expuesto, se ha sugerido que Luman, desempeña un papel en la latencia. También se ha demostrado la existencia de transcriptos de RNA virus-específicos, denominados L/STs. Estos RNAs son transcriptos sintetizados en sentido divergente al RNAm de ICP0 y se yuxtaponen –en la misma orientación– con el transcripto primario *LAT* (Figura 23.2.2B).

Un marco de lectura abierto (ORF) denominado ORF P comprendido en la región L/STs se sobre-exprea cuando ICP4 está inactivo, dado que esta proteína reprime la transcripción de L/STs. Otro producto codificado en la misma región que ORF P, pero en menor cuantía y en un diferente marco de lectura se conoce como ORF O. ORF P y ORF O estarían controlados por el mismo promotor. Existe un circuito de retroalimentación positiva que podría controlar la expresión de genes del HSV durante la latencia: en ausencia de ICP4, ORFs O y P serían producidos y prevendrían

Establecimiento de la latencia

- Ingreso del genoma viral en la neurona ganglionar
- Abundante expresión de genes virales y replicación del DNA (infección aguda)
- Extinción de la expresión génica viral
- Abundante expresión de LATs

Mantención de la latencia

- Expresión de LATs
- Ausencia de expresión detectable de genes virales líticos
- Ausencia de replicación detectable del DNA viral

Reactivación desde la latencia

- Estímulo externo (estrés, inmunosupresión, etc.)
- Infección productiva (expresión génica, replicación del DNA viral y producción de viriones)
- Sobrevida de las células latentemente infectadas (?)
- Expresión de LATs

Tabla 23.2.2. Principales etapas durante el ciclo de latencia – reactivación viral.

la síntesis o la función de proteínas inmediata-tempranas, manteniendo al resto del genoma en un estado reprimido sin transcribir. Inversamente, durante la infección productiva, ICP4 reprime la producción de L/STs. Este atractivo modelo, sin embargo, requiere confirmación, ya que no hay aún evidencias de la expresión de los ORF O u ORF P en neuronas latentemente infectadas por HSV. Asimismo, se ha documentado en el modelo experimental murino que 1 de cada 10 neuronas del ganglio trigémino latentemente infectadas con HSV expresan abundantes transcritos virales (LAT, ICP4, timidina quinasa, y glicoproteína C), sintetizan proteínas y replican el DNA viral. En ausencia de virus infeccioso detectable en el ganglio trigémino, se ha acuñado este proceso con la denominación de *reactivación molecular espontánea*.

Estos hallazgos permitirían justificar la persistencia de una respuesta inmune local mediada por linfocitos T CD8⁺ en el sitio de la latencia. Estas células producen interferón γ , el que podría prevenir la reactivación viral junto con el interferón α . El interferón γ inhibe la expresión de ICP0 (necesaria para la reactivación) y bloquea un paso subsiguiente a la expresión de al menos algunas de las proteínas estructurales del virus. También se ha documentado la presencia de IP-10, TNF alfa y RANTES en el sitio donde HSV establece la latencia. Esta respuesta inmune celular crónica sin lesión neuronal podría asociarse a la vigilancia inmune ejercida frente a los frecuentes eventos de reactivación viral (con la consiguiente expresión de proteínas virales). En síntesis, la respuesta inmune celular no citolítica mediada por citoquinas parecería favorecer la latencia viral e influenciar la reactivación.

Sin embargo, el HSV dispone al menos de tres estrategias para contrarrestar dicha vigilancia inmune local: a) la actividad de fosfatasa 1 celular disparada por ICP34.5 (γ 34.5) que defosforila la PKR; b) la acción de la proteína U_s11 –una proteína viral que se une al RNA y evita la activación de la PKR–; y c) el efecto de inhibición sobre los genes estimulados por el interferón promovido por ICP0, que incluye el impedimento de acumulación nuclear de IRF-3 (factor regulatorio 3 del interferón).

Luego de producida la reactivación viral en la neurona, el virus herpes viaja por vía axonal anterógrada en forma de subcomponentes virales (glicoproteínas de envoltura y cápsides desnudas por separado) y/o como cápsides envueltas, asociados a moléculas de kinesina, liberándose en las terminales nerviosas mediante exocitosis. Ambos modelos referidos al transporte anterógrado del HSV son aún motivo de controversia y de actual investigación. Es menester destacar que este proceso de reactivación viral se realiza en presencia de la respuesta humoral específica del hospedador. Los

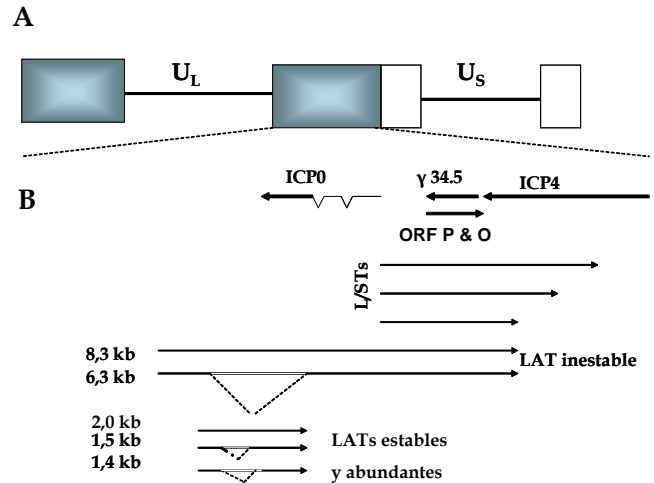


Figura 23.2.2. Localización de genes dentro de las secuencias repetidas de HSV-1. 2A: U_L y U_S indican las secuencias únicas de los componentes largos (L) y cortos (S) del genoma. Los rectángulos representan las secuencias repetidas. 2B. Mapa transcripcional correspondiente a la región genómica con secuencias repetidas. La localización y orientación de los LAT, ICP0, γ 34.5, ICP4, ORF P & O, y L/ST se muestran con líneas continuas.

anticuerpos anti-HSV no desempeñan rol alguno conocido frente a dicho evento intracelular.

Durante la recurrencia el virus vuelve a producir lesiones vesiculares o se excreta en forma inaparente. Estas lesiones son más circunscritas ya que existe una respuesta inmune previa que impide su diseminación; cuando esta respuesta inmunológica se encuentra debilitada o ausente la recurrencia es más severa y prolongada. Estos conceptos ayudan a entender el comportamiento severo de herpes simplex en aquellos grupos de riesgo, como los recién nacidos, los ancianos y los que tienen compromiso de la inmunidad celular. En sujetos inmunocompetentes varios fenómenos, entre ellos el trauma, la fiebre, el estrés, la luz solar y/o cambios hormonales asociados a la menstruación son capaces de estimular una reactivación de cualquiera de los virus herpes simplex, probablemente asociado a una estimulación de la replicación viral y –en algunos casos– a una depresión transitoria (al menos a nivel del sitio de latencia viral) de la inmunidad celular.

3. PUERTA DE ENTRADA Y CUADROS CLÍNICOS

Los mecanismos de transmisión involucrados en la infección por virus herpes simplex 1 ó 2 son el contacto directo de piel o mucosas, entre un sujeto que está excretando el virus, en forma sintomática o asintomática, y otro que es susceptible a la infección.

Las formas más frecuentes de adquirir la infección son a través del contacto oral como el beso, la auto-inoculación en la mucosa conjuntival, o en la piel a través de microlesiones, a través del contacto sexual, y por contacto directo con el canal del parto, en el caso de los recién nacidos.

3.1 INFECCIÓN ORO-FACIAL

La manifestación clínica primaria más común del herpes oro-facial es la gingivo-estomatitis herpética, donde HSV-1 es la principal etiología. La población más afectada es la de los niños entre 1 a 3 años, que presentan un cuadro caracterizado por fiebre alta, sialorrea, lesiones vesiculares en la mucosa oral, labios, lengua, encías y paladar duro, que posteriormente se ulceran y son causa de dolor e inapetencia. Este cuadro es autolimitado, cesando alrededor de

los diez días. La excreción viral dura aproximadamente el mismo tiempo que la sintomatología descrita.

La infección recurrente labial se ubica en la unión mucocutánea del labio. Es frecuente que preceda a la aparición de vesículas, prurito y ardor localizado. Una vez que las vesículas han erupcionado se transforman en costras al cabo de dos a tres días y desaparecen luego de una semana. Estas lesiones son contagiosas ya que el virus se está replicando activamente en ellas. La recurrencia asintomática también existe y es también contagiosa para un hospedador susceptible.

3.2 HERPES GENITAL

Por lo general es causado por el HSV-2, aunque con frecuencia creciente también se ha descrito por el HSV-1. El herpes genital se manifiesta por pápulas, vesículas, pústulas y úlceras en la piel y mucosas de los genitales femeninos o masculinos. En las mujeres las lesiones pueden encontrarse en las paredes vaginales o en el cuello uterino y ser externamente imposibles de ver. Cuando la infección ocurre en un hospedador que carece de inmunidad a ambos tipos de virus herpes (ausencia de anticuerpos contra HSV-1 y HSV-2), la sintomatología suele ser más intensa, con manifestaciones sistémicas y con una excreción viral más prolongada. Los síntomas más comunes son fiebre, cefalea, dolores musculares y disuria. En el examen físico es posible encontrar signos meníngeos, adenopatías inguinales, descarga uretral y vaginal. Las lesiones genitales desaparecen alrededor de las dos semanas y la excreción viral cesa alrededor del mismo período.

Las recurrencias del herpes genital pueden ser con o sin síntomas, en este último caso se manifiestan por pródomos como sensibilidad, adormecimiento o sensación urente en la zona sacra con aparición posterior de vesículas y úlceras que al cabo de unos días se convierten en costras.

Las manifestaciones de recurrencia del HSV-1 son menos frecuentes que las de HSV-2.

3.3 ENCEFALITIS HERPÉTICA

Es uno de los cuadros clínicos más graves e importantes de reconocer y debe ser tratado con antivirales en forma precoz, con el objeto de mejorar el pronóstico vital y así evitar complicaciones y secuelas para el paciente. Se manifiesta en niños y adultos, como un cuadro febril con cefalea, alteraciones de conciencia, conducta bizarra, convulsiones focales asociadas a rápido deterioro de la conciencia. El compromiso del tejido encefálico es de tipo destructivo por lo que las secuelas neurológicas son frecuentes entre los que sobreviven. El lóbulo temporal es el más comprometido. El LCR está alterado con un contenido elevado de proteínas, y recuento anormal de leucocitos (a predominio de mononucleares) y glóbulos rojos, ambos hallazgos traducen la presencia de inflamación y necrosis tisular.

La meningitis por HSV es una complicación del cuadro primario del herpes genital por HSV-2, siendo su evolución autolimitada.

3.4. INFECCIÓN DEL RECIÉN NACIDO

Existen tres formas de adquirir la infección, la transplacentaria o congénita, la perinatal en el momento del parto y la post-natal. La más frecuente es aquella adquirida en el período perinatal (85%) y la menos frecuente es la infección congénita (5%).

La infección perinatal se observa entre los 7 y 20 días de vida como un cuadro séptico. Se reconocen tres formas clínicas: infección diseminada (30%), encefalitis (35%) e infección localizada de la piel, ojos u orofaringe (35%). Estos síndromes no son excluyentes y pueden superponerse durante el curso de la infección. La infección diseminada se caracteriza por un cuadro de tipo séptico progresivo. Los síntomas neurológicos son prominentes en un 60% de los casos. Un 90% de los pacientes tienen lesiones vesiculares cutáneas.

Los órganos afectados con mayor frecuencia son el SNC, hígado y glándulas adrenales. Sin tratamiento el paciente se deteriora de

forma progresiva con una mortalidad del 90%. En ausencia de lesiones de la piel, el diagnóstico requiere un alto grado de sospecha.

En un 35% de los pacientes la infección del SNC no presenta compromiso de otros órganos, pero puede acompañarse de lesiones vesiculares en la piel o lesiones oculares. El momento de presentación es usualmente más tardío que la forma diseminada, alrededor del días 16 a 19 post-parto.

Las manifestaciones clínicas incluyen letargia, irritabilidad, temblor, abombamiento de la fontanela, inestabilidad de la temperatura corporal, convulsiones focales o generalizadas, opistótonos o parálisis flácida. Sin tratamiento, el pronóstico es fatal en el 50% de los casos y los sobrevivientes presentan secuelas neurológicas.

Las infecciones localizadas por lo general tienen buen pronóstico. Estas pueden comprometer la piel, ojos o mucosa oral. En la piel se presenta como pequeñas vesículas de fondo eritematoso que aparecen en el área de la presentación en el parto y luego se extienden a otras áreas del cuerpo. La infección ocular compromete la conjuntiva y la córnea y, eventualmente puede conducir a cataratas y coriorretinitis.

En la infección congénita, las manifestaciones clínicas están presentes al nacer o en las primeras 48 horas de vida y se caracterizan por lesiones vesiculares (simulando impétigo bulloso o piel escaldada) y áreas de cicatrización en la piel, asociado a secuelas neurológicas graves, hepato-esplenomegalia y trastornos de la coagulación. El pronóstico es frecuentemente fatal, aún con tratamiento.

4. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Para la identificación del virus herpes simplex existen cuatro modalidades de diagnóstico de laboratorio específicas:

- 1) Detección de antígenos: el virus puede ser detectado a través de técnicas rápidas como la inmunofluorescencia que intenta visualizar antígenos del HSV presentes en las células tomadas desde la base de las lesiones vesiculares. Con el uso de la inmunofluorescencia directa (IFD) y monoclonales específicos para las glicoproteínas G de HSV-1 y HSV-2, es posible establecer en el lapso de 2 horas cuál de los dos tipos virales es responsable de las lesiones vesiculares encontradas. La sensibilidad es óptima, superior al 90%, si la muestra obtenida es de buena celularidad y si fue tomada de una lesión vesicular en vez de una lesión ulcerada o costrosa. Lo ideal es que sea una lesión de no más de tres días de evolución. La muestra recibida en ese caso será una tórula en medio de transporte para virus. En ocasiones, una impronta de un tejido biopsiado puede ser una excelente alternativa para realizar un diagnóstico rápido.
- 2) Aislamiento en cultivo sobre células de origen epitelial como los fibroblastos humanos. Esta técnica es una excelente alternativa para recuperar el virus desde una lesión vesicular activa, un frotis cervical o vaginal, o una biopsia. El cultivo demora entre 2 y 7 días en hacerse positivo (detección de la acción citopática –o ACP– viral) lo que le confiere una utilidad limitada en la toma de decisiones terapéuticas oportunas. El virus produce una ACP de tipo lítico y se puede tipificar como del tipo 1 ó 2, con anticuerpos monoclonales mediante inmunofluorescencia.
- 3) Biología molecular: la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es otra excelente herramienta diagnóstica, de gran sensibilidad y rapidez, y es la mejor forma de hacer diagnóstico desde fluidos con una carga viral baja que limite su recuperación en cultivo celular. Para el diagnóstico de encefalitis o meningitis herpética la PCR es la técnica de elección; su sensibilidad es de 98 a 100% en niños y adultos, y la especificidad de 94%.
- 4) Serología: en la actualidad se han desarrollado buenas técnicas de diagnóstico serológico que permiten detectar anticuerpos específicos para HSV-1 y HSV-2. Las indicaciones del uso de la serología son aún limitadas: entre ellas, el diagnóstico de susceptibilidad para uno de los dos tipos de virus, consejo y

apoyo a parejas en que una de ellas padece de herpes genital reconocido por lesiones externas y en el diagnóstico de herpes genital sin lesiones externas. No tienen utilidad en el diagnóstico de una enfermedad aguda.

- 5) Otros procedimientos: Las tinciones de Tzanck o Papanicolaou de muestras obtenidas de la base de lesiones sospechosas son técnicas alternativas para la detección de células infectadas por cualquier virus de esta familia. La sensibilidad es baja, oscilando entre el 40 y el 50%.

5. TRATAMIENTO

Actualmente hay disponibilidad de 4 drogas antivirales para el tratamiento de las infecciones por virus herpes simplex: el aciclovir, el valaciclovir, el famciclovir y el foscarnet.

El aciclovir es la droga más ampliamente utilizada como primera opción terapéutica. Su mecanismo de acción es inhibir la replicación viral actuando como análogo de nucleósido al momento de elongarse la hebra de DNA viral, ya que funcionalmente inactiva a la DNA polimerasa viral. Es una droga en extremo segura y eficaz, en ausencia de compromiso renal su vida media es de 2,5 hasta 3 horas. Su biodisponibilidad oral es deficiente por lo que, en situaciones en que la terapia oral es la indicada se prefiere usar

el éster de valina del aciclovir, el valaciclovir, que tiene una vida media en sangre que permite su dosificación dos o tres veces al día.

En consideración a que su excreción es de preferencia por el riñón, su dosis debe ajustarse en pacientes con daño renal y, en ancianos o pacientes con hidratación límite debe asegurarse un buen flujo renal para evitar complicaciones como la cristalización de la droga al nivel tubular.

El uso prolongado de aciclovir puede llevar a la emergencia de resistencia de las cepas de HSV; esta resistencia es transitoria si se suspende el tratamiento, es decir, en un nuevo episodio de recurrencia de la enfermedad la cepa de HSV será nuevamente sensible al aciclovir.

En situaciones de fracaso al tratamiento con aciclovir o resistencia virológica documentada, el tratamiento de elección es el foscarnet. Esta droga actúa por inhibición de la DNA polimerasa viral. La biodisponibilidad oral es baja, por lo que su administración debe ser por la vía intravenosa. La excreción es preferentemente renal, de tal modo que las dosis deben ajustarse de acuerdo al *clearance* (eliminación) de creatinina. Los efectos tóxicos del foscarnet son a nivel renal, SNC (cefalea, irritabilidad, temblores y alucinaciones), y algunos trastornos digestivos como diarrea y vómitos en hasta un tercio de los casos.

Virus varicela-zóster (VZV) (herpesvirus humano 3)

Marcela Ferrés

1. INFECCIÓN AGUDA, LATENCIA Y REACTIVACIÓN

Este virus pertenece al género *Varicellovirus*. El genoma del virus varicela-zóster (VZV) es el más pequeño de todos los miembros de su familia y se compone de 70 genes que se expresan en su totalidad cuando la infección llega a su etapa de lisis celular. Los genes se agrupan en tres clases (al igual que el HSV, inmediato-tempranos, tempranos y tardíos), y son responsables de sintetizar proteínas que se van expresando en una cascada bien regulada. Entre las proteínas estructurales son de importancia las glicoproteínas que son capaces de estimular la respuesta inmune, siendo por lo tanto, de gran significación en el control y resolución de la infección.

El virus ingresa y egresa de las células infectadas a través del receptor catión-independiente para manosa-6 fosfato. Durante la infección aguda el VZV se disemina de dos maneras, por liberación de los viriones envueltos al espacio extracelular y por contigüidad de célula a célula. La primera modalidad de diseminación es la que ocurre en la erupción máculo-vesicular característica y la segunda, en la extensión de las lesiones cutáneas que se observan en pacientes inmunocomprometidos y que es mediada por los leucocitos infectados con VZV. Durante la varicela, el virus se disemina a través de la sangre (viremia), afectando la piel y con menor frecuencia otros órganos.

Durante la infección latente en las células neurales de los ganglios sensoriales, no hay expresión completa de todos los genes virales. A diferencia del HSV, el VZV no posee transcritos antisentido LAT, pero transcribe y traduce diversos genes en los ganglios sensoriales, tales como el que codifica la principal proteína transactivadora IE62 (de localización tegumentaria), la co-reguladora IE63, y los ORFs 4, 21, 29, 40 y 66.

Sin embargo, en la infección latente de células neurales (neuronales y gliales) existe un bloqueo de la expresión de los genes codificantes de las glicoproteínas de envoltura, comparado con lo observado en la infección lítica de las células de la epidermis o la dermis. A diferencia de lo observado habitualmente en la latencia por HSV, en la del VZV no se observan infiltrados linfocitarios en los sitios donde se alberga este último. Esta disimilitud podría atribuirse a las frecuencias relativas de las reactivaciones por HSV (muy frecuente) y del VZV (infrecuente).

Durante la recurrencia por VZV (episodio de herpes zóster) la información genética se expresa completamente hasta producir lisis de las células afectadas. El herpes zóster se asocia a una neuralgia post-herpética en individuos de edad avanzada y a una eventual diseminación a pulmones, hígado y cerebro en los inmunocomprometidos.

El VZV es el agente etiológico de la varicela o *peste de cristal*, que representa la manifestación clínica del primer contacto del hospedador con este virus. Luego de permanecer en forma latente en los ganglios sensitivos, alrededor de un 15% de los individuos reactivan la infección migrando el virus por vía axonal a la piel en una extensión dermatomal.

2. PUERTA DE ENTRADA Y DISEMINACIÓN

El virus ingresa por la vía aérea. Luego de un período de incubación de 2 a 3 semanas, durante el cual ocurre una primera viremia, el virus alcanza el tejido retículo endotelial. Una segunda viremia

ocurre después de 11 a 13 días alcanzando la piel y manifestándose con lesiones maculares y vesiculares generalizadas. En la etapa de infección latente el virus se encuentra en las raíces dorsales de los ganglios sensitivos desde donde migra a la piel cuando se produce la reactivación viral que promoverá la recurrencia de la enfermedad bajo la forma clínica del herpes zóster.

3. CUADROS CLÍNICOS

Varicela. La varicela es un cuadro exantemático vesicular generalizado acompañado de malestar general, fiebre moderada y prurito en las lesiones de la piel. Las lesiones vesiculares características de esta enfermedad evolucionan a pústulas al cabo de 12 horas y posteriormente a costras. Este ciclo se repite durante más o menos 3 a 5 días, momento en el que las últimas lesiones entran a la fase costrosa. El exantema es generalizado y rara vez pasa desapercibido, salvo cuando las lesiones son muy escasas y están ubicadas en sitios poco visibles como el cuero cabelludo. El cuadro clínico tiende a ser más grave en adolescentes y adultos. Las complicaciones asociadas a la varicela son principalmente las que se asocian a la sobre-infección bacteriana de las lesiones de la piel. Sin embargo, existen otras complicaciones que se ven con menor frecuencia como la ataxia, meningitis, artritis, trombocitopenia, hepatitis, neumonía y glomerulonefritis.

El comportamiento de la enfermedad en los pacientes con inmunosupresión se caracteriza por prolongación hasta tres veces de los ciclos eruptivos; existe fiebre alta y se ve con mayor frecuencia compromiso de órganos profundos (pulmón, hígado y SNC). La mortalidad asociada a esta forma grave de varicela es de 15 a 18%. Los fenómenos hemorrágicos son más frecuentes también en este grupo de riesgo.

Herpes zóster. Se manifiesta por lesiones vesiculares unilaterales dolorosas que siguen una distribución dermatomal generalmente torácica, cervical o facial trigeminal. Las vesículas se encuentran en alrededor de dos semanas y, en sujetos con gran compromiso de la inmunidad, pueden durar hasta 4 a 6 semanas. El dolor es el síntoma más importante en el herpes zóster y puede ser observado antes, durante o después de la aparición de las vesículas. Alrededor del 25 al 50% de los casos de adultos que desarrollan herpes zóster presentan neuralgia post-herpética; ésta se describe como un dolor punzante y perforante que puede durar meses. El tratamiento con antivirales sólo ha reducido el tiempo total de evolución de la enfermedad pero no ha bajado la frecuencia de episodios de herpes zóster. Dependiendo de los nervios comprometidos, se pueden afectar otros órganos como el globo ocular (queratitis, uveítis, iridociclitis, panoftalmítis) en el caso del compromiso de la rama oftálmica del trigémino. La reactivación viral en el ganglio geniculado del séptimo par y del octavo par craneano, produce el síndrome de Ramsay Hunt y se asocia con parálisis facial.

Varicela en el binomio madre-hijo. La infección durante el embarazo puede transmitirse al feto; la frecuencia es baja, oscilando entre 0,8 a 2% durante las primeras 20 semanas de gestación y puede manifestarse por malformaciones congénitas o muerte. La infección entre las 20 a 36 semanas raramente resulta en daño. Una infección materna que se haya transmitido al feto en gestación puede también manifestarse únicamente por herpes zóster en el niño

durante sus primeros años de vida. La historia natural de la varicela en embarazadas se caracteriza por complicaciones médicas y obstétricas: en un 10-15% de los casos la infección se complica con neumonía; un 10% presenta parto prematuro y la tasa de mortalidad materna es de 0-2%.

Cuando el exantema materno aparece entre los últimos cinco días del embarazo y dos días post-parto, la infección en el recién nacido es habitualmente grave. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son: neumonía difusa, hepatitis y meningo-encefalitis, con un 40% de mortalidad. La mayor gravedad de la infección se debe a que el recién nacido recibe directamente el virus en su sistema circulatorio, por la ruta transplacentaria, sin alcanzar a recibir pasivamente IgG materna específica a través de la misma vía.

El síndrome de varicela congénita se caracteriza por extensas lesiones cicatrizales cutáneas asociadas a hipoplasia de las extremidades y dedos rudimentarios, retraso del crecimiento intrauterino, daño del sistema nervioso central, microoftalmia, cataratas, coriorretinitis y atrofia muscular. Un 40% de los neonatos nacidos de madres que presentan la erupción vesicular durante las 3 últimas semanas del embarazo, desarrollan infección clínica al nacer o durante los primeros días de vida. Dado que durante el período prenatal alcanzan a recibir pasivamente anticuerpos maternos, la enfermedad evoluciona en forma similar a un lactante mayor.

4. DIAGNÓSTICO

Si bien el diagnóstico clínico de varicela o herpes zóster no ofrece dificultades, el diagnóstico virológico ofrece alternativas para su confirmación.

Los ensayos rápidos disponibles, como la detección de antígenos virales en muestras de raspado de la base de lesiones vesiculares y tinción con anticuerpos monoclonales unidos a fluoresceína, tiene una sensibilidad cercana al 90% y una especificidad de 100%. La calidad de la lesión (vesícula versus costra, por ejemplo) y una buena toma de la muestra son de extraordinaria importancia para tener el mejor rendimiento con este tipo de pruebas diagnósticas.

El aislamiento viral en células de cultivo como los fibroblastos humanos es una buena opción para recuperar el agente para fines de investigación o estudios de sensibilidad a antivirales, más que para diagnóstico. La visualización del efecto citopático acaece alrededor de la semana y puede aparecer hasta dentro de 3 semanas de la inoculación. El virus es lábil y el rendimiento global es del 36%. Éste puede ser mejorado si la inoculación se realiza en *shell vial* con posterior tinción con anticuerpos monoclonales a las 48-72 horas.

Las técnicas de biología molecular como la PCR han mejorado notoriamente el diagnóstico, de especial importancia en aquellos pacientes con infecciones del SNC y del ojo, en que los procedimientos invasivos para un diagnóstico etiológico presentan un mejor rendimiento. El otro gran beneficio del uso de PCR es que permite la identificación de cepas salvajes o de cepas vacunales de varicela-zóster.

El principal uso de la serología es la identificación de susceptibles entre aquellos que serán sometidos a inmunosupresión secundaria a trasplantes. Por ejemplo, las técnicas de detección de IgG específica más ampliamente usadas son las de ELISA o de inmunofluorescencia.

5. EPIDEMIOLOGÍA

La varicela es una infección extraordinariamente transmisible, con tasas de infección secundaria de hasta 90% entre los susceptibles

expuestos a un caso. La ruta de transmisión principal es la respiratoria. El período de incubación oscila entre 10 y 21 días y el de contagiosidad es de 2 días antes del exantema hasta que todas las lesiones estén en etapa de costra. En los países donde no se ha introducido de forma masiva la vacuna como herramienta de prevención de la enfermedad, la varicela es una afección de la infancia donde la mayoría de los casos ocurren antes de los 12 a 13 años.

El herpes zóster se puede manifestar a cualquier edad; sin embargo, la mayoría de los casos se concentra en la población después de los 60 años. Aproximadamente el 4% de los que presentan herpes zóster tienen un segundo episodio.

6. TRATAMIENTO

Tanto la varicela como el herpes zóster pueden ser tratados con aciclovir por la vía oral o intravenosa dependiendo de la gravedad de la enfermedad. El uso de una droga antiviral acorta el período de erupción vesicular y reduce el número de lesiones totales. La indicación de su uso, dentro de las primeras 24 horas de aparecidas las vesículas, es para los adolescentes, adultos y pacientes de alto riesgo. El herpes zóster además puede ser tratado con valaciclovir o famciclovir oral. Su inicio precoz asegura mejores resultados.

7. PREVENCIÓN

Inmunoglobulina hiperimmune (VZIG). Consiste en altas dosis de anticuerpos específicos para el virus varicela, que son administradas a individuos de alto riesgo expuestos a un caso de varicela, con el objeto de disminuir la gravedad de los síntomas al momento de enfermar.

Uso de antivirales profilácticos en días 7 a 14 post-exposición. Es una alternativa a usar en sujetos que pertenecen a grupos de alto riesgo que habiéndose expuesto al virus varicela-zóster, están fuera del plazo para recibir inmunoglobulina hiperimmune.

Vacuna. Es la única vacuna contra un virus de la familia herpes y consiste en un virus vivo atenuado. Es una vacuna segura para niños y adultos, con una eficacia de alrededor del 85% para prevenir toda forma de varicela pero entre 86 a 100% efectiva en la prevención de una varicela moderada a grave.

La protección de la vacuna contra enfermedad leve es menor, variable, y ya se han establecido algunos factores que aumentan el riesgo de fallas, tales como el tiempo entre la vacunación y el contacto con un caso de varicela (más de 3 a 5 años desde la vacunación implica mayor riesgo), vacunación a edad temprana (antes de 15 meses de edad), vacunación cercana a la vacuna trivirica (menos de 28 días entre ambas siendo la segunda vacuna la de varicela), uso de corticoesteroides orales en niños asmáticos (vacunación dentro de los 3 meses post-uso de corticoesteroides). Actualmente, está en discusión la necesidad de utilizar una dosis de refuerzo en los niños. El uso universal de la vacuna ha demostrado una elevada eficacia en reducir la morbilidad, mortalidad y hospitalizaciones por varicela. La inmunidad conferida por la vacuna parece ser duradera, pero debe seguir en evaluación en contextos epidemiológicos que serán cambiantes por su uso universal.

NOTA

Los capítulos 23.1, 23.2 y 23.3 se finalizaron en el año 2008.

Bibliografía (Capítulos 23.1, 23.2 y 23.3)

- Aberle SW, Puchhammer-Stockl E. "Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system". *J Clin Virol* 2002;25: S79-S85.
- Ashley RL, Wald A. "Genital herpes: review of the epidemic and potential use of type-specific serology". *Clin Microbiol Rev* 1999;12: 1-8.
- Benedetti JK, Zeh J, Corey L. "Clinical reactivation of genital herpes simplex virus infection decreases in frequency over time". *Ann Intern Med* 1999;131: 14-20.
- Brown ZA, Selke S, Zeh J, Kopelman J, Maslow A, Ashley RL, et al. "The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy". *N Engl J Med* 1997;337: 509-515.
- Brown ZA, Vontver LA, Benedetti J, Critchlow CW, Sells CJ, Berry S, et al. "Effects on infants of a first episode of genital herpes during pregnancy". *N Engl J Med* 1987; 317: 1246-51.
- Cohen J. "Varicella zoster virus". *Infect Dis Clin North Am* 1996; 457-68.
- DeBiasi RL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Weinberg A, Tyler KL. "Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system". *J Clin Virol* 2002; 25: S5-S11.
- Grose C. "Varicella vaccination of children in the United States: assessment after the first decade 1995-2005". *J Clin Virol* 2005; 33: 89-95.
- Hambleton S, Gershon AA. "Preventing varicella-zoster disease". *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 70-80.
- Katz VL, Kuller JA, McMahon MJ, Warren MA, Wells SR. "Varicella during pregnancy. Maternal and fetal effects". *West J Med* 1995; 163: 446-50.
- Kimberlin DW, Whitley RJ. "Neonatal herpes: what have we learned?" *Semin Pediatr Infect Dis* 2005; 16:7-16.
- Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. *Medical Microbiology*, 4th ed., Mosby, Inc. An imprint of Elsevier Science: St. Louis, Missouri, USA, 2002.
- Roberts SW, Cox SM, Dax J, Wendel GD Jr, Leveno KJ. "Genital herpes during pregnancy: no lesions, no cesarean". *Obstet Gynecol* 1995; 85: 261-4.
- Scott L. "Perinatal herpes: current status and obstetric management strategies". *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 827-32.
- Storch GA. *Essentials of Diagnostic Virology*. Chapter 3 and 6. 1st. Edition, Edited by GA Storch. Churchill Livingstone, USA, 2000.
- Vázquez M, LaRussa PS, Gershon AA, Nicolai LM, Muehlenbein CE, Steinberg SP, et al. "Effectiveness over time of varicella vaccine. *JAMA* 2004; 291:851-5.
- Whitley RJ, Kimberlin DW. "Herpes simplex: encephalitis in children and adolescents". *Semin Pediatr Infect Dis* 2005; 16: 17-23.
- Whitley RJ. "Changing dynamics of varicella zoster virus infection in the 21st century: the impact of vaccination". *J Infect Dis* 2005; 191: 1999-2001.

23.4

Citomegalovirus humano (herpesvirus humano 5 o HHV-5)

Guadalupe Carballal - Cristina M. Videla

INTRODUCCIÓN

La infección con el citomegalovirus humano (CMV) presenta una amplia distribución mundial y ocurre –en la mayoría de los individuos– durante las primeras dos décadas de la vida.

El nombre de este virus deriva de su particularidad de producir agrandamiento celular (citomegalia) con características inclusiones (inclusiones citomegálicas) en el núcleo celular de los tejidos infectados. Estas inclusiones se denominan *en ojo de búho* y se pueden observar con tinciones histológicas habituales (Figura 23.4.1).

Para distinguir el CMV humano de otros CMV que afectan a animales, es habitual en la literatura encontrar la abreviatura HCMV (*human CMV*). Dado que en este capítulo nos referiremos sólo al virus que afecta al ser humano (especie-específico) lo mencionaremos como CMV.

La transmisión del CMV requiere un contacto íntimo entre el individuo susceptible y otro que está eliminando el virus por secreciones orofaríngeas, genitales, leche u orina.

La primoinfección suele ser asintomática pero, a veces, puede presentarse con un cuadro similar al de la mononucleosis infecciosa o bien como hepatitis. Luego de la primoinfección, el sistema inmune principalmente mediante los linfocitos T (LT) citotóxicos, logra controlar la infección aunque no eliminarla. Una particularidad del CMV, al igual que todos los miembros de la familia *Herpesviridae*, es que desarrolla una infección persistente latente.

En la infección crónica persistente por CMV se elimina virus por la saliva y otras secreciones en forma intermitente y en bajos títulos, lo que puede suceder en individuos sanos inmunocompetentes y en total ausencia de enfermedad. Asimismo, los niños con infección congénita pueden eliminar este virus por orina durante meses.

La principal defensa contra el CMV es la inmunidad mediada por células, aunque los anticuerpos antivirales específicos también pueden modificar la enfermedad. Por ello, la disfunción del sistema inmune, en especial la disminución de linfocitos CD8⁺, favorece mayores niveles de replicación viral.

La inmunodepresión, ya sea fisiológica (embarazo) o adquirida por tratamiento con drogas inmunosupresoras o por infección con HIV/SIDA, conduce a menudo a la reactivación del CMV latente lo que produce replicación activa y eliminación prolongada del virus por secreciones. Esto puede asociarse o no con manifestaciones clínicas de enfermedad por CMV.

En la actualidad, los trasplantes de órganos son frecuentes y el impacto de la enfermedad por CMV –primoinfección o reactivación– en estos pacientes que reciben tratamientos con drogas inmunodepresoras es enorme. El CMV puede producir enfermedad diseminada que puede afectar pulmón (neumonitis intersticial), SNC (retinitis) y tracto gastrointestinal (ulceraciones graves). El desenlace puede ser fatal; por esta razón el CMV es considerado como una de las más importantes causas de morbi-mortalidad post-trasplante (Véase el Capítulo 45).

1. ESTRUCTURA

El CMV pertenece a la subfamilia *Betaherpesvirinae*, dentro de la familia *Herpesviridae*, y se clasifica como herpesvirus humano 5



Figura 23.4.1. Célula citomegálica. Se observa una inclusión de gran tamaño en el núcleo de una célula de un tejido infectado con citomegalovirus. Hematoxilina-eosina (100x).

(HHV-5). Posee la estructura típica de la familia y es indistinguible de otros miembros de la misma por microscopía electrónica. Las partículas tienen un diámetro de 180-200 nm y presentan un *core* denso, una cápside con simetría icosaédrica, un tegumento y una envoltura.

Se han descrito tres tipos de partículas virales: a) cuerpos densos (*dense bodies* – DB) que no contienen DNA viral y están compuestos mayoritariamente por la proteína de matriz pp65; b) partículas envueltas no infecciosas, morfológicamente indistinguibles de la partícula infecciosa pero que carecen de DNA viral y c) viriones, es decir, partículas completas e infectantes.

El genoma es a DNA de cadena doble con un tamaño de 245 000 bp, siendo uno de los más extensos y complejos genomas de los virus animales. Está constituido por dos fragmentos UL (*Unique long*) y US (*Unique short*) separados por secuencias repetidas e invertidas que permiten un ordenamiento genómico, que es clasificado como de tipo E en la familia *Herpesviridae*. Este ordenamiento permite distinguir cuatro formas genómicas isoméricas. Esos isómeros se deben a la inversión de los fragmentos L y S usando de pivote las secuencias repetidas e invertidas ubicadas en sus extremos terminales y en la unión L-S. También en el virión se encuentran dos clases de RNA, uno está empaquetado con el DNA y el otro se encuentra en el tegumento. Se ha secuenciado completamente la cepa AD169 del CMV. Posee alrededor 225 marcos abiertos de lectura (*ORF*), de los que al menos 46 son imprescindibles para que el virus pueda replicar *in vitro*.

El DNA está contenido en una nucleocápside icosaédrica compuesta por 162 capsómeros de forma hexagonal. Las principales proteínas son: la proteína principal de la cápside (UL86); la proteína menor de la cápside (UL85); la proteína del ensamble (UL80) y la proteína pequeña de la cápside (UL48/49).

Por fuera de la cápside, se encuentra el tegumento o matriz formado por alrededor de 25 proteínas, muchas de ellas fosforiladas. Las principales son pp65, pp71 y pp150. La pp65 y la pp150 son altamente inmunogénicas y constituyen alrededor del 20% de las proteínas de la matriz.

Rodeando al tegumento se encuentra la envoltura lipoproteica de origen celular y en la que se encuentran insertas 6 glicoproteínas: gpL, gN, gO, gH, gM y gB. Asimismo, estas proteínas se

asocian entre sí formando complejos proteicos. La glicoproteína B (gpUL55) es la más abundante, seguida por la glicoproteína H (gpUL75) y ambas cumplen un papel importante en la entrada del virus a la célula y contra ellas se producen anticuerpos neutralizantes.

Como la mayoría de los virus envueltos, el CMV es muy lábil al calor y es inactivado rápidamente por solventes lipídicos y por la desecación. Por ello, se requiere un contacto íntimo para la transmisión de este virus.

Se han descrito genotipos de CMV mediante el estudio de los genes gp UL55 y UL73, que codifican para las glicoproteínas de envoltura gB y gN, respectivamente. Para la gB hay al menos 4 genotipos (gB-1 a gB-4) y para gN, 7 genotipos (gN-1 a gN-4 a,b,c).

En la actualidad se están realizando estudios para correlacionar estos polimorfismos con el tropismo celular, la latencia y la patogénesis del CMV.

2. REPLICACIÓN

Los betaherpesvirus poseen un rango restringido de hospedadores; su replicación es lenta en cultivo celular, produciendo las características células citomegálicas.

La replicación ocurre en el núcleo celular y la transcripción es regulada por genes alfa o inmediato-tempranos, beta o tempranos y gamma o tardíos, algunos de los cuales son compartidos con el virus herpes simplex. La replicación se caracteriza por la transcripción de estos tres tipos de genes en forma secuencial. La expresión de los genes alfa o inmediato-tempranos ocurre cuando el virus entra a la célula y son requisito para que luego se expresen los genes beta y, por último, los gamma.

La expresión de los genes IE (alfa o inmediato-tempranos) está bajo el control del MIEP (*major immediate early promoter*), una región del genoma viral muy compleja a la que se unirían una serie de factores transcripcionales celulares que juntos actuarían reprimiendo o activando su expresión. Las principales proteínas codificadas por la región IE son las correspondientes a los genes IE72 y la IE86, y actúan sinérgicamente para la activación de los genes tempranos y tardíos. Asimismo, IE86 actúa al nivel de la transcripción celular y del ciclo celular.

La expresión de algunos genes del CMV interfiere con la respuesta inmune del hospedador, por ejemplo, sintetizando proteínas que bloquean la presentación antigénica en el complejo mayor de

histocompatibilidad de clase I CMH-I a los LT citotóxicos, y otras proteínas que interfieren con la respuesta de quimioquinas (*Véase el Capítulo 8*).

3. PATOGENIA

El ser humano es el único reservorio del CMV. La replicación de este virus ocurre en fibroblastos, macrófagos, células epiteliales del riñón, hígado, glándulas salivales, pulmón, tracto digestivo incluyendo hígado y páncreas, así como también células endoteliales y trofoblasto. La replicación en macrófagos y células endoteliales son un factor importante en la infección aguda y contribuyen a la diseminación del virus. Los mecanismos patogénicos propuestos son: acción citopática directa, daño tisular mediado por el sistema inmune e interferencia con la respuesta inmune.

El CMV se mantiene en estado latente, por persistencia del genoma viral sin producción de virus infeccioso pero, ante ciertos estímulos, puede reactivarse y desarrollar una infección crónica con baja producción viral que es controlada especialmente por LT citotóxicos CD8+. Si la inmunidad del hospedador se encuentra disminuida habrá una mayor producción de viriones y más diseminación a diferentes órganos, lo que puede conducir a enfermedad.

Las células en las que el CMV realiza latencia han sido un tema extensamente estudiado. Existen evidencias *in vitro* e *in vivo* que demuestran que este virus establece latencia, pero no replica activamente, en células progenitoras mieloides CD34+ en la médula ósea.

Cuando estas células maduran a macrófagos o células dendríticas desarrollan una infección activa (con replicación viral) y llevan el virus a distintos órganos (Figura 23.4.2).

La diferenciación de los monocitos a macrófagos maduros sería una condición importante para pasar de la latencia a una infección productiva. El DNA viral se mantendría en el núcleo de estas células en forma episomal (DNA circular). Sin embargo, se desconoce si el CMV podría estar asociado al DNA celular como ocurre con el virus Epstein-Barr.

También se ha sugerido que el CMV podría establecer latencia o infección crónica en bajo grado en células endoteliales y epiteliales.

No se conocen los mecanismos de daño fetal pero se postula que el virus infecta a las células endoteliales maternas que se diseminan al citotrofoblasto, y luego pasan a la placenta y a la circulación fetal. En la actualidad, se están estudiando cuáles son los niveles de carga viral asociados a mayor infección fetal.

3.1 CONTROL DEL CMV POR EL SISTEMA INMUNE

La primoinfección con CMV induce una respuesta inmune adaptativa y tanto los LT como los anticuerpos neutralizantes permiten controlar la diseminación del virus en el organismo y disminuir la carga viral en sangre y en secreciones. Sin embargo, a pesar de una respuesta inmune adecuada, el hospedador no es capaz de eliminar al CMV ya que éste establece mecanismos de latencia y cronicidad.

Los anticuerpos son muy importantes en la protección de neonatos y se ha demostrado que la probabilidad de transmisión al feto es mayor si la respuesta de anticuerpos materna es de baja afinidad y de pobre capacidad neutralizante. Estudios realizados en 2005 han demostrado que el tratamiento de las embarazadas con gammaglobulina específica contra CMV puede disminuir el riesgo de transmisión congénita y de enfermedad.

En pacientes con trasplantes, el importante rol de los anticuerpos es bien conocido, ya que la primoinfección por CMV es más frecuente y grave en los pacientes sero-negativos que reciben un órgano sero-positivo.

La inmunidad mediada por células es esencial para evitar la diseminación viral a diversos órganos. Durante las etapas iniciales de la infección, los mecanismos de inmunidad innata como las células NK (*natural killer*) son una fuente de interferón gamma, que facilita la expansión de LT ayudadores (*helper*) antígeno específicos. El número de LT CD8+ específicos aumenta mucho; estas células

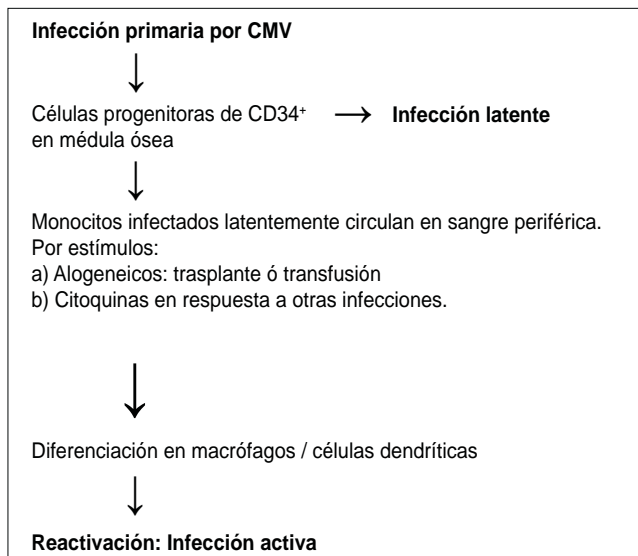


Figura 23.4.2. Mecanismo de latencia/reactivación de citomegalovirus. Adaptado de Sinclair J, P Sissons. "Latency and reactivation of human cytomegalovirus". *J Gen Virol*. 2006;87:1763-79. Review.

reconocen péptidos de la proteína pp65 y de muchas otras proteínas virales. La glicoproteína B y otras de envoltura son los blancos de los anticuerpos neutralizantes y también son reconocidas por las células T.

Anteriormente, se postulaba el importante rol de los CD8⁺ en el reconocimiento de los antígenos virales en el contexto del CMH-I. En la actualidad, se demostró que los CD4⁺ también son importantes en el control de la infección por este virus.

La evidencia del papel de los CD8⁺ resultó de un estudio trasfudicial, publicado en *Science* en 1992, en el que se transfundieron CD8⁺ específicos del donante a pacientes receptores de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, lo que resultó en protección contra la enfermedad por CMV.

3.2 MECANISMOS DE INTERFERENCIA CON LA RESPUESTA INMUNE

Además de la destrucción celular producida por la activa replicación lítica del CMV, algunos genes virales bloquean la apoptosis, otros interfieren con la expresión de moléculas de reconocimiento inmune y HLA en la superficie de las células para así evitar la lisis por células NK o citotóxicas; también pueden inhibir los efectos antivirales de los interferones.

Muchas proteínas codificadas en el genoma del CMV interfieren con la presentación antigénica del CMH-I, produciendo una regulación negativa (*down regulation*) de la expresión de ese complejo en la superficie celular, una alteración del procesamiento antigénico y otros mecanismos.

Algunos ejemplos de estos mecanismos son los siguientes: los productos del gen US3 se unen a moléculas del CMH-I y las retienen en el retículo endoplásmico; los productos del gen US2 y US 11 reciclan estas moléculas al citoplasma luego de su síntesis y son degradadas en los proteosomas; US6 se une a TAP e impide el transporte de péptidos al lumen del retículo endoplásmico; UL83 fosforila una proteína temprana de CMV que constituye un epítipo importante para los LT y así impide la presentación de ese epítipo; UL 18 es homólogo a una molécula de clase I, y se une a la beta 2 microglobulina e interfiere con la función de los monocitos (véase el Capítulo 8).

4. VÍAS DE INFECCIÓN

La infección por CMV puede adquirirse por vía horizontal (la más frecuente), o por vía vertical (transplacentaria o perinatal), siendo este virus una de las causas más frecuentes de infección congénita.

En individuos con replicación activa el CMV está presente en la sangre y se elimina por numerosas secreciones (faríngeas, semen, cervicales –cuello de útero–, leche, saliva, lágrimas y orina) (Tabla 23.4.1).

La presencia del virus en secreciones faríngeas constituye la forma más importante de transmisión horizontal, seguida de la transmisión por vía sexual. El CMV presente en sangre y órganos permite su transmisión por transfusiones o por el órgano trasplantado (Tabla 23.4.1).

5. CUADROS CLÍNICOS

5.1 EN INMUNOCOMPETENTES

La primoinfección con CMV se adquiere habitualmente en la primera infancia por contacto con secreciones faríngeas infectadas. En individuos inmunocompetentes la primoinfección es, por lo general, asintomática o subclínica. Ocasionalmente, puede producir un cuadro similar a la mononucleosis infecciosa (*mononucleosis-símil*) o una hepatitis aguda. Estos cuadros se podrán diagnosticar por la detección de Ig M específica anti-CMV, en ausencia de marcadores serológicos de infección por virus Epstein-Barr en el primer caso, o por la serología negativa para marcadores de hepatitis A, B o C (Tabla 23.4.2).

Luego de la infección se inducen anticuerpos específicos anti-CMV, inicialmente de tipo Ig M y luego de tipo Ig G; estos últimos perduran de por vida. Se producen anticuerpos neutralizantes, aunque no se ha definido con exactitud cuál es la glicoproteína de mayor importancia en la inducción de anticuerpos protectores. Los linfocitos citotóxicos específicos contra la pp 65 (proteína de tegumento) son de fundamental importancia en la limitación de la infección.

5.2 EN INMUNOCOMPROMETIDOS

En pacientes con trasplantes de órganos sólidos o de médula ósea o en aquellos con HIV/SIDA la enfermedad diseminada por CMV constituye la mayor causa de morbilidad y mortalidad. En los pacientes con trasplantes la enfermedad puede estar asociada al rechazo del órgano trasplantado. De allí la importancia de los nuevos ensayos de diagnóstico virológico rápido, desarrollados en los últimos años, para detectar infección activa en estos pacientes, lo que permite instituir en forma precoz el tratamiento con ganciclovir u otros antivirales específicos (véase el Capítulo 45).

La infección activa puede ser el resultado de la reactivación del virus latente endógeno o de la adquisición de un virus exógeno por el órgano recibido o por transfusiones.

En pacientes con trasplante renal, la infección activa por CMV ocurre en el 40 a 70% de los casos, en especial durante el primer trimestre postrasplante.

Los cuadros clínicos más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos son: neumonitis, enfermedad febril debilitante, esofagitis, colitis, hepatitis retinitis o encefalitis. En pacientes con HIV/SIDA seropositivos para CMV, la retinitis es la manifestación más frecuente y ocurre en el 45% de los casos cuando los CD4 son menores de 50/mm³ (véase el Capítulo 45).

Los factores de riesgo que influyen en la morbimortalidad por CMV en los pacientes trasplantados son: 1) el estado serológico del receptor previo al trasplante; 2) la serología del donante; 3) el nivel, tipo y duración de la inmunosupresión; 4) el tipo de trasplante. La enfermedad es más frecuente y grave en receptores seronegativos de órganos de donante seropositivo. El riesgo es mayor en trasplantes de médula ósea y en los multiorgánicos.



Horizontal	
• Vía faríngea	Niño a adulto
	Adulto a niño
• Vía sexual	
• Transfusiones o trasplantes	
Vertical	
• Transplacentaria	Congénita
• Perinatal	Canal de parto
	Leche, secreciones faríngeas

Tabla 23.4.1. Transmisión del citomegalovirus.

En inmunocompetentes:	<ul style="list-style-type: none"> • Asintomático • Síndrome símil mononucleosis • Hepatitis
En inmunocomprometidos:	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome sistémico • Neumonitis intersticial • Hepatitis • Encefalitis • Coriorretinitis • Enfermedad gastrointestinal

Tabla 23.4.2. Citomegalovirus: cuadros clínicos.

Se denomina **infección primaria** a la que adquiere un receptor seronegativo para CMV al recibir un órgano de donante seropositivo. La fuente de infección es el órgano trasplantado o las transfusiones sanguíneas.

Se denomina **infección secundaria** a la que adquiere un receptor seropositivo para CMV. En este caso, la infección puede ser consecuencia de la reactivación de su cepa endógena o bien de la sobreinfección con la cepa presente en el trasplante. La infección por CMV en pacientes inmunocomprometidos y el tratamiento se consignan en detalle en el capítulo 45.

5.3 INFECCIÓN CONGÉNITA

En EE.UU. se detecta infección congénita por CMV en el 0,5 al 2,5% de todos los nacidos vivos. Cada año nacen 40 000 niños con infección congénita por CMV en ese país. Para Argentina existen escasos datos publicados.

En aquellos países o áreas con alto nivel socioeconómico y adecuados hábitos de higiene hasta el 50% de las mujeres en edad fértil pueden ser susceptibles al virus, ya que no adquirieron la primoinfección durante la infancia.

Por el contrario, en países en vías de desarrollo o en áreas de bajo nivel socioeconómico e inadecuados niveles de higiene, sólo el 15% de las mujeres en edad fértil serán susceptibles.

La infección congénita es más frecuente cuando una madre seronegativa adquiere la primoinfección con CMV durante el embarazo. La transmisión intrauterina ocurre aproximadamente en 30-40% de las embarazadas con primoinfección por CMV, debido a la viremia materna. Por el contrario, la infección congénita por reactivación del CMV latente durante el embarazo es poco frecuente (< 1%) y menos grave (Tablas 23.4.3, 23.4.4 y 23.4.5).

El 10% de los niños infectados presentan al nacer un cuadro característico de *enfermedad de inclusión citomegálica* y de éstos el 10-20% muere. La enfermedad de inclusión citomegálica se caracteriza por: hepatoesplenomegalia, bajo peso al nacer, plaquetopenia y daño al SNC como hidrocefalia o microcefalia y/o calcificaciones cerebrales, convulsiones, sordera, retardo psicomotor, y más raramente miopatía y coriorretinitis (Tabla 23.4.5).

Sin embargo, sólo el 5-10% de los niños infectados presentan los síntomas clásicos de enfermedad por CMV al nacimiento. Son más frecuentes las manifestaciones tardías de la infección congénita que se presentan en edad preescolar o escolar (sordera, coriorretinitis, alteraciones en la dentición o retardo mental). En estos casos el diagnóstico etiológico es difícil si no se ha documentado la existencia de Ig M específica en las primeras semanas del nacimiento. El CMV es la primera causa de retardo mental en países desarrollados, pero se carece de datos publicados para Argentina.

6. DIAGNÓSTICO

Cabe destacar que es imposible adscribir la etiología de la enfermedad producida por CMV mediante el mero examen clínico. Para un diagnóstico de certeza resulta imprescindible el diagnóstico virológico.

El éxito de la prevención de la enfermedad luego de los trasplantes, así como los avances en el tratamiento precoz de la enfermedad, se pueden atribuir al desarrollo extraordinario de nuevos ensayos de diagnóstico virológico, altamente sensibles y específicos (Tablas 23.4.6 y 23.4.7).

6.1 SEROLOGÍA

La respuesta humoral a la infección por CMV induce la producción de anticuerpos específicos. La Ig M específica se detecta a las 2-4 semanas luego de la primoinfección y la Ig G aparece posteriormente.

Ante la sospecha de primoinfección, la detección de Ig M anti-CMV o la seroconversión para Ig G en muestras pareadas permite afirmar un diagnóstico de infección reciente. Asimismo, la detección de Ig M específica anti-CMV en sangre de cordón diagnostica una infección congénita.

La detección de Ig G específica anti-CMV en una única muestra de suero permite realizar solamente diagnóstico de *estado inmune*, que suele deberse a una infección pasada. Es muy importante detectar el estado inmune como control antes del embarazo y en los estudios pretrasplante.

En pacientes inmunocomprometidos (trasplantados, HIV/SIDA), la serología tiene un valor limitado dada la inmunosupresión, y además no permite diferenciar claramente la infección latente de la infección activa, excepto en el caso de detectar Ig M específica, que puede elevarse o no en las reactivaciones.

A pesar de ese inconveniente, la serología continúa siendo una parte integral del manejo clínico de los pacientes candidatos a trasplante ya que permite identificar a donantes y receptores previamente infectados. Esto es fundamental durante la evaluación inicial de los pacientes para determinar su riesgo de infección y/o enfermedad postrasplante.

Las técnicas serológicas actuales son: diversos ensayos de inmunoenzimas comerciales (ELISA o MEIA) o la inmunofluorescencia (IFI). Cuando se realiza detección de Ig M específica es necesario descartar la presencia de factores reumatoideos, que pueden dar falsos resultados positivos (*véase el capítulo 9 Diagnóstico Viroológico*).

La detección de Ig M específica en el suero de una mujer embarazada con Ig G positiva puede deberse a una infección primaria o también a una reactivación. Para poder diferenciar entre una infección pasada de una reciente se recurre a determinar la avidéz de la Ig G anti-CMV. La avidéz es baja en las primeras semanas o meses después de la primoinfección, mientras que es alta en las infecciones pasadas o no primarias. Para el ensayo de avidéz se utiliza la técnica de ELISA con una modificación, luego de la adición del suero a los pocillos con el antígeno de CMV, y antes del agregado del conjugado se trata con agentes como urea que rompen los enlaces antígeno-anticuerpo débiles. Los niveles de avidéz se expresan como porcentaje de la Ig G unida al antígeno antes y después del tratamiento con urea.

6.2 MÉTODOS DIRECTOS

6.2.1 Histopatología

Fue el primer ensayo utilizado para diagnóstico de CMV. En cortes histológicos de tejidos obtenidos por biopsia o autopsia se pueden observar las características inclusiones –denominadas *en ojo de búho*– (Figura 23.4.1) mediante tinciones histológicas habituales, aunque la sensibilidad de este ensayo es baja debido a la distribución, a veces focal, de las lesiones.

Estas células con inclusiones pueden observarse en numerosos tejidos como riñón, pulmón, tracto gastrointestinal, glándulas salivales, siendo menos frecuentes en cerebro. El empleo de técnicas inmunohistoquímicas permite confirmar los hallazgos.

• Por primoinfección materna (más frecuente)
• Por reactivación del virus latente (menos frecuente)
• Ocurre en el 0,5 al 2,5% de todos los nacidos vivos en EE.UU.
• 5 al 10% presenta al nacimiento enfermedad de inclusión citomegálica
• 5 al 20% tendrá manifestaciones tardías (visuales, auditivas, alteraciones neuromusculares o retardo mental)

Tabla 23.4.3. Frecuencia de la infección congénita por citomegalovirus.

La citología sobre muestras como lavado bronquio-alveolar también permite detectar células con inclusiones aunque la sensibilidad de esta técnica es menor a la del cultivo.

6.2.2 Aislamiento en cultivo celular (Figura 23.4.3)

El aislamiento en cultivo es un procedimiento clásico de diagnóstico. Se puede realizar en tubos conteniendo cultivos primarios de fibroblastos humanos, habitualmente de prepucio humano o en células diploides como MRC-5 ó WI-38. En estas células el CMV desarrolla lentamente exhibiendo una ACP característica (Figura 23.4.3). La ACP se distribuye en forma focal en los cultivos y se presenta como racimos de células redondeadas refringentes. Luego, se debe realizar la identificación del aislamiento del CMV por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales para detectar antígenos en las células infectadas.

Las muestras pueden ser: sangre, leucocitos de sangre periférica, orina, líquido amniótico, hisopados faríngeos o de cuello uterino, semen, biopsias, etc.

Luego del procesamiento de las muestras para su descontaminación (véase el capítulo 9 *Diagnóstico virológico*) éstas son inoculadas en tubos que contienen las células susceptibles. Estos tubos se mantienen en estufa a 37°C, se les cambia el medio nutritivo cada 2 ó 3 días y se inspeccionan diariamente al microscopio invertido para detectar la aparición de la ACP. La ACP aparece generalmente en 1-2 semanas de incubación, pero puede demorar hasta 1 mes.

Un cultivo positivo para CMV es diagnóstico inequívoco de infección activa pero no es diagnóstico de enfermedad en muestras como orina o saliva, ya que puede existir eliminación viral asintomática. Un cultivo positivo a partir de sangre se asocia fuertemente a enfermedad, aunque los pacientes inmunocomprometidos pueden presentar viremia por CMV asintomática.

Ventajas

El aislamiento en cultivo es el procedimiento patrón (*gold standard*) que permite recuperar la cepa viral, lo que es importante en caso de ser necesario el estudio de su sensibilidad a las drogas antivirales.

Desventajas

Su alto costo y su complejidad, debido a la necesidad de contar con la infraestructura para cultivos celulares, y el largo tiempo de espera del resultado para el desarrollo de la ACP. Por ello, no pueden descartarse los cultivos como negativos hasta los 30 días posinoculación. Otra desventaja es la gran labilidad del CMV a temperatura ambiente; por esta razón el transporte al laboratorio debe ser rápido y realizarse a 4°C para evitar la inactivación térmica del virus.

6.2.3 Aislamiento en cultivo rápido (*shell vial*) (Figura 23.4.4)

Un avance muy importante para el aislamiento del CMV (y de muchos otros virus) fue el desarrollo del cultivo rápido o *shell vial*, que permite un diagnóstico rápido a las 24 ó 48 h. de obtenida la muestra. Es considerado el otro procedimiento patrón para CMV.

Este procedimiento combina el aislamiento en cultivo con la detección de antígenos por IF. Pueden emplearse las mismas muestras que en el procedimiento clásico.

Los pasos esenciales de esta técnica son: a) la inoculación de la muestra en cultivo de fibroblastos crecidos en portaobjetos redondos en el fondo de un tubo; b) la centrifugación

de la muestra a baja velocidad sobre las células para aumentar la adsorción del virus a los fibroblastos; y c) la tinción por inmunofluorescencia (IF) con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos tempranos (*immediate early antigens*) que el CMV expresa en el núcleo de las células infectadas pocas horas después de la infección y antes de la aparición de la ACP.

Ventajas

La rapidez en la obtención del resultado, que está disponible en 24 ó 48 h.

Desventajas

Requiere virus viable, por lo que el envío de las muestras debe realizarse rápidamente para evitar la inactivación térmica del virus. Es de realización muy laboriosa y la lectura al microscopio de IF lleva mucho tiempo.

6.2.4 Detección de antígenos

La detección directa de antígenos virales (p 72) por IF en orina, lavado broncoalveolar, líquido amniótico o biopsias es un ensayo rápido, pero su sensibilidad baja, menor del 70% respecto del aislamiento en cultivo y mucho menor que la de las técnicas moleculares.

Antigenemia pp65 (Figura 23.4.5)

Su detección revolucionó el diagnóstico de CMV ya que la misma indica infección activa y se asocia significativamente con enfermedad. Además, permite cuantificar el virus en forma rápida, lo que provee una medida de la intensidad de la infección y es, por ello, un equivalente a la carga viral.

El fundamento del procedimiento es la detección del antígeno denominado pp65 en los leucocitos de sangre periférica. Este antígeno es una fosfoproteína de matriz del CMV (proteína estructural de 65 kDa del CMV) que se acumula en el núcleo de los polimorfonucleares dando una imagen muy característica en las tinciones por inmunoperoxidasa o por IF con anticuerpos monoclonales específicos, siendo esta última la más sensible. Existen reactivos comerciales conteniendo anticuerpos monoclonales de los cuales varios tienen la aprobación de la FDA (*Food and Drug Administration*, EE.UU.). Puede ser cualitativa o cuantitativa.

El nivel de viremia se determina contando el número de células que exhiben el antígeno pp65 en la preparación sobre 200 000 leucocitos examinados. Los niveles clínicamente relevantes del número de células positivas difiere en las distintas poblaciones de pacientes. En pacientes con trasplantes de órgano sólido más de 10 células positivas/200 000 examinadas sugieren la necesidad de la terapia preventiva, mientras que en los pacientes con trasplante de médula ósea, la presencia de más de 1 ó 2 células indica necesidad de tratamiento.

Ventajas

No requiere cultivos celulares. Tiene una sensibilidad y especificidad mayores a las del cultivo y, además, presenta la ventaja de que puede ser cuantitativo, por lo que es un equivalente de la *carga viral*. El diagnóstico puede realizarse en 6-8 h. por lo que el resultado estará disponible en el día.

Madre con:	
Serología positiva	Serología negativa
Inmune	Susceptible
<ul style="list-style-type: none"> • Puede transmitir el virus por reactivación del virus latente • Riesgo de transmisión: < 10% • Enfermedad aparente del recién nacido o secuelas: 0-1% 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede transmitir el virus por la viremia durante la primoinfección 30-40% 10% con clínica compatible 90% asintomáticos

Tabla 23.4.4. Riesgo de transmisión del citomegalovirus durante el embarazo según el estado serológico materno.

Infección congénita
1) Recién nacido sintomático: enfermedad de inclusión citomegálica: Hepatoesplenomegalia, exantema petequial, bajo peso, transaminasas aumentadas, plaquetopenia, púrpura, ictericia, anemia. En SNC: hidro o microcefalia, calcificaciones cerebrales. Complicaciones tardías: sordera, retardo mental, coriorretinitis, defectos en la dentición
2) Recién nacido asintomático Sordera (trastorno más frecuente), alteraciones en la dentición
Infección perinatal
Habitualmente asintomática

Tabla 23.4.5. Infección congénita y perinatal por citomegalovirus: cuadros clínicos.

Métodos directos
Ensayos clásicos
Histología: en tejidos obtenidos por autopsia o biopsia: inclusiones intranucleares en ojo de búho.
Cultivo celular: aislamiento en fibroblastos de prepucio humano (cultivo primario) o MRC-5.
Ensayos rápidos
Detección directa de antígenos: En sangre: antigenemia pp 65 (equivale a la carga viral) En otras muestras: orina, LBA, líquido amniótico, biopsia, autopsia: antígeno p 72
Cultivo rápido (<i>shell vial</i>): Aislamiento más identificación de antígenos tempranos a las 24 y 48 h. Muestras: sangre (viremia), orina (viruria), otras muestras
Ensayos moleculares
PCR directa para DNA, cuali o cuantitativa, con o sin hibridación RT-PCR para RNAm PCR en tiempo real: carga viral Hibridación <i>in situ</i> en muestras tisulares
Métodos indirectos o serológicos
Seroconversión para Ig G en muestras pareadas Ig M específica (suero de adultos o de recién nacidos obtenido por cordocentesis) Ensayo de avididad para Ig G

Tabla 23.4.6. Diagnóstico de citomegalovirus.

La antigenemia pp65 es de gran utilidad en el seguimiento de los pacientes con trasplantes para el diagnóstico rápido de infección activa por CMV, lo que indicará la necesidad del tratamiento antiviral específico.

Desventajas

El transporte debe ser rápido y la muestra debe procesarse antes de las 24 h. para evitar la degradación del antígeno. Este procedimiento puede aplicarse solamente a muestras de sangre. Es de procesamiento laborioso, ya que requiere la separación de los

leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica, su recuento y dilución para obtener una suspensión con 200 000 células, la citocentrifugación y la fijación de las mismas en un portaobjetos. Luego, se realiza la tinción de IF. La lectura y recuento de las células que presentan el antígeno pp65 debe realizarse por un observador entrenado y lleva mucho tiempo. Además, se requiere un buen microscopio de IF.

En los pacientes neutropénicos no siempre es posible obtener la cantidad de células necesarias para una preparación adecuada.

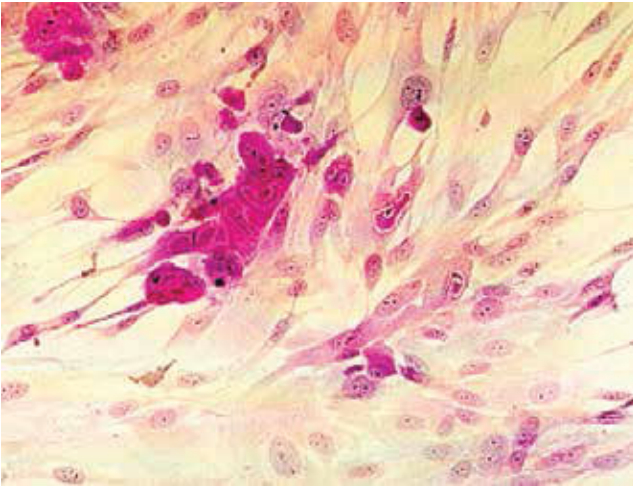


Figura 23.4.3. Acción citopática del citomegalovirus. Cultivo de fibroblastos de prepucio humano. Se observan focos de células redondeadas y refringentes con grandes inclusiones intranucleares.

6.2.5 Ensayos moleculares. (Figura 23.4.6)

Las técnicas moleculares son de elección en la actualidad ya que presentan alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de CMV.

6.2.5.1 PCR para diferentes genes.

Se pueden amplificar distintos fragmentos de genes tardíos (UL 83) que codifican para la pp65 (fosfoproteína de matriz), genes tempranos (UL 123) que codifican para la p 72 (proteína temprana del IE 1 *immediate early 1*), segmentos de genes que codifican para la envoltura (UL 55), y otros. En todos los casos, el fragmento por amplificar deberá ser altamente conservado y con una baja tasa de mutación.

Para aumentar la sensibilidad también se ha utilizado PCRs que amplifican dos regiones genómicas de la región temprana y tardía; esta estrategia permite detectar distintas cepas circulantes. Otra forma de aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo molecular es la utilización de formatos de PCR anidada (*Nested PCR*).

La PCR se ha utilizado con éxito para la detección de DNA de CMV en una amplia variedad de muestras clínicas de pacientes trasplantados, pacientes con SIDA, en niños con infección congénita y también para el seguimiento de pacientes inmunocomprometidos y en la evaluación de la terapia antiviral. Sin embargo, el

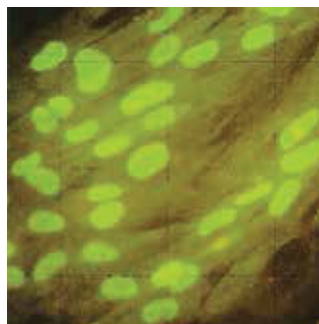
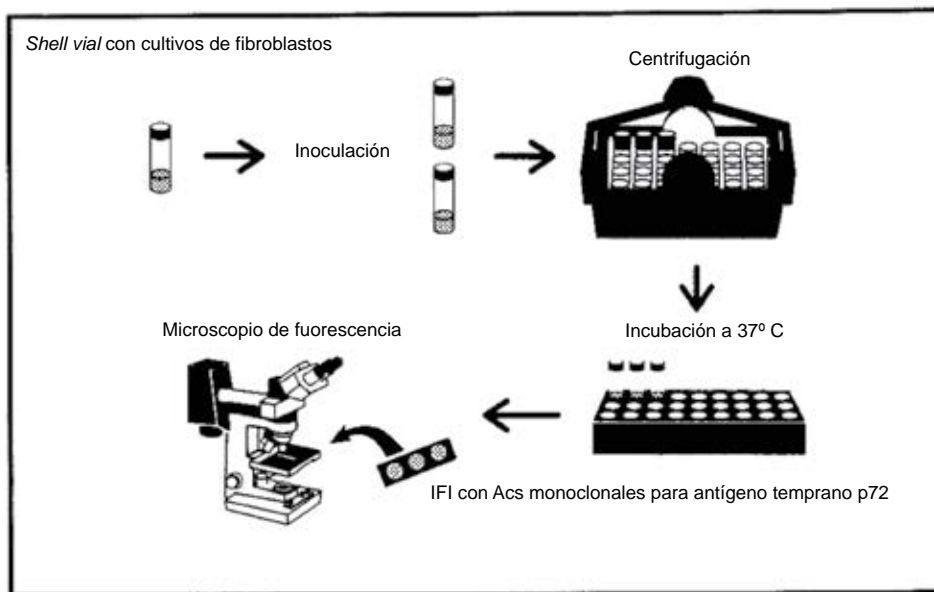


Figura 23.4.4. Cultivo rápido de citomegalovirus (shell vial): detección de antígeno temprano p72 de CMV. En el esquema superior se muestra el procesamiento del aislamiento de citomegalovirus en cultivo rápido (*shell vial*). La figura inferior muestra la detección de antígeno temprano p72 por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales en el núcleo de los fibroblastos humanos infectados a las 48 horas post-infección.

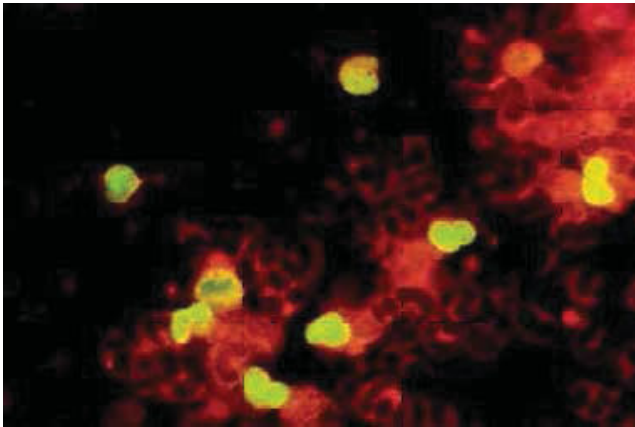


Figura 23.4.5. Antigenemia pp65. Se observa el antígeno pp65 en núcleos de polimorfonucleares de sangre periférica. Tinción por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales.

principal inconveniente proviene de su gran sensibilidad, ya que no permite distinguir entre enfermedad activa e infección asintomática o latencia. La viremia por CMV se considera el mejor marcador de enfermedad por CMV. Diferentes estudios han reportado la detección de DNA de CMV tanto en sangre entera, leucocitos de sangre periférica, plasma y suero por PCR cualitativa.

En el seguimiento de pacientes luego del trasplante, la detección de DNA de CMV en leucocitos de sangre periférica se positiviza muy tempranamente, precediendo en una semana a la detección de antigenemia y al aislamiento en cultivo rápido. Por ello, es de gran utilidad para el diagnóstico rápido de infección. Sin embargo, como consecuencia de esta elevada sensibilidad, una vez instaurado el tratamiento con antivirales puede continuar siendo positiva aun cuando la replicación de CMV haya disminuido o cesado debido al tratamiento antiviral (antigenemia pp 65 y viremia

negativas). Por lo tanto, la PCR directa **cualitativa** no sería útil en el seguimiento de la terapia antiviral postrasplante y en este caso cobra importancia la determinación de la carga viral por PCR cuantitativa o por PCR en tiempo real.

La PCR **cualitativa** es de utilidad en determinados cuadros clínicos, tales como la detección de CMV en LCR en pacientes con encefalitis o polirradiculomielitis, en orina, biopsias, líquido amniótico, o sangre fetal en las infecciones congénitas, en el humor vítreo o acuoso en pacientes con retinitis, y en la sangre de pacientes con alto riesgo de contraer una infección primaria por CMV, como en el caso de los trasplantados receptor negativo y donante positivo.

La medición de los niveles de DNA en sangre es necesaria para predecir y diagnosticar enfermedad por CMV y luego realizar el seguimiento del tratamiento antiviral. La carga viral se puede determinar por diferentes ensayos cuantitativos y semicuantitativos artesanales y comerciales.

6.2.5.2 Ensayos moleculares cuantitativos. Carga Viral.

Se han realizado estudios comparando la carga viral determinada por antigenemia y por los diferentes ensayos moleculares cuantitativos. Se observó que estos últimos proveen resultados cuantitativos comparables a los obtenidos por antigenemia, siendo más sensibles, y permitiendo predecir con anterioridad la aparición de enfermedad por CMV.

Los pacientes trasplantados y pacientes con SIDA con infección activa por CMV tienen altos niveles de copias de DNA y un rápido aumento del número de copias se correlaciona con la presencia de síntomas de enfermedad y con la falla del tratamiento. Sin embargo, todavía no se han establecido valores absolutos de copias de DNA (carga viral) que determinen o permitan predecir enfermedad. Parece ser más importante monitorear los cambios relativos en los niveles de copias de DNA en muestras seriadas de sangre que los valores absolutos de carga viral.

En el caso del diagnóstico prenatal de infección congénita de CMV se han realizado estudios de carga viral en líquido amniótico para poder correlacionar los niveles de carga viral con riesgo de desarrollo de enfermedad citomegálica en el recién nacido.

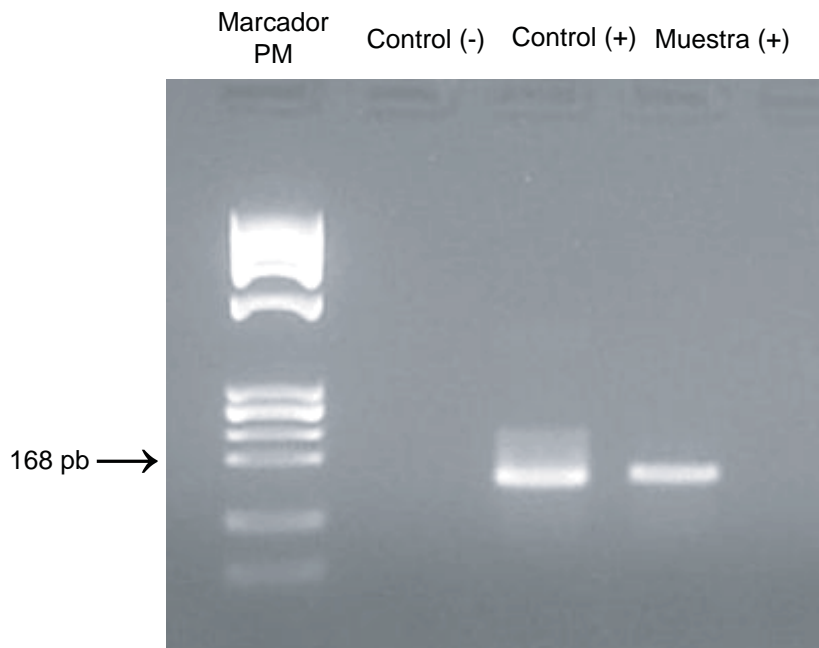


Figura 23.4.6. Técnicas moleculares : PCR anidada (nested) para la región mtrII-EI del DNA de citomegalovirus. En leucocitos de sangre periférica de un paciente post-trasplante renal con enfermedad diseminada. Laboratorio de Virología Clínica, CEMIC.

Ensayo / Detecta	Tiempo de realización	Utilidad clínica	Desventajas
Serología Detecta: anticuerpos Ig G ó Ig M	4-6 h.	- Si Ig G +: Infección previa - Si Ig M +: Infección aguda o reciente - Evaluación pre-trasplante - Infección congénita	- Requiere sueros pareados para evaluar seroconversión
Aislamiento en cultivo de fibroblastos humanos ACP	2-4 semanas	- Indica replicación viral - Infección activa - Permite recuperar la cepa para los estudios fenotípicos de resistencia	- Infraestructura para cultivos - Tiempo prolongado para producir ACP - Pérdida de viabilidad viral durante el transporte - Sensibilidad baja comparada con ensayos moleculares
Cultivo rápido en el Shell vial Antígenos tempranos (p72) en núcleo celular antes de la aparición de la ACP*	24-48 h.	- Indica replicación viral - Infección activa - Ensayo rápido	- Ídem anterior - Complejo para elevado número de muestras
Antigenemia pp65 Antígeno pp65 en el núcleo de leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica	6-8 h.	- Ensayo rápido - Cual o cuantitativo - Si cuantitativo, equivale a la carga viral - Para iniciar tratamiento - Para monitorear tratamiento	- Realización compleja - Requiere procesamiento rápido de la muestra - Personal especializado - Inapropiada en neutropénicos o si el volumen de muestra es escaso (neonatos)
Ensayos moleculares cualitativos			
PCR# Amplificación del DNA viral	6-8 h.	- Cualitativa - Alta sensibilidad para detectar precozmente infección por CMV	- Falta de estandarización en PCR artesanales - Personal especializado - Riesgo de falsos + por contaminación - Inapropiada para monitoreo de tratamiento - Bajo valor pronóstico para enfermedad por CMV
Nested PCR# Amplificación de DNA viral	8 h.	- Mayor sensibilidad que la anterior	- Ídem anterior
NASBA: Nuclisens pp67 RNA mensajero de la proteína pp67	6 h.	- Cualitativo - Específico de replicación - Útil para tratamiento preventivo	- Menor sensibilidad que ensayos de DNA - Costo
Ensayos moleculares cuantitativos			
COBAS AMPLICOR Amplificación de DNA viral (discontinuado)	6 h.	- Cuantitativa: mide carga viral - Informa número de copias genómicas por ml de plasma (límite: 400 copias) - Alta sensibilidad y especificidad - Ensayo rápido - Útil para monitoreo de tratamiento	- Costo - Equipamiento - Personal especializado - Contaminaciones
PCR en tiempo real### Amplificación y detección simultánea de DNA viral (Roche, Abbott)	4-6 h.	- Cuantitativa: mide carga viral - Ensayo rápido - Alta sensibilidad y especificidad - Útil para iniciar tratamiento - Útil para monitoreo de tratamiento	- Costo de reactivos - Equipamiento - Personal especializado



Tabla 23.4.7. Diagnóstico virológico de infección por citomegalovirus. ACP: acción citopática. *: por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales. #: los diferentes genes que pueden amplificarse figuran en el texto. ###: pueden ser artesanales o comerciales.

Los ensayos moleculares disponibles comercialmente para determinar carga viral son: PCR convencional cuantitativa (COBAS AMPLICOR CMV MONITOR de *Roche Diagnostic*); amplificación de la señal con sondas ramificadas (QUANTIPLEX de *Bayer-Chiron*) y captura de híbridos (*Digene Hibrid Capture CMV DNA* de *Digene Corporation*) (Tabla 23.4.7).

PCR en Tiempo Real

Esta metodología combina los procedimientos de la PCR con sondas fluorescentes para la detección del producto amplificado en el mismo tubo y permite medir la fluorescencia emitida a medida que se amplifica el DNA en tiempo real con cada ciclo de amplificación. Hay distintos tipos de sistemas de detección del ácido nucleico que se han utilizado para cuantificar el DNA de CMV: a) *syber green*; b) sondas 5' nucleasas (Taqman); c) faros moleculares (*molecular beacons*) y d) sondas de hibridación FRET. Existen diferentes equipos comerciales para carga viral, con distintos límites de detección. Por ejemplo: Roche, Abbott, Qiagen, Cepheid. Al año 2011, ninguno de ellos ha sido aprobado por la FDA.

6.2.5.3 Detección del RNAm

Una alternativa al uso de ensayos cuantitativos es la detección de RNAm de proteínas tempranas y/o tardías del CMV por la técnica de RT-PCR. Estos transcritos sólo se expresan cuando hay infección activa de CMV y de esta manera se pueden identificar aquellos pacientes en riesgo de desarrollar una infección sintomática. Se han desarrollado ensayos comerciales basados en la técnica de NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*) para la detección de RNAm de proteínas inmediato-tempranas y la tardía pp67.

Estos ensayos se han utilizado para la detección de infección activa por CMV en sangre y en LCR. En general, han resultado tener una menor sensibilidad que otros procedimientos pero presentan alta especificidad para el diagnóstico de enfermedad por CMV.

Ventajas de los ensayos moleculares

La aplicación de los ensayos moleculares al diagnóstico, tanto en la detección como en la cuantificación de DNA de CMV presenta enormes ventajas. Su elevada sensibilidad, especificidad y reproducibilidad permiten reducir significativamente el tiempo de diagnóstico de certeza de infección activa, lo que posibilita un tratamiento rápido y un seguimiento adecuado del paciente. Además, los ensayos moleculares pueden emplearse aun cuando la muestra no ha sido adecuadamente conservada para aislamiento. Puede realizarse en cualquier muestra, aun de escaso volumen, incluyendo líquido amniótico o sangre fetal obtenida por cordocentesis. La detección de DNA de CMV por PCR en LCR está especialmente indicada en caso de encefalitis ya que en esta muestra los demás ensayos no son efectivos.

Desventajas

Se ha desarrollado una amplia variedad de técnicas moleculares que difieren en los blancos a amplificar, pares de *primers*, sondas, condiciones de amplificación, de extracción de ácidos nucleicos, controles, y estándares cuantificados. Por esta razón, los ensayos artesanales deben ser optimizados y validados; más aún, los ensayos comerciales ya estandarizados también requieren ser validados en cada laboratorio (véase "Control de calidad" en el capítulo 11).

Algunas muestras (orina o LCR) pueden presentar inhibidores inespecíficos que deben ser eliminados con el procedimiento de extracción de ácidos nucleicos elegido.

Otras desventajas son el costo de los ensayos y del instrumental y la necesidad personal especialmente entrenado en técnicas moleculares.

7. VALOR DIAGNÓSTICO DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DIRECTOS (TABLA 23.4.7)

La infección activa por CMV se diagnostica por el aislamiento del virus o por la presencia de antígeno o del genoma (este último mediante técnicas moleculares).

Sin embargo, debido a que este virus establece un verdadero estado de latencia y cronicidad y a que puede producir infección activa (con replicación), aun en ausencia de enfermedad clínica, es necesario tener en cuenta que la mera detección de CMV en ciertas muestras (como orina o saliva) no demuestra su rol etiológico en la producción de enfermedad, ya que el hallazgo del virus puede ser producto de una excreción asintomática.

El diagnóstico definitivo de enfermedad por CMV debe realizarse considerando, además de la presencia del virus, otros factores como cuadros clínicos específicos o inespecíficos (por ejemplo, fiebre de origen indeterminado), evidencias histológicas y la exclusión cuidadosa de otros agentes etiológicos.

En los pacientes trasplantados se ha determinado que la detección del virus en sangre, ya sea por aislamiento, por antigenemia pp 65 ó por técnicas moleculares, se correlaciona adecuadamente con el desarrollo de enfermedad por CMV, no ocurriendo lo mismo con la detección de viruria o de virus en saliva, como ya se ha mencionado.

En el seguimiento de pacientes luego del trasplante, la detección de DNA de CMV en leucocitos de sangre periférica se positiviza muy tempranamente, precediendo en una semana a la detección de antigenemia y al aislamiento en cultivo rápido. Por ello es de gran utilidad para el diagnóstico rápido de infección. Sin embargo, como consecuencia de esta elevada sensibilidad, una vez instaurado el tratamiento con antivirales, la PCR puede continuar siendo positiva aun cuando la replicación de CMV haya disminuido o cesado debido al tratamiento antiviral (antigenemia pp 65 y viremia negativas). Por lo tanto, la PCR directa cualitativa no sería útil en el seguimiento de la terapia antiviral postrasplante. En estos casos es muy útil determinar la carga viral por ensayos moleculares cuantitativos.

8. EPIDEMIOLOGÍA Y PREVENCIÓN

El hombre es el único reservorio del CMV humano y la transmisión ocurre por contacto directo con secreciones infectadas. La infección es más frecuente en países en vías de desarrollo o en áreas de bajo nivel socioeconómico y escasa higiene. Los numerosos estudios de seroprevalencia realizados han demostrado que el 40-90% de adultos en países desarrollados presenta anticuerpos, mientras que el 100% de pobladores de áreas en vías de desarrollo es seropositiva. Los pacientes homosexuales son habitualmente positivos en un 100% de los casos.

La adquisición del CMV durante la infancia se incrementa a medida que aumenta la edad, y al llegar a la pubertad el 20% de los niños son seropositivos.

Dos estudios sobre seroprevalencia de anticuerpos anti-CMV realizados en Argentina en niños de la ciudad de Buenos Aires han demostrado que la aparición de anticuerpos anti-CMV se detecta principalmente entre los 4 y 6 años de edad. Se ha observado que la seroprevalencia de anticuerpos en sangre del cordón es muy diferente de acuerdo con el nivel socioeconómico de la población (95% en la de bajo nivel y sólo 55% en la de medio o alto nivel) (Tabla 23.4.8). El hecho de que aproximadamente la mitad de esta última población carece de anticuerpos, implica un alto riesgo de primoinfección de la madre durante futuros embarazos. Por ello, se recomienda el estudio del estado inmune antes de la preñez y, si la madre es seronegativa, el seguimiento serológico durante el embarazo.

Prevención

La prevención de la infección por CMV es difícil dadas sus formas de transmisión. En el caso de embarazadas seronegativas se recomiendan medidas de higiene para evitar la exposición, aunque esto resulta muy dificultoso en el ámbito familiar o escolar donde existen niños. En caso de necesidad de transfusiones o trasplantes se recomienda emplear sangre u órganos seronegativos para pacientes vírgenes de infección, lo que resulta difícil dada la alta prevalencia de anticuerpos anti-CMV en la población. La prevención en pacientes con trasplantes se analiza en detalle en el capítulo 45.

Grupo	+/total	%	Media del título
Sangre de cordón	48/87	55	2,2
	p<0,001		
niños de 1-6 años	49/54	90	5,2
	p<0,001		
niños 6-15 años	39/66	59	3,5
Total	96/207	46,3	

Tabla 23.4.8. Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-citomegalovirus en una población pediátrica de Buenos Aires. Damilano G; Carballal G. y colaboradores. *Prevalence of anti-cytomegalovirus antibodies in a children population of Bs. As. Medicina*, 52, 1992.

Nombre	Tipo	Población en estudio
AD 169	Virus vivo y atenuado (en desuso)	
Towne	Virus vivo y atenuado	Trasplantados, niños, mujeres
Quimérica	Towne= cepa salvaje Towne / Toledo (recombinante)	Adultos seropositivos
A subunidades	Glicoproteína gB de origen recombinante	Mujeres fértiles, (superó la fase II*)
ALVAC	Canarypox*/con gen de pp65 o de gB	Adultos seropositivos (en fase I)
ALVAC - gB	Canarypox seguido por glicoproteína gB	Adultos seropositivos
DNA	Plásmido	En fase I en adultos sanos
<i>Vacunas evaluadas en modelos preclínicos</i>		
Péptidos	Péptidos sintéticos incorporados en un epítipo de T helper	
Partículas	Cuerpos densos (no infecciosos)	Seronegativos

Tabla 23.4.9. Ensayos clínicos de vacunas experimentales para CMV. Adaptado de Schleiss M, "Progress in Cytomegalovirus Vaccine Development". *HERPES* 2005;12,3:66. * Poxvirus que infecta productivamente ciertas aves, pero en forma abortiva células de mamífero, por lo que se comporta como un virus atenuado para el hombre, siendo utilizado como vector de expresión -por ejemplo- de pp65 o de gB. #Pass RF, et al. *N Eng J Med* 2009; 360: 1191-99.

9. VACUNAS EN DESARROLLO PARA CITOMEGALOVIRUS

Se han realizado numerosos esfuerzos en las últimas tres décadas para desarrollar vacunas para CMV (Tabla 23.4.9). Sin embargo, a pesar de los avances, ninguna ha sido aún licenciada para uso masivo. Además, se están estudiando los beneficios terapéuticos de la reconstitución inmune en pacientes con trasplante y algunos autores sugieren que un enfoque más realista sería prevenir la enfermedad por CMV, más que la infección.

La vacuna para CMV es necesaria para: a) prevención de la infección congénita, lo que se podría lograr con la vacunación de mujeres en edad fértil; b) prevención de la primoinfección en adultos inmunosuprimidos; 3) prevención de la reactivación en adultos inmunosuprimidos.

La vacunación de donantes de médula ósea y/o de órganos sólidos, así como la vacunación del receptor pre- o postrasplante, combinado con inmunización pasiva, beneficiarían a estos pacientes.

10. TRATAMIENTO

Antivirales

El ganciclovir y el foscarnet son efectivos contra CMV, aunque presentan efectos adversos graves. El ganciclovir es la droga de elección. Es un análogo de la desoxiguanosina, similar al aciclovir, pero difiere por la presencia de un grupo hidroximetilo. Es efectivo en las infec-

ciones activas por CMV en pacientes con trasplante o con HIV/SIDA, pero está contraindicado durante el embarazo debido a su toxicidad.

El efecto adverso más importante del ganciclovir es la neutropenia, y también cabe citar la neurotoxicidad, la erupción cutánea y la anemia.

Para que el ganciclovir actúe se requiere de la fosforilación inicial por una fosfotransferasa viral codificada por el gen UL 97.

El foscarnet es otra alternativa, aunque es nefrotóxico. Esta droga no requiere de una fosforilación previa y bloquea la DNA polimerasa viral.

Respecto de las dosis, vías de administración e indicaciones del ganciclovir y el foscarnet, remitimos al lector al capítulo 45.

Inmunoterapia adoptiva

Recientemente se han desarrollado métodos para expandir clones de linfocitos CD8⁺ específicos para CMV. La inmunización adoptiva con estas células con actividad contra el virus es otra posibilidad terapéutica que, aunque de compleja realización, está en estudio en pacientes inmunosuprimidos.

11. RESISTENCIA A ANTIVIRALES Y ENSAYOS DE DETECCIÓN

El empleo de drogas antivirales por períodos prolongados ha llevado a la aparición de cepas de CMV resistentes a los mismos. En pacientes inmunocomprometidos, particularmente en pacien-

tes con HIV que reciben tratamientos prolongados para la retinitis por CMV, se ha reportado la aparición de cepas de CMV con resistencia al ganciclovir. Asimismo, se han aislado cepas resistentes en trasplantados de médula ósea, de órgano sólido y pacientes oncológicos.

Dos son los genes involucrados en la resistencia a ganciclovir, el UL97 que codifica para la fosfotransferasa, que fosforila y activa al ganciclovir y el UL54 para la DNA polimerasa viral.

Las mutaciones más frecuentes en el gen UL97 están en los codones 460, 520, 591, 595 y 607. La resistencia a foscarnet se produce por mutaciones en la DNA polimerasa viral y también dan resistencia para el ganciclovir. Las mutaciones suelen aparecer dentro de los tres meses de tratamiento con ganciclovir y se mantienen estables por largos períodos.

Se han desarrollado dos ensayos para determinar la presencia de cepas de CMV resistentes en los pacientes:

1) Ensayos fenotípicos: miden la capacidad del virus de replicar en presencia de diferentes concentraciones de la droga antiviral. Una técnica utilizada es el ensayo de reducción de placas bajo agarosa, que determinan la CI_{50} ó concentración mínima inhibitoria 50%, esto es la concentración de la droga que inhibe un 50% el crecimiento del virus. Este ensayo requiere el aislamiento de la cepa, su pasaje en cultivo de células y titulación, procedimiento muy laborioso y lento.

2) Ensayos genotípicos: estos ensayos amplifican los genes involucrados (UL 97 ó UL54) por PCR, luego se los secuencian directamente para detectar e identificar mutaciones. Muchas mutaciones ya se conoce que confieren resistencia pero, en el caso de mutaciones desconocidas se deberá realizar el ensayo fenotípico para corroborar la resistencia. También hay ensayos que utilizan sondas específicas contra mutaciones que confieren resistencia. Otra alternativa es el estudio de fragmentos amplificados mediante PCR y tratados con enzimas de restricción.

Bibliografía

- Caliendo AM, Yen-Lieberman B, Baptista J, Andersen J, Crum-packer C, Schuurman R, *et al.* "Comparison of molecular tests for detection and quantification of cell-associated cytomegalovirus DNA". *J Clin Microbiol* 2003; 41:3509-13.
- Damilano G, Juárez MC, Carballal G, Arana RA. "Prevalence of anti-cytomegalovirus antibodies in a children population of Buenos Aires". *Medicina* (Buenos Aires) 1992;52:116-8.
- Guiver M, Fox AJ, Mutton K, Mogulkoc N, Egan J. "Evaluation of CMV viral load using Taqman CMV quantitative PCR and comparison with CMV antigenemia in heart and lung transplant recipients". *Transplantation* 2001; 71:1609-15.
- Halfon P, Berger P, Khiri H, Martineau A, Pénaranda G, Merlin M, *et al.* "Algorithm based on CMV kinetics DNA viral load for preemptive initiation after hemopoietic cell transplantation". *J Med Virol* 2011; 83: 490-5
- Khanna R, Diamond J. "Human cytomegalovirus vaccine: time to look for alternative options". *Trends Mol Med* 2006; 12:26-33.
- Schleiss M. "Progress in cytomegalovirus vaccine development". *HERPES* 2005;12:366-75.
- Sinclair J, Sissons P. "Latency and reactivation of human cytomegalovirus". *J Gen Virol* 2006; 87:1763-79. Review.
- Galiano M, Videla C, Sanchez Puch S, Carballal G. "Aislamiento de citomegalovirus por cultivo convencional y cultivo rápido". *Medicina* (Buenos Aires) 2001;61:825-9.
- Sánchez Puch S, Ochoa C, Carballal G, Zala C, Cahn P, Brunet R, *et al.* "Cytomegalovirus UL97 mutations associated with ganciclovir resistance in immunocompromised patients from Argentina". *J Clin Virol* 2004;30:271-5.
- Razonable RR, Brown RA, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Espy M, *et al.* "The clinical use of various blood compartments for CMV DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease". *Transplantation* 2002; 73:968-73.

Herpesvirus humano 6 (HHV-6) y herpesvirus humano 7 (HHV-7)

Beatriz I. Livellara

1. INTRODUCCIÓN

El virus *Herpes humano 6* (HHV-6) -otro miembro de la familia *Herpesviridae*- es el agente causal del exantema súbito. Es considerado en la actualidad un patógeno emergente en la población de individuos inmunocomprometidos, principalmente en trasplantados y en pacientes con SIDA. Salahuddin y colaboradores descubrieron el HHV-6 en 1986 a partir de linfocitos de sangre periférica de pacientes infectados con HIV o afectados por síndromes linfoproliferativos. En 1988 Yamanishi y colaboradores describieron la asociación entre el HHV-6 con el exantema súbito, también conocido como *roseola infantum* o sexta enfermedad exantemática. En 1991 se describieron dos variantes genéticamente distintas, la variante A (HHV-6A) y la B (HHV-6B), con diferencias antigénicas, en el tropismo celular, en su distribución geográfica y en las manifestaciones clínicas respectivamente asociadas. La variante B es el agente etiológico del exantema súbito.

El HHV-6 se considera un virus ubicuo, que infecta a casi todos los niños menores de dos años (con un pico de incidencia entre los 6 y 9 meses de edad); al igual que otros herpesvirus, se mantiene en estado de latencia y es capaz de reactivarse tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunocomprometidos. El HHV-6A no ha sido asociado claramente con enfermedad alguna. Se cree que la infección primaria con HHV-6A ocurre en la niñez o durante la adolescencia y la infección puede presentarse sin síntomas (Figura 23.5.1).

El HHV-7 fue descrito en 1990 por Frenkel y colaboradores a partir de linfocitos activados T CD4⁺ de un adulto sano. Posteriormente, se aisló este virus a partir de muestras de saliva y de linfocitos T con fenotipo CD4⁺ y CD8⁺ de individuos sanos. El HHV-7 es un virus muy relacionado con ambas variantes del HHV-6, compartiendo propiedades moleculares y biológicas.

2. BIOLOGÍA

2.1 MORFOLOGÍA

Las variantes del HHV-6 comparten la morfología común a todos los herpesvirus: a) una nucleocápside con simetría icosaédrica y un diámetro de 90 a 110 nm, que contiene el DNA viral; b) una

envoltura con glicoproteínas; y c) el tegumento consistente en una mezcla de proteínas que ocupan el espacio entre la nucleocápside y la envoltura. El virión mide aproximadamente 150 a 200 nm. La estructura del virión del HHV-7 es similar.

2.2 GENOMA

El genoma del HHV-6 es lineal, bicatenario, habiendo sido secuenciados completamente el de las dos variantes. Su extensión nucleotídica es de 160-162 kb presentando una región única "U" de 143-144 kb donde se encuentran los marcos abiertos de lectura (*open reading frames*: ORFs). La región está flanqueada por secuencias terminales directamente repetitivas (DR: *direct repeats*) e interrumpida por tres regiones intermedias denominadas R1, R2 y R3 (Figura 23.5.2). Las DR son reiteraciones de hexanucleótidos (GGGTTA)_n, secuencias similares a las presentes en los telómeros de los cromosomas de los mamíferos. Se postula que estas secuencias desempeñan un papel importante en la replicación y mantenimiento del genoma viral en estado de latencia en las células infectadas.

Los genes de la región U se denominan U1 - U100 y los ORFs dentro de las DR son designados como DR1 - DR7. El HHV-6B contiene 119 ORFs y 97 genes únicos y el HHV-6A presenta 110 ORFs. Los 9 ORFs de diferencia entre HHV-6B y el HHV-6A son abreviados como B1 al B9. El genoma incluye 100 genes, 40 de los cuales son homólogos a los de otros miembros de la familia *Herpesviridae*. Muchos de estos genes codifican proteínas estructurales o proteínas que están implicadas en el ciclo lítico del virus. Algunos genes están también representados en otros miembros de la subfamilia *Betaherpesvirinae* (incluyendo al *Citomegalovirus humano* [HCMV]), mientras que unos pocos genes son específicos del género *Roseolovirus* (variantes del HHV-6, y HHV-7). Un único gen, el U94 -común al HHV-6A y HHV-6B- y ausente en el HHV-7, es homólogo al gen codificante de la proteína no estructural NS1 del parvovirus humano B 19.

Variación intercepas. Las variantes de HHV-6 comparten un elevado grado de homología nucleotídica (95-99%). El mayor grado de divergencia se ubica en la región IE-1 (genes U86 al U95, excepto el U94) que las diferencia en sus propiedades biológicas (por ejemplo, el tropismo celular *in vitro*, la expresión de los genes y los

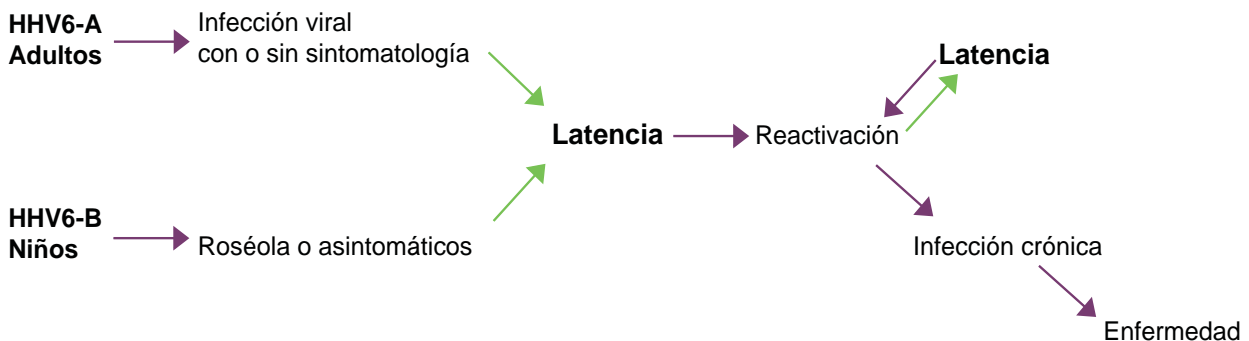


Figura 23.5.1. Ciclo biológico del HHV-6.

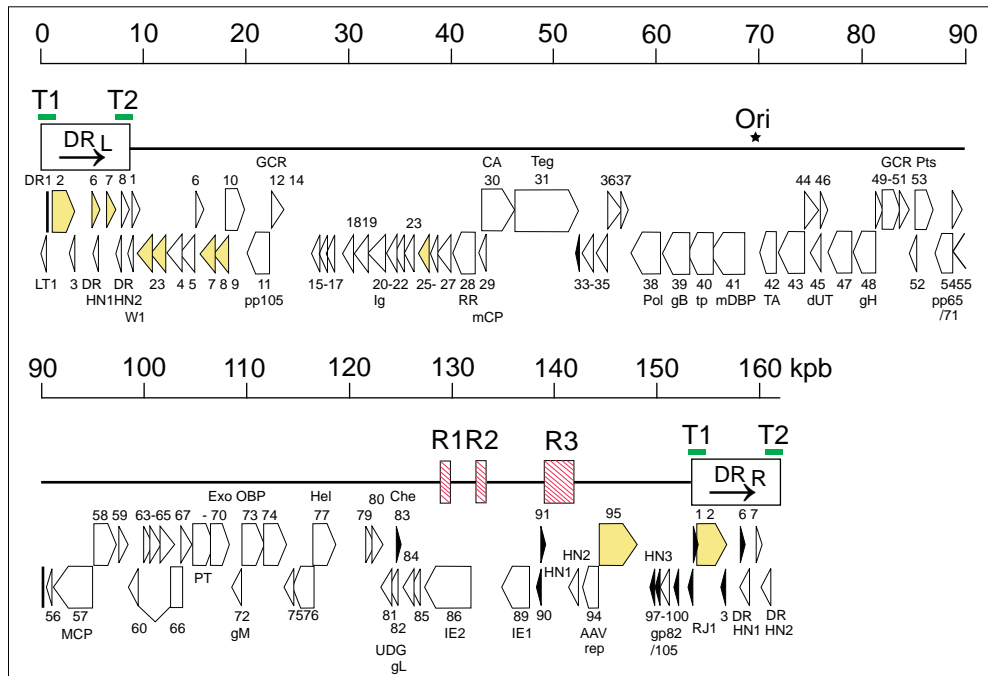


Figura 23.5.2. Representación esquemática de la organización del genoma del HHV-6. Las regiones genómicas repetidas (DR_L, DR_R, R1, R2 y R3) se esquematizan con recuadros; las regiones teloméricas T1 y T2 se indican con una barra verde y la región UR por una línea continua. DR_L y DR_R: región repetida izquierda y derecha, respectivamente; R1, R2 y R3: regiones repetidas intermedias; UR: región con secuencia única. Ori: sitio de origen de la replicación en el ciclo lítico. Las regiones codificantes de proteínas están representadas por flechas abiertas y están numeradas DR1, DR2, DR3, DR6, DR7, DR8, DRHN1 y DRHN2 dentro de las regiones repetidas directas, designándose HN1, HN2, HN3, y U1 a U100 (excluyendo U78, U88, U92 y U96) dentro de la región UR. Las regiones sombreadas en amarillo corresponden a la familia de genes US22 (DR1, DR2, DR6, DR7, U2, U3, U7, U8, U16, U25, y U95) semejantes a los observados como transactivadores en el genoma del HCMV. GCR: receptor acoplado a proteína G. Ig: superfamilia de Inmunoglobulinas. RR: subunidad grande de la ribonucleótido reductasa. mCP: proteína menor de la cápside. CA: Proteína de ensamblaje de la cápside. Teg: proteína del tegumento. Pol: DNA polimerasa. Tp: proteína de transporte. mDBP: proteína principal de unión al DNA de cadena única. TA: transactivador conservado entre los herpesvirus. dUT: dUTPasa. PT: fosfotransferasa. Exo: exonucleasa. OBP: proteína de unión al origen. Hel: helicasa. UDG: uracil DNA glicosilasa. Che: quimioquina. AAV rep: proteína homóloga a la de replicación del virus asociado a Adenovirus. IE1 e IE2: regiones inmediato-tempranas 1 y 2, respectivamente. Reproducida de Isegawa Y et al. con autorización. *Journal of Virology*, 1999, 73: 8053-63.

diferentes modelos de corte y empalme del genoma [*splicing*], la reactividad a los anticuerpos monoclonales, etc.), su distribución tisular, y en algunos casos, la correlación con ciertas patologías.

Otro factor de diferencia fenotípica se ubica en la región U97 - U100, que codifica glicoproteínas de envoltura del virión, el complejo gp82-gp105 que sólo se encuentra en un gen del HHV-6A designado NH3. La proteína resultante contiene epítopos de neutralización variante-específicos, como es el producto de 80-kDa del gen U100, denominado gQ involucrado en la unión al receptor CD46 y la subsiguiente fusión a la membrana. Divergencias en esta región podrían contribuir al diferente tropismo de las variantes A y B.

El genoma del HHV-7 es más compacto que el del HHV-6 y su longitud es de 145 kb. El genoma está flanqueado por secuencias nucleotídicas que se asemejan a las de los telómeros de los vertebrados.

Cada gen del HHV-7 tiene homología en el HHV-6. La similitud en las secuencias de aminoácidos entre las variantes del HHV-6 y el HHV-7 oscila entre el 22 y el 75%, aunque con la mayoría de los genes la identidad varía entre un 40 a un 60%.

3. TAXONOMÍA

El HHV-6A, el HHV-6B y el HHV-7 pertenecen al género *Roseolovirus*. Junto con el *Citomegalovirus humano* integran la subfamilia *Betaherpesvirinae* dentro de la familia *Herpesviridae*.

La inclusión de los ocho herpesvirus humanos hasta la fecha conocidos dentro de alguna de las tres subfamilias (*Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* o *Gammaherpesvirinae*) se basa en el análisis de su secuencia genómica.

4. CICLO REPLICATIVO

Las variantes A y B del HHV-6 interactúan con el receptor CD46, glicoproteína presente en la membrana de células nucleadas y fisiológicamente relacionada con la regulación del sistema del complemento (la ausencia de CD46 torna a las células pasibles del ataque lítico mediado por dicho sistema). Esto explica el amplio tropismo celular de este virus, aunque el mismo está restringido a un determinado hospedador-especie. CD46 está asociada a la estructura de viriones purificados de HHV-6. Dicha molécula también actúa como receptor para la cepa atenuada vacunal Edmonston del virus sarampión, aunque la interacción con estos dos virus ocurre a través de diferentes dominios de CD46. Se ha determinado que el complejo de glicoproteínas gH-gL-gQ (codificadas por los genes U48, U82 y U100, respectivamente) sirve como ligando viral para el CD46. El gH es el factor responsable de la unión a las secuencias cortas de dominio repetitivo SCR2 y SCR3 de CD46. La gB del HHV-6 (codificada por el gen U39) está implicada en el proceso de fusión, aunque aún no se conoce su mecanismo. El proceso de replicación viral es muy similar al del HSV-1 y del citomegalovirus humano. Un ciclo replicativo se extiende durante aproximadamente 72 horas.

5. TROPISMO CELULAR

Inicialmente al HHV-6 se lo denominó (erróneamente) "Herpesvirus Linfotrópico B" debido a que se postulaba que replicaba en los linfocitos B. Actualmente, se reconoce que los linfocitos T CD4⁺ activados son las células diana de la infección para las dos variantes. Su habilidad difiere en el modo en que ellas pueden replicar en líneas celulares de linfocitos T transformados. Las células NK, los linfocitos T CD8⁺ y los linfocitos $\gamma\delta$ permiten la infección por el HHV-6.

El HHV-6 está caracterizado por un amplio tropismo por diferentes tipos de células humanas (que expresan el receptor CD46), tales como mononucleares, fibroblastos, células dendríticas, hepatocitos, células renales, células de glándulas salivales y bronquiales, células epiteliales de cuello uterino, células endoteliales, astrocitos fetales, oligodendrocitos y microglia, además de las células progenitoras de la médula ósea.

El HHV-6 bloquea la diferenciación de macrófagos desde las progenitoras de médula ósea y disminuye *in vitro* la formación de colonias de progenitoras de granulocitos / macrófagos, y de la serie eritroide.

Al igual que el HHV-6, el HHV-7 utiliza como receptor celular *in vitro* a la molécula CD4; sin embargo, *in vivo* se han detectado otras células CD4⁺ que expresan el HHV-7 en pulmón, piel, glándulas mamarias, hígado, riñón, amígdalas, apéndice y cuello uterino. Se ha detectado DNA del HHV-7 en tejido cerebral de adultos sanos, pero con menor frecuencia que en las infecciones por HHV-6.

6. EPIDEMIOLOGÍA

Los reportes de seroprevalencia para el HHV-6 difieren de acuerdo al número de variables estudiadas, tales como: a) diferencias de sensibilidad e interpretación de los ensayos serológicos; b) reacciones cruzadas de ciertos anticuerpos con antígenos de HHV-6 y HHV-7 utilizados en pruebas de inmunofluorescencia; y c) variaciones geográficas. La seroprevalencia de ambas variantes del HHV-6 en la población adulta se estima que es mayor al 95% en los países desarrollados. El HHV-6 se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, con diferencias geográficas de prevalencia que oscilan entre el 70 y 100%. Los estudios brindan escasa información sobre el tipo de infección que producen las variantes; sin embargo, se cree que la mayoría de las infecciones sintomáticas en individuos inmunocompetentes son debidas al HHV-6B (asociadas al exantema súbito), mientras que el HHV-6A produce mayor número de infecciones en individuos inmunocomprometidos, observándose manifestaciones neurológicas.

La seroprevalencia del HHV-7 en adultos varía entre el 60-90%. La infección se adquiere en los primeros años de vida, generalmente luego de la infección por el HHV-6-B. Aunque el HHV-7 es más eficiente en su transmisión, se desconoce la razón por la cual los niños se infectan habitualmente antes con HHV-6B.

7. TRANSMISIÓN

La detección en saliva y glándulas salivales del DNA del HHV-6B sugiere que estas últimas son el sitio potencial de persistencia del HHV-6 y que la saliva es el vehículo implicado en la transmisión (sobre todo de adultos a niños o entre infantes). Se ha sugerido la existencia de transmisión materno-fetal intrauterina (1-2%), debiéndose considerar también la transmisión iatrogénica (a través de la sangre, médula ósea y órganos trasplantados). El HHV-6A es detectado comúnmente en la piel, lo cual sugiere que el virus podría ser transmitido por contacto directo. Esta ruta también sería posible para el HHV-6B. Además, el HHV-6 puede ser transmitido genéticamente a través de la integración cercana a los telómeros del cromosoma 1. La integración en la vecindad de los telómeros puede estar relacionada con la presencia de secuencias nucleotídicas similares a las teloméricas en los extremos del genoma del HHV-6. Tras la infección primaria, el genoma viral persiste en las células

mononucleares de sangre periférica (monocitos) y en las progenitoras de la médula ósea, además de las glándulas salivales, pudiéndose detectar habitualmente el DNA del HHV-6 en saliva mediante PCR. El DNA del HHV-6 también ha podido detectarse en el LCR de niños, durante y luego de la primoinfección, así como en el tejido cerebral de adultos inmunocompetentes, lo que implica que el SNC puede considerarse un lugar adicional para la persistencia de dicho virus. De estos datos, se infiere que la persistencia del HHV-6 involucra dos estados, uno de verdadera latencia en monocitos (sin producción de virus infecciosos) y otro, con bajo nivel de replicación, en glándulas salivales y cerebro.

Por haberse aislado a partir de muestras de saliva en un 75% de individuos seropositivos para HHV-7, se supone que dicho fluido participa también en la transmisión de este agente.

8. ASPECTOS CLÍNICOS Y PATOGÉNESIS

La infección por el HHV-6A y HHV-6B y su asociación con las manifestaciones clínicas es diferente según se trate de pacientes inmunocompetentes o inmunodeprimidos, y también de acuerdo a su edad.

Infección primaria. El HHV-6 causa un cuadro febril agudo en niños de hasta un año con temperaturas elevadas (mayor o igual a 40° C) por lo menos durante 3 días (en algunos casos hasta 7), tras lo cual disminuye en forma espontánea. En un reducido porcentaje (17% - 20%) aparecen las manifestaciones típicas del exantema súbito (fiebre y posterior desarrollo de un eritema cutáneo, con normalización de la temperatura) o *rash* en tronco, rodillas y rostro. Es un cuadro autolimitado. Las complicaciones son poco frecuentes, representadas principalmente por la invasión viral al SNC con aparición de convulsiones febriles (13%) o de otros órganos como hígado, riñones y pulmones, los cuales representan un sitio potencial de latencia y reactivación. Pueden aparecer mialgias, inflamación de las membranas timpánicas, síntomas gástricos y respiratorios, raramente complicaciones tales como hepatitis, artritis, encefalitis y síndrome hemofagocítico. La infección primaria en el adulto **inmunocompetente** es más rara, manifestándose como una enfermedad febril sin características especiales, o como un síndrome mononucleosiforme con marcadores serológicos negativos para citomegalovirus humano y virus Epstein-Barr. Puede aparecer eritema cutáneo, hepatitis y linfocitosis atípica. También se ha descrito la reactivación del HHV-6 en pacientes adultas inmunocompetentes durante la gestación y en períodos de alguna enfermedad crítica (variante HHV-6A). La infección por el HHV-6 se asocia con muchos otros cuadros clínicos, en los que sólo hay evidencia de asociación, pero sin confirmación de que el HHV-6 sea el agente etiológico, como la esclerosis múltiple, la parálisis de Bell, algunos síndromes linfoproliferativos (incluyendo linfomas Hodgkin, no-Hodgkin y leucemia linfoblástica) y el síndrome de fatiga crónica. En individuos **inmunocomprometidos** el HHV-6 se reactiva comúnmente en pacientes infectados por el HIV, siendo la neumonitis y la encefalitis las manifestaciones más frecuentes. Aunque es conocido el efecto que el HHV-6 tiene sobre la replicación del HIV *in vitro*, clínicamente no existe evidencia directa de progresión de la enfermedad por HIV debido a la replicación del HHV-6, excepto, tal vez, en los casos de transmisión vertical. La incidencia de infección por el HHV-6 en **pacientes trasplantados** varía según la metodología usada para el diagnóstico. Se ha sobrestimado la incidencia de la infección activa cuando su diagnóstico se basó en la detección de DNA por PCR o el cultivo del virus a partir de muestras de orina y saliva, resultantes de la eliminación del virus durante la infección persistente, fenómeno que es muy común entre los herpesvirus incluyendo al citomegalovirus humano. La detección de DNA de HHV-6 y el cultivo a partir de muestras de sangre, se correlaciona más con la infección activa por el HHV-6. Esto lleva a plantearse la conveniencia de un monitoreo mediante PCR en sangre, plasma o suero en los pacientes trasplantados. El tipo de trasplante también influye, con incidencias medias del 48%

(28-75 %) en los trasplantados de médula ósea y del 32% (0%-82%) en los de órgano sólido. En la mayoría de los casos, las infecciones post-trasplante son debidas a la reactivación de la variante HHV-6B, aunque también se han descrito casos de primoinfección o sobreinfección (con una cepa distinta a la del receptor) debidos a la transmisión del virus a partir del órgano del donante. Sin embargo, la asociación entre infección activa y sintomatología clínica no está totalmente establecida. En el caso de trasplante de médula, la asociación es más evidente entre la reactivación y la aparición de fiebre sin focalización y encefalitis, y también se ha descrito la asociación con leucopenia y eritema cutáneo inespecífico. La neumonitis intersticial parece ser más frecuente en el trasplante de médula y la hepatitis en el de hígado. También en trasplante de médula puede aparecer encefalitis, con correlación entre la detección de DNA del HHV-6 en el LCR y la presencia de síntomas de encefalopatía, al igual que la supresión idiopática de médula. Se ha descrito que la infección por el HHV-6A induce la aparición de una forma más grave de supresión medular en el periodo post-trasplante. En cuanto a la relación entre infección activa por el HHV-6 y el HCMV, es posible la modificación de la historia natural de la infección por este último en los pacientes trasplantados; así, se ha documentado que existe correlación entre la cantidad de DNA de HHV-6 en sangre y la presencia de enfermedad por HCMV. Inclusive, algunos autores indican que la evidencia serológica de infección por el HHV-6 es un buen marcador subrogante de enfermedad por HCMV. Por esta razón, en la literatura se ha utilizado el término *síndrome por beta herpesvirus*.

El HHV-7 se considera el agente etiológico de un 10% de los casos de *roséola infantum*, con síntomas similares a los producidos por la variante HHV-6B. Las complicaciones neurológicas, como convulsiones febriles, aparecen en el 50 % de las infecciones primarias, sin signos de exantema súbito clásico. En raras ocasiones se presentan manifestaciones más graves, como encefalitis y hemiplejía. Recientemente, se ha propuesto que la pitiriasis rósea (o pitiriasis rosada de Gibert) podría ser una reactivación del HHV-7, aunque ello no ha sido definitivamente establecido aún. La incidencia de la infección por HHV-7 en trasplantados de médula ósea oscila en torno al 55%, y entre el 0 al 46% en trasplantados renales. La mayoría de la infecciones parecen producirse por reactivación. Sin embargo, se han descrito casos de infección primaria en receptores seronegativos a partir de donantes seropositivos, y también pueden producirse sobreinfecciones por esta vía. El pico de actividad de la infección por HHV-7 ocurre alrededor del segundo mes post-trasplante, lo que precede a la normal aparición de la enfermedad por HCMV en dos a cuatro semanas. Se cree que el riesgo relativo de enfermedad por HCMV es mayor cuando coexiste infección por HHV-7. Las manifestaciones clínicas directas de la infección por HHV-7 en trasplantados incluyen el síndrome febril inespecífico asociado a citopenias que a veces, se ha atribuido erróneamente a reactivación del HCMV. Quizás más importantes sean sus posibles efectos indirectos, los cuales pueden resultar de la activación de fenómenos inmunológicos o de transactivación de otros virus, e incluyen, fundamentalmente, una mayor frecuencia de enfermedad por HCMV, o manifestaciones más graves de la enfermedad producida por éste, y una asociación con el rechazo o disfunción del injerto.

9. TERAPIA ANTIVIRAL

La infección por el HHV-6 en niños inmunocompetentes es frecuentemente autolimitada y no requiere terapia antiviral específica. En pacientes inmunodeprimidos, con síndromes orgánicos específicos, tales como la encefalitis, sería necesario implementar un tratamiento específico. Se necesita un mayor número de estudios para conocer si la eficacia de la terapia preventiva iniciada cuando se detecta una elevación de la carga viral, es una estrategia válida para prevenir los efectos indirectos, tales como la reactivación por HCMV o el rechazo al injerto en pacientes trasplantados.

Los antivirales ganciclovir, foscarnet y cidofovir son activos

frente al HHV-6 *in vitro*, mientras el cidofovir tiene la mejor actividad inhibitoria *in vitro*. El ganciclovir y el foscarnet son activos frente a las dos variantes del HHV-6, aunque con el ganciclovir se requiere una dosis mayor para el HHV-6B. En cuanto a la resistencia a los antivirales, se han descrito mutaciones puntuales en la región UL69, homóloga de UL97 del HCMV humano, que se asocian con la disminución de la sensibilidad *in vitro* y con la exposición prolongada al ganciclovir *in vivo*. Se trata de una mutante obtenida por pasajes seriados *in vitro* con concentraciones crecientes de ganciclovir. Dicha mutante mostró resistencia cruzada al ganciclovir y al cidofovir.

Se han identificado dos mutaciones: una que conduce a la sustitución M318V en la región UL69 (equivalente a la mutación M460I/L de la región UL97 del HCMV humano), y la otra en la región de la DNA polimerasa (A961V). Se ha detectado por PCR la mutante M318V en células mononucleares de sangre periférica infectadas por HHV-6 en un paciente con SIDA que había recibido tratamiento prolongado con ganciclovir. La forma de detección de esta mutante es semejante a la descrita para el HCMV.

No se han definido pautas aceptadas para el tratamiento de las infecciones por HHV-7. Si bien se acepta que no es necesario tratar las infecciones primarias en niños, no hay consenso respecto a la recomendación del tratamiento de las complicaciones neurológicas. En cuanto a los cuadros asociados a infección por HHV-7 y trasplante, algunos autores sugieren también tratamiento si hay demostración de infección activa mediante: a) aislamiento del virus en sangre, LCR o tejidos, b) antigenemia en sangre o médula ósea o PCR positiva en plasma o suero, LCR o lavado broncoalveolar y c) manifestaciones clínicas asociadas a la infección por HHV-7.

El HHV-7 es más sensible al cidofovir (IC₅₀ 3 µg/ml) y foscarnet que a otros antivirales. Este hecho puede ser reflejo de que la proteína codificada por el gen UL69 del HHV-7 puede carecer de actividad fosfotransferasa, a diferencia del producto de UL97 del HCMV.

10. DIAGNÓSTICO

Puede realizarse a través de a) técnicas de co-cultivo con linfoblastos o células de sangre de cordón; b) mediante la detección de antígenos en las muestras clínicas utilizando anticuerpos monoclonales, o bien, c) de forma indirecta, mediante la demostración de una seroconversión de anticuerpos de clase IgG y/o mediante la detección de anticuerpos IgM específicos (Véase el cuadro 23.5.1).

La detección de la avididad de la IgG tiene un considerable valor para distinguir entre una infección reciente y una previa, detectándose anticuerpos de baja avididad durante la infección reciente y de alta avididad cuando han transcurrido varias semanas de la primoinfección (al menos 6) y tras las reactivaciones. Una avididad inferior al 30% sería indicativa de una infección reciente, mientras que si es superior al 70% sería sugerente de una infección pasada en el tiempo.

El HHV-7 se cultiva en linfocitos de sangre de cordón y ha sido adaptado a líneas celulares T como SupT1. El efecto citopático es indistinguible del producido por el HHV-6.

En la actualidad se dispone de ensayos moleculares que son más específicos y más sensibles: PCR cualitativa (directa o *nested*) o PCR en tiempo real (cualitativas o cuantitativas). Debido a que el HHV6 y el HHV7 son virus que presentan latencia, se indica solicitar el estudio de la carga viral por PCR en tiempo real cuantitativa en plasma como intento para diferenciar este estadio de latencia de la infección activa.

11. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL HHV-6 Y AL HHV-7

Tras la primoinfección se pueden detectar anticuerpos entre los tres y los siete días post-infección. El pico máximo de producción de IgM ocurre en la segunda semana, la que puede ser detectable hasta dos meses después de la infección. Los anticuerpos IgG se elevan a las dos semanas y se mantienen durante toda la vida,

Técnica	Muestra	Conservación	Ventajas	Inconvenientes	Aplicación
ELISA	Suero o plasma	7 días a 2-8 °C o -20° C	<ul style="list-style-type: none"> • Procesamientos en lotes • Posibilidad de automatización • Detecta IgG • Sensible 	<ul style="list-style-type: none"> • Reacciones cruzadas entre HHV-6 y HHV-7 	<ul style="list-style-type: none"> • Determinación del estado inmune • Confirmación de infección previa • Carece de utilidad diagnóstica en la primoinfección y la reactivación, a menos que se usen sueros pareados, resultados con variaciones > 1.6 de absorbancia son diagnósticos
IFI (Inmuno-fluorescencia)	Suero	Ídem anterior	<ul style="list-style-type: none"> • Detecta IgG / IgM • Sensible 	<ul style="list-style-type: none"> • Interpretación subjetiva • Reacciones cruzadas entre HHV-6 y HHV-7 	<ul style="list-style-type: none"> • Ídem anterior • Diferencia significativa en sueros pareados: mayor o igual a 4 veces
Inmunohisto-química	Biopsia en fisiológica		<ul style="list-style-type: none"> • Rápida y específica 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja sensibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Detección del virus en órganos infectados
Antigenemia en mononucleares de sangre periférica (PBMC)	Sangre (EDTA)	Procesar con no más de 6 horas desde su extracción	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible y específica • Rápida (4-5 horas) • Cuantificable 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere estandarización • Escasas evaluaciones clínicas 	<ul style="list-style-type: none"> • En trasplantados e inmunocomprometidos como marcador diagnóstico, pronóstico y control de tratamiento
Co-cultivo o cultivo directo de PBMC	Ídem anterior y orina, saliva, LCR, biopsias	Ídem anterior	<ul style="list-style-type: none"> • Recuperación de cepas para su estudio y pruebas de sensibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere Laboratorios especializados en cultivos celulares • Demora en obtener resultados • Poca experiencia con HHV-7 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad a antivirales • Estudios genómicos
<i>Shell vial</i>	Ídem anterior	Ídem anterior	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible y específico • Rapidez comparable con co-cultivo o cultivo directo 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere experiencia en cultivos celulares y lectura de inmunofluorescencia 	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico de infección activa en trasplantados e inmunocomprometidos
PCR cualitativa (directa ó <i>nested</i>)	Ídem a co-cultivo más suero o plasma	Refrigerado a 4° C	<ul style="list-style-type: none"> • Rápida • Sensible y específica 	<ul style="list-style-type: none"> • Imposibilidad de distinguir entre infección activa y latente 	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico de infección en SNC • Diagnóstico de infección en inmunocomprometidos
PCR cuantitativa en tiempo real	Ídem anterior	Ídem anterior	<ul style="list-style-type: none"> • Ídem anterior • Cuantificable 	<ul style="list-style-type: none"> • No existen ensayos comerciales 	<ul style="list-style-type: none"> • Monitoreo de infección en trasplantados • Diagnóstico en cuadros neurológicos



Tabla 23.5.1. Diagnóstico HHV-6 y HHV-7.

al menos, en un 90% de los adultos. La reactivación induce una respuesta inmune secundaria, con elevación de los niveles de anticuerpos IgG y, raramente, con reaparición de anticuerpos IgM. Dichas reactivaciones se producen en los casos de infección por otros virus, como por ejemplo en pacientes con infección latente

por el HHV-6 que padecen una infección primaria por el HHV-7, así como en los casos de inmunosupresión (trasplantados), aunque en éstos no suele ir acompañada de una respuesta serológica detectable. Inclusive, algunos autores han señalado que en la infección previa por HHV-6 seguida de una infección por el

HHV-7, se produce respuesta de anticuerpos IgM frente a aquél, y no frente al HHV-6. En el caso contrario, es decir, infección por HHV-7 previa en el tiempo a la infección por el HHV-6, la respuesta de anticuerpos IgM se produce frente a ambos virus. Frente a las reactivaciones del HHV-6 -y a pesar de la homología entre la glicoproteínas de las especies de la subfamilia *Betahepesvirinae*- se produce un incremento en el título de anticuerpos específicos para HCMV y HHV-6, no atribuible a reacciones cruzadas entre estos virus.

El HHV-6 utiliza varias estrategias para evadir o disminuir la respuesta inmune. Así, se ha observado la producción de quimioquinas funcionales y de receptores para dichas moléculas. A través de la expresión de la molécula inmediato-temprana IE-1, este virus es capaz de inhibir la expresión del interferón β debido al impedimento de la unión de IRF-3 al promotor de dicho gen, lo cual favorece la persistencia viral. La inmunosupresión es favorecida por la depleción de linfocitos T CD4⁺ por vía de la infección directa de progenitores intratímicos y por la inducción de apoptosis.

12. OPORTUNIDAD DEL MUESTREO PARA HHV-6 Y HHV-7

En determinadas circunstancias es necesario un diagnóstico específico para HHV-6 o HHV-7. Algunos ejemplos, se mencionan a continuación.

- En niños que presentan complicaciones durante la infección primaria para diferenciar el exantema causado por HHV-6 o HHV-7 de otras manifestaciones similares (como las causadas por rubéola, sarampión o por otras patologías febriles asociadas a exantemas) o por reacciones adversas al tratamiento con antibióticos

- En individuos inmunocomprometidos para determinar posibles asociaciones entre estos virus y sus manifestaciones clínicas:

→ Síndrome de inmunodeficiencia

→ Pacientes tratados con citostáticos y/o corticoides

→ Neumonía intersticial (trasplante de médula ósea)

→ Casos esporádicos asociados a hepatitis fulminante o síndrome hemofagocítico)

- Para estudios de seroprevalencia

- En manifestaciones clínicas en las cuales el rol patogénico de estos virus genera controversias, tales como en la esclerosis múltiple y el síndrome de la fatiga crónica

En la **infección primaria**: la detección de DNA viral en plasma, o una carga vírica elevada, son buenos marcadores predictivos. Otros autores han establecido que la detección de una carga viral elevada en células mononucleares de sangre periférica, o la combinación de la presencia del DNA del virus en dichas células, en ausencia de DNA en saliva, sugiere infección primaria. Sin embargo, la detección de anticuerpos IgM y/o IgG, siempre teniendo en cuenta los problemas de las reacciones cruzadas, es el procedimiento de elección por su sencillez y rentabilidad, tanto en niños como en adultos.

En la **infección en pacientes trasplantados**: la serología no se considera un procedimiento adecuado para distinguir una infección activa respecto a una latente, ni para el monitoreo de este tipo de pacientes, ya que si los mismos eran seropositivos con anterioridad al trasplante no suele haber cambios durante la reactivación, y si eran seronegativos, la inmunosupresión hace que la mayoría de las veces no haya respuesta inmunológica detectable. Algunos autores recomiendan el monitoreo periódico mediante PCR en la fracción acelular. La aparición de un aumento de la carga vírica en los pacientes trasplantados detectada en sangre o -mejor aún- en plasma, se asocia no sólo con una posible infección activa para HHV-6 y HHV-7, sino también como un marcador de enfermedad por HCMV. De todos modos, hasta el momento no existe un acuerdo unánime en los grupos de trasplante sobre la necesidad de llevar a cabo este monitoreo, por lo que la decisión de hacerlo dependerá de las condiciones de cada paciente en particular.

NOTA

Este capítulo se finalizó en el año 2008.

Bibliografía

- Ablashi DV, Balachandran N, Josephs SF, Hung CL, Krueger GR, Kramarsky B, *et al.* "Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates". *Virology* 1991; 184:545-52.
- Acott PD, Lee SH, Bitter-Suermann H, Lawen JG, Crocker CF. "Infection concomitant with pediatric renal allograft rejection". *Transplantation* 1996; 62: 689-91.
- Agut H, Aubin JT, Huraux JM. "Homogeneous susceptibility of distinct human herpesvirus 6 strains to antivirals in vitro". *J Infect Dis* 1991; 163:1382-83.
- Akashi K, Eizuru Y, Sumiyoshi Y, Minematsu T, Hara S, Harada M, *et al.* "Brief report: severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult". *N Engl J Med* 1993; 329:168-71.
- Baillargeon J, Piper J, Leach CT. "Epidemiology of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in pregnant and nonpregnant women". *J Clin Virol* 2000;16:149-57
- Bethge W, Beck R, Jahn G, Mundinger P, Kanz L, Einsele H. "Successful treatment of human herpesvirus-6 encephalitis after bone marrow transplantation". *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:1245-48.
- Boutolleau D, Cointe D, Gautheret-Dejean A, Mace M, Agut H, Grangeot-Keros L, *et al.* "No evidence for a major risk of roseolovirus vertical transmission during pregnancy". *Clin Infect Dis* 2003; 36:1634-5.
- Chan P K, Peiris JS, Yuen KY, Liang RH, Lau YL, Chen FE, *et al.* "Human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 infections in bone marrow transplant recipients". *J Med Virol* 1997; 53:295-305.
- De Bolle L., Naesens L., De Clercq E. "Update on Human Herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy". *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 217-45.
- Isegawa Y, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, *et al.* "Comparison of complete DNA sequences of human herpes virus 6 variants A and B". 1999; *J Virol* 73; 8053-63.
- Pellet PE, Dollard SC. "Human herpesviruses 6, 7, and 8". Specter S, Hodinka R, Young S. Editors. *Clinical Virology Manual*. USA: ASM Press 2000; 450-71.
- Wand, KN. "The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent". *J Clin Virol* 2005; 32:183-93.

23.6

Virus Epstein-Barr (herpesvirus humano 4)

M. Dolores Fellner - M. Alejandra Picconi

1. GENERALIDADES

El virus Epstein-Barr (EBV) o herpesvirus humano 4 (HHV-4) fue descubierto en 1964 por M. A. Epstein e Y. M. Barr, quienes hallaron partículas virales en líneas celulares establecidas en cultivo a partir de células provenientes de un linfoma de Burkitt, convirtiéndose así en el primer virus tumoral humano en ser identificado. Posteriormente, el EBV fue asociado con el desarrollo de mononucleosis infecciosa cuando se detectó conversión serológica (mediante el aumento de anticuerpos específicos) en individuos que cursaban la primoinfección. A partir de ese momento se ha ligado al EBV con numerosas patologías tanto benignas como malignas.

2. CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA

El virus Epstein-Barr pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *gammaherpesvirinae*, y es el único herpesvirus humano integrante del género *lymphocryptovirus*.

Tiene una estructura semejante a los demás herpesvirus. Posee una envoltura externa con espículas glicoproteicas, un tegumento proteico, una nucleocápside icosaédrica y un *core* toroideo de na-

turalidad proteica al que se enrolla el genoma viral. Dicho genoma es a DNA de doble cadena lineal, de 172 kpb aproximadamente y fue el primero de los herpesvirus en ser completamente secuenciado. Se caracteriza por poseer regiones con secuencias únicas y regiones con secuencias repetitivas, tanto internas (IR) como terminales (TR; Figura 23.6.1). El número de secuencias repetitivas terminales es característico de cada progenie viral, por lo que su homogeneidad o heterogeneidad ha sido utilizada para determinar si un grupo de células deriva de una misma célula infectada o de progenitores múltiples.

3. INFECCIÓN VIRAL

3.1 *IN VITRO*

El ciclo de propagación viral ha sido clasificado según el tipo de infección, productiva o no productiva, en un estadio de latencia (persistencia viral dentro de la célula) y un estadio lítico (lisis celular con producción de viriones). Muestra tropismo principalmente por linfocitos B y también es capaz de infectar células epiteliales.

La infección *in vitro* en linfocitos humanos primarios es muy eficiente e induce su proliferación en forma continua, lo que da

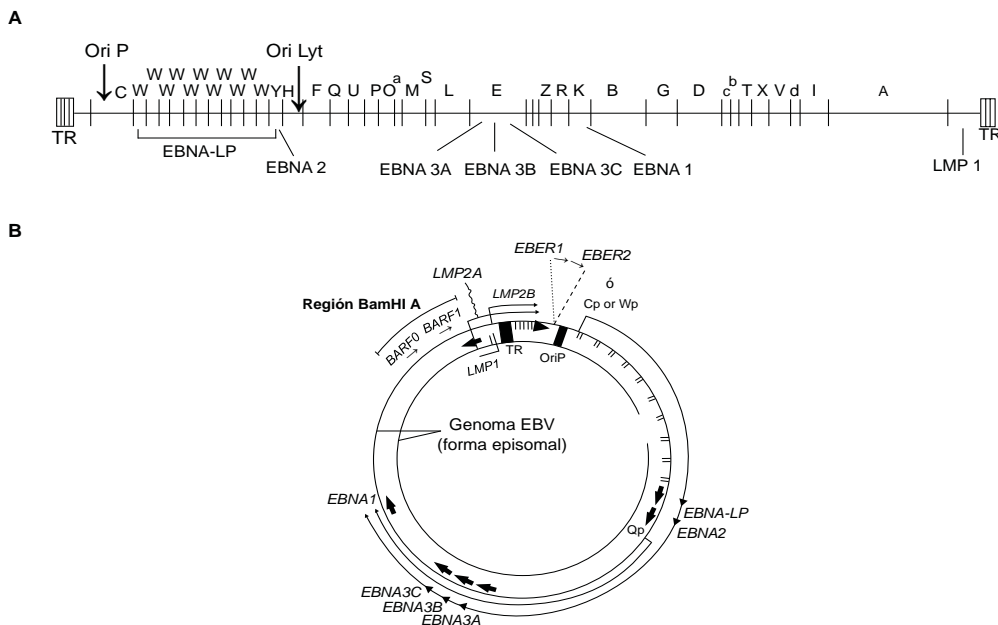


Figura 23.6.1. Genoma del virus Epstein-Barr. **A.** Forma lineal. Localización de los marcos abiertos de lectura de las proteínas de latencia sobre el mapa de restricción con la enzima *Bam*HI del genoma prototípico de la línea celular B95-8. Los fragmentos de restricción se denominan secuencialmente de acuerdo al tamaño, siendo A el de mayor longitud. Ori P: origen de replicación plasmídica; Ori Lyt: origen de replicación lítica. **B.** Forma episomal. Localización y transcripción de genes de latencia. EBNA-LP se transcribe a partir de un número variable de exones repetitivos de los fragmentos *Bam*HI W. LMP 2 se compone de múltiples exones localizados en ambos extremos de la región repetitiva terminal que se forma durante la circularización del DNA lineal para formar el episoma. Cp, Wp, Qp: promotores.

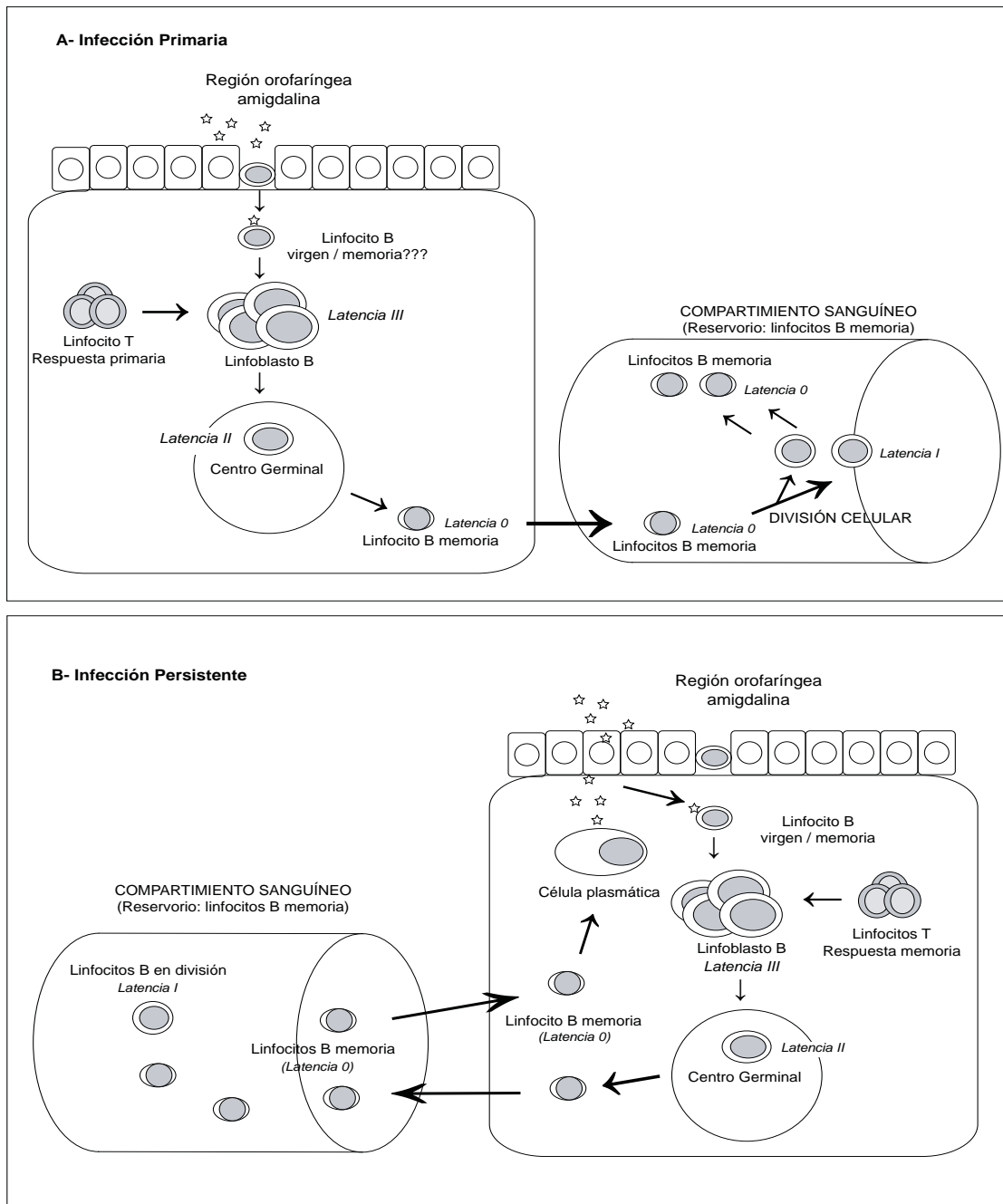


Figura 23.6.2A y 2B. Infección en el hospedador natural.

origen a líneas celulares linfoblastoideas (LCL). Esta capacidad ha sido crítica para otorgar al EBV su potencial oncogénico y provee el principal modelo de infección *in vitro*. El EBV ingresa al linfocito B a través de la unión de las glicoproteínas de envoltura gp350 y gp42 con el receptor del complemento CD21 y una molécula HLA de clase II, respectivamente. Cada célula proveniente de LCL transformada por EBV porta generalmente múltiples copias extracromosómicas de episoma viral y expresa en forma constitutiva una limitada cantidad de genes virales, que son las denominadas proteínas de latencia (latencia tipo III; Tabla 23.6.1). La expresión individual de las proteínas de latencia en líneas celulares B humanas ha permitido demostrar su rol crítico en el proceso de transformación, a través de la alteración de la transcripción de genes celulares y activación constitutiva de vías de señalización claves (p. ej., vía de señalización Notch). Se han observado patrones de

expresión génica viral semejantes a los descriptos *in vitro*, en diferentes tipos de células B infectadas y en células de tumores EBV positivos. En las LCL la replicación viral es mínima o indetectable e implica la expresión de genes asociados al ciclo lítico que codifican transactivadores (p. ej., BZLF1, BRLF1), enzimas de replicación (p. ej., BALF-5, BARF-1) y proteínas estructurales (p. ej., BNRF-1, BLLF-1). Así, algunas células provenientes de LCL pueden espontáneamente hacerse permisivas para la replicación viral e inclusive ciertas condiciones específicas de cultivo pueden influenciar la frecuencia con la que esto ocurre (medios libres de arginina, exposición a ciertas drogas: ácido butírico, ésteres de forbol, ionóforos, etc.).

Así como el EBV es capaz de infectar y transformar linfocitos B generando un sistema para estudiar dicha interacción, por el contrario, las células epiteliales *in vitro* son bastante resistentes a la infec-

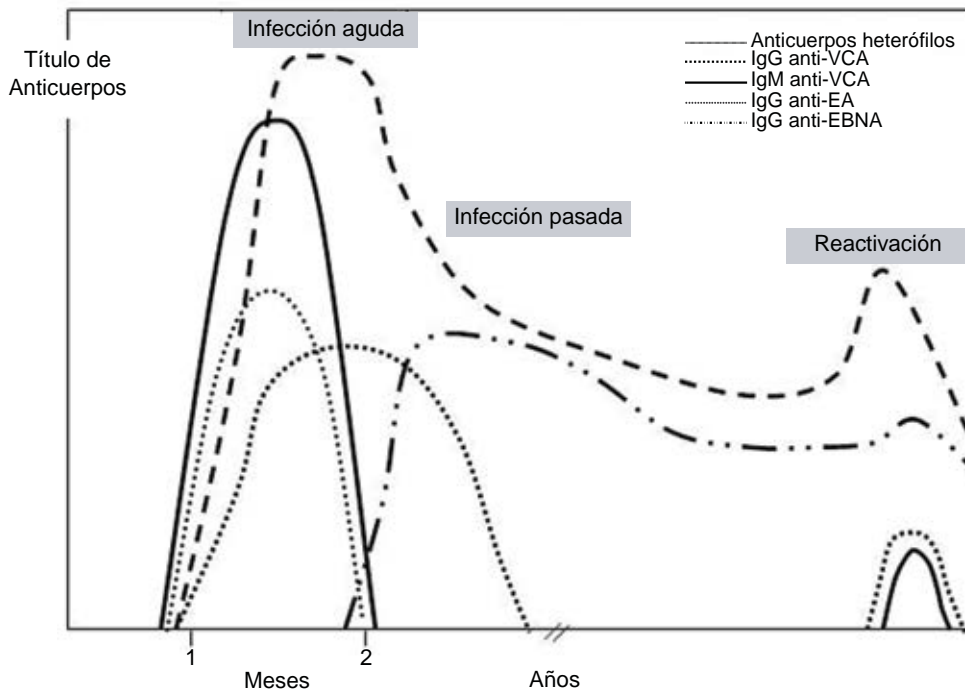


Figura 23.6.3. Respuesta serológica al virus Epstein-Barr utilizada en el diagnóstico de laboratorio.

ción con virus libre, observándose una muy baja tasa de infección. Además, la obtención de líneas celulares EBV positivas a partir de tejidos de carcinoma ha sido muy dificultosa debido a que es frecuente la pérdida del genoma viral durante el establecimiento de la línea celular. Sólo se ha logrado la inducción del ciclo lítico y una tasa de infección cuantificable cocultivando monocapas de células epiteliales con linfocitos infectados con EBV. La vía de infección en células epiteliales ocurre por un mecanismo diferente al de los linfocitos y todavía no ha sido bien definido.

3.2 EN EL HOSPEDADOR NATURAL

A diferencia de la infección *in vitro*, la comprensión de la biología de la infección por EBV *in vivo* es todavía rudimentaria. Durante la infección aguda a su hospedador natural (el ser humano) se han detectado altos títulos virales en la región orofaríngea que derivarían de la infección lítica, ya sea de linfocitos B dispersos en dicha mucosa o bien directamente del epitelio orofaríngeo. En este sentido, no ha sido aclarado aún el rol de las células epiteliales durante la infección primaria. A su vez, en amígdalas (y posiblemente en otros tejidos linfoides) se ha observado un gran número de células B infectadas con EBV: linfoblastos vírgenes expresando una latencia tipo III (el programa de crecimiento; Tabla 23.6.1), células del centro germinal y principalmente clones en expansión de linfocitos B de memoria. Muchas de estas células son eliminadas por la fuerte respuesta inmune celular primaria dirigida contra antígenos de latencia y líticos, que logra controlar la infección. Sin embargo, algunas células escaparían a dicha destrucción al dejar de expresar antígenos y transformarse en células B de memoria en reposo portadoras del genoma viral (Programa de latencia), generando un reservorio de EBV (Figura 23.6.2A). Si bien la subpoblación linfocitaria predominantemente infectada es la de memoria, no se ha esclarecido aún el mecanismo de entrada del virus a este tipo celular. Según el modelo propuesto por Thorley-Lawson y col. los linfocitos B vírgenes serían el principal blanco de la infección por EBV *in vivo* y dicha infección conduciría la transformación de linfocitos B vírgenes a memoria, mimetizando el proceso fisiológico de evolución normal del linfocito B. Así, durante el pasaje de una célula B infectada a través de una reacción del centro germinal se ha observado la expresión de un Pro-

grama restringido (Tabla 23.6.1), por medio del cual se aseguraría: a) la mantención episomal del genoma viral dentro de la célula debido a la expresión de EBNA-1 (*Epstein Barr nuclear antigen-1*); b) el rescate de linfocitos infectados hacia el compartimento de memoria a través de la expresión transitoria de LMP-1 (*Latent membrane protein-1*) y LMP-2, las que reemplazarían las señales provenientes de linfocitos T colaboradores (vía CD40) y del receptor de antígeno, respectivamente. Sin embargo, en amígdalas de pacientes con mononucleosis infecciosa, las células B infectadas se localizan en áreas extrafoliculares (no en centros germinales) y los clones en expansión no evidencian hipermutación somática en curso. Alternativamente, el EBV podría infectar en forma directa, además de linfocitos vírgenes, células B de memoria o del centro germinal preexistentes; éstas no se diferenciarían según el modelo de Thorley-Lawson y col. y serían eliminadas por una respuesta inmune apropiada. Sin embargo, esta hipótesis no explicaría la aparente desaparición de la población de linfoblastos B vírgenes infectados.

A su vez, durante la infección primaria circula una gran cantidad de linfocitos B infectados con EBV en sangre periférica (hasta el 50%), siendo la gran mayoría linfocitos B memoria en reposo (Programa de Latencia). Esto concuerda con el tipo celular infectado circulante descrito en portadores sanos, aunque en este caso en menor número. Así, luego de la infección primaria, este reservorio sería mantenido en forma estable a través de los mismos mecanismos fisiológicos que controlan la migración y diferenciación de células B de memoria; es decir, el encuentro fortuito con su antígeno reclutaría a las células infectadas hacia centros germinales, obteniéndose como consecuencia del tránsito a través del mismo una progenie de linfocitos que pueden recircular en el *pool* de linfocitos de memoria o bien diferenciarse a células plasmáticas (Figura 23.6.2B). Las células plasmáticas generadas pueden migrar hacia las mucosas y de esta manera, a través de una infección lítica, dar origen a viriones; éstos pueden ser excretados en la región orofaríngea y entonces transmitirse hacia nuevos individuos, o bien infectar células B vírgenes del mismo hospedador. En este sentido, se ha demostrado que la replicación de EBV en amígdalas se inicia en células plasmáticas y sería la diferenciación terminal de células B a células plasmáticas la que induciría dicha replicación viral.

	Latencia 0 ¹	Latencia I ²	Latencia II ³	Latencia III ⁴
EBNA 1	-	+	+	+
LMP-1, 2	-	-	+	+
EBNA 2, 3 _{A,B,C} , LP	-	-	-	+
BARTs	+	+	+	+
EBERs	+	+	+	+

Tabla 23.6.1. Tipos de infección latente del virus Epstein-Barr.

BARTs (*Bam*HI-A *rightward transcripts*): transcritos de la región *Bam*HI-A (al menos 16 exones) / EBERs (*Epstein-Barr virus-encoded small RNAs*): transcritos primarios (son dos: 1 y 2) / EBNA: antígenos nucleares de EBV (son seis: 1, 2, 3A, 3B, 3C y LP) / LMP: proteína latente de membrana (son tres: 1, 2A, 2B)

¹ *In vivo* denominado programa de latencia (*latency program*). Ej. linfocitos B de memoria en reposo

² *In vivo* denominado programa sólo EBNA-1 (*EBNA-1 only program*). Ej. linfocitos B de memoria en división, linfoma de Burkitt, carcinoma gástrico

³ *In vivo* denominado programa restringido (*default program*). Ej. células de centro germinal, linfoma de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo

⁴ *In vivo* denominado programa de crecimiento (*growth program*). Ej. linfocitos B activados, LCL, linfomas inmunoblásticos

Tumores asociados	Subtipo	Asociación (%)	Tipo de Latencia
Linfoma de Burkitt	Endémico Esporádico Asociado a SIDA	100 15-85 30-40	I
Linfomas en inmunosuprimidos	Inmunodeficiencias primarias DLPT Asociados a SIDA	100 > 90 > 80	III
Linfoma de Hodgkin	Celularidad mixta Nodular esclerosante	60-80 20-40	II
Linfoma T	Asociado a SH Nasal a células T y NK	100 100	I / II
Carcinoma nasofaríngeo	Indiferenciado (OMS tipo III) Diferenciados (OMS tipo I y II)	100 30-100	I / II
Otros carcinomas indiferenciados tipo nasofaríngeo [#]	En: estómago, región sinonasal En: timo, amígdalas, glándulas salivales, piel, pulmón, cérvix uterino	100 variable	I / II
Carcinoma gástrico	Adenocarcinomas	5-15	I / II
Leiomiomas	En pacientes inmunosuprimidos	100	III / ?

Tabla 23.6.2. Patologías malignas relacionadas al EBV. DLPT: Desórdenes linfoproliferativos post-trasplante. SH: Síndrome hemofagocítico. / [#] También se denominan carcinomas tipo linfopiteliomas.

Detección	Metodología	Indicador	Muestra	Comentarios
DNA viral	HIS	Asociación	Tejido fijado	DNA en tipo celular específico (sonda <i>Bam</i> HI-W)
	RFLP-SB	Clonalidad	Tejido	Discrimina entre infección latente y lítica
	PCR cualitativa	Inmunidad/Inf 1 ^a	CMP, SE	Útil en menores de un año, inmunodeficiencias
		Asociación	LCR	En pacientes con LPSNC y SIDA, inespecífico
PCR cuantitativa	React/Riesgo, Evolución	CMP, SE, Suero, Plasma	En: TOS y TMO, CNF, LH??, SIDA+linfomas? En IC: más sensible y específico que perfil serológico	
RNA viral	HIS-(EBERs)	Asociación	Tejido fijado	Ensayo de referencia para asignar asociación entre virus y tipo celular
Perfil génico	RT-PCR NASBA	Asociación con enfermedad?; Pronóstico?	Tejido fresco; CMP, SE	Su utilidad está actualmente en estudio
Antígenos virales (LMP-1, BZLF-1)	Inmuno-histoquímica	Asociación	Tejido fijado	En LH, LOV

Tabla 23.6.3. Metodología directa de detección del EBV aplicada al diagnóstico de laboratorio. CMP: células mononucleares periféricas. CNF: carcinoma nasofaríngeo. HIS: Hibridación *in situ*. IC: individuos inmunocompetentes. Inf 1^a: primoinfección. LH: linfoma de Hodgkin. LOV: leucoplasia oral vellosa. LPSNC: linfoma primario del sistema nervioso central. React: reactivación. RFLP + SB: análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción seguido de hibridación (*Southern blot*). SE: sangre entera. TMO: trasplantado de médula ósea. TOS: trasplantado de órgano sólido.

4. EPIDEMIOLOGÍA

La infección por EBV se halla ampliamente distribuida en todo el mundo, con una prevalencia mayor al 95% en la población adulta. La infección primaria ocurre por lo general durante los primeros años de la vida en forma asintomática; cuando dicha primoinfección se retrasa hasta la adolescencia o edad adulta temprana, situación observada con mayor frecuencia en poblaciones desarrolladas, puede presentarse con el cuadro clínico de mononucleosis infecciosa. De la historia natural de la infección por EBV se desprende que los viriones generados durante la fase lítica pueden transmitirse en forma oral a otros individuos a través de secreciones orofaríngeas y también puede adquirirse la infección por transfusión de sangre o trasplante de órganos a través de los linfocitos B infectados.

El EBV se ha clasificado en dos tipos principales, denominados en la actualidad 1 y 2 (originalmente A y B), en base a polimorfismos alélicos observados en un grupo de genes asociados a la latencia. Diversos estudios han mostrado que ambos tipos virales circulan en todas las regiones estudiadas, con un amplio predominio del tipo 1 en Europa, América y Asia, mientras que ambos tipos circularían con similar frecuencia en África ecuatorial, Nueva Guinea y algunas otras regiones. A su vez, el tipo 2 se ha hecho endémico en la población homosexual. La mayoría de los individuos sanos está infectada con un solo tipo viral, aunque también se han informado infecciones múltiples; estas últimas son frecuentes en pacientes inmunosuprimidos. También se han descrito otros subtipos o variantes virales que incluyen diferentes polimorfismos e inclusive recombinaciones

intratípicas. Por otra parte, estudios *in vitro* han mostrado que el tipo 1 tiene mayor poder transformante que el tipo 2. Sin embargo, no se ha logrado relacionar una patología tumoral asociada a EBV con un tipo o subtipo viral particular, siendo su distribución un reflejo de diferencias geográficas más que de asociaciones específicas.

5. PATOLOGÍAS ASOCIADAS

El EBV ingresa habitualmente por vía oral, replica en fauces y se excreta a través de secreciones orofaríngeas durante toda la vida, si bien es muy alta la concentración en las primeras semanas o meses.

La infección primaria por EBV puede ocasionar el cuadro clínico de *mononucleosis infecciosa (MI)*, cuyas características clínicas principales incluyen faringitis, fiebre, adenopatías y esplenomegalia. Las mismas reflejarían tres componentes de la enfermedad: a) daño celular debido a virus replicando en la región orofaríngea; b) linfoproliferación de células B y producción de citoquinas debido a infección latente en linfocitos B (latencia III); y c) patología inmune secundaria a la fuerte respuesta inmunológica. Generalmente, es una enfermedad benigna y autolimitada que resuelve en 3 a 6 semanas; ocasionalmente, se desarrollan algunas complicaciones cardíacas, respiratorias, renales, neurológicas, o hematológicas, que son rara vez fatales (p. ej., ruptura esplénica, obstrucción respiratoria). En algunos pocos individuos la primoinfección puede evolucionar hacia el desarrollo de *un síndrome hemofagocítico (SH)*, entidad en la que el principal tipo celular infectado con EBV es la población de células T (princi-

palmente CD8 positivas). La consecuente hiperactivación de linfocitos T promueve la activación de macrófagos, además de una desmedida producción de citoquinas conduciendo al desarrollo de esta patología. En forma muy poco frecuente algunos pacientes, especialmente niños, sufren síntomas graves de infección primaria que además se hacen persistentes o recurrentes; este cuadro se denomina *infección crónica activa por EBV (CAEBV)*. Es más común en Japón y tiene una alta mortalidad asociada en general al desarrollo de linfoma, síndrome hemofagocítico o hepatitis fulminante. En estos casos se ha hallado además de linfocitos B infectados, linfocitos T CD4 positivos o células NK. En los pacientes que padecen el *síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X*, se produce una inhabilidad para controlar la infección primaria por EBV debido a la alteración de una proteína (SH2D1A o SAP) que interviene en la regulación de señales de transducción necesarias para activar células NK y células T. Esta inmunodeficiencia primaria es poco frecuente, afecta varones, por lo general es fatal y clínicamente puede presentarse como una mononucleosis infecciosa fatal, un desorden linfoproliferativo, una disgamaglobulinemia y rara vez, como vasculitis linfocítica sumada a anemia aplásica. La *leucoplasia oral vellosa (LOV)* es una patología epitelial benigna asociada a EBV, que ocurre en los bordes laterales de la lengua en pacientes inmunosuprimidos. Se caracteriza por la replicación de EBV en células epiteliales orales, por lo que el tratamiento con drogas que inhiben su replicación resuelve la lesión aunque no elimina la infección persistente, ni la recurrencia.

El EBV también se asocia a una variedad de patologías malignas tanto de origen linfoideo como epitelial, como se describe en la Tabla 23.6.2. Para que un tumor sea asociado a EBV debe demostrarse la presencia del genoma viral en forma de episoma monoclonal (sugiriendo que el virus estuvo presente antes de la transformación maligna) o de los productos génicos virales en la mayoría de las células tumorales.

6. DIAGNÓSTICO

6.1 MÉTODOS INDIRECTOS

6.1.1 Serología

El diagnóstico de infección aguda en pacientes inmunocompetentes con el cuadro clínico de mononucleosis infecciosa se basa en la detección de anticuerpos heterófilos y/o anticuerpos específicos. La prueba de Paul-Bunnell, posteriormente modificada por Davidsohn, fue el primer ensayo desarrollado para la detección de anticuerpos heterófilos (aglutinación de glóbulos rojos de caballo, luego de la absorción del suero con antígeno de Forssmann y una emulsión de eritrocitos bovinos); actualmente existen otras técnicas más rápidas y menos laboriosas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos anticuerpos no siempre aparecen en niños pequeños y en algunos casos pueden persistir meses luego de la primoinfección.

La confirmación diagnóstica de primoinfección *versus* infección pasada en individuos inmunocompetentes se realiza a través de la detección de anticuerpos específicos, utilizando ensayos de inmunofluorescencia (ensayos de referencia) o ELISA. El diagnóstico de *infección primaria* se realiza mediante la detección de anticuerpos IgM contra antígeno de la cápside viral (VCA, *viral capsid antigen*) en ausencia de anticuerpos contra antígenos nucleares (EBNA; Figura 23.6.3). Cabe mencionar que se han descrito resultados falsos positivos de anticuerpos IgM anti-VCA debido a reacción cruzada con otros herpesvirus y también en pacientes con autoanticuerpos. Por otro lado, el estudio serológico de individuos portadores sanos (infección no reciente) revela la presencia sólo de anticuerpos IgG anti-VCA y anti-EBNA. El diagnóstico serológico de *reactivación viral* se ha asociado tradicionalmente a la presencia de altos títulos de anticuerpos contra antígenos tempranos (EA; *early antigen*) en presencia de anticuerpos IgG anti-EBNA y ausencia de anticuerpos IgM anti-VCA (Figura 3). Sin embargo, varios estudios han reportado la falta de especificidad en el uso de anticuerpos IgG anti-EA para el diagnóstico de reactivación viral;

además la respuesta serológica refleja una reactivación en forma retrospectiva y no un evento actual, por lo que la utilidad de este patrón serológico es limitada o nula.

El perfil serológico en pacientes con tumores asociados a EBV muestra altos títulos de anticuerpos IgG anti-VCA, e IgG anti-EA y una disminución de los anticuerpos IgG anti-EBNA. Dado que el mismo cuadro se observa en pacientes con enfermedades autoinmunes y otras disfunciones inmunológicas, la serología no es específica para su diagnóstico. En el caso particular de pacientes con carcinoma nasofaríngeo se observa la presencia particular de anticuerpos de clase IgA contra antígenos líticos asociada al cuadro de reactivación serológica. Así, actualmente se utiliza con éxito un panel de pruebas serológicas para tamizaje de poblaciones de alto riesgo y en casos confirmados de carcinoma nasofaríngeo para asignar pronóstico o detectar recaídas. En pacientes inmunosuprimidos la respuesta serológica a EBV es variada, lo que indica que el perfil serológico no es un marcador confiable del estatus clínico; en este sentido los métodos directos, tales como la detección de ácidos nucleicos o proteínas virales, generan información más fidedigna.

Por otra parte, estudios de inmunidad celular específica, tales como ensayos de tetrámeros (para su detección) o *Elispot* (para evaluar su funcionalidad), han mostrado algunos resultados prometedores en el campo clínico.

6.2 MÉTODOS DIRECTOS

6.2.1 Estudios moleculares

Los métodos directos de detección viral han permitido ligar al EBV con una variedad cada vez mayor de enfermedades benignas y malignas. De esta manera, la detección de ácidos nucleicos y los estudios inmunohistoquímicos permitieron importantes avances no sólo en el conocimiento de la historia natural de la infección por este virus, sino también en el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas. Dado que el EBV se halla presente en las células de tumores asociados, se ha sugerido que el virus puede ser usado como marcador tumoral para determinar la extensión de la diseminación de una enfermedad y para el control de su tratamiento. A su vez, pacientes con riesgo de desarrollar patologías malignas asociadas a EBV pueden beneficiarse a partir de pruebas de tamizaje basadas en la detección viral. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la mayoría de los individuos se infecta en los primeros años de la vida y que como el EBV persiste de por vida en linfocitos B, también puede ser detectado en portadores sanos. Por lo tanto, es importante resolver el problema de la especificidad para poder utilizar un determinado ensayo como marcador tumoral. En este sentido, se han observado altos niveles circulantes de EBV en la mayoría de los pacientes con linfomas asociados a EBV y carcinoma nasofaríngeo en relación a controles adecuados, sugiriendo que la medición de la carga viral puede ser útil en el diagnóstico y monitoreo de estos pacientes. Como ejemplo de aplicación clínica, merece ser destacada la utilidad del seguimiento de la carga viral en pacientes trasplantados como indicador de riesgo de desarrollo de DLPT (desorden linfoproliferativo postransplante), ya que permite a través de una intervención terapéutica oportuna, revertir esta patología evitando alcanzar el estadio de linfoma irreversible; asimismo se correlaciona la disminución de la carga viral con una respuesta favorable al tratamiento aplicado. La Tabla 23.6.3 resume la aplicación de la metodología directa de detección viral utilizados en el diagnóstico y monitoreo de pacientes con enfermedades relacionadas a EBV.

6.2.2 Otros

Cabe mencionar otros ensayos de detección directa, tales como la microscopía electrónica y el cultivo, que si bien no son prácticos para el uso clínico, permiten detectar, identificar y cuantificar viriones o linfocitos infectados, y también aislar cepas.

7. TERAPÉUTICA Y PERSPECTIVAS PARA UNA FUTURA VACUNA

Se han intentado diversas terapéuticas para el tratamiento de pacientes con MI, como el uso de inhibidores de la replicación viral (aciclovir, ganciclovir, foscarnet), inmunomoduladores (corticoides, IFN α , IL-2), sin haber sido demostrado su beneficio.

Dado que el EBV se asocia al desarrollo de una variedad de tumores, la terapéutica se ha focalizado en el diseño de nuevas terapias dirigidas contra la presencia del virus en células malignas. Entre ellas merecen destacarse las siguientes. *Immunoterapia*: la infusión de linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos de latencia expandidos *in vitro* ha demostrado su eficacia en pacientes con síndrome linfoproliferativo trasplantados de médula ósea y para su profilaxis. *Terapia génica*: aplicada a la expresión de proteínas citotóxicas o inhibitorias selectivamente de células de tumores, o a la inducción del ciclo lítico combinado con terapia antiviral. *Terapia farmacológica*: se está ensayando la aplicación de agentes demetilantes (5-azacitidina) capaces de inhibir la represión de genes inmunogénicos líticos y latentes en pacientes con carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Hodgkin y linfomas asociados a SIDA. La hidroxiurea, que provoca la pérdida de episomas virales *in vitro*, ha demostrado alguna eficacia en pacientes con SIDA y linfoma en SNC. Algunas estrategias buscan eliminar la función de proteínas individuales utilizando anticuerpos de una sola cadena o RNA anti-sentido.

Por otra parte, se ha postulado la potencial utilidad de una vacuna para prevenir la infección primaria por EBV (y sus cánceres asociados) en adolescentes seronegativos o en niños que serán inmunosuprimidos (trasplante de órganos). Así, una variedad de vacunas se hallan en ensayos clínicos, siendo la más

avanzada la prueba de una vacuna basada en la utilización de la glicoproteína de envoltura gp350 que se halla en fase II de los ensayos clínicos.

8. CONCLUSIONES

Existe convincente evidencia que relaciona al EBV con un rol significativo en la patogénesis de una amplia variedad de tumores. Los estudios iniciales fueron dirigidos al conocimiento de la epidemiología de la infección en la población humana y a dilucidar la relación entre el EBV y la transformación celular en sistemas de cultivo de células B. El análisis molecular del virus ha contribuido a la identificación de los productos virales relacionados al desarrollo de tumores y continúa aportando información acerca de su interacción con procesos celulares. Actualmente, está claro que los genes virales asociados a la latencia interaccionan no sólo con células B sino que en otros tipos celulares tienen funciones diferentes y probablemente más críticas; además, se ha reconocido la importancia del entorno celular en la determinación de la tolerancia a la infección y su evolución.

Si bien la comprensión de la interacción virus-hospedador se ha incrementado enormemente en la última década, todavía quedan muchas preguntas por responder. Así, el desafío actual consiste en explorar los mecanismos de acción de las proteínas virales que contribuyen a la tumorigénesis, de manera de obtener una mejor comprensión de la biología de la infección *in vivo*, desarrollar nuevas terapias para tratar las enfermedades asociadas a EBV y lograr una mejor apreciación de los procesos que llevan al desarrollo de cánceres en general.

Bibliografía

- Chabay P, De Matteo E, Merediz A, Preciado MV. "High frequency of Epstein Barr virus latent membrane protein-1 30 bp deletion in a series of pediatric malignancies in Argentina". *Arch Virol* 2004;149:1515-26.
- Correa RM, Fellner MD, Alonio LV, Durand K, Teyssié AR, Picconi MA. "Epstein-Barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene". *J Med Virol* 2004;73:583-8.
- Fellner MD, Durand K, Correa M, Bes D, Alonio LD, Teyssié AR, Picconi MA. "A Semiquantitative PCR method (SQ-PCR) to measure Epstein-Barr Virus Load: Its application in transplant patients". *J Clin Virol* 2003;28:323-330.
- Gulley ML. "Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related disease". *J Mol Diagn* 2001;3:1-10.
- Khanna R, Moss D and Gandhi M. "Technology Insight: applications of emerging immunotherapeutic strategies for Epstein-Barr virus-associated malignancies". *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2:1-12.
- Kurth J, Hansmann ML, Rajewsky K, Kuppers R. "Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction". *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4730-5.
- Laichalk LL, DA Thorley-Lawson. "Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus *in vivo*". *J Virol* 2005;79:1296-307.
- Luderer R, Kok M, Niesters H, Schuurman R, de Weerd O, Thijssen S. "Real-Time Epstein-Barr Virus PCR for the Diagnosis of Primary EBV Infections and EBV Reactivation". *Mol Diagn* 2005;9:195-200.
- Preciado MV, Diez B, Grinstein S. "Epstein Barr virus in Argentine pediatric Hodgkin's disease". *Leuk Lymphoma* 1997;24:283-90.
- Rickinson AB, E Kieff. "Epstein Barr Virus and its replication; and Epstein Barr Virus". En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editores. *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001;2511-2627.
- Rickinson AB, Kieff E. "Epstein-Barr Virus and its replication" and "Epstein-Barr Virus". En Fields Virology. Editores: Knipe DM, Howley, PM. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2007:2603-2700.
- Thorley-Lawson DA, A Gross. "Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas". Review. *N Engl J Med* 2004;350:1328-37.
- Vetsika EK, M Callan. "Infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus". *Expert Rev Mol Med* 2004;6:1-16.
- Williams H, DH Crawford. "Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice". *Blood* 2006;107:862-69.
- Young LS, AB Rickinson. "Epstein-Barr Virus: 40 years on". *Nature Reviews Cancer* 2004;4:757-67.



Herpesvirus humano 8 (HHV-8)

Luisa V. Alonio - Celeste Pérez

1. INTRODUCCIÓN

Han pasado más de 100 años desde la descripción inicial del sarcoma de Kaposi (SK) en lesiones cutáneas de adultos de edad avanzada. En 1994 Chang y colaboradores detectaron en lesiones de pacientes con HIV y con SK, secuencias de DNA viral al que llamaron virus Herpes asociado al SK (KSHV). Posteriormente, se demostró que el KSHV, también conocido como el virus herpes humano 8 (HHV-8), era el agente etiológico del SK. Las secuencias de este virus se encuentran en más del 90% de las lesiones del SK en todas sus formas clínicas. Si bien se lo ha asociado a varias patologías, hay una consistente evidencia de su rol como agente causal del linfoma primario de efusiones (PEL) y de la enfermedad multicéntrica de Castleman. A diferencia del resto de los virus herpes, el HHV-8 no es ubicuo y la prevalencia de la infección varía de acuerdo a una combinación de factores tanto geográficos como de comportamiento.

2. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

2.1 ESTRUCTURA

El HHV-8 pertenece a la subfamilia *Gammaherpesviridae* y es el primer integrante del género *Rhadinovirus* que infecta al hombre. Los miembros de este grupo se encuentran en primates no humanos, ungulados, conejos y ratones, siendo causantes de linfomas fulminantes y otros desórdenes del sistema hematopoyético. Los rhadinovirus comparten una estructura genómica similar y la mayoría contiene secuencias que parecen capturadas del genoma celular. Estas secuencias codifican para enzimas del metabolismo nucleotídico, antagonistas del sistema complemento, proteínas involucradas en la estimulación de la proliferación en células persistentemente infectadas, tales como interleuquinas y análogos de receptores de interleuquinas.

El genoma del HHV-8 ha mostrado una extensa homología con el del *Herpesvirus saimiri* de monos, como el gen K1, que codifica proteínas con capacidad transformante y la secuencia R que codifica proteínas transactivadoras también presentes en el virus Epstein-Barr (EBV). El HHV-8 es el virus herpes que más ha almacenado este tipo de genes *celulares capturados*, cuya función es codificar proteínas involucradas en la modulación de la respuesta inmune, la apoptosis y la proliferación de las células persistentemente infectadas.

El EBV es el gammaherpesvirus humano más relacionado con el HHV-8 y ambos comparten mecanismos relacionados con el establecimiento y el mantenimiento de la latencia, y con el pasaje desde la latencia a la infección lítica (productiva).

3. TRANSMISIÓN Y SEROPREVALENCIA

El HHV-8 no es un virus ubicuo como los demás miembros de la familia *Herpesviridae*. Se han descrito subtipos, en base al gen K1, que codifica para una proteína transmembrana de fase lítica exclusiva de HHV-8. Esta proteína se denomina VIP o K1; mediante el análisis filogenético del ORF K1 del HHV-8, éste se ha podido clasificar en 7 subtipos principales: A, B, C, D, E, F y Z que abarcan numerosas variantes (p.ej. A1-A5, B1-B3, C1-C7, D1-D3, E1-E2), cuyos cambios se correlacionan con ancestros

étnicos y geográficos en diferentes poblaciones. Recientemente se demostró que la seroprevalencia en bancos de sangre en países del Cono Sur es en general baja: 3,7% en Argentina; 3% en Santiago de Chile y 2,8% en Campinas, Brasil.

Los modos de transmisión no parecen ser los mismos en los países de baja endemicidad (menos del 5%) que en aquellos con mediana o alta (mayor al 10%).

Países de baja endemicidad. La mayoría de los infectados son hombres homosexuales y la seroprevalencia alcanza al 70% en los individuos co-infectados con el HIV. Numerosos factores de riesgo aumentan la seroprevalencia del HHV-8: la promiscuidad, la seropositividad para HIV, la antigüedad de la actividad homosexual, los antecedentes de enfermedades de transmisión sexual y el uso de drogas ilícitas por vía endovenosa.

La actividad sexual desempeña un rol importante en la transmisión del virus entre hombres que tienen sexo con hombres. El DNA viral ha sido detectado en esperma de seropositivos asintomáticos para HHV-8, pero en forma inconstante y en tan baja cantidad que sería insuficiente para transmitir la infección. Los factores sexuales de riesgo mencionados indican que otras formas de contactos íntimos con intercambio de secreciones, particularmente salivales, son responsables de la transmisión. La presencia del virus en saliva está documentada y podría explicar, en parte, la fuerte asociación entre la seroconversión para HHV-8, en individuos HIV negativos.

La seropositividad entre drogadictos que utilizan drogas inyectables, así como en hemofílicos y politransfundidos es baja y del mismo orden que en los dadores de sangre, lo cual indicaría que no es un virus habitualmente transmisible por sangre.

La transmisión puede ocurrir luego de un trasplante de órganos; hay varios estudios que describen el desarrollo de SK luego de un trasplante de riñón en individuos que eran seronegativos para HHV-8 antes del trasplante.

Países de alta endemicidad. En ellos, la epidemiología del virus y los modos de transmisión son diferentes. La seroprevalencia es alta ya en la infancia y al final de la pubertad, con tasas muy similares a la de los adultos. Además, se han descrito casos de SK en niños de África central, no asociados al HIV. La transmisión parece ocurrir antes de la pubertad y de la actividad sexual. Los estudios realizados en familias seropositivas para HHV-8, han sugerido la transmisión de la madre al niño y entre niños luego de los 5 años de edad. La carga viral en la leche es menor que en la saliva y no ha podido demostrarse una transmisión intrauterina, durante el parto o perinatal. La transmisión de la madre al hijo podría estar relacionada con la saliva, probablemente por la aplicación de la misma en lesiones cutáneas de los niños, o por la costumbre de masticar el alimento y luego dárselo a los niños.

La seroprevalencia del HHV-8 está asociada con la pobreza y condiciones de hacinamiento en las viviendas. La transmisión heterosexual no es significativa, ya que la seroprevalencia del HHV-8 no varía entre los 15 y los 45 años, rango que comprende los grupos etarios de mayor actividad sexual.

La epidemiología y modos de transmisión del HHV-8 comienzan a ser mejor comprendidos; sin embargo, persisten muchos interrogantes. El primero es la aparente ausencia de transmisión entre heterosexuales en la población general. Teniendo en cuenta la probable transmisión por saliva, esta diseminación es rara fuera de las zonas

endémicas, ya que la prevalencia debería ser mayor, como la del virus Epstein-Barr. Otro aspecto controvertido es la excepción africana a la buena correlación entre seroprevalencia de HHV-8 y la incidencia de SK. La frecuencia del SK en África no se superpone exactamente con la seroprevalencia de la infección por HHV-8. En África Central (Uganda), donde la seroprevalencia del HHV-8 en adultos alcanza el 60-80%, el SK presenta una incidencia de 5/100.000 habitantes; mientras que en África Occidental (Gambia) donde la seroprevalencia es similar, la incidencia de SK es más baja. En Egipto, donde la seroprevalencia en niños de 12 años es mayor del 50%, el SK es raro y ocurre en edad adulta. Lo mismo se observa en algunas poblaciones amerindias de Brasil donde la seroprevalencia es alta (41% en niños menores de 10 años; 65% en los adultos de más de 30 años), pero no hay registrados casos de SK. Muchos fenómenos podrían explicar estas discordancias, entre ellos, una subestimación del número de casos debido a la ausencia de un sistema de vigilancia del SK en esas regiones. Además, los estudios serológicos utilizan diferentes ensayos y valores de corte. Es evidente que las diferencias mencionadas podrían estar asociadas a cofactores aún no identificados que lleven a la infección por HHV-8 al desarrollo del SK.

Es probable que los estudios inmunogenéticos en realización puedan dar respuestas a estos interrogantes.

4. PATOGENIA

Estudios *in vitro* han demostrado que el HHV-8 puede infectar linfocitos B, células endoteliales y epiteliales; si bien los linfocitos B son el blanco principal, también puede infectar linfocitos T circulantes. En estados de inmunocompromiso, el HHV-8 podría contribuir indirectamente a la transformación maligna de los linfocitos infectados, aunque su participación en la patogénesis de linfomas es controvertida, debido a la co-infección con virus Epstein-Barr.

Como todo miembro de la familia *Herpesviridae* presenta períodos de latencia en los cuales es difícil detectarlo. Se ha demostrado que la infección viral presenta fases víricas intermitentes, lo cual explicaría por qué no se lo detecta en linfocitos periféricos de todos los pacientes con sarcoma de Kaposi.

La infección primaria, en la mayoría de los casos, se presenta con fiebre alta y erupción máculo-papular que se resuelve rápidamente sin adenopatías ni ulceraciones orales. También puede presentarse como un síndrome febril de origen indeterminado. En la infección de homosexuales HIV negativos se han documentado síntomas inespecíficos como diarrea, fatiga, erupción localizada y adenopatía; en inmunocomprometidos la infección está asociada a un espectro de signos y síntomas más graves que incluyen artralgias, adenopatías, esplenomegalia, observándose también citopenia.

4.1 PATOLOGÍAS MALIGNAS INDUCIDAS POR EL HHV-8

Durante la latencia, el virus produce proteínas que aseguran el mantenimiento del DNA viral y promueve la supervivencia de las células que actúan como reservorio. La promoción de la supervivencia celular es una característica del cáncer, por lo que no sorprende que estos virus estén asociados con patologías malignas (Figura 23.7.1).

4.1.1 Sarcoma de Kaposi (SK)

Es la principal enfermedad asociada a la infección con HHV-8. El SK es una neoplasia vascular que afecta a piel y tejidos blandos, con una anatomía patológica compleja que presenta un componente angiogénico, uno proliferativo y otro inflamatorio. En el examen de las lesiones se observa una variedad de tipos celulares incluyendo células endoteliales, células fusiformes (de origen endotelial) características del SK, células inflamatorias infiltrantes (linfocitos y monocitos) y gran cantidad de glóbulos rojos en los espacios extracelulares. La proporción relativa de estas poblaciones celulares varía en función del estadio evolutivo de la enfermedad. A partir de una pequeña mancha o placa inicial situada en la dermis, la lesión evoluciona progresivamente a una lesión nodular verdaderamente tumoral (Figura 23.7.2). Durante años se cuestionó su categoriza-

ción como cáncer porque no se podía establecer la monoclonalidad del tumor. El comportamiento clínico de esta enfermedad es más parecido a un cáncer que a un proceso infeccioso. Las lesiones de SK siempre contienen HHV-8, que se encuentra en forma latente en la mayoría de las células fusiformes, expresando un pequeño subgrupo de proteínas virales. Sólo en una pequeña proporción de estas células se expresa una gran cantidad de antígenos líticos, por lo que podría considerarse al SK como una enfermedad de la latencia. Sin embargo, es una sola proteína expresada durante el ciclo lítico y no el latente, la que puede iniciar y mantener las lesiones vasculares del SK. Es por esto, que el SK es un ejemplo de oncogénesis paracrinal donde unas pocas células producen factores que estimulan el crecimiento de las células vecinas.

Existen 4 formas clínico-epidemiológicas de SK: la clásica, la endémica, la iatrogénica y la epidémica asociada al SIDA.

La **forma clásica** descrita por Moritz Kaposi en 1872, se detecta en forma esporádica en la zona baja del Mediterráneo, particularmente Italia y Grecia, en individuos mayores de 60 años. Afecta más a los hombres que a las mujeres en una proporción de 5-15 hombres por cada mujer. El SK clásico es poco agresivo, comienza generalmente en la piel de miembros inferiores como máculas que progresan lentamente a pápulas y éstas a placas de color rojo violáceo.

El SK **endémico** descrito después de 1950 es la forma más frecuente en África Central y del Este, donde representa del 1 al 10% de los cánceres diagnosticados en la región. También es más frecuente en hombres que en mujeres en una proporción de 10-15 hombres por cada mujer y la incidencia aumenta con la edad. La presentación clínica es variable, en algunos casos, comparable a la forma clásica; en otros, mucho más agresiva, con nódulos diseminados y lesiones infiltrantes viscerales y ganglionares. El desarrollo del SK endémico no es frecuente en niños (menos del 5% de los casos) pero adopta formas ganglionares graves y en proporciones similares en niños y niñas.

El SK **iatrogénico**, también llamado post-trasplante, fue descrito a partir de 1970. Se observa en receptores de órganos que reciben terapia inmunosupresora de larga duración. Se puede desarrollar a partir de una infección por HHV-8 adquirida a través del órgano trasplantado o por reactivación de una infección preexistente. Una disminución o modificación del tratamiento inmunosupresor permite una regresión del tumor. La incidencia del SK en trasplantados es 500 a 1000 veces mayor que en la población general.

El SK **epidémico** inicialmente fue descrito en homosexuales infectados con HIV y actualmente es la forma más frecuente. Se presenta de forma diseminada con lesiones multifocales dérmicas, orales y viscerales. El SK en individuos con HIV podría deberse a que este virus ejerce un efecto promotor a través de la proteína Tat para el desarrollo de las lesiones cutáneas y vasculares al estimular la proliferación vascular, aunque el HIV no se considera un cofactor esencial.

4.1.2 Riesgo de desarrollar SK

El riesgo de SK en individuos sanos y seropositivos para HHV-8 es bajo; por el contrario, en inmunocomprometidos es mucho más alto. **HIV positivos.** Actualmente, el SK se presenta como enfermedad asociada a SIDA en el 15% de homosexuales y en el 2% de heterosexuales. Antes del uso extendido de la terapia antirretroviral, la probabilidad de que un HIV positivo infectado con HHV-8 desarrollara SK en 10 años era del 30 al 50%. Con la introducción de la terapia antirretroviral, la incidencia de SK fue decreciendo significativamente en países industrializados. Sin embargo, es un grave problema de salud en África Central y del Este donde es alta la prevalencia del HHV-8 y existen dificultades económicas para recibir esas terapias. En dichas regiones representa el 20 al 50% de todos los cánceres diagnosticados.

En individuos coinfectados con ambos virus, una disminución de linfocitos CD4⁺ o el aumento de la carga viral de HIV son factores que predisponen el desarrollo de SK. También se observó que la detección de HHV-8 en linfocitos periféricos era un factor de predicción de SK.

Trasplantados. La terapia inmunosupresora posttrasplante predispone el desarrollo del SK. Entre el 0,2 al 5% de los trasplantados renales desarrolla SK ya sea por reactivación de la infección o por

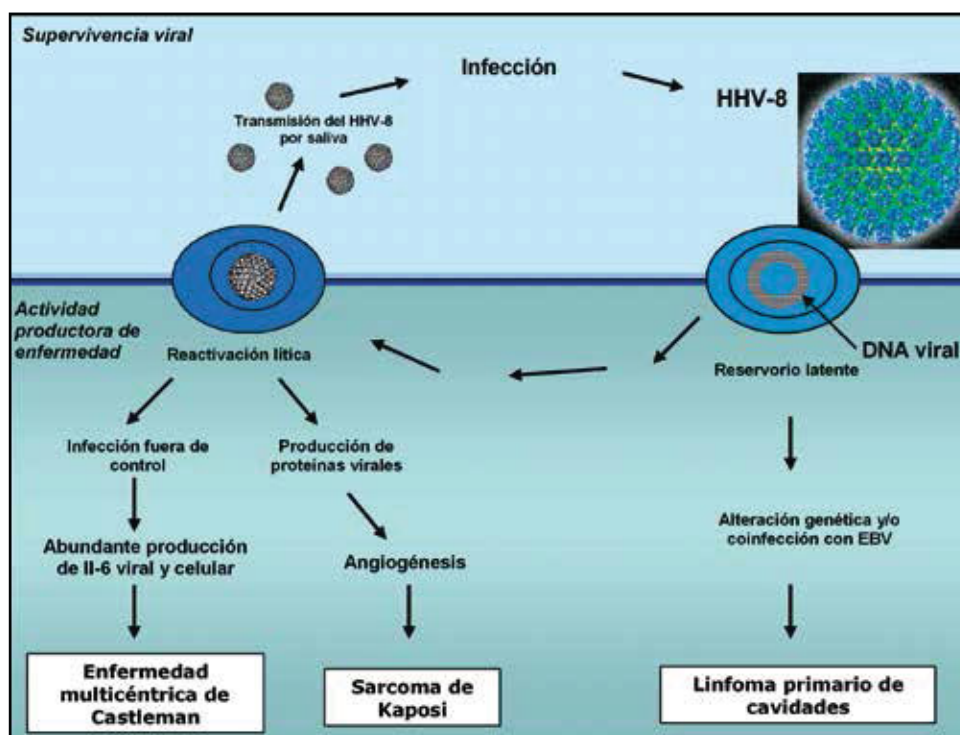


Figura 23.7.1. Patologías malignas asociadas al HHV-8: un efecto colateral de la estrategia de supervivencia viral.



Figura 23.7.2. Sarcoma de Kaposi en tórax. (Fotografía amablemente cedida por el Dr. Jorge Benetucci, Hospital Muñiz).

primoinfección en el trasplante. Hay una apreciable morbi-mortalidad asociada con el desarrollo de SK en trasplantados; el 40 % presenta diseminación visceral y en aproximadamente el 17-20% es la causa de muerte. Si bien una reducción o suspensión de la terapia inmunosupresora produce remisión completa del SK, el 65% de los pacientes puede sufrir rechazo o fallas en la función del órgano trasplantado, mientras que la frecuencia de estos trastornos en la población general trasplantada es del 21%.

4.1.3 Enfermedad multicéntrica de Castleman (EMC)

La enfermedad de Castleman fue descrita inicialmente en la década del 50 del siglo pasado. Es un síndrome linfoproliferativo policlonal que afecta a una variedad de tejidos linfoides o no linfoides y en su forma sistémica, suele acompañarse de sintomatología general. Dicho cuadro se halla íntimamente relacionado al SK pudiendo coexistir ambos procesos en un mismo individuo y particularmente, en aquellos pacientes con evidencia de infección por HIV. La EMC, también se llama síndrome de POEMS (Poliadenopatías, Organomegalia, Endocrinopatía, IgM

aumentada y alteraciones en la piel (en inglés *skin*). En pacientes inmunocompetentes, el virus está presente en aproximadamente el 50% de los casos de EMC y casi en el 100% del los pacientes infectados con HIV. El HHV-8 se encuentra en células B de la zona del manto de los nódulos linfáticos y una porción importante de estas células expresa antígenos líticos. La enfermedad de Castleman se ha vinculado a un exceso de interleuquina 6. El HHV-8 produce entre sus proteínas líticas una molécula muy similar a la interleuquina 6 de origen humano, responsable de la fisiopatología de la EMC. Esta enfermedad es la resultante de la activación del ciclo lítico en el contexto de un hospedador con un control deficiente de su sistema inmune.

4.1.4 Linfoma primario de efusiones (PEL: *Primary effusion lymphoma*)

Es un tipo raro de linfoma de células B, no Hodgkin asociado a la infección por HHV-8 que se manifiesta en cavidades corporales (pericárdica, pleural y peritoneal). Morfológicamente las células son indiferenciadas, de gran tamaño y a veces poseen características de inmunoblastos. El inmunofenotipo presenta una marcada pérdida de la mayoría de los antígenos B, ausencia de expresión de moléculas de adhesión y expresión de antígenos de activación tales como el CD23, CD25, CD38 y EMA. El genotipo es el de una célula B con reordenamiento de las cadenas de inmunoglobulinas.

El PEL se halla generalmente co-infectado con el virus Epstein-Barr, pero a diferencia del linfoma de Burkitt, no hay reordenamiento del gen *c-myc*. La mayoría de las veces se observa en el curso de una co-infección con HIV.

El pronóstico es malo con una media de supervivencia menor a los 6 meses. Dos factores de mal pronóstico previo al diagnóstico de PEL son el deterioro del estado general y la ausencia de terapia antirretroviral.

5. DIAGNÓSTICO

5.1 SEROLOGÍA

Los anticuerpos que se producen durante la infección están dirigidos contra antígenos expresados en la latencia, como el antígeno nuclear LANA (codificado por el ORF 73), los antígenos

líticos como los de la cápside (codificados por el ORF 65) o las glicoproteínas de membrana. Varias técnicas serológicas han sido desarrolladas para detectar anticuerpos anti-HHV-8: inmunofluorescencia (IFI), inmunoperoxidasa (IP), ensayo inmunoenzimático (ELISA) y *Western blot* (WB).

Las técnicas de IFI e IP utilizan como sistema de detección de virus a líneas celulares (BCBL-1, BCP-1; BC-3; KS-1) establecidas a partir de líneas tumorales obtenidas de linfomas no infectadas con EBV. Las técnicas de ELISA emplean combinaciones de diferentes antígenos recombinantes o de péptidos sintéticos.

Existe una discordancia en los resultados de detección según las técnicas utilizadas y el tipo de anticuerpos investigados. En general, son más frecuentes los anticuerpos dirigidos contra antígenos líticos que contra los antígenos de la fase de latencia. Cuando se compararon diferentes ensayos serológicos, se observó que la mayoría es eficaz para la detección de anticuerpos en pacientes con SK, EMC o PEL; sin embargo, los resultados son discordantes cuando se trata de evaluar el estatus serológico de la población general.

5.2 DETECCIÓN DE DNA VIRAL EN FLUIDOS CORPORALES

El DNA viral se detecta por PCR con mayor frecuencia –y en alta concentración– en saliva de homosexuales masculinos seropositivos para HHV-8; también puede hallarse en linfocitos periféricos y menos frecuentemente en semen, secreciones prostáticas, hisopados anales y uretrales. La PCR detecta DNA viral en linfocitos periféricos en el 10-20% de las personas serológicamente positivas y podría considerarse un marcador de infección en curso.

6. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

6.1 PREVENCIÓN

La mejor terapia para prevenir el SK en HIV positivos es la misma terapia antirretroviral. Por otro lado, en el caso de los pacientes trasplantados la reducción de la terapia inmunosupresora en el manejo del SK puede tener consecuencias adversas relacionadas con el rechazo del órgano, por lo que será necesario contar con tratamientos específicos.

- **Identificación de pacientes con alto riesgo y detección temprana del SK.** Los tests serológicos son los más sensibles para detectar pacientes en riesgo; el monitoreo de la carga viral en linfocitos periféricos en los pacientes HHV-8 seropositivos podría ayudar a identificar a estos pacientes. La determinación de la carga viral es útil en pacientes HIV positivos, que no responden

a la terapia antirretroviral, con alta carga de HIV y bajo nivel de linfocitos CD4⁺. Por otro lado, en pacientes cuyos resultados serológicos sugieren un alto riesgo de SK, es conveniente alentar el autoexamen de la cavidad oral que podría detectar el SK en etapas tempranas, cuando el tratamiento es más efectivo.

- **Detección de HHV-8 en dadores y receptores de órganos.** La mayoría de los casos de SK en trasplantados son producto de una reactivación del HHV-8; sin embargo, habría que evitar que individuos HHV-8 seropositivos sean donantes de pacientes seronegativos, para prevenir el desarrollo del SK. Aunque la evidencia actual es insuficiente para recomendar evitar un trasplante sobre la base de la presencia de seropositividad del donante, habría que analizar el costo-beneficio de tales estrategias teniendo en cuenta el tipo de órgano y la prevalencia regional de la infección por HHV-8; además, el uso de diagnóstico de HHV-8 post-trasplante podría tener beneficios en la vigilancia de receptores en riesgo de SK y la profilaxis o el tratamiento del mismo.

6.2 TRATAMIENTO

El tratamiento difiere según el tipo de enfermedad asociada al HHV-8.

Sarcoma de Kaposi. Los inhibidores de la DNA polimerasa de los virus herpes, como foscarnet, ganciclovir y cidofovir, son efectivos en la infección lítica pero no en la latente. Existen publicaciones de tratamientos profilácticos exitosos con estos antivirales y también con zidovudina para prevenir el desarrollo del SK. Si bien ninguna de estas drogas está aprobada para el tratamiento específico del HHV-8, algunos estudios han mostrado que en los pacientes tratados acontece la remisión de las lesiones.

El control de la infección del HIV con el cóctel de antivirales utilizado en la terapia antirretroviral de alta eficacia (HAART) es parte integral de una exitosa terapia para el SK asociado a SIDA.

Otras terapias combinadas incluyen tratamientos localizados en las lesiones utilizando crioterapia, retinoides y drogas oncológicas o con antivirales, aunque no impiden la recurrencia del SK.

La terapia sistémica mediante tratamiento con interferón alfa o quimioterapia se indica cuando hay diseminación visceral, progresión a formas mucocutáneas y linfedema.

Enfermedad multicéntrica de Castleman. Los tratamientos con antivirales para la variante asociada al HHV-8 demostraron resultados controvertidos.

Linfoma primario de cavidades. Se lo trata como un cáncer, con una combinación de ciclofosfamida, vincristina, antraciclinas, doxorubicina y corticosteroides, administrados en forma cíclica (CHOP).

Bibliografía

- Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE Jr., Cesarman E. "Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases". *Clin Microbiol Rev* 2002;15:439-64.
- Boulanger E, Gerard L, Gabarre J, Molina JM, Rapp C, Abino JF, et al. "Prognostic factors and outcome of human herpesvirus 8-associated primary effusion lymphoma in patients with AIDS". *J Clin Oncol* 2005;23:4372-80.
- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowless DM, et al. "Identification of an herpesvirus-like DNA sequences in AIDS associated Kaposi's sarcoma". *Science* 1994;266:1865-9.
- Dollard S.C., Butler L.M., Graves Jones A.M., Mermin J.H., Dollard SC, Butler LM, Graves Jones AM, Mermin JH, Chidzonga M et al. "Substantial regional differences in human herpesvirus 8 seroprevalence in sub-saharan Africa: insights on the origin of the "KS Belt". *Int J Cancer* 2010; 127:2395-401.
- Pérez CL, Tous MI, Zala N, Camino S. "Human herpesvirus 8 in healthy blood donors, Argentina". *Emerg Infect Dis* 2010; 16, 150-1.
- Pérez C, Tous M, Benetucci J. "Correlations between synthetic peptide-based enzyme immunoassays and immunofluorescence assay for detection of human herpes virus 8 antibodies in different Argentine populations". *J Med Virol* 2006; 78: 806-13.
- Pérez C, Tous M, Gallego S, Zala N, Rabinovich O, Garbiero S, et al. "Seroprevalence of human herpesvirus 8 in blood donors from different geographical regions of Argentina, Brazil and Chile". *J Med Virol* 2004;72:661-7.
- Plancoulaine S, Gessain S. "Aspects épidémiologiques de l'herpès humain 8 (HHV-8) et du sarcome de Kaposi". *Médecine et Maladies Infectieuses* 2005;35:314-21.
- Tornesello ML, Biryahwaho B, Downing R, Hatzakis A, Alessi E, Cusini M, et al. "Human herpesvirus type 8 variants circulating in Europe, Africa and North America in classic, endemic and epidemic Kaposi's sarcoma lesions during pre-AIDS and AIDS era". *Virology* 2010; 398: 280-9.

HEPATITIS VIRALES

María Luján Cuestas - Verónica Lidia Mathet - María Laura Minassian
José Raúl Oubiña - Cintia Wanda Rivero - Julieta Trink

24.1

Hepatitis virales

José Raúl Oubiña

1. INTRODUCCIÓN

Diversos agentes infecciosos –como los hongos, protozoarios, bacterias y virus– pueden afectar al hepatocito y, por ende, la función hepática.

Aunque fue necesario arribar hasta el siglo XX para aislar e identificar a muchos de los agentes causales de hepatitis virales, muy probablemente las primeras descripciones de cuadros clínicos compatibles con estas infecciones se remontan hasta tiempos de Hipócrates en el siglo V a.C.

En la actualidad se identifican los virus primariamente hepatotropos, causantes de la mayoría de las hepatitis virales, con las cinco primeras letras del alfabeto: de la A a la E (Tabla 24.1.1). Sin embargo, otros agentes virales deben ser también incluidos entre las posibles causas de compromiso de la glándula hepática (Tabla 24.1.2), aunque en este caso el hígado puede o no estar involucrado durante el curso de la infección. Estas hepatopatías virales han sido denominadas secundarias o sindrómicas y forman parte, con frecuencia, de entidades nosológicas definidas, que se describen en otros capítulos del libro. A continuación se presentarán algunos aspectos relacionados con los agentes etiológicos de las hepatitis

A, B, C, D y E. En el final de este capítulo se mencionarán algunos datos recientes que demuestran la existencia de otros virus que fueron asociados en principio a la replicación en hígado, pero que actualmente no se consideran causantes de hepatitis.

Hasta mediados de 1960, sólo existían evidencias epidémicas e inmunológicas que permitían sospechar que tanto la materia fecal, como el contacto sexual o la transfusión de sangre de ciertos individuos que padecían afección hepática, podían transmitir la enfermedad a otras personas. Los estudios realizados por S. Krugman en Willowbrook, Nueva York, demostraron claramente que era posible transmitir a un mismo paciente los agentes responsables de las entonces llamadas hepatitis epidémicas (MS-1) y séricas (MS-2), con lo que quedaba establecido que al menos dos agentes estaban implicados: los hoy denominados virus hepatitis A (HAV) y B (HBV), respectivamente.

En 1965, B. S. Blumberg y colaboradores describieron un *nuevo* antígeno en el suero de pacientes leucémicos australianos. Este antígeno –en principio denominado australiano– fue posteriormente identificado como el antígeno de superficie (HBs Ag) del HBV. Al observar en una prueba de inmunodifusión una banda correspondiente a la precipitación de dicho antígeno al enfrentarse con el suero



Virus	A	E	B	C	D
Familia ^a	<i>Picornia</i>	<i>Hepe</i>	<i>Hepadna</i>	<i>Flavi</i>	No asignada
Tamaño del virión ^b	28 nm	34 nm	42 nm	60 nm	36 nm
Genoma: tipo ^c	RNA (+)	RNA (+)	DNA (dc/sc)	RNA (+)	RNA (-) c
Tamaño (kb)	7,8	7,5	3,2	9,4	1,7
Cápside	VP1-VP4	Una	HBc Ag	HCc Ag	HD Ag
Envoltura	No	No	HBs Ag	E ₁ - E ₂	HBs Ag
Transmisión	Fecal - oral (F-O)*	F-O, trasfusional	Parenteral, sexual (S)	Parenteral, S	Parenteral, S
Prevalencia	Alta	Regional	Baja, regional	Moderada	Baja, regional
Curso fulminante	Raro	En embarazada	Raro	Raro	Frecuente
Curso crónico	Nunca	En inmunosuprimido (IS)	Frecuente	Muy frecuente	Muy frecuente
Oncogenicidad	No	No	Sí	Sí	No
Diagnóstico					
- Antígeno	No ^d	No ^d	Sí ^e	Sí ^e	Sí ^e
- Ácido nucleico	No ^d	No ^d ; Sí en IS	Sí ^e	Sí ^e	Sí ^e
- Anticuerpo	Sí ^e	Sí ^e	Sí ^e	Sí ^e	Sí ^e
Terapéutica	No	No	Sí	Sí	Sí
Vacuna/s	Inactivada y atenuada	Cápside recombinante ^f	HBs Ag y pre-S Ag recombinante	No	No

Tabla 24.1.1. Virus hepatotrópicos primarios. Clasificación, propiedades biológicas y propiedades clínicas. ^a Todos los virus constituyen nuevos géneros en sus respectivas familias; el HBV y el HEV, nuevas familias. / ^b Todos los virus son esféricos. / ^c (+) sirve como RNAm; (-) complementario al RNAm; c = circular / ^d Aunque puede detectarse **virucopria y/o viremia** mediante la detección de antígenos virales o del genoma viral, **ninguno de los dos procedimientos se utiliza habitualmente en el diagnóstico virológico** de las infecciones por HAV o HEV. / ^e Suero / ^f Superó la evaluación de seguridad y eficacia (fase 2) en una población de riesgo de Nepal; otra formulación a VLPs superó la fase 3 en China. *puede transmitirse también por relaciones homosexuales masculinas.

Familia	Virus
<i>Herpesviridae</i>	Epstein-Barr* Citomegalovirus humano* Herpes simplex Varicela-zóster
<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus
<i>Togaviridae</i>	Rubéola
<i>Flaviviridae</i>	Fiebre amarilla Dengue
<i>Picornaviridae</i>	Polio Coxsackie B ECHO
<i>Paramyxoviridae</i>	Sarampión Parotiditis
<i>Arenaviridae</i>	Junín Lassa
<i>Filoviridae</i>	Ébola Marburg
<i>Bunyaviridae</i>	Andes
<i>Influenzaviridae</i>	Influenza A H5N1
<i>Coronaviridae</i>	SARS-CoV
<i>Retroviridae</i>	HIV**

Tabla 24.1.2. Virus asociados a hepatopatías sindrómicas: algunos ejemplos. * Asociado frecuentemente a hepatitis. ** Asociado a esteatosis y a esteatohepatitis.

a su vez, es el más frecuente a nivel mundial. Si bien aproximadamente el 90% de los infectados se curan, un 2-10% desarrolla una enfermedad crónica, con frecuencia asociada a lesiones de alta morbi-mortalidad. Entre uno y dos millones de personas infectadas con HBV mueren anualmente en el mundo.

El HBV fue el primer agente descubierto de un grupo actualmente identificado como familia *Hepadnaviridae* (virus hepatotrópicos con genoma a DNA), cuyos integrantes se caracterizan por un modo de transmisión similar al de los retrovirus. Entre los hepadnavirus se incluyen agentes que infectan mamíferos (género designado como *Orthohepadnavirus*) y aves (*Avihepadnavirus*). Así, están incluidos también en el género *Orthohepadnavirus* el virus *Hepatitis de la marmota*, el virus *Hepatitis de la ardilla de suelo*, el virus *Hepatitis de la ardilla ártica*, el virus *Hepatitis B del mono lanudo*, y los respectivos virus *Hepatitis B del gorila*, *orangután*, *chimpancé* y *gibón*. El género *Avihepadnavirus* comprende el virus *Hepatitis B del pato pekinés*, el virus *Hepatitis B de la garza*, y probablemente otros miembros. Estos virus no son patógenos para el ser humano.

En 1977 M. Rizzetto observó en un grupo de pacientes italianos crónicamente infectados, una enfermedad hepática aguda, logrando detectar mediante estudios de inmunofluorescencia un antígeno que se conoció como delta. Este antígeno fue posteriormente confirmado como perteneciente a la estructura de un agente virus-símil cuyo RNA muestra semejanzas con el de los virioides de las plantas y/o virus satélites. Este virus –en principio designado agente delta y actualmente denominado virus hepatitis delta (HDV)– sólo puede infectar individuos en los que se ha establecido una infección productiva previa (sobreinfección) o concomitante (coinfección) con el HBV, ya que requiere de la colaboración de éste para su propagación. La participación del HDV en individuos infectados con HBV produce desde cuadros agudos más severos a los que corresponderían por la infección única con este último, hasta el desarrollo de una hepatopatía crónica grave con cirrosis. El HDV no ha sido aún clasificado de manera definitiva.

En 1973, S. M. Feinstone, A. Z. Kapikian y R. H. Purcell identificaron por primera vez las partículas del HAV, lográndose en 1975 infectar primates y años más tarde cultivar el virus en células. La obtención de reactivos para diagnóstico permitió determinar que el HAV es el mayor causante de *epidemias de ictericia* por transmisión fecal-oral. En 1989 se publicaron resultados experimentales exitosos empleando una vacuna anti-hepatitis A inactivada con formalina, obtenida en cultivos celulares.

Hasta 1988, en los países desarrollados, a pesar de haberse disminuido las hepatitis postransfusionales causadas por el HBV mediante el control de sangre de hemodonantes, el 10% de los transfundidos desarrollaban cuadros de hepatitis, que no presentaban marcadores para HAV, HBV u otros virus hasta entonces identificados

(conteniendo anticuerpos específicos) de un individuo hemofílico con múltiples transfusiones, se obtuvo una primera pista. El subsiguiente desarrollo de una hepatitis aguda en una técnica de laboratorio que manipulaba las muestras séricas, sugirió el nexo entre el agente etiológico y la enfermedad. Por estas observaciones, Blumberg recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1976.

La utilización de reactivos diagnósticos y la consiguiente exclusión de hemodonantes en los que se detectaba el HBs Ag permitieron no sólo controlar esa forma de diseminación, sino también describir la historia natural y la epidemiología de la hepatitis por HBV.

En la actualidad existen entre 350 y 460 millones de personas infectadas en el mundo, de modo permanente, con HBV; ésta es la principal causa de cirrosis y hepatocarcinoma celular; este cáncer,

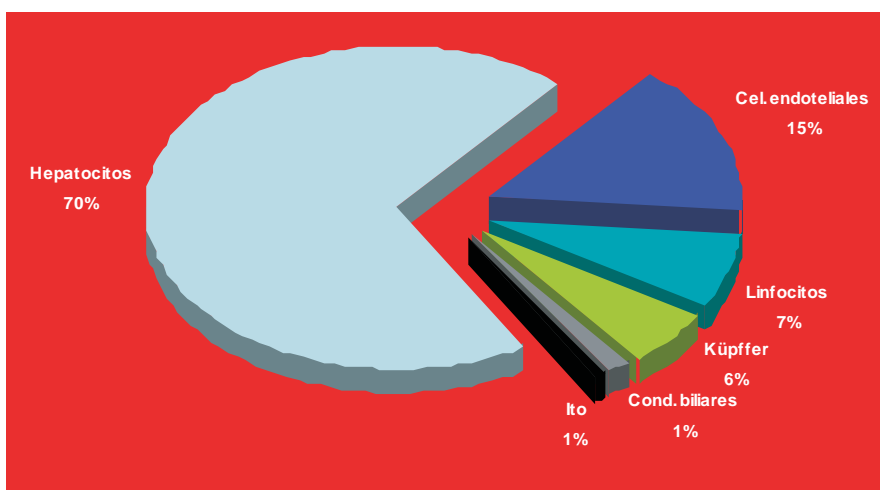


Figura 24.1.1. Contribución porcentual de las diferentes estirpes celulares a la constitución del hígado.

que pudieran causar la enfermedad (citomegalovirus humano, virus Epstein-Barr, fiebre amarilla y muchos otros) por lo que se la llamó hepatitis no-A no-B postransfusional. Dependiendo de cada caso, estas hepatitis no sólo pueden transmitirse por transfusiones sino también, probablemente, mediante el contacto parenteral o sexual.

En 1988 –mediante la colaboración científica de los grupos de D. Bradley del Centro de Control de Enfermedades (CDC, *Centers for Diseases Control and Prevention*) de EE.UU. y de M. Houghton de la Corporación Chiron– se documentó la existencia de un nuevo agente viral, descubierto a partir de la infección experimental de un chimpancé inoculado con sangre humana identificada como causal de hepatitis postransfusional no A no B. Los ácidos nucleicos virales fueron extraídos del plasma de ese primate, clonados en vectores apropiados (bacteriófago lambda gt11) y expresados en *Escherichia coli* y levaduras. Con ello se logró la expresión de proteínas virales que reaccionaban con suero de convalecientes de hepatitis no-A no-B. Si bien el virus no fue inicialmente aislado, los ácidos nucleicos clonados corresponden a un agente causante –en ese entonces– de la vasta mayoría de las hepatitis postransfusionales, así como una significativa proporción de hepatitis *adquiridas en la comunidad* en todo el mundo: el virus hepatitis C (HCV). El análisis comparativo de secuencias nucleotídicas y los estudios de caracterización viral desarrollados en el modelo chimpancé indican que el HCV es un miembro de la familia *Flaviviridae*. Éste fue el primer caso de la historia de la Microbiología, en el que se descubría un agente etiológico de una enfermedad infecciosa, al margen del conocimiento de su estructura morfológica y antigénica.

Otro agente viral, inicialmente caracterizado como causante de hepatitis no-A no-B epidémicas, transmitido principalmente mediante aguas contaminadas con excretas fecales humanas y por contacto con animales reservorios, ha sido designado como virus hepatitis E (HEV). Su caracterización genómica se obtuvo en 1990 gracias a los estudios de G. Reyes y col., quienes lograron el clonado de genes virales a partir del análisis de ácidos nucleicos provenientes de bilis de monos *Cynomolgus* infectados. Se clonaron genes y expresaron proteínas recombinantes; mediante tamizaje con sondas y con anticuerpos, respectivamente, se detectaron clones específicos que contenían material genético del HEV, actualmente clasificado como único miembro de la familia *Hepeviridae*.

El descubrimiento de estos cinco agentes en menos de tres décadas no sólo significó el mayor aporte de la ciencia a la Salud

Pública en la segunda mitad del siglo XX, sino también abrió la puerta a una nueva posibilidad diagnóstica de la Virología: la identificación, el aislamiento y la consiguiente metodología de estudio a partir de la manipulación del genoma viral y las proteínas que codifica, más allá o al margen de la respuesta inmune que el agente induce en el individuo infectado.

2 EL HÍGADO COMO BLANCO DE INFECCIÓN Y ÓRGANO INMUNOLÓGICO

La organización estructural y funcional del hígado ejerce una influencia decisiva en la patogénesis de las infecciones virales.

Como descubrirá el lector en los subcapítulos siguientes, la respuesta inmune desempeña un rol crucial no sólo en la eliminación viral, sino en el daño hepático. Por este motivo, es relevante tener presente la contribución de células hepatocíticas y no-hepatocíticas en la constitución de este órgano vital, así como los mecanismos que regulan el curso diverso de la respuesta inmune innata y adaptativa.

Dos tercios de la estructura hepática están constituidos por células parenquimatosas (los hepatocitos), mientras que el tercio restante lo está por células no parenquimatosas que incluyen las endoteliales sinusoidales (50% de dicho tercio), linfocitos (aproximadamente 25%), células de Küpffer (alrededor del 20%), células de los conductos biliares (5%), y células estrelladas o de Ito (< 1% hasta 5-8%). La población de linfocitos residentes en el hígado se calcula en el orden de 10^{10} células, lo que incluye células de la respuesta inmune innata (NK y NKT) y adaptativa (LT y LB), respectivamente (Figuras 24.1.1 y 24.1.2). El hígado es el órgano principal de acumulación de células NKT en el organismo, alcanzando el 30% del total de los linfocitos en dicha glándula.

Mediante circulación centripeta, el hígado es un órgano que recibe por cada minuto el 30% de la sangre circulante en el organismo, a través de la que arriban unos 10^8 linfocitos/día. La sangre ingresa al parénquima a través de la vena porta (70-75%; poco oxigenada y rica en nutrientes) y la arteria hepática (oxigenada), pasa a través de una red de sinusoides hepáticos, y abandona la glándula a través de las venas hepáticas. Cada espacio porta se ubica en la confluencia de los lobulillos hepáticos, que son formaciones aproximadamente hexagonales de hepatocitos y que poseen en el centro la vena centrolobulillar. La confluencia de venas centrolobulillares da lugar a las venas hepáticas izquierda y derecha, que

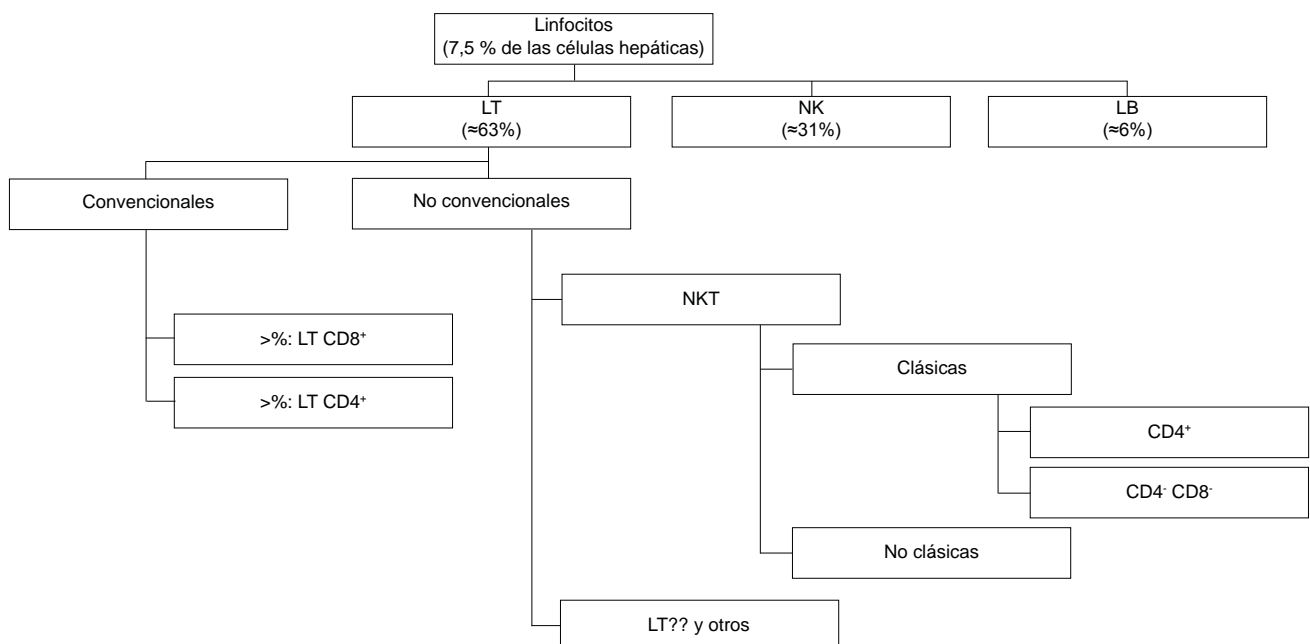


Figura 24.1.2. Distribución de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en el hígado.

finalmente drenan en la vena cava inferior. Por lo tanto, la sangre de la vena porta y la arteria hepática se mezcla en los sinusoides hepáticos (Figura 24.1.3). El drenaje linfático se produce a través de vasos que drenan hacia la vena cava inferior o hacia ganglios linfáticos que siguen, en sentido inverso, el recorrido de la arteria hepática. Diversos agentes desestructuran los lobulillos hepáticos y los espacios porta, pudiendo conducir a la hipertensión portal, al obstaculizar el flujo vascular.

Los **hepatocitos** exhiben en su membrana plasmática un dominio con microvellosidades hacia el espacio de Dissé, y otro lateral para con las células contiguas. A través de esas microvellosidades, los hepatocitos pueden entrar en contacto con linfocitos que, a su vez, pueden penetrar en el espacio de Dissé mediante pseudópodos. Los hepatocitos expresan un escaso número de moléculas del CMH-I. Entre hepatocitos contiguos se delimita un canalículo donde se vierte la bilis.

Las **células de Kúpffer** residen en el interior de la vasculatura de los sinusoides –especialmente en el área periportal–, pudiendo también atravesar el espacio de Dissé y entrar en contacto con hepatocitos y fagocitar células muertas por apoptosis. Las células de Kúpffer exhiben una lenta migración, por lo que pueden promover la estasis sanguínea, y así facilitar la interacción con linfocitos circulantes. Producen galectina 9 y pueden promover el aflujo de Linfocitos Treg que inducen la apoptosis de los LT citotóxicos CD8⁺.

Las **células endoteliales sinusoidales** forman una estructura de monocapa fenestrada con receptores de manosa y *scavenger* (*recolector de residuos*) que favorece la captación de antígenos y que, al mismo tiempo, permite el contacto entre hepatocitos y linfocitos. Estas células exhiben moléculas del CMH-I y II, así como las co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86. Por ende, la endocitosis/

fagocitosis así como la presentación antigénica son semejantes a las de las células dendríticas. Estas últimas residen alrededor de la vena centrolobulillar y del tracto portal.

Dado que las células de Kúpffer y las endoteliales sinusoidales producen constitutivamente IL-10 y TGF- β , y las células de Ito lo hacen de modo inducible, el microambiente de citoquinas formado hace que las dendríticas en reposo puedan tornarse tolerogénicas, logrando inhibir la proliferación de linfocitos activados que infiltran el hígado y la concomitante producción de citoquinas, a través de la interacción con las moléculas linfocitarias CTLA-4 y PD-1 (*véanse los capítulos 7 "Mecanismos de defensa" y 8 "Evasión a la respuesta inmune"*). La activación de las células dendríticas, inhibe la expresión de dichos receptores, y favorece su propia ulterior migración a través del espacio de Dissé hacia el tracto portal y finalmente hacia los ganglios regionales.

Las **células de Ito** están ubicadas en el espacio de Dissé, y separadas de la luz sinusoidal por las células endoteliales sinusoidales. Poseen actividad fagocítica y contráctil, pudiéndose diferenciar a miofibroblastos en presencia de TFG- β . No sólo son relevantes por ser el principal reservorio de vitamina A del organismo y por su participación en la generación de fibrosis a través de la producción de proteínas de matriz celular como el colágeno, sino porque también funcionan como células presentadoras de antígeno (CPA) para NKT (a través de CD1d) y LT (mediante moléculas del CMH-I y II). Las células de Ito liberan IL-15, a través de la que modulan la actividad de las NK y NKT. La interacción entre LT y célula de Ito es relevante no sólo por la activación del primero, sino también de esta última, por su consiguiente participación en la regulación del flujo sanguíneo local y en el evento fibrótico.

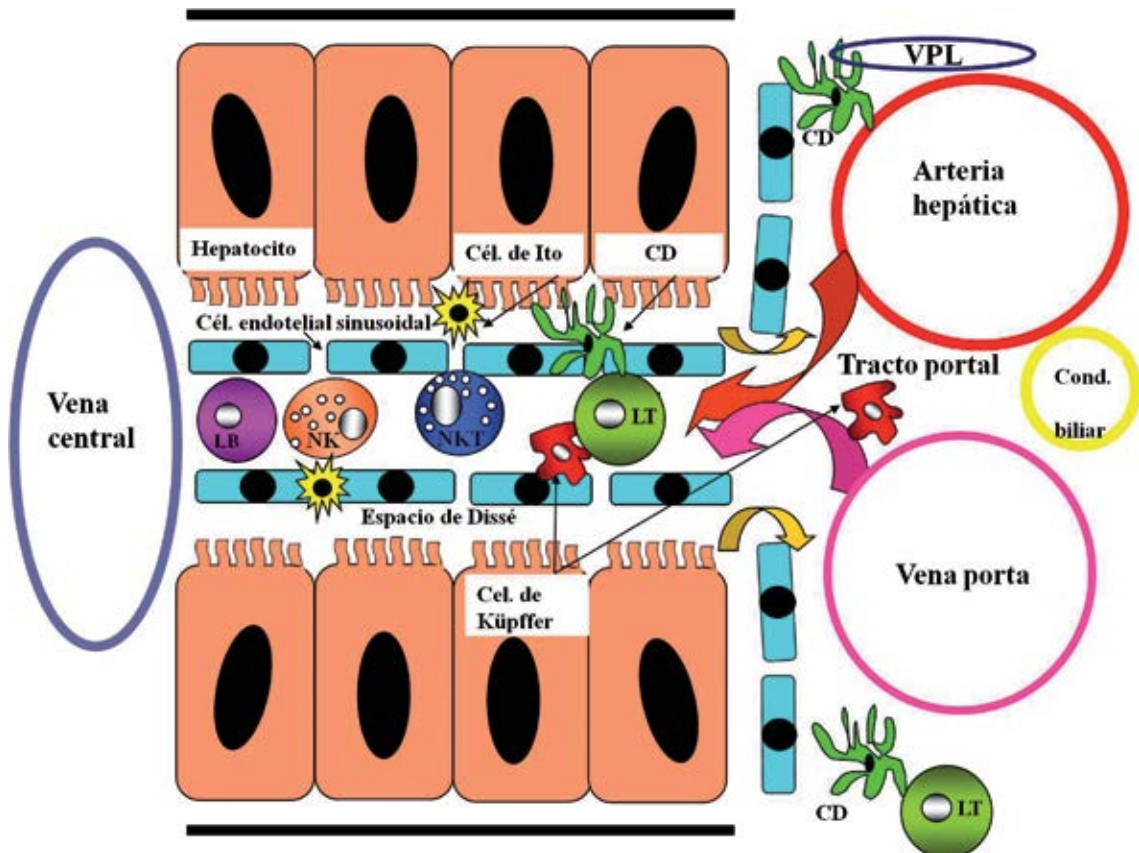


Figura 24.1.3. Esquema de la espacialidad entre hepatocitos, sinusoides hepáticos y algunas células del sistema inmune. Léase el texto. CD: célula dendrítica; VPL: Vaso prelinfático; LT: linfocito T; LB: linfocito B; NK: célula asesina natural; NKT: célula T asesina natural. Obsérvense las interacciones entre las diversas células presentadoras de antígeno y las NKT y LT. La sangre oxigenada proveniente de la arteria hepática y la menos oxigenada conteniendo nutrientes proveniente de la vena porta se mezclan, desembocando en la vena central. La bilis producida por los hepatocitos se vierte hacia el espacio de Dissé, y desde allí al canalículo biliar.

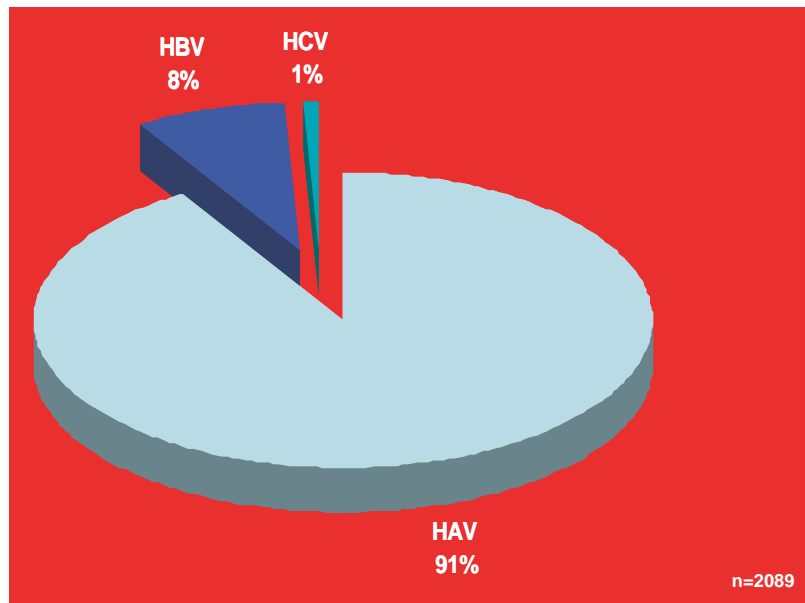


Figura 24.1.4. Registro de hepatitis virales agudas en Argentina durante el período comprendido entre julio de 2004 y junio de 2005.

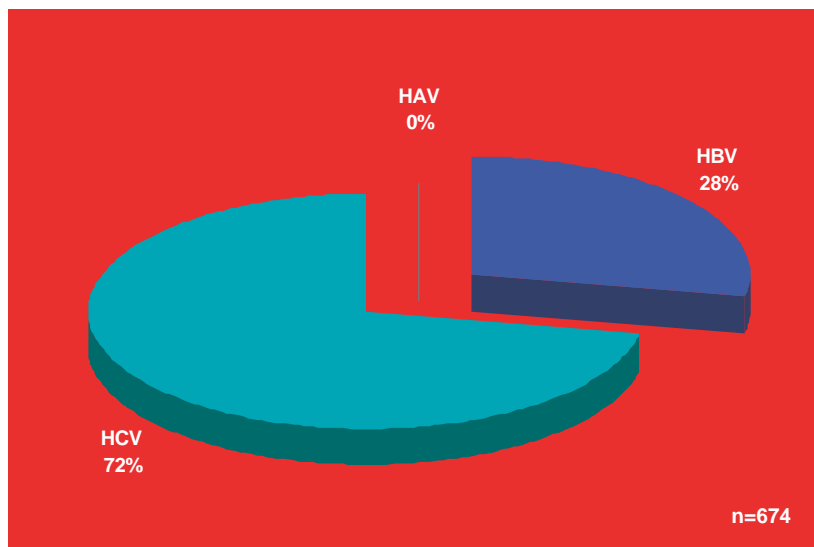


Figura 24.1.5. Registro de hepatitis virales crónicas en la Argentina durante el período comprendido entre julio de 2004 y junio de 2005.

El hígado está selectivamente enriquecido en células de la respuesta inmune innata: macrófagos de K upffer, c elulas NK y NKT. Las c elulas de K upffer producen IL-12 e IL-18, lo que activa a las c elulas NK. Aquellas c elulas tambi en producen IL-1 , IL-6, TNF-  y leucotrienos, lo que atrae y activa polimorfonucleares neutr ofilos. Estas c elulas no sólo exhiben actividad fagocítica, sino que tambi en liberan citoquinas proinflamatorias que promueven el aflujo de LT CD4⁺ y CD8⁺.

Ante la eventual ausencia de moléculas inhibitorias de las NK (CMH-I) como resultado de diversas infecciones virales de hepatocitos y en presencia de IFN tipo I y CCL3, la unión de ligandos a receptores de activación de las NK promueve su activación y la lisis de la c elula blanco. Dependiendo de la unión a receptores de activación o de inhibición de las NK se modula la injuria tisular, a través de una respuesta proinflamatoria Th1 o anti-inflamatoria Th2, respectivamente. La activación de las NK promueve la liberación de IFN- , lo que estimula a los hepatocitos y c elulas endoteliales

sinusoidales para producir CXCL9, que promueve el reclutamiento de LT y NKT. Las NKT son activadas por la IL-12 producida por las c elulas de K upffer y las dendríticas, lo que culmina habitualmente con la lisis celular mediada por Fas. Dado que las NKT pueden producir tanto IFN-  como IL-4, se las considera cruciales en el evento de polarización de la respuesta inmune proinflamatoria tipo I (IFN-  y TNF- ) o anti-inflamatoria tipo II (IL-4, IL-10, IL-13). En otros términos, la respuesta inmune celular resultante es modulada por el eje CPA (K upffer, endotelial sinusoidal, dendrítica, LB o c elula de Ito) → NK → NKT → LT.

Si bien la sensibilización de los LT *na ve* puede ocurrir por medio de cualquier c elula que exprese el péptido para el receptor T específico, la activación adecuada sólo se logra cuando dicha presentación sucede a través de una c elula presentadora profesional, pues posee las moléculas coestimuladoras necesarias y porta el antígeno correspondiente desde el sitio de infección al órgano linfoide.

Se ha observado que, dependiendo de la célula y del lugar de presentación antigénica, el desenlace de la interacción entre la CPA y el LT varía. Si en condiciones no inflamatorias son las células endoteliales sinusoidales o las de Kuppfer las que realizan la presentación a linfocitos T circulantes o residentes en los espacios porta, se observa un evento tolerogénico mediado por IL-4 e IL-10. Esta última es producida no sólo por las células de Kuppfer, sino también por LT CD4⁺ y también CD8⁺ regulatorias (véase más adelante). En presencia de IL-10, la activación de LT promueve una disminución de la citotoxicidad y de la producción de citoquinas. En contraste, si el contexto es inflamatorio, las células endoteliales sinusoidales inhiben la expresión de moléculas del CMH y por ende disminuye el efecto tolerogénico asociado a la presentación antigénica realizada por su intermedio.

Por el contrario, si la célula presentadora es una dendrítica que reside en los espacios porta, podría producirse tanto la sensibilización *in situ* de LT *naïve* que infiltren el hígado, como de aquellos con los que podría interactuar una vez llegada al ganglio linfático regional. En base a observaciones en modelos experimentales, se ha postulado que si la presentación ocurre en dicho ganglio, la actividad citotóxica de los LT sensibilizados promoverá la hepatitis; por el contrario, si la sensibilización ocurre en el propio hígado, la injuria citotóxica será de menor cuantía y duración más restringida.

Si un determinado virus no infecta una CPA o si haciéndolo, promueve un defecto en su capacidad de presentación, la única forma conocida de sensibilizar eficientemente LT *naïve* consiste en el evento de **presentación cruzada**. Se entiende por tal, a la fagocitosis que, por ejemplo, un macrófago realiza de una célula infectada y muerta o en el proceso de estarlo, con posterior presentación a LT CD8⁺ de péptidos virales en el contexto de las propias moléculas del CMH-I. El término presentación cruzada hace referencia a que clásicamente se consideró que los antígenos capturados mediante endocitosis por las CPA eran presentados sólo en el contexto de moléculas del CMH-II a LT CD4⁺, aunque de esta forma lo hacen a LT CD8⁺ a través de CMH-I. Esta forma de presentación es relevante pues se asocia a un efecto símil-adyuvante, pudiendo promover un viraje desde la tolerancia inmune hacia la respuesta inmunológica.

Las células que participan en la eliminación viral de los hepatocitos infectados corresponden tanto a la respuesta inmune innata (NK y NKT, principalmente) como adaptativa (LT CD4⁺ y CD8⁺). Se ha documentado que inicialmente se produce la liberación de IFN- γ por un período limitado, lo que es seguido por la producción de granzima B y citotoxicidad persistente. La producción de IFN- γ por LT promueve la eliminación no citolítica de las células, y es responsable de la mayor parte de la eliminación viral. En contrapartida, aquellas pocas células que persisten infectadas aun después de la liberación de la citoquina mencionada son pasibles de la actividad citotóxica mediada por perforina/granzima B y por Fas. La disminución de la producción de IFN- γ coincide con el aumento de la expresión de PD-1 en los LT CD8⁺ (lo que promueve su muerte al unirse a su ligando PD-L1). Dado que PD-L1 está constitutivamente expresado por las células endoteliales sinusoidales y las de Kuppfer, se ha sugerido que estas células modulan la actividad de los LT activados en el hígado, evitando la perpetuación del daño histórico. Se ha documentado que pacientes con hepatitis C aguda exhiben elevados niveles de PD-1 en LT, los que disminuyen en quienes resuelven la infección. Por el contrario, en pacientes que evolucionan a la persistencia viral, la expresión de PD-1 permanece elevada. En modo análogo, los pacientes con hepatitis B crónica exhiben elevados niveles de PD-L1 en monocitos de sangre periférica, lo que se correlaciona con los niveles altos de IL-10, y la incapacidad del hospedador de limitar la infección.

También existen estructuras símil-folículos linfoides, que corresponden a acúmulos de LB rodeados por células foliculares den-

dricas. Estos centros germinales se comportan como estructuras foliculares funcionales.

Si bien las células T regulatorias (Treg) han sido recientemente asociadas a la evolución de algunas infecciones virales, su rol en el curso de las hepatitis virales no ha sido aún establecido de forma definitiva, aunque se cree que participan en el compromiso de la respuesta inmune en los pacientes infectados crónicamente por HBV o HCV.

Las células T regulatorias pueden actuar mediante contacto célula-célula (Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) o mediante la liberación de citoquinas como IL-10 ó TGF- β . Dado que las Treg fueron inicialmente caracterizadas como moduladoras negativas de la respuesta Th1, de la actividad citotóxica, del cambio isotípico de IgM a IgG, y de la inmunidad de las mucosas, se postuló que podrían favorecer el curso de infecciones crónicas como las que pueden producirse por HBV y HCV. Entre las diversas subpoblaciones T regulatorias, se han definido las regulatorias naturales CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺, las Treg 1 o Tr1 (CD25⁺ Foxp3⁺ que secretan IL-10) y que son inducibles por antígeno, las Th3 que secretan TGF- β , las Treg CD8⁺ (CD25⁺ Foxp3⁺) y finalmente las Treg CD8⁺ productoras de IL-10. Se ha observado que las Tr1 productoras de IL-10 están presentes en individuos con hepatitis C crónica pero no en quienes limitan la infección. En modo análogo, las Treg naturales se expresan en mayor cuantía en quienes padecen la infección crónica por HCV al compararse con aquellos que la autolimitan. Se desconoce si las Treg son la causa o la consecuencia de la infección crónica viral. La participación individual de estas subpoblaciones en la patogénesis de las hepatitis virales requiere aún más estudios de investigación clínica.

3. REGISTRO DE HEPATITIS VIRALES EN ARGENTINA

En Argentina, los casos y brotes de hepatitis virales deben ser notificados obligatoriamente (Ley nacional 15.465) desde el establecimiento asistencial a nivel regional, y por la vía pertinente a la Dirección de Epidemiología del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) del Ministerio de Salud y Acción Social.

Por otra parte, cabe destacar que el "Proyecto Programa Nacional de Control de Hepatitis Virales en Argentina" se ha sumado desde 1992 al accionar del SINAVE. Dicho proyecto fue gestado, en conjunto con el SINAVE, desde el Servicio de Hepatitis y Gastroenteritis, Laboratorio de Referencia, Departamento de Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán". Tiene como objetivo controlar y conocer la incidencia de las hepatitis virales y de portadores de virus causantes de dicha entidad nosológica en la República Argentina, a través de la información proporcionada por redes de Unidades Centinelas y redes de Bancos de sangre. Se cuenta con la participación de numerosos médicos y bioquímicos de hospitales agrupados en 24 Unidades centinela que se ubican en 9 regiones geográficas del país: Buenos Aires (CABA, Conurbano bonaerense y ciudad de La Plata), Pampa, Patagonia, Litoral, Neuquén, Centro, Cuyo, Noroeste argentino (NOA) y Noreste argentino (NEA).

Los datos detallados a continuación, en las Figuras 24.1.4 y 24.1.5, fueron obtenidos del Informe Epidemiológico N° 6 (año 2006) del "Proyecto Programa Nacional de Control de Hepatitis Virales en Argentina", los que pueden ampliarse para conocer datos regionales en la página de Internet www.hepatitisviral.com.ar/pdf/informeepi6.pdf. Observe el lector la significativa proporción de casos de hepatitis aguda asociados a la infección por HAV, seguida por el HBV y por una mínima contribución del HCV. En contraposición, en los casos de hepatitis crónica registrados, prevalece la infección por HCV sobre el HBV, sin casos asociados al HAV.

Bibliografía

- Fainboim L, Chernavsky A, Paladino N, Flores AC, Arruvito L. "Cytokines and chronic liver disease". *Cytokine growth factor Rev* 2007;18:143-57.
- Li S, Jones KL, Woollard DJ, Dromey J, Paukovics G, Plebanski M *et al.* "Defining target antigens for CD25+ FOXP3 + IFN-gamma-regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection". *Immunol Cell Biol* 2007;85:197-204.
- Guidotti L, FV Chisari. "Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis". *Annu Rev Pathol* 2006;1:23-61.
- Rehermann, B. "Chronic infections with hepatotropic viruses: mechanisms of impairment of cellular immune responses". *Sem Liver Dis* 2007;27:152-60.
- Rehermann B, M Nascimbeni. "Immunology of hepatitis B virus and Hepatitis C virus infection". *Nat Rev Immunol* 2005;5:215-29.

1. MORFOLOGÍA

El virus *Hepatitis A* (HAV) –agente etiológico de hepatitis A– es el único virus del género *Hepatitis A* dentro de la familia *Picornaviridae*. Como todos los miembros de esa familia, presenta forma esférica, con una cápside de simetría icosaédrica. No posee envoltura. Mide 27 a 32 nm (Figura 24.2.1).

2. ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL VIRUS

Las características biológicas de los *Hepatitis A* que los distinguen de los otros miembros de la familia *Picornaviridae* son su hepatotropismo, la termoestabilidad a 60° C, una replicación habitualmente lenta y no citopática en cultivos celulares (luego de un período de adaptación prolongado), así como una marcada tendencia a establecer en ellos una infección persistente. Debe destacarse que esta infección persistente no se produce habitualmente en la infección humana. Los enterovirus son, en general, citopáticos y causan necrosis, produciéndose alrededor de 1 000 partículas por célula. Sin embargo, la mayoría de las cepas de HAV no son citopáticas en cultivos celulares *in vitro*, y sólo se generan unas 20 partículas por célula, sin que se presenten alteraciones metabólicas.

Además, el HAV es estable en el medio ambiente por al menos un mes y es más resistente al calor y a la inactivación por cloro que el poliovirus.

Los agentes físicos como el calor a más de 85° C durante un minuto, la radiación ultravioleta de 1,1 watts durante 60 segundos, o bien los agentes químicos como la formalina al 0,02% p/v durante 96 horas a temperatura ambiente (o bien durante 12 horas en solución acuosa al 40%) o el hipoclorito de sodio (aplicado sobre las superficies infectadas en dilución 1:1 000 durante un minuto) inactivan el virus.

3. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL

La organización estructural de la cápside y del genoma del virus se observan en la Figura 24.2.2.

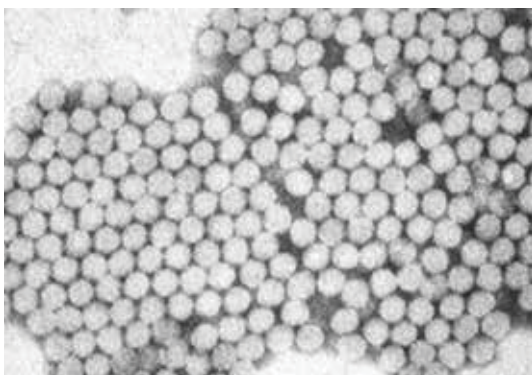


Figura 24.2.1. Microscopia electrónica del virus de la hepatitis A. Fuente: Sitio web del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, EE.UU.

Genoma. Está constituido por una cadena única de RNA de polaridad positiva de 7,48 kb. La organización del genoma viral (Figura 24.2.3) es similar a la del resto de los picornavirus. Consta de tres partes:

1) el extremo 5' no codificador de proteínas que abarca un 10% del genoma (734 a 740 bases de longitud) y presenta, en lugar de una estructura de *cap*, una proteína específica viral (Vpg) covalentemente unida. La traducción ocurre, por ende, por un mecanismo *cap*-independiente, bajo el control de un IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) situado dentro del extremo 5' no codificante;

2) un marco abierto de lectura dividido en tres regiones (P1, P2 y P3) que codifica una única poliproteína precursora de 2 225 a 2 227 aminoácidos, a partir de la que –mediante clivaje post-traduccionales por una proteasa viral (3C^{pro})– se originarán cuatro proteínas estructurales y varias no estructurales;

3) el extremo 3' no codificante que posee una cola poli-A (40 a 80 bases de longitud).

La estructura secundaria de la región no codificadora es muy diferente de la de los enterovirus y rinovirus, y se asemeja más a la de los cardiovirus y aftovirus.

Si bien el HAV había sido inicialmente clasificado junto a los enterovirus (como el *Enterovirus 72*) el conocimiento de su secuencia nucleotídica ha demostrado que dentro de la familia *Picornaviridae* su bajo contenido de G + C (38 %) es sólo similar al de los rinovirus (39-40%).

Diversidad genética. El HAV presenta un alto grado de conservación nucleotídica y aminoacídica a lo largo de todo su genoma. Sin embargo, existe suficiente diversidad genética para agrupar a los aislamientos de HAV en genotipos y subgenotipos.

Si se utiliza la región VP1/P2A para definir genotipos y subgenotipos, los genotipos poseen una variabilidad nucleotídica mayor al 15% y los subgenotipos del 7 al 7,5% entre aislamientos.

Inicialmente, se detectaron 7 genotipos: los genotipos I, II, III y VII provenientes de aislamientos humanos y los genotipos IV, V y VI de origen simiano. Investigaciones recientes han reclasificado al genotipo VII como un subgenotipo del genotipo II.

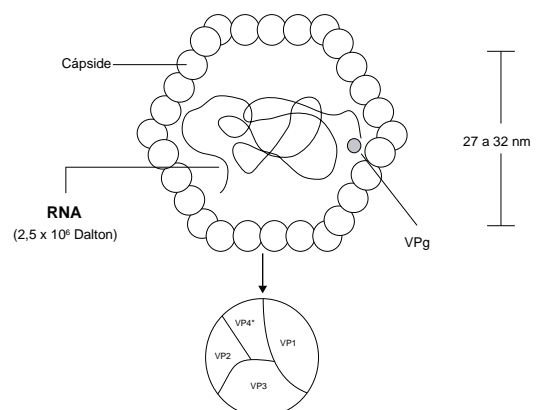


Figura 24.2.2. Diagrama de la estructura del virus hepatitis A. * VP4 no permanecería unido al virión, ya que no ha sido detectado en partículas infecciosas maduras.

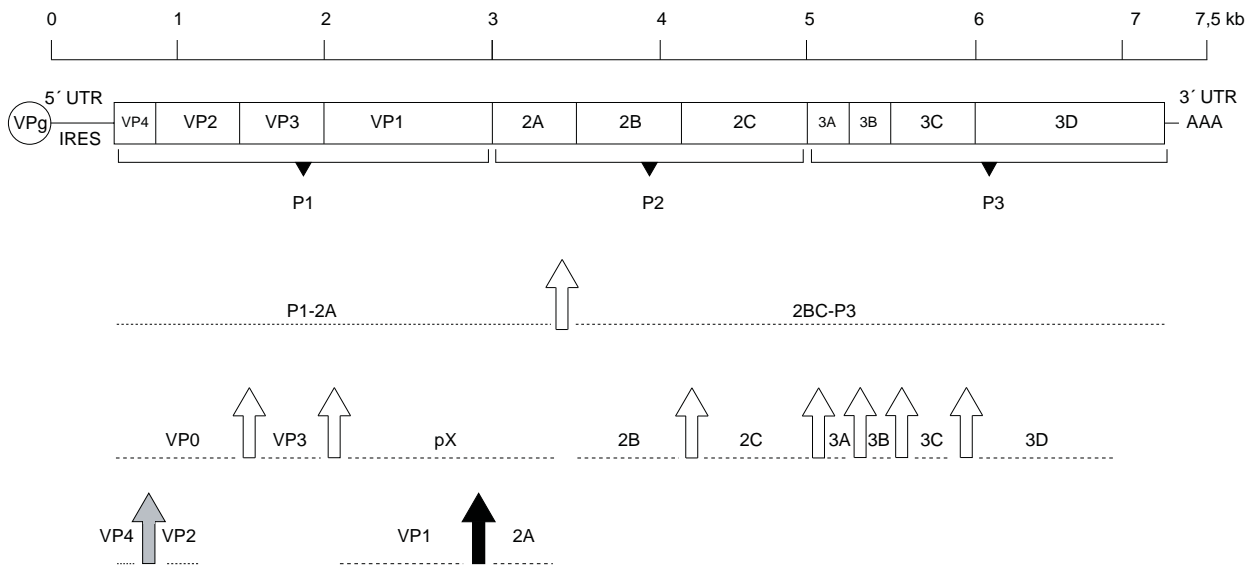


Figura 24.2.3. Organización del genoma del HAV. Se señalan, en orden secuencial, los sitios de clivaje de la proteasa viral codificada por el gen 3C (flecha blanca) y de una proteasa celular (flecha negra). La flecha gris indica el resultado de una actividad proteolítica desconocida, que cliva VP4 -VP2.

A pesar de la presencia de cepas del HAV de diversos orígenes, existe una inmunidad cruzada entre las mismas que confiere protección contra todos los genotipos humanos y simianos.

Se desconoce la incidencia de infecciones genotípicas mixtas. Un evento de recombinación intergenotípica fue documentado por vez primera en 2003 en una niña hospitalizada en Francia que había estado de vacaciones en Marruecos, y en quien se documentó una cepa recombinante entre los genotipos VII (actualmente un subtipo del II, como se mencionó antes) y 1B, cuyas cepas parentales circulan con alta frecuencia en esa parte de África.

Proteínas. Basados en estudios con otros picornavirus, se asume que la partícula viral consta de unas 60 copias de cada una de las tres principales proteínas estructurales codificadas por la región P1: VP1, VP2 y VP3. También codifica una cuarta proteína de la cápside (VP4), esencial en la formación del virión, que no se detecta en partículas virales maduras.

La región P2 codifica proteínas no estructurales que intervienen en la formación del virión y la síntesis del RNA. En cambio, la región P3 codifica a la proteína Vpg asociada al genoma viral, la proteasa viral 3C encargada del clivaje de la poliproteína precursora que da origen a las proteínas de la cápside, y la RNA polimerasa viral.

En partículas vacías se detecta también la proteína VP0 (precursor de VP2 y VP4), lo que sugiere que su clivaje se produce en las etapas tardías del ensamblado viral.

Los polipéptidos de la cápside VP1 y VP3 conforman un único epítipo antigénico en la superficie viral capaz de desencadenar una respuesta de anticuerpos neutralizantes. Los antígenos que inducen protección son conformacionales: ni las proteínas purificadas de la cápside ni las proteínas recombinantes obtenidas a partir de cDNA poseen adecuada antigenicidad.

Por el contrario, las partículas vacías que se forman durante la infección natural son antigénicas e inducen anticuerpos protectores.

A pesar de la heterogeneidad genética del HAV, existe un único serotipo. Esto significa que los individuos infectados por el HAV están protegidos frente a una eventual reinfección en cualquier parte del mundo. Aunque se han detectado variantes antigénicas naturales del HAV en aislamientos simianos, estas cepas pueden reconocer anticuerpos humanos policlonales contra el HAV. Más aún, chimpancés inmunizados con cepas de primates presentan una respuesta protectora humoral ante el desafío de la infección con HAV humanos.

Publicaciones recientes han documentado aislamientos humanos con sustituciones aminoácidas en la cápside viral y de

lecciones en la región antigénica inmunodominante. Algunas variantes del HAV –detectadas en España en hombres que tienen sexo con hombres– exhiben un fenotipo de resistencia a la vacuna específica. Más aún, se ha reportado la emergencia de dos nuevas variantes antigénicas asociadas a un brote de hepatitis A transmitido por berberechos congelados, provenientes de Sudamérica. Estas mutantes naturales fueron mapeadas en un epítipo conformacional y otro lineal de VP1. Dado que se ha documentado recientemente una significativa variabilidad genética y antigénica en aislamientos de Sudamérica, se ha especulado con la posibilidad de una futura emergencia de un nuevo serotipo como resultado del proceso evolutivo de las cepas de esta región geográfica.

La codificación genómica, distribución en el virión y función de los distintos polipéptidos se detallan en las Figuras 24.2.2 y 24.2.3, y en la Tabla 24.2.1, respectivamente.

Replicación. Varias características del ciclo de replicación del HAV lo distinguen de los poliovirus y del resto de los picornavirus, ya que el correspondiente al HAV es un proceso lento que genera una escasa progenie. Luego de su adsorción, el proceso de ingreso y desnudamiento es lento, abarcando 12 horas o más. El período de eclipse es incompleto, probablemente por una replicación asincrónica. La producción de la progenie viral es también lenta, y pueden requerirse 24-140 horas para alcanzar los niveles máximos en condiciones especiales de cultivo *in vitro*.

El HAV ingresa al hepatocito a través de la interacción con el receptor celular HAVCR1/TIM1. Se produce el desnudamiento de la partícula viral y la liberación del genoma del HAV al citoplasma, listo para ser traducido.

La región 5'UTR (*5' untranslated region*) inicia la traducción de la poliproteína precursora desde el IRES. Se ha sugerido que los dominios IV y V de la región 5'UTR son inhibidores del inicio de la traducción. Las mutaciones en esta región son importantes para determinar la adaptación de HAV a ciertos sustratos celulares.

Sin embargo, a diferencia de los poliovirus, las mutaciones en el IRES poseen, como máximo, un efecto limitado en la atenuación de las cepas.

Una vez sintetizada la poliproteína, se producen múltiples clivajes, la mayor parte de ellos mediados por la proteasa viral (3C). El primer evento de clivaje ocurre en la unión 2A/2B. El precursor estructural P1-2A es subsiguientemente clivado para dar origen a 2 proteínas precursoras de la cápside, VP0 (VP4-VP2) y VP1-2A (también conocido como pX), así como la pro-

teína VP3 madura. VP1-2A es un intermediario estructural crítico en la morfogénesis del virión, y su clivaje ocurre tardíamente por la acción de una proteasa celular desconocida hasta el momento (Figura 24.2.3). Los genomas virales delecionados a nivel de la secuencia de la proteína 2A no son capaces de producir partículas infecciosas, indicando que la misma cumple un rol esencial en el ensamblado de la cápside. Al igual que VP4, la proteína 2A madura no ha podido ser detectada en células infectadas. Posteriores estudios determinaron que las proteínas no estructurales del HAV, excepto 2A, son esenciales en la síntesis del RNA viral. Esto responde a que éstas forman una replicasa que se une al extremo 3' del RNA genómico e inician, de esta manera, la síntesis de la cadena negativa que será usada como templado para la síntesis de múltiples copias del RNA genómico de polaridad positiva.

Mostrando otra disimilitud con los poliovirus, en las células infectadas se produce una cantidad muy reducida de cadenas de RNA (-) complementarias. Se ha postulado que la rápida encapsidación de las cadenas (+) podría ser la causa de un *pool* disminuido para la síntesis de las cadenas intermediarias, así como para la traducción de aquéllas.

Los posibles destinos que pueden tener estas nuevas moléculas incluyen ser utilizadas como templado en los procesos de síntesis del RNA viral o de traducción del genoma. Mientras tanto, otras copias del RNA (+) son empaquetadas dentro de partículas virales formadas por el ensamblado de las proteínas estructurales, proceso que conduce al clivaje de los precursores VP1-2A y VP4-VP2.

4. PATOGENIA

El HAV tiene como principal, aunque no único lugar de replicación, al hepatocito y, en menor medida, a las células de Küpferr. También se ha detectado la infección de células de los conductos biliares y del epitelio vesicular. Algunos estudios sugieren que el HAV podría desarrollar una replicación inicial en las células crípticas del intestino delgado antes de alcanzar el hígado.

Con respecto al receptor utilizado para el ingreso a la célula, se ha propuesto que el HAV interactúa con una glicoproteína integral de membrana de tipo 1 constituida por un dominio simil-inmuno-

globulina que se extiende sobre la superficie celular por un dominio simil-mucina, llamada *HAVCR1/TIM1*. Esta proteína fue identificada por primera vez en cultivos de células de riñón de mono verde africano, detectándose posteriormente su homóloga en el ser humano. Sucesivos estudios permitieron considerarla miembro de un grupo de receptores altamente conservados entre los mamíferos que cumplen importantes funciones desde el punto de vista inmunológico: la familia TIM (*T-cell Immunoglobulin Mucin*). *HAVCR1/TIM1* estaría codificado por un importante gen de susceptibilidad al asma y a la atopía en humanos y desempeñaría un papel esencial en la regulación de la diferenciación de los linfocitos T y en la reducción de uniones estrechas en células endoteliales.

Al cabo del período de incubación (aproximadamente 15-50 días) el HAV logra expresar masivamente su genoma y producir virus maduros que son excretados por los canalículos biliares. La eliminación biliar provoca una intensa **virucopria** (eliminación de virus por materia fecal) de cantidad, duración y continuidad variables, que alcanza su pico máximo antes de la injuria hepática. La virucopria es acompañada por lo general por una **viremia** de menor magnitud, que si bien es habitualmente de fugaz duración, puede ser detectable en algunos pacientes por el término de hasta un mes mediante RT-PCR, aunque éste no es el procedimiento diagnóstico habitual.

Al final de este período, el individuo infectado presenta daño celular que se evidencia por un intenso padecimiento coloidosmótico del hepatocito, con salida del contenido celular a la sangre, inflamación hepática y toda la presentación clínica, histológica y de laboratorio que se conoce como *hepatitis viral*. En la Tabla 24.2.2 se mencionan las distintas posibilidades evolutivas asociadas a la infección con HAV.

El antígeno del HAV (HAV Ag) puede también detectarse en otros tejidos no hepáticos como el bazo, nódulos linfoides y glomérulos; éstos podrían desempeñar algún papel en el mecanismo normal de eliminación del HAV mediante la formación de inmunocomplejos específicos (HAV-anticuerpo anti-HAV). La eliminación fecal del HAV Ag se extiende por 2 a 3 semanas desde la elevación de las transaminasas, aunque mediante técnicas muy sensibles de biología molecular como la RT-PCR se ha determi-

Región genómica	Proteínas codificadas	Función atribuida
5'UTR	-	Inicio de la traducción
P1		
1A	VP4	Proteínas estructurales de la cápside
1B	VP2	
1C	VP3	
1D	VP1	
P2		
2A	2A	Morfogénesis Desconocida Síntesis de RNA
2B	2B	
2C	2C	
P3		
3A	Pre-VPg	Unión al genoma viral
3B	VPg	
3C	3C	Proteasa RNA polimerasa
3D	3D	
3'UTR	-	Terminación de la traducción

Tabla 24.2.1. Organización del genoma del HAV y proteínas codificadas.

Características	Frecuencia
Evolución subclínica	En < de 5 años: 90-95% En adultos: 25-50%
Hepatitis aguda sintomática	En < de 5 años: 5-10% En adultos: 50-75%
Recuperación total de hepatitis aguda	99%
Evolución a hepatitis crónica	No se observa
Asociación con hepatocarcinoma	No se observa
Mortalidad de los casos ictericos	0,5%

Tabla 24.2.2. Evolución clínica de la hepatitis A.

nado que dicha eliminación puede ser más prolongada, aún hasta por 3 meses desde la aparición de la enfermedad. Esta prolongada excreción viral puede contribuir a la diseminación del HAV más allá del período durante el cual el paciente se mantiene en reposo relativo, y puede ser un factor principal en la circulación global de este virus, manteniendo la hiperendemicidad de esta enfermedad en distintas áreas del planeta.

Las manifestaciones clínicas de la infección viral aparecen junto con la primera evidencia de respuesta inmune. Sin embargo, esto sucede 4 a 5 semanas después del contagio, período en el que el HAV se replica activamente. Estudios recientes sugieren que este hecho llamativo podría reflejar la capacidad del virus de interferir con los mecanismos celulares por los que las células afectadas reconocen

la infección viral e inducen la síntesis de interferón- β . En el caso de los hepatocitos infectados con HAV, se encuentra bloqueada la activación –mediada por moléculas de RNA doble cadena– del IRF-3 (factor regulador 3 del interferón). Este bloqueo ocurriría, al igual que en el caso del HCV, mediante la alteración de dos mecanismos de transducción de señales que conducen a la estimulación del IRF-3: la vía del receptor símil-Toll 3 (TLR-3) y la mediada por el gen 1 inducible por ácido retinoico (RIG-1) (véase Capítulo 7: Mecanismos de defensa).

A diferencia de lo que ocurre con la inmunidad innata, la respuesta de la inmunidad adaptativa frente al HAV es extremadamente efectiva en su objetivo: la eliminación viral.

El mecanismo responsable de la injuria hepatocelular no ha sido totalmente caracterizado. Sin embargo, la hepatitis por HAV parece estar mediada por una respuesta inmunopatológica frente a la infección del hepatocito, y no a un efecto citopático directo del virus. Linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y virus-específicos han sido recuperados de muestras hepáticas obtenidas durante una hepatitis A aguda. Más aún, se determinó que dichas células secretan interferón- γ , estimulante de una respuesta celular inflamatoria inespecífica dirigida al sitio de la replicación viral dentro del hígado. La respuesta de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra las proteínas estructurales del virus (Ac anti-HAV) aparece por lo general en el suero, junto con la primera evidencia de elevación de las transaminasas e injuria hepatocelular. La respuesta temprana está compuesta por IgM específica (IgM anti-HAV), aunque títulos de IgG también se detectan desde poco tiempo después y persisten durante toda la vida; confiriendo así protección contra la reinfección. La **re-exposición al virus de individuos inmunes** puede generar un incremento en el título de anticuerpos específicos, pero **sin asociarse a enfermedad**. Sin embargo, individuos inmunes pueden tener una transitoria reinfección intestinal, con excreción viral en la materia fecal.

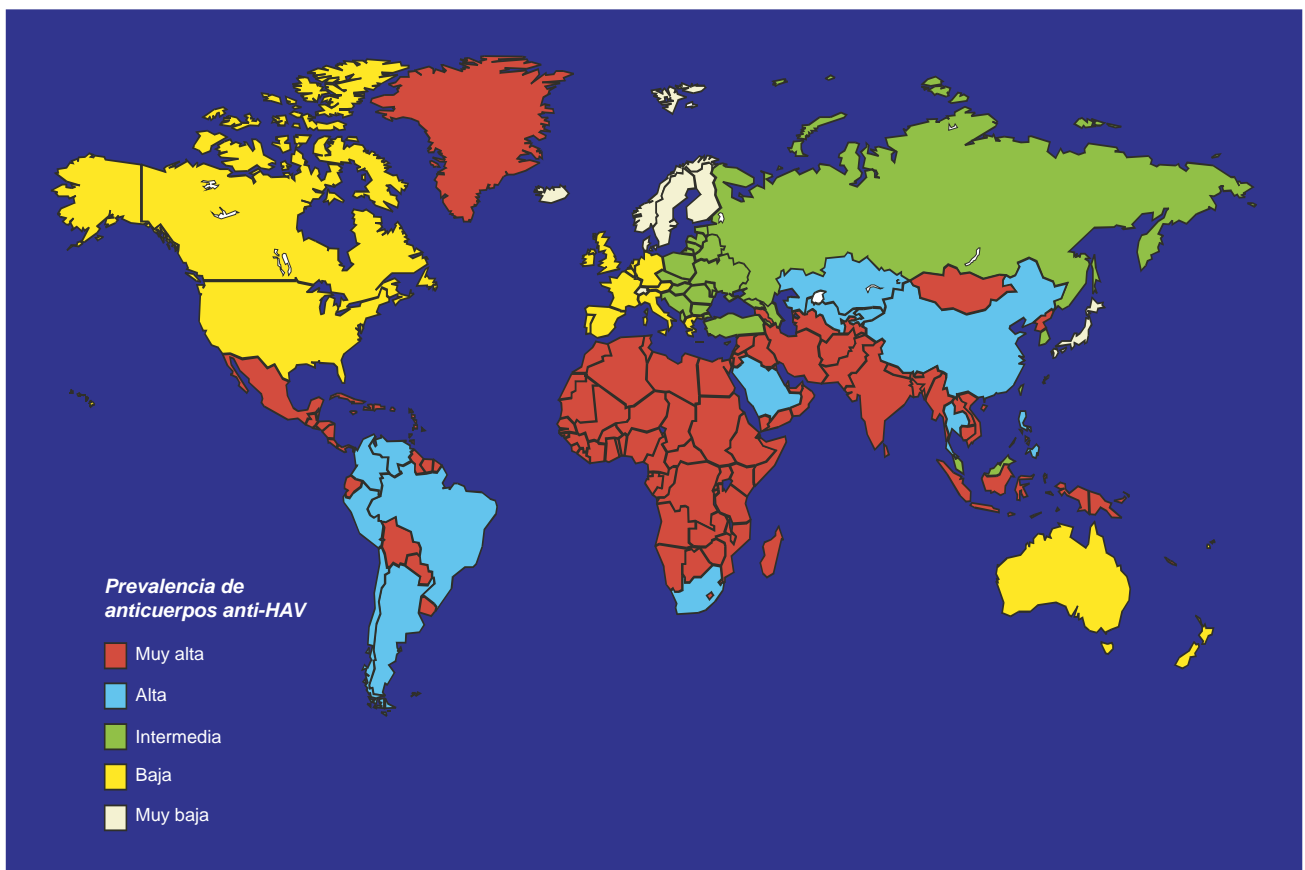


Figura 24.2.4. Prevalencia de la infección por HAV en el mundo. Modificado del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, EE.UU.

Los anticuerpos de clase IgA sintetizados en el intestino aparentemente carecen de actividad neutralizante, aunque sí forman inmunocomplejos con el virus. Prueba de ello es que puede detectarse RNA genómico en heces, aun cuando no se detecten antígenos virales. Sin embargo, estos coproanticuerpos (IgA) proveen una protección local eficiente ante la infección del tracto intestinal y limitarían el curso evolutivo de ésta. Su falta de actividad o insuficiente cantidad probablemente determinaría los casos clínicos de reactivación que se observan en el 7 a 10% de las infecciones agudas, con elevación de aminotransferasas, reaparición de partículas virales en materia fecal y nuevos signos clínicos de actividad lesional. Además, se ha sugerido que estos coproanticuerpos participarían en la protección del hospedador frente a las reinfecciones.

También el sistema inmune produce anticuerpos específicos contra las proteínas no estructurales del virión, aunque su rol en el mantenimiento de la inmunidad es probablemente menos importante en comparación a las inmunoglobulinas dirigidas contra la cápside viral. Esto respondería a su baja concentración y/o ausencia de capacidad neutralizante. Dichos anticuerpos han sido detectados en humanos y primates infectados, pero no en individuos vacunados con cepas inactivadas.

La **hepatitis fulminante** (definida por la encefalopatía y una concentración de Factor V < 50%) es una complicación infrecuente, aunque a veces fatal, cuya patogénesis molecular aún se desconoce. La recuperación es frecuente, aunque el trasplante hepático puede ser necesario. Un polimorfismo del receptor viral TIM (asociado a una inusual inserción de 6 aa) predispone al fallo hepático, vinculado a una mayor afinidad por el virus y a una mayor actividad lítica de las células NKT sobre los hepatocitos infectados.

Se ha documentado en pacientes pediátricos de Argentina que el **haplotipo DRB1*1301** está significativamente asociado a un **curso prolongado de la hepatitis A**. Ello puede posibilitar la liberación prolongada de antígenos hepáticos que contribuirían –junto a otros genes desconocidos asociados a la susceptibilidad individual– al disparo de hepatitis autoinmunes.

Los estudios pioneros que evaluaron la frecuencia y función de la población CD4⁺ CD25⁺ (Tregs) en un número limitado de pacientes con hepatitis A aguda documentaron que aunque su cantidad es comparable al de controles sanos, su función está disminuida.

Estudios en modelos experimentales documentaron el desarrollo de hepatitis autoinmunes en hepatocitos con menor expresión de PD-L1, lo que acelera el daño hístico. Dicha merma podría conducir a una actividad exagerada de LT. En modo análogo, la ausencia de PD en los LT produce una rápida eliminación viral en

el hígado. La infección viral y los LT activados estimulan habitualmente la expresión de PD-L1 en los hepatocitos, lo que a su vez ejerce un efecto regulatorio en la homeostasis de los LTregs.

5. EPIDEMIOLOGÍA

Reservorio. El único conocido es el ser humano que cursa una hepatitis aguda. No existen portadores crónicos sanos ni se asocia al HAV con hepatopatías crónicas. No existen evidencias de que los genotipos de HAV que infectan simios puedan producir enfermedad al hombre. Más aún, su inoculación experimental a chimpancés induce anticuerpos específicos que los protegen contra el desafío posterior con cepas salvajes humanas.

Fuente de infección. El nexo epidemiológico entre el individuo enfermo y el susceptible es el medio ambiente: agua, alimentos contaminados con materia fecal o con otras secreciones o el contacto manual con utensilios o sanitarios contaminados. Las heces pueden contener hasta 10⁸ viriones por ml. También se ha detectado el HAV en la saliva y en el suero en concentraciones de hasta 10⁵/ml. Sin embargo, la transmisión que no incluye la vía fecal-oral es muy infrecuente. La virucopia es máxima durante la última fase del período de incubación, y persiste en adultos por un período menor a una semana después de comenzada la ictericia. Como contrapartida, y como se mencionó anteriormente, se ha detectado virucopia hasta tres meses después de la aparición de la enfermedad. En niños prematuros que se infectan con HAV, la excreción viral puede prolongarse intermitentemente hasta 6 meses.

Entre los alimentos que pueden transmitir el HAV se encuentran las verduras frescas, frutillas, moras, grosellas y bebidas con hielo. Sin embargo, merecen mencionarse especialmente las ostras bivalvas por su capacidad de filtrar hasta 45 litros de agua/hora y porque el HAV puede permanecer viable en el agua entre 3 y 10 meses.

Vías de transmisión. La diseminación del HAV se produce principalmente a través de las heces, existiendo una distribución mundial del virus. El ciclo ano-mano-boca ha sido clásicamente propuesto como la más probable vía de transmisión.

La transmisión más frecuente se produce mediante el contacto de persona a persona, como se observa en convivientes de individuos con hepatitis A y entre niños que acuden a centros de cuidado diario. Los niños presentan la más alta tasa de prevalencia de la infección.

Otras vías de contagio documentadas incluyen los viajes a áreas endémicas, el consumo de agua o alimentos contaminados



Endemicidad del HAV	Regiones incluidas	Promedio de edad de presentación en años
Muy alta	África, Medio Oriente, Sudeste asiático, Bolivia, Paraguay, Ecuador y México	< 5
Alta	China, Brasil, Colombia, Venezuela, Perú, Chile y Argentina	5 a 14
Intermedia	Algunas regiones de Medio Oriente y Europa del este	5 a 24
Baja	Australia, Estados Unidos, Canadá y Europa occidental	5 a 40
Muy baja	Norte de Europa y Japón	> 20

Tabla 24.2.3. Los cinco patrones geográficos de la infección por HAV.

(altamente vinculado con la aparición de brotes epidémicos) y, sólo muy excepcionalmente, la transfusión de sangre y sus derivados.

Existen reportes de brotes epidémicos de HAV entre usuarios de drogas ilícitas en América del Norte y Escandinavia atribuidos a la contaminación fecal de las drogas y al contacto de persona a persona.

El sorprendente hallazgo de alta incidencia de hepatitis A en hombres homosexuales sugeriría la posible transmisión sexual, aunque más probablemente esos casos podrían atribuirse a la transmisión fecal-oral durante el contacto oro-anal.

Prevalencia e incidencia. La detección de anticuerpos específicos ha permitido describir la presencia de esta virosis en casi todo el mundo, aunque las tasas de infección son muy diferentes en los diversos países. Son muy altas en países tropicales y subtropicales, donde a los factores climáticos se agregan los socioeconómicos por su definitiva influencia en los bajos niveles sanitarios. Así, por ejemplo, la enfermedad es de baja incidencia en los países escandinavos (Suecia exhibe 100 casos por cada 100 000 habitantes y una seroprevalencia del 2%), aunque estos valores se incrementan hacia el sur de Europa. En América, la tasa se incrementa de norte a sur en el hemisferio norte y a la inversa en el hemisferio sur. Por ejemplo, la población argentina presenta 560 casos por cada 100 mil habitantes y 70% de positividad para anticuerpos anti-HAV, mientras que en Belice la tasa de ataque es de 850 a 1 200 casos por 100 000 habitantes y la seroprevalencia es mayor al 95%.

El estudio de seroprevalencia para HAV según la edad ha permitido establecer cinco patrones de infección en distintas áreas geográficas del mundo (Figura 24.2.4 y Tabla 24.2.3), que se correlacionan con el nivel socioeconómico y las condiciones de higiene respectivas. En los países más pobres, la infección ocurre en edades más tempranas, y se observa que casi todos los niños menores de 10 años exhiben anticuerpos. Sin embargo, la enfermedad por HAV no es común. Por el contrario, a medida que las condiciones de higiene mejoran, la infección se produce a una edad más avanzada, con lo que se incrementa la incidencia de enfermedad clínica, señalando ello que en este tipo de países el contacto personal con un individuo infectado es más importante que la diseminación masiva del virus.

El HAV es responsable en el mundo de 1,4 millones de casos de hepatitis aguda por año, los que pueden ser esporádicos o formar parte de brotes epidémicos de tórpida evolución y relacionados con la ingesta de agua o alimentos contaminados. En Argentina, los brotes epidémicos se observan durante los meses de otoño e invierno (Figura 24.2.5).

El **mejoramiento de los estándares sanitarios** y de la calidad de vida a nivel mundial ha logrado que la **prevalencia de la inmunidad anti-HAV** se esté **reduciendo en diversas áreas geográficas**. Ello, paradójicamente, podría significar un riesgo para la Salud Pública debido al menos a tres factores: 1) la población de dichas áreas carece de la protección conferida por los anticuerpos neutralizantes generados por la infección natural; 2) las infecciones se producen a mayor edad de los individuos tomándose habitualmente sintomáticas; y 3) la falta de cobertura de la vacuna específica, por razones actuales de costo.

Epidemiología molecular. Los genotipos de HAV presentan una distribución mundial característica. Los genotipos I y III son los más prevalentes a nivel mundial. El subgenotipo IA es más frecuente que el IB.

En Argentina, sucesivos estudios filogenéticos de más de un centenar de secuencias nucleotídicas de aislamientos obtenidos de casos esporádicos y brotes epidémicos permitió incluir las principalmente dentro del subgenotipo IA y agruparlas en 2 *clusters*, sin observarse un patrón de distribución geográfica característico.

Control. Conociendo que el momento de máxima infectividad se observa en los días previos al período de estado y no más allá de 8 a 10 días de aparecidos los síntomas y signos clínicos, es de fundamental importancia el cuidado de la higiene, en especial de las excretas.

El simple hecho de hervir durante 5 minutos un recipiente de 5 litros de agua con dos cucharadas soperas de hipoclorito de sodio concentrado es un procedimiento recomendado en zonas endémicas para descontaminar el agua a ser utilizada como vehículo de diversos alimentos, o bien como bebida.

Debe destacarse la necesidad de un diagnóstico precoz de los pacientes en la fase preictérica (de máxima infectividad) ya que la contagiosidad es también máxima. Es fundamental tener presente que existen formas anictéricas u oligosintomáticas que también son fuente de diseminación viral. Detectado el foco, deberá impedirse aquélla evitando el paciente la concurrencia a sitios favorables para la propagación como piletas, guarderías o colegios. Esta medida debe prolongarse durante 20-30 días a partir del inicio de la sintomatología.

Es aconsejable suministrar la información necesaria a pacientes y contactos con relación al mecanismo de transmisión de la enfermedad.

Desde el año 2005, en Argentina, se ha sumado a estas premisas la incorporación de la vacuna inactivada contra el HAV (admi-

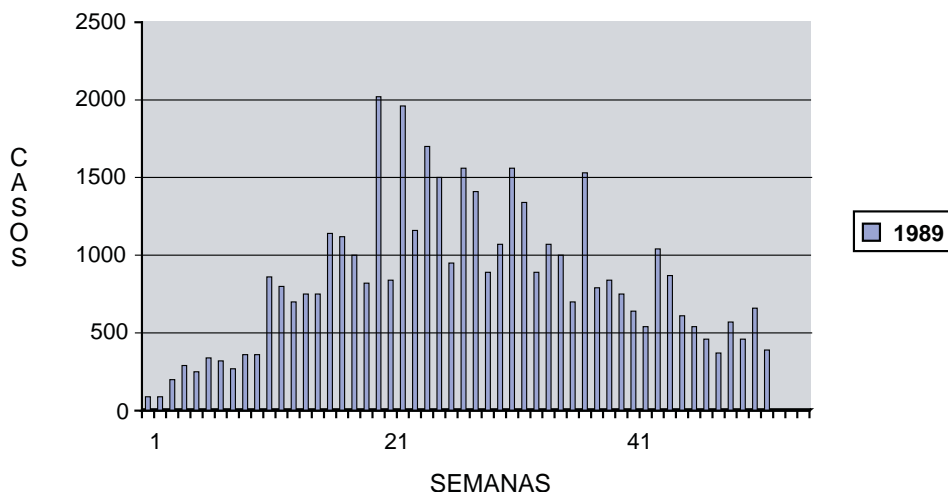


Figura 24.2.5. Hepatitis virales en la Argentina: notificación semanal en 1989. Casos notificados en 52 semanas epidemiológicas: 22 400. Obsérvese la mayor incidencia durante los meses de otoño e invierno, característica de las infecciones por HAV. (Datos proporcionados por la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud y Acción Social de la República Argentina).

nistrada en una única dosis a los 12 meses de edad) al Plan Nacional de Vacunación.

6. CUADRO CLÍNICO

La infección causada por HAV en el ser humano puede producir un amplio rango de formas clínicas que varían entre cuadros asintomáticos hasta hepatitis fulminante severa y fatal. En general, la aparición de manifestaciones clínicas asociadas a la infección por HAV tiende a aumentar con la edad. En la mayoría de los casos, la infección es autolimitada.

En menores de 6 años, la mayoría de las infecciones (70%) son asintomáticas, y si la enfermedad ocurre, es usualmente anictérica. En menores de un año la infección es casi siempre subclínica. En niños mayores y adultos, la infección es usualmente sintomática con ictericia en más del 70% de los pacientes.

Después de un período de incubación que varía entre 15 a 50 días, los individuos infectados presentan manifestaciones inespecíficas (fiebre, anorexia, astenia) seguidas por signos y síntomas gastrointestinales (dolor abdominal, ictericia, coluria, acolia) que se extienden por un período superior a los dos meses.

No existen datos que avalen una forma de presentación crónica o persistente. Sin embargo, 15 a 20% de los pacientes pueden manifestar una enfermedad prolongada o inclusive recaídas de 6 meses de duración.

La hepatitis fulminante es una complicación inusual de la infección por HAV. El riesgo de falla hepática aguda es del 0,015 al 0,5%, aunque puede verse incrementado entre individuos adultos con enfermedad hepática crónica subyacente.

7. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico presuntivo se basa en tres elementos fundamentales: a) *la clínica* con el clásico dolor epigástrico, anorexia, astenia, hepatomegalia y a veces esplenomegalia; b) *el laboratorio clínico* con la coluria, acolia, hipertransaminasemia con o sin hiperbilirrubinemia; y c) *la epidemiología* donde la noción de foco o caso índice no es difícil de poner de manifiesto con una buena anamnesis.

Simultáneamente con la aparición del daño hepático, se detectan anticuerpos circulantes anti-HAV de clase IgM contra las proteínas de

la cápside, los que pueden inclusive preceder la aparición de los signos clínicos. Como en casi todas las infecciones virales, **la elevación de la IgM específica constituye un claro signo de infección aguda**. Por lo tanto, la forma más simple de realizar un diagnóstico de certeza es intentar la detección de IgM anti-HAV tan pronto como sea posible, durante el curso evolutivo de la infección (Figura 24.2.6). Para ello, la técnica de enzimoimmunoensayo (**ELISA**) es la más apropiada.

La IgM anti-HAV alcanza su título máximo en 3 semanas y tiene valor diagnóstico si posee alto título durante los primeros 30-40 días, pudiendo prolongarse su presencia hasta 3 a 6 meses después de la infección aguda.

La elevación del nivel sérico de IgG anti-HAV se produce más lentamente, aunque aparece casi al mismo tiempo o muy poco después de la IgM específica. Esa IgG es detectable durante períodos prolongados: por años o toda la vida en zonas endémicas (Figura 24.2.6).

La infección por HAV pasada o resuelta se diagnostica mediante la detección de IgG anti-HAV. Sin embargo, los equipos comerciales disponibles sólo detectan anti-HAV totales (incluyendo anticuerpos IgG e IgM). Por lo tanto, la presencia de anti-HAV totales en ausencia de IgM específica puede ser utilizada para diferenciar infecciones pasadas de aquellas en curso.

En los individuos inmunes al HAV que vuelven a exponerse al virus, sólo podrá observarse una elevación en el título de la IgG anti-HAV, sin replicación viral, y se ha demostrado que la inmunidad específica protectora persiste toda la vida.

IgG e IgA anti-HAV pueden ser detectadas en suero, saliva, orina y materia fecal. Varios estudios han demostrado los beneficios del testeo de la saliva, en reemplazo del suero, como herramienta de tamizaje útil en estudios epidemiológicos o durante brotes epidémicos debido a la sencillez de la recolección de la muestra. Sin embargo, la sensibilidad de las técnicas utilizadas en la detección de anti-HAV en saliva es de 1 a 3 unidades log₁₀ inferior en comparación con aquellas que analizan muestras séricas.

Los métodos de diagnóstico virológico indirecto mencionados son los más comúnmente utilizados en la práctica médica de rutina. Sin embargo, es posible contar con métodos directos que son de elección para aquellos que intervienen en proyectos de investigación básica, epidemiológicos o ambientales.

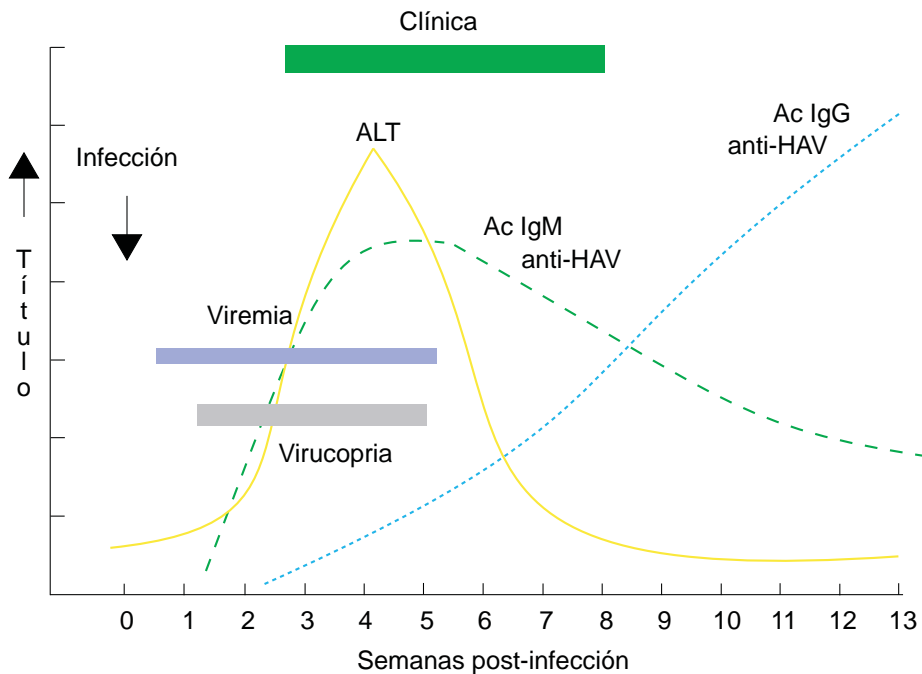


Figura 24.2.6. Hepatitis A aguda sintomática. Modificado del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, EE.UU.

El virus puede detectarse en la materia fecal en el período prodromico, 3 a 4 días antes de la aparición de los signos clínicos, como consecuencia de la intensa virucopia. Existe con frecuencia un paso viral muy fugaz por la sangre, aunque como se mencionó anteriormente, en algunos casos el RNA viral puede persistir detectable hasta un mes mediante RT-PCR. Ello significa que la vía más importante de transmisión es la materia fecal durante los primeros 7 a 10 días de enfermedad y especialmente en los 3 ó 4 días previos a su aparición.

La búsqueda de partículas virales en las heces mediante microscopía electrónica e inmunomicroscopía electrónica tiene gran importancia en instancias epidémicas o en estudios de grupos cerrados. Además, el antígeno viral puede ser detectado en materia fecal, cultivos celulares y muestras ambientales por medio de ELISA. Si bien la viremia del HAV ha sido documentada, la detección del antígeno viral en suero es dificultosa ya que la fibronectina puede unirse al HAV y enmascarar determinantes antigénicos claves en el proceso de detección inmunológica. Además, recuerde el lector que la viremia es transitoria.

Para el diagnóstico del HAV, las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos son más sensibles que el inmunoensayo para el antígeno viral. En la actualidad, la más ampliamente utilizada es la RT-PCR para muestras clínicas, ambientales (agua) o alimentos que se presumen contaminados con el HAV.

La PCR acoplada a un paso previo de transcripción inversa, así como sus variantes *multiplex* y *real time (a tiempo real)*, constituyen la técnica más sensible en la actualidad para la detección y amplificación de pequeñas concentraciones del genoma del HAV. La secuenciación nucleotídica de los productos de PCR confirma la especificidad de los mismos y brinda la posibilidad de asignar el genotipo a cada aislamiento. Sin embargo, esta técnica sólo se debe solicitar para el diagnóstico virológico ante pacientes que exhiban un defecto en la respuesta humoral, ya que la detección de **IgM específica anti-HAV constituye el procedimiento de elección.**

8. PROFILAXIS

Inmunización activa. En la actualidad, se encuentran disponibles en el mercado cuatro tipos de vacunas a virus inactivado contra el HAV. Se caracterizan por su seguridad y efectividad al ser altamente inmunogénicas y proveer protección contra la infección por un período prolongado de tiempo (alrededor de 20-25 años). Dicha protección se confiere a partir de la cuarta semana de la administración de la primera dosis.

Se han desarrollado dos vacunas a virus inactivado con formaldehído (Havrix[®], SmithKline Beecham, y Vaqta[®], Merck), utilizando como semilla el virus aislado de un individuo infectado (cepa HM-175) y luego propagado en fibroblastos diploides humanos.

La suspensión de partículas virales completas es obtenida mediante lisis celular y posterior purificación por ultracentrifugación y cromatografía en gel. El virus es entonces inactivado con formaldehído. La preparación comercial utiliza hidróxido de aluminio como adyuvante.

Estas vacunas son altamente inmunogénicas e inducen títulos de anticuerpos neutralizantes más elevados que los obtenidos mediante administración pasiva de inmunoglobulinas. Más del 99% de los adultos vacunados responde a la inmunización activa. Un resultado similar se ha obtenido en niños vacunados.

En el caso particular de Havrix[®], se administran 720 U de ELISA por dosis a los 0, 1 y 6 meses de iniciada la vacunación. No se ha observado diferencia alguna según el sexo o la edad de niños vacunados. Esta vacuna ha demostrado un 100% de eficacia al administrarse una única dosis en brotes epidémicos. Más aún, es la única vacuna específicamente indicada para la inmunización activa contra el HAV en pacientes con hepatopatías crónicas.

Debido al elevado número de casos de hepatitis A registrados en los años 2003 y 2004 en la Argentina, se ha incorporado la vacunación específica al calendario nacional desde 2005. Se encuentra indicada a todos los niños de 12 meses de edad la administración

intramuscular de una única dosis de vacuna anti-hepatitis A. Ello genera al cabo de un período de aproximadamente 14 días una respuesta inmune protectora en el 91,6 al 96,8% de los vacunados. Estudios realizados en nuestro país lograron documentar que la incorporación de dicha vacuna al calendario nacional, permitió disminuir un 80% el número de casos ambulatorios y hospitalizados reportados; así como un 100% la tasa de hepatitis fulminante atribuible a este virus y, consiguientemente, la indicación de trasplante hepático en niños.

Se recomienda la administración de una segunda dosis de vacuna al cabo de 6 meses de aplicada la primera. Este refuerzo permite alcanzar virtualmente un 100% de respuesta inmune en los así vacunados y la persistencia más duradera de anticuerpos específicos. Sin embargo, esta segunda dosis no integra el calendario nacional de vacunación en nuestro país como ocurre en otros países del mundo con vacunación universal masiva contra esta enfermedad.

Una vacuna combinada anti-HAV-HBV (Twinrix[®], SmithKline Beecham) es comercializada desde 1997. Está compuesta de 720 U de ELISA de la vacuna Havrix[®] y 20 µg del antígeno de superficie del HBV (Engerix[®]-B), y también utiliza hidróxido de aluminio como adyuvante. Se encuentra indicada para individuos desde el año de edad y se administra en 3 dosis (0, 1 y 6 meses). En un estudio, la inmunogenicidad de esta vacuna combinada ha sido comparada con la inmunogenicidad de cada vacuna aplicada por separado. Se recomienda la aplicación de Twinrix[®] en individuos con riesgo de contraer tanto HAV como HBV.

Cerca de la totalidad de los vacunados con cualquiera de estas tres vacunas desarrollarán títulos de anticuerpos protectores dentro del mes de recibir la primera dosis. Sin embargo, no se ha determinado su seguridad en embarazadas.

Al tratarse de vacunas a virus inactivado, no existe riesgo alguno en el momento de administrarla a individuos inmunosuprimidos aunque por razones obvias, éstos pueden ser menos respondedores.

En estos tres casos, la vía de administración es intramuscular. Los efectos adversos son mínimos: dolor local (30%), induración local (18%), y dolor del brazo (1,7%).

Una cuarta vacuna (Epaxal[®], Berna) fue desarrollada en Suiza y actualmente se comercializa en ese país y en la Argentina. Se caracteriza por la incorporación de partículas virales inmunogénicas, purificadas de cultivos de células diploides humanas e inactivadas con formaldehído asociadas al interior de virosomas de influenza reconstituidos e inmunopotenciadores. Los virosomas han sido desarrollados como una alternativa frente al uso del hidróxido de aluminio como adyuvante. Por lo tanto, Epaxal[®] no se asocia a los efectos adversos locales propios de las vacunas arriba mencionadas y constituye la primera vacuna anti-HAV libre de aluminio del mercado.

Los virosomas se obtienen luego de purificar la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de la cepa A/Singapur6/68 del virus de la influenza humana y mezclarlas con glicoproteínas de superficie que contienen fosfolípidos naturales y sintéticos. Después de remover el agua con detergentes, espontáneamente se forman los virosomas, que son estructuras esféricas de 150 a 200 nm de diámetro compuestas de una bicapa fosfolipídica con moléculas intercaladas de HA y NA. En el caso de Epaxal[®], las partículas de HAV se unen electrostáticamente a los virosomas.

La HA de los virosomas, mediante su interacción con los receptores de las células inmunocompetentes, facilita la generación de la respuesta inmune frente al HAV inactivado. Se ha demostrado que una única dosis intramuscular de Epaxal[®] es segura, bien tolerada y altamente inmunogénica, logrando una eficacia del 84,6% en las primeras 6 semanas desde la vacunación y del 100% después de ésta. En comparación con las vacunas con aluminio, Epaxal[®] posee igual eficacia pero menor riesgo de efectos adversos.

La utilización de variantes atenuadas propagadas en células AGMK (riñón de mono verde africano), MRC-5 ó en fibroblastos diploides, luego de su aislamiento a partir de heces humanas o luego del pasaje en mono tití, permitió producir en China la primera vacuna atenuada contra el HAV. La administración oral no resultó

ser efectiva, por lo tanto se prefiere la vía subcutánea en dos dosis a los 0 y 12 meses logrando así mantener la protección del 98% de los vacunados después de pasados 8 años desde su administración. Se elimina por materia fecal en bajas concentraciones.

Inmunización pasiva. Se ha demostrado en múltiples ocasiones el valor de la inmunoglobulina estándar (también denominada normal) en el control de brotes de la infección en grupos específicos de poblaciones, ya que puede reducir la incidencia de hepatitis A hasta en un 90%. Puede administrarse antes o después de la exposición, siendo más efectiva en el primer caso.

La administración intramuscular de esta inmunoglobulina –solución al 16% en dosis de 0,02-0,06 ml/kg– antes de la exposición al virus o en etapas tempranas del periodo de incubación (dentro de las dos primeras semanas desde la exposición) puede evitar o atenuar la enfermedad clínica sin que impida necesariamente la infección ni la excreción del virus.

La administración de Ig estándar antes de una exposición potencial al virus ha sido indicada en países con baja tasa de infección (por ejemplo, los escandinavos) especialmente en el caso de viajeros a zonas endémicas de otros países, teniendo en cuenta la prevalencia de las infecciones por HAV en dicha área, las condiciones sanitarias en el lugar y el tiempo de la estadía. También, se encuentra indicada en individuos alérgicos a alguno de los componentes de la vacuna.

Con particular énfasis debe señalarse que las indicaciones de la Ig estándar luego de la exposición son muy restringidas. Se acepta, en general, que en países de baja prevalencia debería limitarse a

familiares y contactos sexuales de pacientes con hepatitis aguda y a personal que atiende centros de cuidado asistencial. Ante la simultánea exposición a una fuente común de contagio, y si como consecuencia de ello hubieran comenzado a producirse casos clínicos, no debe indicarse el tratamiento con Ig al resto de las personas expuestas.

La profilaxis pasiva es segura para adultos, niños, mujeres embarazadas o en período de lactancia e individuos inmunosuprimidos. Sin embargo, se encuentra en desuso ante la alta efectividad de la profilaxis activa. Otra razón que desestima su elección es que brinda un período de protección de duración limitada (6 meses), dejando a los individuos susceptibles frente a una nueva exposición al agente. Por lo tanto, debería ser readministrada para mantener su efectividad y asegurar una protección continua lo que, obviamente, es anti-económico comparado con la profilaxis activa. Además, la inmunoglobulina estándar puede interferir con la respuesta inmune frente a vacunas a virus vivos y atenuados, como la vacuna contra la varicela o la triple viral. Como consecuencia, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propone retrasar su administración dos semanas desde la vacunación. Por otra parte, también se sugiere posponer la triple viral por lo menos 3 meses y la anti-varicela 5 meses desde la aplicación de la gammaglobulina estándar.

Si bien la hepatitis A consiste en una enfermedad benigna que no evoluciona hacia la cronicidad y que causa una mortalidad menor al 1%, el lucro cesante que produce debido a su evolución prolongada, especialmente en adultos, la convierte en una enfermedad con repercusiones socioeconómicas y laborales en el mundo entero.

Bibliografía

- Costa-Mattioli M, Di Napoli A, Ferré V, Billaudel S, Pérez-Bercoff R, Cristina J. "Genetic variability of hepatitis A virus". *J Gen Virol* 2003;84:3191-3201.
- Espina Peña M, Carabajal C, Ensínck G, Galdeano H, Jarma R, Santillan Iturre A, et al. "Impact of universal immunization against hepatitis A in children hospitals in Argentina". *Global Hepatitis A Meeting*, 2007. Miami, EE.UU.
- Holzer BR, Hatz C, Schmidt-Sissolak D, Glück R, Althaus B, Egger M. "Immunogenicity and adverse effects of inactivated virosome versus alum-adsorbed hepatitis A vaccine: a randomized controlled trial". *Vaccine* 1996;14:982-6.
- Jacobsen KH, JS Koopman. "Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis". *Epidemiol Infect* 2004;132:1005-22.
- Martin A, SM Lemon. "Hepatitis A virus: from discovery to vaccines". *Hepatology* 2006;43:S164-S172.
- Kim HY, Eyheramonho MB, Pichavant M, González Cambaceres C, Matangkasombut P, Cervio G, et al. "A polymorphism in TIM1 is associated with susceptibility to severe hepatitis A virus infection in humans". *J Clin Invest* 2011; 121: 1111-8.
- Mayorga Pérez O, Herzog C, Zellmeyer M, Loáisiga A, Frösner G, Egger M. "Efficacy of virosome hepatitis A vaccine in young children in Nicaragua: randomized placebo-controlled trial". *J Infect Dis* 2003;188:671-7.
- Munné MS, Vladimírsky S, Otegui L, Soto S, Brajterman L, Castro R et al. "Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from Argentina". *J Med Virol* 2007;79:887-94.
- Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS. "Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach". *Clin Microbiol Rev* 2006;19:63-79.
- Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Caylà J, Tortajada C, Lite J, Bosch A, et al. "Hepatitis A virus vaccine escape variants and potential new serotype emergence". *Emerg Infect Dis* 2011; 17:734-7.
- Tami C, Silberstein E, Manangeeswaran M, Freeman GJ, Umetsu SE, DeKruyff RH et al. "Immunoglobulin A (IgA) is a natural ligand of hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVCR1), and the association of IgA with HAVCR1 enhances virus-receptor interactions". *J Virol* 2007;81:3437-46.
- Wang X-Y, Xu Z-Y, Ma J-C, von Seidlein L, Zhang Y, Hao Z-Y et al. "Long-term immunogenicity after single and booster dose of a live attenuated hepatitis A vaccine: results from 8-year follow-up". *Vaccine* 2007;25:446-49.
- World Health Organization (WHO). Department of Communicable Disease Surveillance and Response. Hepatitis A. En: www.who.int/csr/disease/hepatitis

Virus Hepatitis B

Verónica Lidia Mathet - María Luján Cuestas - José Raúl Oubiña

Al comienzo de la década de 1940, se habían acumulado suficientes evidencias epidemiológicas que sugerían la existencia de una segunda forma de transmisión de hepatitis viral: a la sospechada vía de transmisión oral, se sumaba una forma de transmisión parenteral. El significado militar que esas hepatitis tuvieron durante la Segunda Guerra Mundial indujo la multiplicación de esfuerzos en investigación, particularmente en EE.UU. e Inglaterra. Los repetidos fracasos en los intentos de encontrar animales susceptibles u otros métodos de laboratorio que permitieran el aislamiento y la propagación virales condujeron a la realización de estudios controlados de transmisión humana que establecieron firmemente la distinción epidemiológica y etiológica entre la hepatitis A (llamada entonces infecciosa) y la B (denominada sérica), la ausencia de inmunidad cruzada y el amplio espectro de manifestaciones clínicas resultantes de la infección por cada uno de los virus homónimos.

1. MORFOLOGÍA

Los estudios de microscopía electrónica de preparaciones parcialmente purificadas del HBV provenientes de suero humano demostraron tres tipos de partículas (Figura 24.3.1A y 1B): **1)** partículas de 42 nm doblemente cubiertas, denominadas de **Dane** (en homenaje a su descubridor) y que constituyen el virión intacto; **2)** **esferas** de 22 nm, habitualmente presentes en 10^3 - 10^6 veces en exceso con relación al número de viriones; y **3)** **filamentos** de 22 nm de diámetro y de longitud variable (hasta 250-300 nm). Estas dos últimas formas subvirales del HBV son partículas envueltas vacías, por lo que al carecer de ácido nucleico no son infecciosas.

2. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL

2.1 INTRODUCCIÓN

La envoltura del HBV es una estructura macromolecular compleja constituida casi exclusivamente por lípidos derivados de las membranas internas de las células infectadas, carbohidratos (en forma de oligosacáridos *N*-unidos a glicoproteínas) y tres glicoproteínas virales relacionadas: **pre-S1** o **L HBs Ag** (L: *large*: grande), **pre-S2** o **M HBs Ag** (M: *middle*: mediana) y **S** o **S HBs Ag** (S: *small*: pequeña), siendo esta última el principal componente de la envoltura viral.

La proteína S, también conocida como antígeno de superficie del HBV (HBs Ag) es una proteína pequeña de 226 aminoácidos (aa) y la más abundante de las tres. Es en función de su abundancia relativa que al HBs Ag también se lo designa como antígeno "principal".

La abundancia relativa de las proteínas de envoltura pre-S1, pre-S2 y S alcanza un 20%, 10% y 70%, respectivamente, tanto en las partículas infecciosas (partículas de Dane) como en las no infecciosas filamentosas. En las partículas no infecciosas esféricas los porcentajes respectivos: son 1%, 10% y 89%. Estas formas subvirales del HBV son altamente inmunogénicas e inducen eficientemente la formación de anticuerpos neutralizantes anti-HBs. Estas partículas esféricas no infecciosas purificadas, provenientes del plasma de pacientes crónicamente infectados con HBV, constituyeron el sustrato con el que se elaboró la primera vacuna obtenida contra la hepatitis B.

La remoción artificial de la envoltura de la partícula de Dane con detergentes no iónicos libera una **nucleocápside** o **core** de 27

nm, cuyo principal componente es una fosfoproteína de 22 kDa que constituye el antígeno del *core* o **HBc Ag**. Asociada a la nucleocápside, se encuentra la **DNA polimerasa viral**. Esta proteína contiene cuatro dominios: una **región amino-terminal** (proteína terminal o PT) unida por un **brazo espaciador** a un **dominio con actividad de transcriptasa inversa / DNA polimerasa** y a un cuarto **dominio que contiene actividad de RNasa-H** (Figura 24.3.2). También asociada a la nucleocápside se encuentra una proteína multifuncional transactivadora: es la **proteína X**. Un producto de clivaje del polipéptido **pre-core** se conoce como proteína e, y el antígeno respectivo **HBe Ag** (véanse proteínas virales). Esta proteína no está asociada a la partícula viral; existe libre en circulación en forma soluble. En el interior de la nucleocápside está localizado el genoma viral.

2.2 GENOMA

El genoma del HBV es característico e inusual, ya que su **DNA** adopta una **configuración circular laxa**, es **parcialmente doble catenario** y el más pequeño de los virus a DNA. Posee **dos asimetrías** que lo distinguen de todos los genomas virales no pertenecientes a la familia *Hepadnaviridae*. **La primera asimetría está referida a la longitud de sus dos cadenas de DNA**. Una de ellas consiste en una unidad íntegra de longitud, mientras que la otra es menor que esa unidad y su extensión varía entre un 20-80 % con relación a la primera. La cadena más larga (L: *long*) posee una secuencia nucleotídica complementaria a la del RNA mensajero viral, y por convención se la designa como de polaridad negativa o cadena (-). Consecuentemente, la cadena más corta (S: *short*) tiene polaridad positiva y se la designa indistintamente (+). La cadena (-) posee los extremos 5' y 3' fijos, mientras que la cadena (+) exhibe el extremo 5' fijo y el 3' en posición variable, difiriendo tanto en viriones de un mismo origen como en los obtenidos de una misma semilla viral. **La segunda asimetría genómica ocurre en el extremo 5' de ambas cadenas**, en donde a la cadena (-) se le une covalentemente la proteína terminal (codificada por el dominio PT de la polimerasa viral), y a la cadena (+) se le une un oligorribonucleótido de 18 bases de longitud proveniente del RNA pregenómico (RNApp). Estas asimetrías están íntimamente vinculadas al fascinante modo de replicación del HBV.

La cadena L (-) posee 3182-3221 nucleótidos, mientras que la cadena S (-) varía en su longitud y alcanza en algunos casos las 2800 bases.

La cadena L (-) no forma un círculo cerrado: existe una interrupción ubicada en un lugar fijo, a menos de 300 bases del extremo 5' de la cadena S (+).

A pesar de que ninguna de las dos cadenas del genoma viral forma un círculo cerrado, la circularización genómica está mantenida por una secuencia terminal cohesiva delimitada por el extremo 5' de la cadena S (+) y el sitio de interrupción de la cadena L (-), secuencia que se extiende por 224 pb que son complementarias (Figura 24.3.3).

En el genoma del HBV existen **cuatro marcos abiertos de lectura** (MAL = ORF: del inglés *Open Reading Frame*) principales y superpuestos entre sí: **1)** el de la **nucleocápside** o **core**, que codifica las proteínas *pre-core* y *core*; **2)** el de la **envoltura**, que codifica las proteínas de envoltura *pre-S1*, *pre-S2* y S; **3)** el

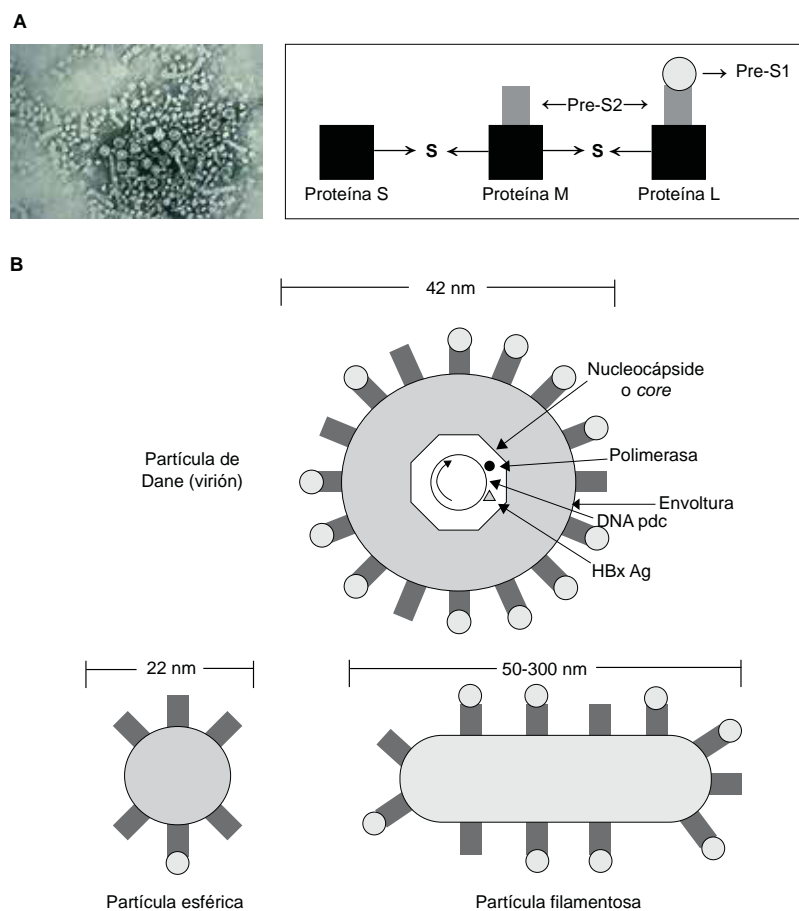


Figura 24.3.1. A. Virus hepatitis B. La microfotografía electrónica muestra tres tipos de estructuras: partículas subvirales esféricas y filamentosas, y partículas (infectivas) de Dane. El core de 27 nm es visible en varias partículas de Dane (De Ford E. y Gerin J. 100.000 X). **B. Diagrama de las estructuras exhibidas en el panel A** (no mostradas en escala). pdc: parcialmente doble cadena.

de **X**, que codifica la proteína X (o HBx Ag); y **4**) el de **Pol (o también designado P)**, que codifica la polimerasa viral. Estos cuatro ORFs se encuentran codificados por la cadena L (-). Un ORF es una secuencia de codones potencialmente traducibles en aminoácidos, sin codones de terminación en su interior. En estos ORFs residen los genes que codifican todas las proteínas virales.

El ORF que codifica la polimerasa viral se yuxtapone (aunque fuera de fase) con los otros tres ORFs anteriormente mencionados. Esto adquiere relevancia cuando ocurren mutaciones en la secuencia que codifica para el HBs Ag (por ejemplo, como consecuencia de la presión de selección inducida en el hospedador por la inmunoprofilaxis específica), ya que dichos cambios nucleotídicos se producirían también en la secuencia de la polimerasa viral, traduciendo o no en un cambio aminoacídico. De la misma manera, cambios nucleotídicos en la polimerasa viral (por ejemplo; como consecuencia de la presión de selección de la terapia con antivirales) pueden tener implicancias más o menos importantes en las proteínas de la envoltura.

Los procesos transcripcionales del genoma del HBV están regulados por dos **potenciadores o enhancers** (enhI y enhII), cuatro **promotores** (el promotor del core, el de pre-S2/S, el de pre-S1 y el de X), un **elemento silenciador** (*silencer element*), un **elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG)**, y un elemento **CCAAT** (que es una caja de inicio de la transcripción).

Un **enhancer** es un elemento regulatorio capaz de activar la transcripción de genes homólogos o heterólogos en un modo independiente de la orientación y posición (corriente arriba *-upstream-* o corriente abajo *-downstream-*) del promotor. Ello se

logra mediante una actividad en *cis* que incrementa la utilización de (ciertos) promotores. Un **promotor** es una región de DNA involucrada en la unión de la enzima RNA polimerasa para iniciar la transcripción. Un **elemento de respuesta** es una secuencia nucleotídica que promueve la respuesta de un gen (o grupo de genes) a factores regulatorios de transcripción, que puede estar localizado en el promotor o en un **enhancer**. Esto último se observa con el ERG detectado en el genoma del HBV, que se localiza corriente abajo del enhI. Un **elemento silenciador** es una secuencia nucleotídica que disminuye la expresión génica mediante su interacción con proteínas represoras celulares; dicha secuencia ejerce en *cis* sus efectos en un modo dependiente de la localización pero independiente de su orientación.

Entre el marco de lectura abierto de la envoltura y el del X existe un **enhancer** que regula la transcripción de todos los RNAm del HBV, incluido el RNApp, denominado **enhI**. Este enhI está ubicado unas 550 pb corriente arriba del promotor del core, el más relevante para la replicación del HBV. Más recientemente se ha demostrado la existencia de un segundo **enhancer (enhII)** que se solapa con dicho promotor, y que al menos ejerce considerable influencia sobre los promotores de pre-S1 y S.

El efecto del enhI se ejerce sobre los diversos promotores del HBV regulando la actividad transcripcional y la estabilidad del RNApp y de los distintos RNAm del virus. Al igual que el ERG, enhI es inducible por los glucocorticoides (Figura 24.3.3).

La actividad en *cis* del **enhancer** sobre el promotor del core no es muy eficiente, ya que en cierta medida es inhibida por una secuencia nucleotídica que los separa. Experimentos de transfección

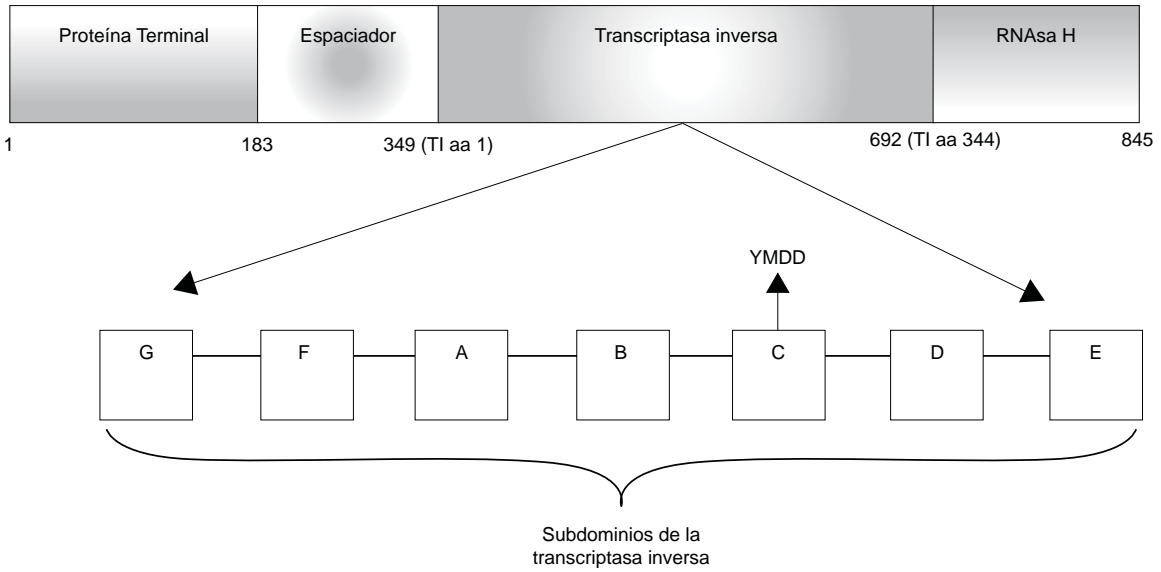


Figura 24.3.2. Esquema de los dominios codificados por el gen P. Se indican los subdominios del dominio de la transcriptasa inversa (TI; también denominado RT: *Reverse Transcriptase*, en inglés). En ellos residen las mutaciones que se asocian a la resistencia natural o adquirida frente a los análogos de nucleósidos o nucleótidos utilizados en el tratamiento de la infección crónica por HBV. El sitio catalítico de la TI está conformado por los aminoácidos YMDD dentro del subdominio C y se indica con una flecha.

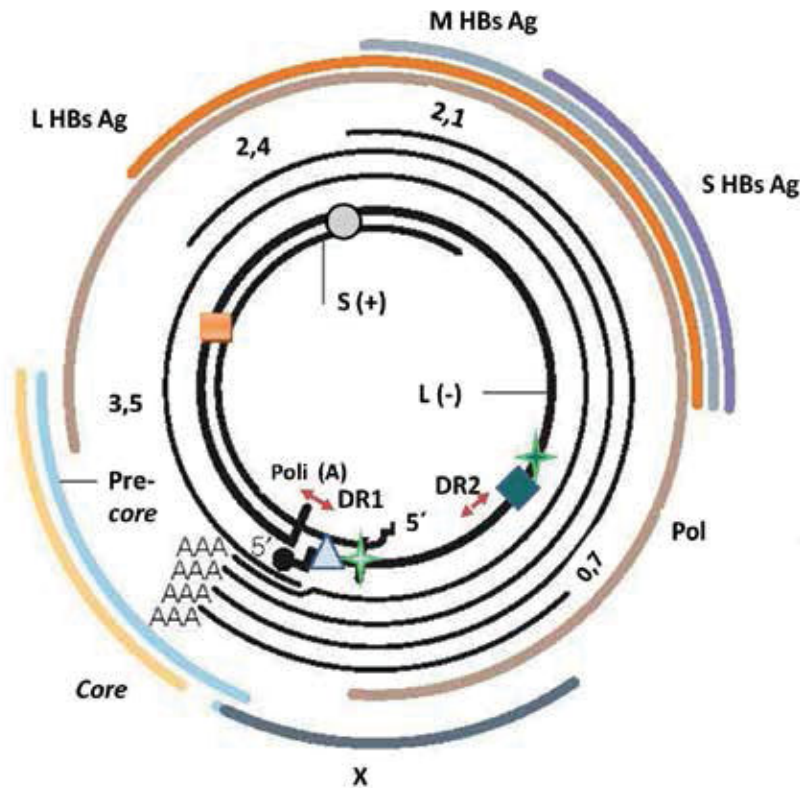


Figura 24.3.3. Diagrama del genoma del HBV parcialmente bicatenario (cadenas L [-] y S [+]) y de sus 4 marcadores abiertos de lectura (ORFs): Pre-S/S (correspondiente a la región codificante para L HBs Ag, M HBs Ag y S HBs Ag), Pre-core / core (codificantes del HBe Ag y del HBc Ag, respectivamente), X y Pol. Se indican las regiones repetidas directas DR1 y DR2. Se observan también los diferentes transcritos de RNA poliadenilados. Se observan los cuatro promotores indicados con el mismo color de la región genómica a transcribir: Pre-S1, Pre-S2 / S, X y Pol.



con plásmidos que contienen el *enhancer* del HBV adyacente a ese promotor revelan un aumento de la actividad de éste de casi 30 veces, comparado con un aumento de sólo 3 veces cuando el *enhancer* está separado por la secuencia nucleotídica constitutivamente interpuesta entre ambos en el genoma viral. Estudios de Gerlach y Schloemer demostraron que esa secuencia actúa como un elemento de regulación negativa del promotor del *core*, que ejerce en *cis* sus efectos en un modo dependiente de la localización pero independiente de su orientación. Esta característica, como se mencionó anteriormente, es propia de los elementos silenciadores.

La expresión del genoma del HBV está regulada por **cuatro elementos promotores: el del *core*, el de pre-S2/S (M HBs / S HBs), el de pre-S1 (L HBs) y el de X**. Los dos primeros son muy activos *in vivo*, en contraposición con los dos últimos. Sus respectivas ubicaciones se observan en la Figura 24.3.3.

El **promotor del *core*** está compuesto por **tres dominios: un RE [+]** (elemento regulatorio [+]), **un RE [-]** (elemento regulatorio [-]) y **el BCP** (promotor básico del *core*, situado entre los nucleótidos 1744-1814). Regula la expresión del RNAPg y del RNAm del *pre-core*, que son idénticos entre sí y que presentan una secuencia nucleotídica de mayor longitud que la del genoma viral (3,5 kb cada uno, a diferencia de los 3,2 kb del genoma del HBV). Ello se debe a que estos transcritos terminan en el único sitio de poliadenilación (secuencia de terminación de la transcripción) ubicado en el marco de lectura de la nucleocápside. La transcripción, entonces, debe producirse pasando una segunda vez por la secuencia de origen, hasta alcanzar la señal de terminación mencionada. Esto implica que el sistema de transcripción debe efectuar siempre una primera lectura a través de esas secuencias, ignorándolas. El RNAPg sirve, por un lado como templado para la transcripción inversa y subsiguiente síntesis de la cadena L (-) de DNA, y por el otro, para la traducción de las proteínas *core* y Pol. El RNA de *pre-core/core* no sirve como templado para la transcripción inversa, sino sólo para la generación de la proteína e soluble a partir de la proteína *pre-core* que es su precursora (véase replicación).

Teniendo en cuenta el control negativo que ejerce el silenciador sobre el promotor del *core*—efecto que no puede ser totalmente superado por *enhI*— y dada la necesidad de su actividad para la replicación del HBV, se investiga si participa en la estimulación de este promotor la proteína X o si se inhibe la función y/o síntesis de la proteína celular involucrada en la actividad del silenciador. En otros términos, si el resultado final depende de otro estímulo positivo sobre el promotor o de la ausencia de mecanismos efectores de represión sobre él.

El promotor de *pre-S2/S* regula la producción de un RNA de 2,1 kb. Debido a microvariaciones en su extremo 5' este transcrito codifica los polipéptidos *pre-S2* y *S* (M HBs Ag y S HBs Ag). Un elemento distal de este promotor puede estar reprimido por factores celulares específicos de ciertos tipos de células. La abundancia de este RNA en las células es responsable del exceso de las formas subvirales esféricas de 22 nm que son secretadas a la circulación.

El promotor de *pre-S1* está ubicado contiguamente al primer ATG del marco de lectura del gen de la envoltura que codifica para el polipéptido *pre-S1*. Este polipéptido cumple un rol fundamental en el ensamblado del virión, en la regulación de la replicación viral, en la regulación del *pool* nuclear de DNAcc (circular covalentemente cerrado), y en la transactivación de una gran variedad de promotores.

Análogamente, el promotor de X es bastante inactivo desde el punto de vista transcripcional. Los transcritos X usualmente constituyen menos del 1 % del total del RNA viral en la célula.

El análisis de la secuencia nucleotídica del genoma viral permitió además identificar ciertos elementos que desempeñan importantes papeles en la replicación viral. Dos de ellos merecen especial mención (Figura 24.3.3): 1) un oligonucleótido de 11 bases presente dos veces en el genoma como secuencias repetidas directas (DR: *direct repeats*) ubicadas a ambos lados de los extremos cohesivos de las cadenas L (-) y S (+) que se denominan respectivamente **DR1** y **DR2**; y 2) la secuencia **TATAAA** ubicada en el extremo 5'

terminal de la región que codifica el HBe Ag. DR1 y DR2 están involucrados crucialmente en la síntesis de DNA viral, mientras que la secuencia TATAAA forma parte de la señal de clivaje / poliadenilación que está presente en el extremo 3' de los RNAm del virus. Estos RNAm virales también poseen como elemento regulatorio de la replicación del HBV una **señal de encapsidación** denominada **epsilon (ε)**.

La Tabla 24.3.1 detalla las proteínas codificadas por el genoma viral.

2.3 PROTEÍNAS VIRALES

Pre-core/core. Se encuentran codificadas por el ORF de la nucleocápside o *core*. El mismo contiene **dos codones de iniciación (ATG) ubicados en fase**, de ahí que los dos polipéptidos codificados son idénticos en buena parte de su extensión, difiriendo solamente entre sí por la presencia de 29 aa adicionales en el extremo amino-terminal del polipéptido *pre-core* y por la delección peptídica del *core* en el extremo carboxilo-terminal (Veáse la figura 24.3.4).

El antígeno del *core* o HBe Ag es el principal componente de la nucleocápside del HBV. Es una fosfoproteína de 22 kDa (p 22^c), de 183, 185, ó 195 aa dependiendo del genotipo viral, que se autoensambla *in vivo* formando partículas icosaédricas o esféricas de 27 nm. Cada una de ellas constituye una subunidad, y a su vez 180 de estas subunidades se autoensamblan formando la nucleocápside viral. La microscopía electrónica demuestra que estas cápsides se encuentran predominantemente en el núcleo de los hepatocitos; no se secretan a la circulación libres sino rodeadas de la envoltura viral, constituyendo la partícula de Dane.

El polipéptido *core*—rico en arginina en sus 34 aa terminales del extremo carboxilo— tiene por función, a través de esa secuencia peptídica básica, la unión al ácido nucleico viral. Desde el extremo amino hasta el aminoácido 140 se encuentran las secuencias necesarias para el autoensamblaje.

Diecinueve de los primeros 29 aa del extremo amino-terminal del polipéptido *pre-core* (p 24^c) funcionan como una señal de secreción que dirige la molécula naciente hacia el retículo endoplásmico desde donde—luego del clivaje de los extremos carboxilo y amino por una peptidasa de la célula hospedadora infectada— se dirige al aparato de Golgi para ser secretado a la circulación como un antígeno soluble de 16 kDa denominado HBe Ag (p 16^E). El polipéptido del *pre-core* no es imprescindible para la replicación viral, y se lo considera un "polipéptido accesorio".

Estudios experimentales han demostrado que la síntesis de la proteína *core*, en ausencia de la proteína *pre-core*, induce la acumulación nuclear de nucleocápsides. Por el contrario, si *pre-core* está presente, el HBe Ag se acumula en membranas del retículo endoplásmico y se secreta el producto de clivaje de la proteína *pre-core*: el HBe Ag. Este antígeno contiene 149 aa idénticos a los primeros 149 de la proteína *core*, precedidos por 10 aa remanentes de la secuencia del polipéptido de *pre-core*. Se han descrito en múltiples trabajos mutantes de *pre-core* en las que la existencia de un codón de terminación en el triplete anterior al inicio del gen del *core* impide la síntesis de *pre-core* pero no de *core* (Figuras 24.3.4 y 24.3.5). Ello demostró definitivamente que es posible la síntesis de cápsides, y por ende, de las partículas de Dane aun en ausencia del HBe Ag.

Se ha demostrado que la formación de puentes disulfuro (S-S) entre cisteínas intramoleculares del HBe Ag (Cys 7 y Cys 61) es responsable de la diferente estructura terciaria que existe entre éste y el HBe Ag. Esta diferencia entre ambos polipéptidos condiciona a sus respectivas estructuras cuaternarias y justifica sus diferentes antigenicidades. Asimismo, esa unión S-S es crítica para la secreción del HBe Ag como proteína soluble. Por el contrario, en las partículas de *core*, la formación de puentes S-S entre la Cys 7 y la Cys 61 se produce entre cisteínas intermoleculares y no intramoleculares como en el HBeAg; es decir, el puente S-S se forma entre la Cys 7 (codificada por la región *pre-core*) y la Cys 61 ubicada en subunidades contiguas, generando así, dímeros estables covalente-

Marco abierto de lectura	Proteína	Glicoproteína	Localización	Función
Envoltura (región pre-S/S)	p 24 ^s	p 27 ^s	Virión, partículas filamentosas y esféricas	S HBs Ag
	p 33 ^s	p 36 ^s	Virión, partículas esféricas y filamentosas	M HBs Ag (con regiones S y pre-S2)
	p 39 ^s	p42 ^s	Virión y -en menor cuantía- partículas filamentosas y esféricas	L HBs Ag (con regiones S, pre-S2 y pre-S1)
Nucleocápside (región pre-core/core)	p 22 ^c	No	Virión (nucleocápside)	HBc Ag Unión al genoma
	p 24 ^c	No	-	Autodireccionado al R.E.: procesado; transportado al Golgi es secretado como HBe Ag
	p 16 ^E	No	Soluble (no forma parte de las partículas virales)	HBe Ag
Pol (P)	p 90 ^p	No	Virión	DNA polimerasa/transcriptasa inversa, proteína terminal cebadora; RNAsa H
X	p 17 ^x	No	Virión	Transactivador transcripcional; promueve estrés oxidativo, altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial regulando el nivel de Ca ⁺⁺ citosólico

Tabla 24.3.1. Detalle de las proteínas codificadas por el genoma viral. R.E.: retículo endoplásmico.

mente unidos que promueven el ensamblaje de estas partículas de *core* para formar la nucleocápside viral (Figura 24.3.6).

Pre-S1, pre-S2 y S. Los antígenos de envoltura del HBV son el producto de la traducción de un amplio ORF que se divide en tres dominios específicos: **pre-S1, pre-S2 y S.** Cada uno de ellos presenta un codón de iniciación de la traducción (ATG) diferente ubicado en fase y un idéntico codón de terminación, obteniéndose así los tres polipéptidos de envoltura pre-S1 (o **L** [*Large*] HBs Ag), pre-S2 (o **M** [*Middle*] HBs Ag) y **S** (*Small*), que tienen en común el dominio S o HBs Ag. Debido a la presencia de estos tres **codones de iniciación (ATG) de la traducción ubicados en fase** es que las tres proteínas de envoltura del HBV son traducidas a partir de RNAm distintos. **La proteína S, de 226 aa, es codificada por el gen S. La proteína pre-S2 (M HBs Ag) está codificada conjuntamente por la región pre-S2 (55 aa) y el gen S (226 aa), mientras que la proteína pre-S1 (L HBs Ag) se encuentra codificada conjuntamente por la región pre-S1 (108-119 aa, dependiendo del subtipo viral), por la región pre-S2 (55 aa) y por el gen S** (Figura 24.3.7). De esta manera, estas tres proteínas comparten el mismo extremo carboxilo-terminal; es decir, todas contienen en dicho extremo al HBs Ag, y por lo tanto pueden ser detectadas con facilidad mediante los inmunoensayos convencionales utilizados para el diagnóstico de la infección con HBV y para su tamizaje en los bancos de sangre.

Diferentes estudios, sugieren que la proteína pre-S1, y posiblemente, pre-S2 y X, están involucradas en el ingreso del virus a los hepatocitos. También se observó que pre-S1, pre-S2 y S participan en la generación y secreción viral, aunque probablemente, pre-S2 no sea esencial para este proceso. La secreción de la proteína S puede ser bloqueada por el polipéptido pre-S1 en forma dosis-dependiente, aunque su mecanismo todavía no ha sido dilucidado. Ello se traduce en la formación de filamentos de más de 1000 nm, constituidos por el polipéptido S, que son atrapados en las cisternas del retículo endoplásmico y que producen las características imágenes en *vidrio esmerilado* observadas en los hepatocitos de los

pacientes con hepatitis B crónica. Recientemente se ha demostrado que mutaciones o deleciones en las regiones promotoras de pre-S1 y pre-S2/S producen la agregación del HBs Ag en el retículo endoplásmico con la consiguiente alteración en la secreción de este antígeno. Éste es uno de los posibles factores responsables de las infecciones ocultas por HBV (véase el ítem 7.3).

Diversos reportes en la literatura demostraron que la proteína pre-S1 desempeña un rol preponderante en la unión del HBV a el/los receptor/es en la célula, estando involucrado en este proceso un epítipo comprendido entre los residuos 21 a 47 de esta proteína. Más aún, mediante estudios de mutagénesis dirigida se pudo determinar que dentro de este epítipo, la secuencia **QLDPAF** (Gln-Leu-Asp-Pro-Ala-Phe) es crucial para la unión del virus a la célula. Variaciones en este epítipo –así como en secuencias adyacentes– tendrían significativas implicancias tanto en el tropismo celular como en la especificidad de especie en la infección por HBV (Figura 24.3.7). Llamativamente, la proteína X contiene en su extremo amino-terminal secuencias análogas al epítipo antes mencionado. Es por esto que se postula la posibilidad de que dicha proteína (incluida en el virión) pueda tener un rol en la adsorción del HBV a la célula hospedadora.

Aproximadamente, el 50% de la proteína S se encuentra en forma glicosilada (gp27) y el 50% restante está sin glicosilar (p24). La forma glicosilada de la proteína S, se caracteriza por poseer una cadena de oligosacáridos con residuos de ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico) *N*-unida a la Asn146 del HBs Ag. La *N*-unión del carbohidrato a la proteína S se produce en esta posición debido a que ese sitio contiene la secuencia adecuada para la glicosilación **Asn-X-Thr/Ser**, donde X es cualquier aminoácido distinto de Cys, Trp, Asp o Glu.

Las otras dos proteínas de envoltura, pre-S1 (L HBs Ag) y pre-S2 (M HBs Ag) también pueden existir en forma glicosilada o no, en la Asn 146 de la región S. El hecho que la Asn 146 se encuentre tanto glicosilada como sin glicosilar, puede deberse a que la proteína S es capaz de adoptar dos estados conformacionales distintos cuando

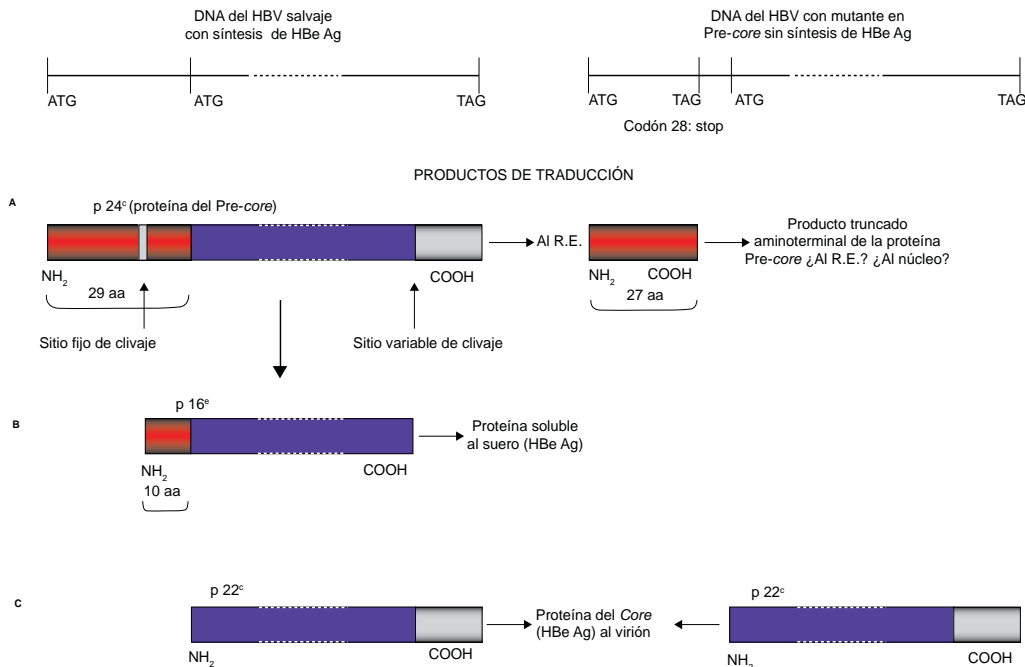


Figura 24.3.4. Origen de las proteínas del pre-core y del core del HBV. Obsérvese que a partir de dos marcos abiertos de lectura ubicados en fase y superpuestos, se sintetizan dos proteínas con regiones idénticas. De la proteína del pre-core (A) deriva por clivaje proteolítico de los extremos amino- y carboxilo-terminal la proteína soluble e (HBe Ag). La presencia de un codón de terminación (STOP) en el triplete 28, impide la síntesis de la proteína del pre-core, y por ende la de su derivado, el HBe Ag. Sin embargo, los virus con dicha mutación (al igual que los que tienen un genoma "salvaje"), pueden sintetizar la proteína del core, ya que ésta comienza en un codón de iniciación ubicado corriente abajo. La extensión nucleotídica y aminoacídica de este ORF no está en escala (línea punteada).

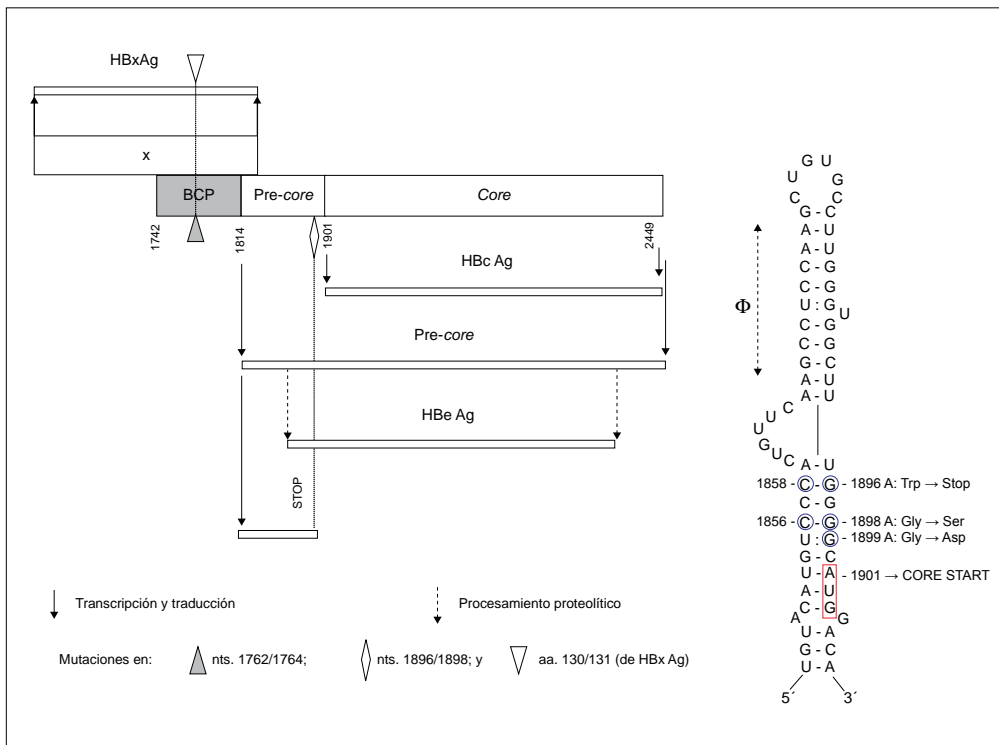


Figura 24.3.5. A la izquierda de la figura se muestra la correlación entre el ORF X y la región superpuesta del promotor basal del core (BCP) y pre-core. Las mutaciones T/A ubicadas en las posiciones 1762 / 1764 del BCP, implican cambios aminoacídicos en los residuos 130 y 131 de la proteína X. **A la derecha de la figura se muestra la estructura secundaria de la señal de encapsidación ε del RNA pregenómico (RNAppg).** La transición G1896A produce un codón de STOP, que impide la síntesis de la proteína pre-core y por ende del HBe Ag. Se indica también la región genómica del DNA del HBV correspondiente al elemento Φ que es complementaria a una porción de la señal de encapsidación ε. Véase replicación viral en el texto.

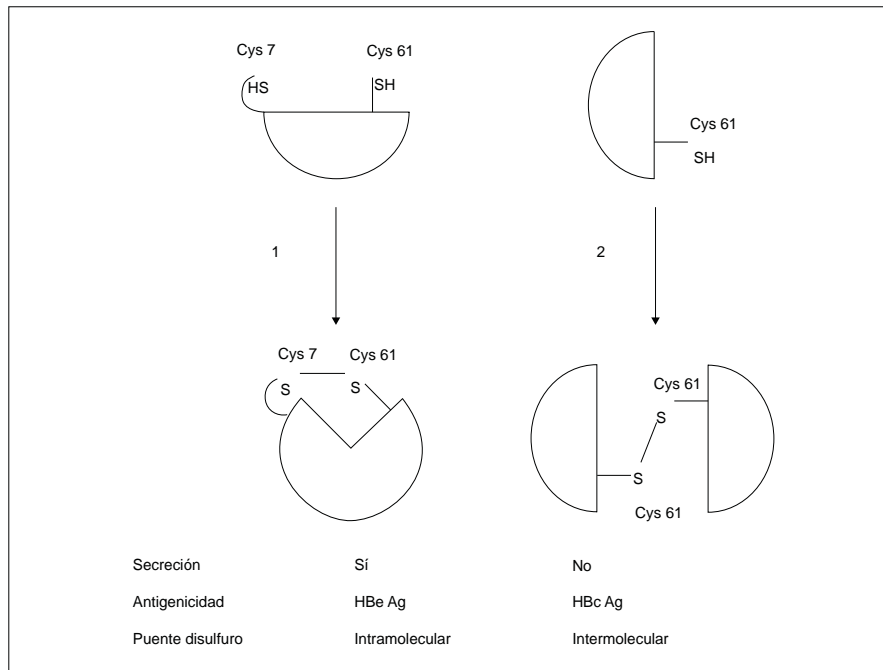


Figura 24.3.6. Influencia de los residuos de cisteína 7 (Cys 7) y 61 (Cys 61) en la secreción de p16E como proteína soluble (1) y no como proteína del core (2), ya que no hay en ésta residuos de cisteína 7 codificada en la región de pre-core.

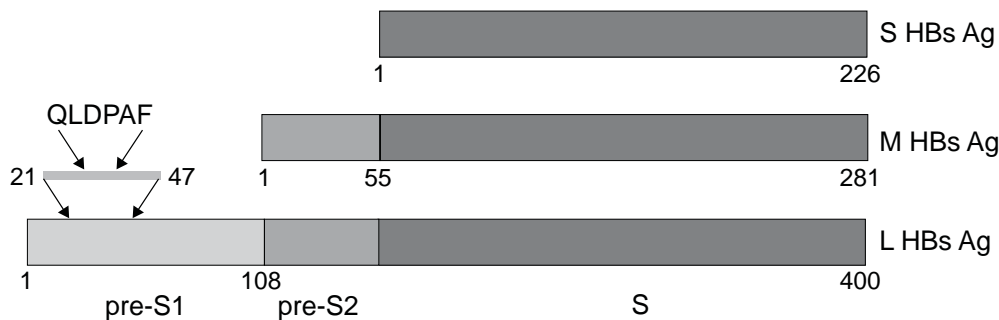


Figura 24.3.7. Correlación existente entre las tres proteínas de envoltura del HBV. Obsérvese que la proteína pequeña o S, exhibe en común la totalidad de su secuencia con las proteínas M y L. Para múltiples autores, los términos S, M y L son indistintamente utilizados como HBs Ag, Pre-S2 y Pre-S1, respectivamente.

se transloca en la membrana del retículo endoplásmico durante su traducción para ser glicosilada. La proteína pre-S2 también se encuentra glicosilada en la Asn 4; es decir, pre-S2 contiene dos sitios de glicosilación en su molécula: a nivel de Asn 4 del dominio pre-S2, y de Asn 146 del dominio S. En cambio la proteína pre-S1 sólo se encuentra glicosilada en Asn 146 del dominio S. Este polipéptido presenta además en su extremo amino-terminal un residuo de ácido mirístico, por poseer en su dominio pre-S1 la secuencia consenso de miristilación: **Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr/Ala**, donde X es cualquier aa. Este residuo de ácido mirístico que se le añade a su molécula en el citosol, es fundamental para la secreción de pre-S1.

El HBs Ag contiene una alta cantidad de puentes disulfuro que estabilizan su estructura secundaria. Posee un **determinante inmunológico principal** (por algunos, también denominado mayor), que es el **determinante α** , ubicado entre los aa 107 a 147, el cual es considerado **el más importante blanco para los anticuerpos neutralizantes anti-HBs**. De esta manera, la antigenicidad del HBs Ag, depende principalmente de este determinante inmunogénico, que se encuentra formando parte de la **región hidrofílica principal (RHP)** que está comprendida –a su vez– entre los aa 100 a 160 del HBs Ag. Esta región altamente inmunogénica se expone

en la superficie de los viriones y de las formas subvirales, y se encuentra sometida a la presión de selección del sistema inmune del hospedador. En esta región, también se hallan los **determinantes menores de subtipo d/y** (en la posición 122), y **w/r** (en la posición 160) que son mutuamente excluyentes entre sí, y que constituyen a los cuatro subtipos antigénicos principales *adw*, *ayw*, *adr* y *ayr*. (Figura 24.3.8 A y B).

Estudios de mutagénesis dirigida demostraron que el reemplazo de G por A en el codón 122 del HBs Ag se traduce en el reemplazo de arginina por lisina y consiguientemente del subtipo *ay* por *ad*. De modo similar, una sustitución de G por A en el codón 160 resulta en el cambio de *aw* por *ar*.

Dado que el HBs Ag es una partícula pleomórfica a la que todavía no se ha logrado cristalizar, su estructura espacial exacta aún se desconoce. Sin embargo, si bien se han postulado varios modelos para explicar su estructura secundaria, la mayoría de los autores concuerda en que el determinante α consiste en dos *loops* (rulo o bucle) conformacionales estabilizados mediante puentes disulfuro establecidos entre residuos de cisteína altamente conservados. Estos puentes disulfuro son importantes para mantener la conformación de dicho determinante inmunológico y –por ende– su antigenicidad. Anticuerpos dirigidos

contra este epítipo conformacional, común a todos los genotipos del HBV, confieren habitualmente protección contra la infección (y/o re-infección) con cualquiera de ellos, aunque se han descrito casos de irrupción del genotipo E en niños inmunizados.

Formas nativas o recombinantes del HBs Ag son el actual sustrato para la elaboración de las vacunas contra la hepatitis B.

Mutaciones dentro y fuera del determinante *a*, e inclusive de la RHP, pueden producir cambios conformacionales que afecten la unión de dichos anticuerpos neutralizantes; tales mutantes se conocen como **mutantes S de escape al sistema inmune**.

Proteína X (HBx Ag). Se encuentra codificada por el marco abierto de lectura X (así denominado porque en un principio no se había identificado al producto de la codificación génica). HBx Ag es un polipéptido de 145-154 aa, con un peso molecular de 16-19 kDa que es expresado durante la infección por HBV y aún en el hepatocarcinoma asociado a este agente viral. Esta proteína puede funcionar como una enzima con actividad de nucleósido difosfato **quinasa**. Es la segunda proteína accesoria de HBV y se encuentra conservada en todos los hepadnavirus de mamíferos (pero no de aves).

El polipéptido X posee propiedades transactivadoras de la transcripción, que regulan positivamente promotores del HBV, de otros virus –como HIV– y del genoma celular, a través de la interacción directa con factores de la transcripción como la subunidad **RPB5** de la RNA-polimerasa II celular, la proteína de unión a TATA (**TBP: TATA Binding Protein**), y **ATF/CREB**. También está involucrada en la activación de las vías de transducción de señales como la cascada **Ras/Raf/MAP quinasa**s. HBx es un polipéptido multifuncional con actividad reguladora que modula la transcripción de genes virales y celulares afectando de forma directa o indirecta, la replicación y proliferación del virus. **También se demostró que altera los puntos de control (checkpoints) del ciclo de división celular, regula la muerte celular y promueve la carcinogénesis**. Estudios realizados con ratones transgénicos permitieron observar que el gen X por sí solo es capaz de inducir en este hospedador experimental lesiones hepáticas carcinomatosas. Se ha observado que debido a su actividad de proteína transactivadora, podría producir alteraciones en la expresión de genes celulares contribuyendo a la transformación celular. **HBx se puede unir al factor supresor de tumores, p53 e inactivarlo**. Asimismo, el polipéptido X transactiva ciertas moléculas de histocompatibilidad de clase II, lo cual contribuiría a la patogénesis de la infección *in vivo*.

Polimerasa viral. El marco abierto de lectura *pol* codifica para una enzima multifuncional de 831 aa y 90kD llamada proteína P, Pol o polimerasa. (Figura 24.3.2) Esta proteína cumple un rol fundamental en la replicación viral, llevando a cabo las siguientes funciones: **1)** encapsidación del RNApp; **2)** iniciación de la síntesis de DNA; **3)** transcripción inversa del RNApp; y **4)** degradación del RNApp debido a su actividad de RNAsa H asociada. También es blanco de las distintas drogas antivirales utilizadas en el tratamiento de la hepatitis B crónica. La estructura de la polimerasa del HBV consiste en cuatro dominios conservados que fueron determinados por analogía con la secuencia de la transcriptasa inversa del HIV. Estos cuatro dominios son: **a)** la **proteína terminal o dominio PT**, que codifica a la proteína terminal que tiene como actividad iniciar la transcripción inversa; **b)** el **brazo espaciador**, cuya función aún se desconoce; **c)** la **transcriptasa inversa/DNA polimerasa-DNA dependiente** donde el motivo altamente conservado **YMDD** (Tyr-Met-Asp-Asp) forma parte del sitio catalítico, y **d)** el dominio con actividad de **RNAsa H** que degrada al RNA (original templado) del híbrido RNA-DNA sintetizado durante la transcripción inversa. Algunas secuencias aminoácidas localizadas dentro de estos dos últimos dominios funcionales de Pol, son altamente conservadas y constituyen epítopos reconocidos por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, los que participan en la eliminación viral y en el desarrollo de formas subclínicas de la infección.

La **proteína terminal (PT)**, se encuentra covalentemente unida al extremo 5' de la cadena L (-) del DNA viral, y actúa como

cebadora de la síntesis de dicha cadena (véase replicación viral). Mutaciones puntuales en el dominio PT producen una incapacidad de la polimerasa del HBV para encapsidar al RNA pg, impidiendo así que el virus continúe con su replicación, mientras que mutaciones puntuales en el dominio del brazo espaciador no modifican la actividad de esta enzima.

La región con actividad de **transcriptasa inversa / DNA polimerasa-DNA dependiente** es un dominio funcional que lleva a cabo la transcripción inversa y la síntesis de la segunda cadena del DNA viral. La actividad enzimática polimerizante le permite sintetizar DNA teniendo como templado tanto DNA como RNA. En este último caso, la síntesis de la primera cadena de DNA a partir del templado de RNApp involucra un paso de transcripción inversa, sin posibilidad de correcciones si hubiere incorporación errónea de bases nucleotídicas. De ahí que la tasa de error asociada a este paso de transcripción inversa durante la replicación del HBV (aproximadamente 2×10^{-4} sustituciones nucleotídicas por sitio por año, dependiendo de la presencia o ausencia del HBe Ag, siendo dicho valor mayor con las cepas e *minus* que no producen dicho antígeno) es cuatro órdenes de magnitud superior a la del resto de los virus a DNA, aunque inferior a la de los virus a RNA.

Algunas de las variantes virales resultantes van a ser seleccionadas positivamente bajo la presión selectiva de fuerzas tales como las ejercidas por el sistema inmune, el tratamiento antiviral, la vacuna anti-HBV y la inmunoglobulina específica para este virus (HBIG). Este mecanismo, está asociado a la variabilidad observada entre los diferentes aislamientos del HBV (*cuasiespecies* y mutantes), aun en un mismo hospedador durante el curso de la infección viral.

Como se definió en el Capítulo 1, se denominan **cuasiespecies virales** a genomas viables sometidos a un proceso de evolución y selección cuyas secuencias nucleotídicas están íntimamente relacionadas entre sí (diferenciadas por pocas mutaciones), las que varían alrededor de una secuencia predominante o *master*.

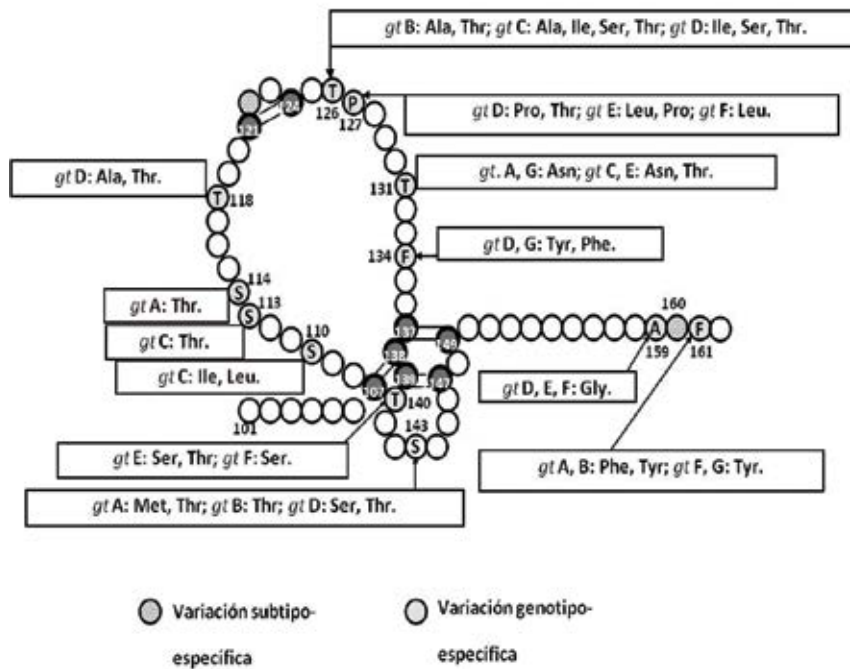
A este dominio con actividad de **transcriptasa inversa / DNA polimerasa-DNA dependiente** se lo puede subdividir a su vez en 7 subdominios, denominados A, B, C, D, E, F y G (Figura 24.3.2). El sitio catalítico se encuentra dentro del subdominio C, y abarca a la secuencia aminoácida **YMDD**, que es un motivo altamente conservado entre los hepadnavirus y los retrovirus. Se cree que este motivo es el sitio de la enzima donde se produce el reconocimiento de los distintos nucleótidos necesarios para llevar a cabo su función en la replicación viral. Las mutantes del HBV resistentes al tratamiento antiviral con análogos de nucleósidos / nucleótidos presentan mutaciones puntuales en los subdominios A, B, C, D o E de la polimerasa viral. Dentro del subdominio C, las mutaciones puntuales en el motivo YMDD, son las más frecuentes y son clínicamente significativas, dado que la mayoría son seleccionadas durante el tratamiento antiviral con análogos de nucleósidos, tales como la lamivudina, contribuyendo así al fracaso terapéutico. Dentro de estas variantes YMDD-resistentes a la lamivudina se han descrito las mutantes YVDD, YIDD, YRDD e YSDD, donde la metionina del codón 552 del motivo YMDD (actualmente denominado rM204; véase el ítem 10) es sustituida por residuos de valina, isoleucina, arginina o serina, respectivamente. Por último, el dominio con actividad de **RNAsa H** de la polimerasa del HBV es otro dominio funcional, que degrada al RNApp.

3. ÚNICO TIPO, MÚLTIPLES SUBTIPOS SEROLÓGICOS, GENOTIPOS Y SUBGENOTIPOS

Todas las cepas del HBV examinadas hasta el presente corresponden a un único serotipo. Ello explica la protección cruzada conferida por una infección pasada por HBV frente a eventuales reinfecciones con cepas diferentes.

Desde el punto de vista antigénico, durante la década de 1980 y parte de la de 1990 era frecuente clasificar al único tipo serológico del HBV en 10 subtipos: *ayw₁*, *ayw₂*, *ayw₃*, *ayw₄*, *ayr*, *adw₂*, *adw₃*, *adw₄*, *adrq⁺* y *adrq⁻*. Estos subtipos están determinados por la

A



B

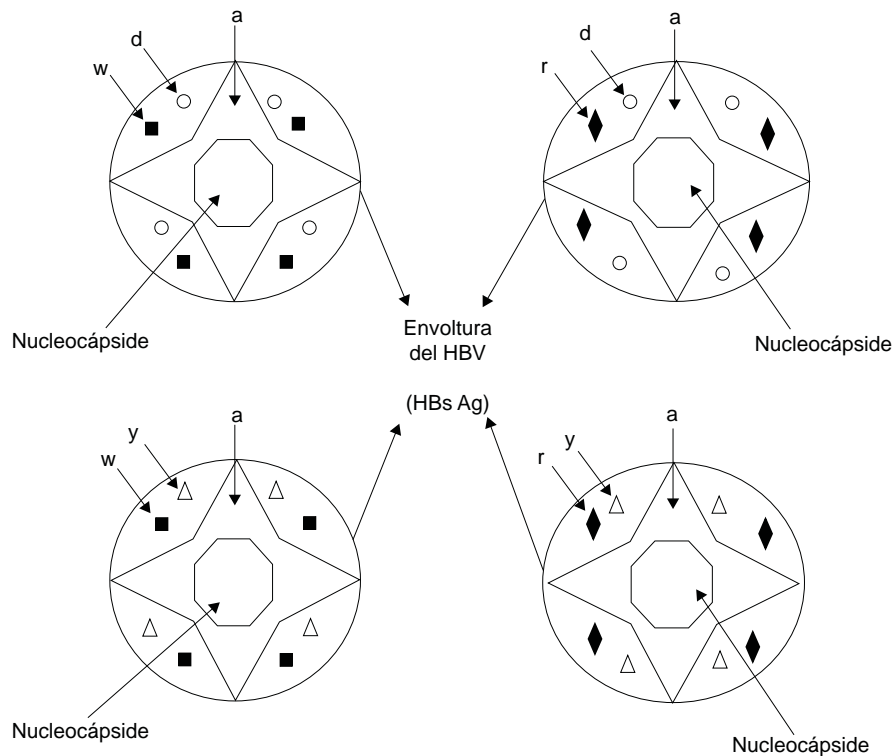


Figura 24.3.8. A. Representación esquemática de la región hidrofílica principal (RHP) en la proteína S (aa 101 a 160). Los círculos negros representan residuos de Cys. Los puentes disulfuro se muestran como barras dobles. Se muestran las variaciones aminoacídicas específicas de genotipo (círculos grises) según Osiowy (Osiowy C., 2006). Los determinantes de subtipo "d/y" y "w/r" son mutuamente excluyentes en las posiciones aminoacídicas 122 y 160. **B. Representación esquemática de los subtipos más frecuentes del HBs Ag: adw, adr, ayw y ayr.**

existencia de residuos aminoácidos característicos en determinadas posiciones específicas del HBs Ag, por lo cual existen subtipos mutuamente excluyentes entre sí (Véase la Tabla 24.3.2 y la Figura 24.3.8 B).

Más recientemente, el análisis de secuencias completas del genoma del HBV, permitió documentar que no existe una relación exclusiva entre determinados subtipos (fenotipo del HBV) y genotipos virales, ya que algunos subtipos están presentes en más de un genotipo. Actualmente, se utiliza la clasificación genotípica del HBV en estudios de epidemiología y patogénesis molecular.

3.1 GENOTIPOS VIRALES

El HBV puede ser clasificado en 9 (o tal vez 10) genotipos, comprendidos entre las letras A y J del alfabeto. Cada genotipo incluye cepas que exhiben entre sí una divergencia intergenotípica mayor al 8% en la secuencia nucleotídica del genoma completo, y/o una divergencia intergenotípica mayor al 4% en la secuencia nucleotídica del gen S. Estos genotipos presentan distinta distribución geográfica: al genotipo **A** se lo encuentra principalmente en el norte de Europa, América del Norte y centro de África; al **B** y al **C** en el sudeste continental asiático y Japón. El genotipo **D**, tiene una distribución universal, aunque predomina en India y en la región del Mediterráneo; mientras que el genotipo **E** se encuentra principalmente en el oeste de África. El genotipo **F**—el de mayor divergencia nucleotídica—prevalece en América Central y del Sur; el **G** en Alemania, EE.UU., Francia y México; el **H** en América Central y el **J** en Japón.

En Argentina, entre los pacientes con hepatitis B crónica, prevalece el genotipo F (más del 60%), seguido de los genotipos A, D, C y B; aunque entre los pacientes coinfectados con HBV y HIV predomina el genotipo A (alrededor del 80%), seguido del D y el F. En Buenos Aires, se reportaron recientemente los dos primeros casos de hepatitis B crónica por genotipo E en América Latina.

El genotipo G se distingue del resto de los genotipos por poseer dos codones de terminación en la región del pre-core, lo cual impide la traducción del polipéptido homónimo, precursor del HBe Ag (Figura 24.3.4). De esta manera, los individuos monoinfectados con este genotipo no van a presentar HBe Ag detectable en suero, aunque el mismo está presente en individuos coinfectados con algún otro genotipo del HBV, que sí lo pueda sintetizar.

3.2 SUBGENOTIPOS, CLUSTERS Y RECOMBINANTES INTERGENOTÍPICAS

Se han identificado para los genotipos A, B, C, D y F múltiples **subgenotipos** (subgrupos dentro un mismo genotipo de HBV con una divergencia intergrupala del 4% al 8%) en la secuencia nucleotídica del genoma completo (Véase la Tabla 24.3.2).

Se denominan **clusters** a las distintas agrupaciones de cepas de HBV asignadas a un mismo subgenotipo que presentan una divergencia filogenética menor al 4% en la secuencia nucleotídica del genoma completo.

Recientemente se han detectado **recombinantes** intergenotípicas, como por ejemplo: **A/B/C**, **A/C**, **A/E**, **A/G**, **C/D**, **C/F** y **C/G**. Los genotipos A y C son los que presentan la mayor tendencia a producir eventos de recombinación. En Argentina se ha detectado y caracterizado -por vez primera en el continente americano- la circulación de una recombinante **D/A**, mediante la secuenciación nucleotídica del genoma completo. Los eventos de recombinación intergenotípica pueden ocurrir cuando dos o más genomas virales de diferentes genotipos infectan una misma célula.

3.3 IMPORTANCIA MÉDICA DE LA DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS DEL HBV

En los últimos años, se han ido acumulando cada vez más evidencias que asocian la evolución del curso natural de la infección, el cuadro clínico inicial y la respuesta al tratamiento antiviral, con el/los genotipo/s del HBV involucrados. El curso de la infección con HBV

también depende de factores del hospedador como el sistema inmune, la edad, el sexo, la coinfección con HCV y/o HIV, la coinfección o sobreinfección con HDV, la obesidad y el alcohol, entre otros.

Se ha postulado que la genotipificación del HBV debería implementarse antes de iniciar la terapéutica antiviral. Datos provenientes de trabajos realizados en el sudeste asiático—donde la infección con HBV es hiperendémica con predominio de los genotipos B y C—demostraron que los pacientes infectados con **genotipo C** denotan un mayor nivel sérico de transaminasas hepáticas y una mayor predisposición a la cronicidad y a los **estadios más avanzados de enfermedad hepática** (fibrosis, cirrosis, hepatocarcinoma), **que los infectados con genotipo B**.

Estudios realizados en la India, en donde predominan los genotipos A y D documentaron que la hepatitis B crónica es más frecuente en pacientes infectados con genotipo A que con el D. Sin embargo, se observó que los pacientes crónicamente infectados con genotipo A presentan un mejor pronóstico que aquellos infectados con el genotipo D, ya que estos últimos **exhiben una enfermedad hepática más activa y avanzada cirrosis**, aunque la asociación con el carcinoma hepatocelular (HCC) es aún controversial. Un análisis efectuado en España a un grupo de pacientes infectados con el genotipo F del HBV asoció a este genotipo con una mayor tasa de mortalidad. Otro estudio realizado con **esquimales de Alaska** también demostró que el **genotipo F** prevalece entre los pacientes con HCC comparado con aquellos sin HCC (68% *versus* 18%, respectivamente). Además, se observó que en pacientes infectados con dicho genotipo, el tiempo promedio requerido para el desarrollo del HCC es menor que para los otros (22,5 vs 60 años al cabo del diagnóstico inicial de infección por HBV, respectivamente).

La edad de seroconversión a anti-HBe también varía entre las infecciones producidas por distintos genotipos: con el E, la seroconversión ocurre a edades más tempranas; con B y C a edades más avanzadas; y con A y D a edades intermedias. Diferentes estudios han demostrado también que la seroconversión de HBe Ag a anti-HBe puede asociarse a un cambio (*switch*) en el genotipo viral. Así, por ejemplo se han reportado casos en los que después de la seroconversión a anti-HBe, el genotipo A fue desplazado por el D, y viceversa. La causa de estos cambios genotípicos en un mismo individuo no se conoce. Algunos autores postulan que puede deberse a que inicialmente el individuo se coinfecta con dos genotipos diferentes y que durante la seroconversión, existe una selección genotípica por parte del sistema inmune. Los pacientes con hepatitis B crónica infectados con genotipo G muestran elevados niveles séricos de DNA viral, de HBe Ag y de transaminasas hepáticas. Sin embargo, esto podría estar asociado a la muy frecuente coinfección del genotipo G con el A.

Con respecto a la respuesta al tratamiento antiviral, sólo se obtuvieron resultados concluyentes en la terapia con el interferón- α (IFN- α). Se observó que los pacientes infectados con genotipo A o B responden mejor a dicha terapéutica antiviral que los infectados con los genotipos C o D.

4. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN POR HBV

4.1 ADSORCIÓN A LA MEMBRANA Y PENETRACIÓN

La característica de los hepadnavirus es infectar principalmente al hepatocito. El mecanismo de la entrada del virus a la célula hepática es desconocido, aunque se han postulado varios potenciales receptores / correceptores. Se postula que el reconocimiento inicial de la infección por HBV podría estar mediado por **receptores Toll-símil** (TLRs) expresados en los hepatocitos.

Parecería que un(os) dominio(s) del polipéptido **pre-S1** interactúa(n) con un receptor celular, cuya naturaleza aún no ha sido dilucidada definitivamente. De hecho, estudios recientes proponen que el HBV se une a los hepatocitos a través de un dominio principal de la porción pre-S1 (aa 41 a 47) de su antígeno de envoltura con receptores celulares. Existiría también un

Genotipos del HBV	Subgenotipos	Subtipos del HBs Ag	Distribución geográfica principal
A	A1 A2 A3	<i>adw</i> ₂ <i>ayw</i> ₁ <i>adw</i> ₂ <i>ayw</i> ₁	- África, India, Japón - Sudáfrica, Malawi, Filipinas - Europa, América del Norte - Camerún, Gabón
B	B1 B2 B3 B4	<i>adw</i> ₂ <i>adw</i> ₂ <i>adw</i> ₃ <i>adw</i> ₂ <i>ayw</i> ₁	- Japón - China, Taiwan, Hong Kong, Vietman - Tailandia - Indonesia, Polinesia, Hawaii - Vietman, Francia
C	C1 C2 C3 C4	<i>adr</i> <i>ayr</i> <i>adw</i> ₂ <i>adr</i> <i>ayr</i> <i>adrq</i> <i>adw</i> ₂ <i>ayw</i> ₃	- China, Corea, Japón, Tailandia, Laos, Malasia, Bangladesh - Vietman, Corea, Japón, Alaska - Japón, China, Vietman, Indonesia, Tibet - China, Corea, Japón, Tailandia, Laos, Costa Rica, Francia - Vietman, Corea, Japón, Alaska - Oceanía, Hawaii, Nueva Zelanda, Japón - Japón, China, Vietman, Indonesia, Tibet - Noreste de Australia (comunidades originarias)
D	D1 D2 D3 D4	<i>ayw</i> ₂ <i>ayw</i> ₃ <i>ayw</i> ₄ <i>adw</i> ₃ <i>ayw</i> ₂ <i>ayw</i> ₃ <i>ayw</i> ₂	- Región del Mediterráneo, Medio Oriente, India, Europa del Este - India, Japón - África Central y Occidental, EE.UU. - Suecia, España - Sudáfrica, Alaska - Europa, EE.UU. - Oceanía, Somalia
E	-	<i>ayw</i> ₄	- África, Argentina*
F	F1 F2	<i>adw</i> _{4q} ; <i>ayw</i> ₄ <i>adw</i> _{4q} ; <i>ayw</i> ₄	- América Central, Alaska - Sudamérica, Polinesia
G	-	<i>adw</i> ₂	- Francia, EE.UU., México
H	-	<i>adw</i> ₄	- Nicaragua, México, EE.UU.

Tabla 24.3.2. Relación entre genotipos y subgenotipos del HBV con los subtipos de HBs Ag y su respectiva distribución geográfica. *Hasta la fecha se han documentado sólo tres casos.

dominio auxiliar de unión a la célula en la porción **pre-S2** (aa 120 a 145). Por otra parte también el **receptor para transferrina** podría desempeñar un papel en la unión entre el virus y la célula, ya que esta molécula permite la interacción HBV-linfocito T, a través del antígeno pre-S2 viral. Estudios *in vitro* también demostraron la unión del HBV a **células que expresan el receptor para IL-6** sobre su superficie, ya que poseen sitios de reconocimiento para pre-S2. Mediante ensayos de *binding* se pudo determinar la interacción del epítipo **QLDPAF** en la proteína **pre-S1** (Figura 24.3.7) con una proteína de la membrana plasmática de 44 kDa denominada "**HBV-binding protein**" (HBV-BP). Esta HBV-BP es un inhibidor de las serinproteasas y miembro de la familia de las ovoalbúminas. Diferentes estudios sugieren que esta proteína celular desempeña un rol preponderante en la infección por HBV. En los últimos 10 años se han postulado a otras proteínas solubles y celulares como posibles receptores para la entrada de HBV a las células del hospedador, incluyendo a los receptores para la inmunoglobulina A, asialoglicoproteína, apolipoproteína H y anexina V. Recientemente, se han obtenido evidencias de que las proteínas de membrana plasmática **anexina V** (endonexina II) y **apolipoproteína H** podrían actuar como receptores potenciales para el virus, a través de una interacción con los lípidos –y no las proteínas– de la envoltura viral.

También se sugirió que el HBV puede infectar *in vivo* numerosas células en sitios **extrahepáticos** como páncreas, epitelio ductal, piel, riñón, leucocitos de sangre periférica, células de la médula ósea y neuronas.

Se desconoce si las infecciones extrahepáticas por hepadnavi-

rus, especialmente en linfocitos, ocurren utilizando el mismo mecanismo de ingreso que en el hepatocito.

Luego de la entrada en la célula y de la posterior decapsidación, el DNA circular laxo (abierto) es transferido al núcleo celular. En este momento de la infección, el virus puede seguir uno de los tres caminos siguientes: a) replicar y ser transcrito; b) persistir en estado latente; o bien ocasionalmente c) integrarse al genoma de la propia célula hospedadora.

4.2 INFECCIÓN PRODUCTIVA

Es éste tal vez el aspecto más deslumbrante de toda la biología molecular del HBV. Todos los hepadnavirus, incluyendo al HBV, replican a través de un intermediario pregenómico a RNA, denominado RNAg, lo cual implica una etapa de transcripción inversa (por un mecanismo diferente al empleado por los retrovirus).

Después de producirse la entrada de los viriones a los hepatocitos, mediante la interacción con un receptor de naturaleza aún no definitivamente establecida, las nucleocápsides transportan al genoma viral hacia el núcleo celular, donde el DNA del HBV que es circular, laxo y parcialmente bicatenario es convertido en circular covalentemente cerrado (DNA_{ccc}). Se observó que **los hepatocitos infectados contienen 50 copias o más de DNA_{ccc}, probablemente en forma de minicromosomas que contienen histonas**. Este DNA_{ccc} funciona como templado para la transcripción de cuatro RNAs virales: el de 0,7 kb (X); el de 2,1 kb (pre-S2/S); el de 2,4 kb (pre-S1) y el de 3,5 kb (pre-core/core), que son exportados al citoplasma celular donde actúan como RNAm para la traduc-

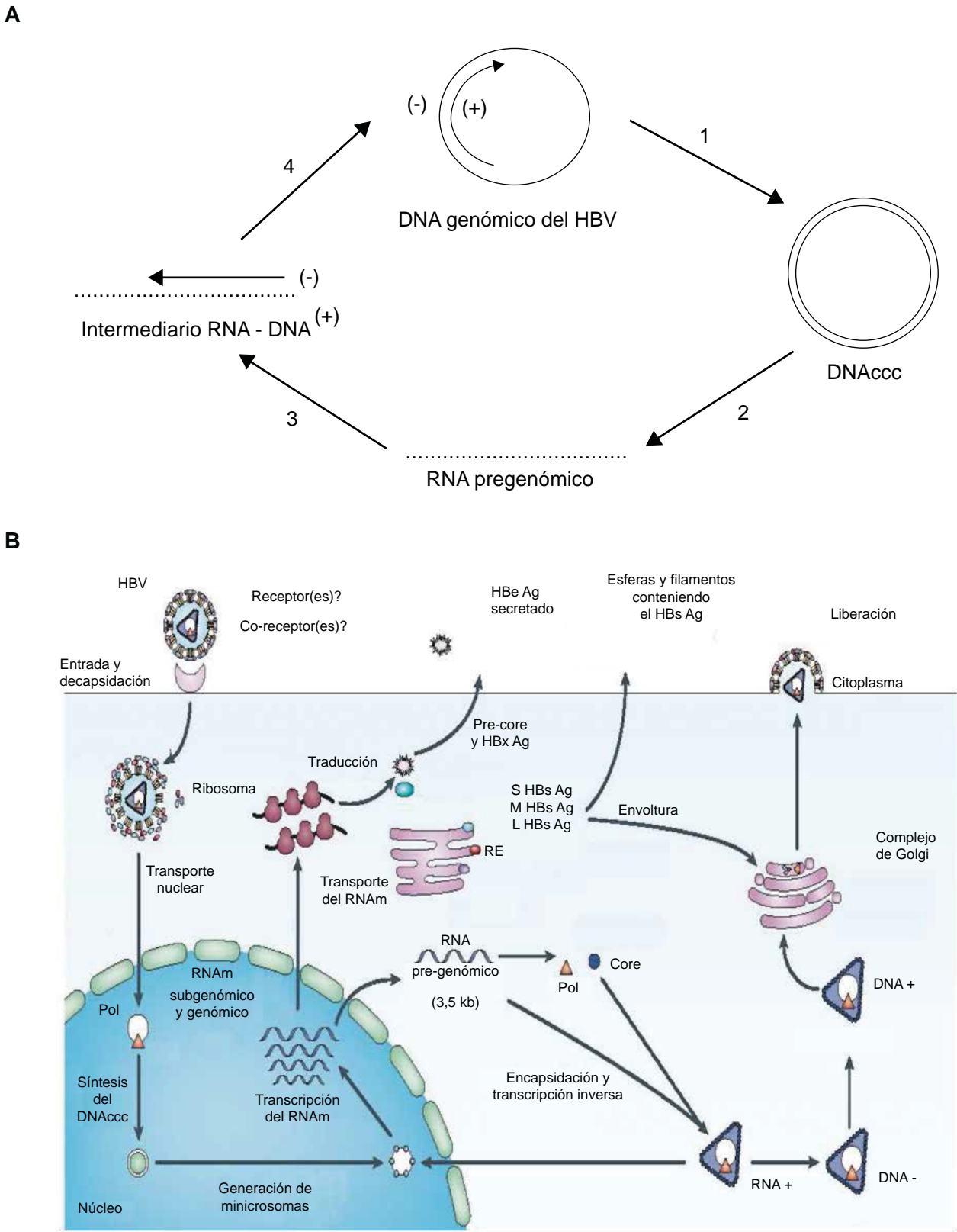


Figura 24.3.9. A. Esquema simplificado de la replicación genómica del HBV: 1. conversión del DNA circular laxo parcialmente doble cadena (DNApdc) del HBV en DNA circular cerrado covalentemente (DNAccc); 2. transcripción del DNAccc para generar el RNA pregenómico (RNAppg); 3. síntesis de la cadena L (-) por la enzima transcriptasa inversa viral; 4. síntesis de la cadena S (+) para producir DNA genómico maduro. **B. Esquema de la replicación del HBV en los diversos compartimentos celulares** (Adaptado de Rehmann & Nascimbeni; *Nat Rev Immunol* 5: 215-29,2005; con permiso de Nature Publishing Group).

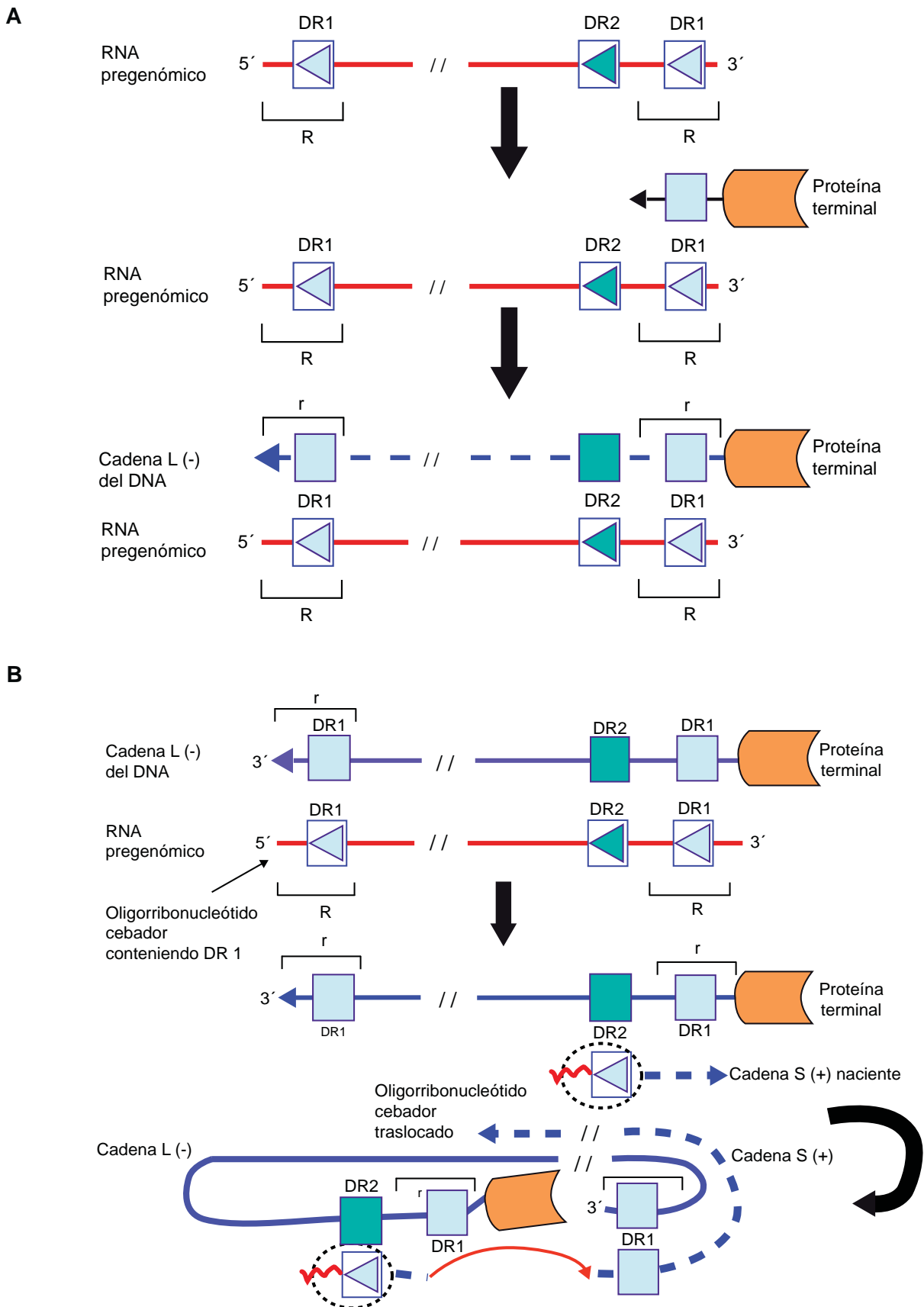


Figura 24.3.10. A. Síntesis de la cadena L (-) del DNA del HBV. Los rectángulos que contienen flechas indican las secuencias DR en el RNA pregenómico (RNAPg). Los rectángulos totalmente coloreados representan las copias (complementarias) de DNA correspondientes a las secuencias DR. **B.** Síntesis de la cadena S (+) del DNA del HBV. (Modificado de Ganem D y Varnus H; *Ann Rev Biochem*, 1987).

ción de las proteínas virales correspondientes. El RNA de mayor longitud (RNAPg), sirve tanto como templado para la traducción de las proteínas *core* y Pol, como para la replicación del virus. Este último proceso se lleva a cabo en el interior de las nucleocápsides presentes en el citoplasma. Las nucleocápsides así maduras adquieren la envoltura con sus glicoproteínas de superficie ancladas, durante su pasaje por el retículo endoplásmico y/o el aparato de Golgi, para ser después secretadas desde la célula como progenie viral. Este hecho es privativo de la familia *Hepadnaviridae*, ya que en casi todos los otros virus envueltos –excepto los que adquieren la envoltura en la membrana nuclear, como los miembros de la familia *Herpesviridae*– las glicoproteínas de superficie permanecen ancladas sobre la membrana plasmática de la célula hospedera infectada, a la espera de interactuar con las proteínas de la matriz o de la nucleocápside.

Sintéticamente, la replicación viral comprende cuatro pasos (Figuras 24.3.9A y B; y 24.3.10A y B): **1)** conversión del DNA circular, laxo y parcialmente bicatenario presente en el interior de la nucleocápside viral, en DNAccc en el núcleo del hepatocito; **2)** transcripción de este DNAccc por la RNA-polimerasa II celular para generar los distintos RNA mensajeros virales y el RNAPg, que servirá como templado para la transcripción inversa; **3)** síntesis de la cadena L (-) del DNA genómico; **4)** síntesis de la cadena S (+) del genoma viral. La vida media del DNA viral en el suero es de 1-2 días, produciéndose aproximadamente 10^{11} - 10^{12} viriones por día.

1) Síntesis del DNAccc. Es inducida por factores no totalmente identificados al ingresar el virus a la célula. En este proceso intervienen enzimas celulares reparadoras de DNA, tales como la topoisomerasa I y II. Diversos procesos bioquímicos son requeridos para la circularización covalente del DNA circular, laxo, parcialmente bicatenario: **a)** reparación de las cadenas de DNA; **b)** remoción de los cebadores: la proteína terminal unida al extremo 5' de la cadena L (-) es degradada por una proteasa y el oligorribonucleótido de 18 bases unido al extremo 5' de la cadena S (+) es eliminado por una RNAsa; **c)** eliminación de una secuencia corta terminal redundante "r", de 10 nucleótidos, de la cadena L (-) por una DNAsa; y **d)** cohesión de los extremos de las cadenas de DNA por una ligasa. Estas moléculas de DNA viral adquieren características tipo cromatina por la acción de proteínas histónicas y no histónicas celulares para formar los **minicromosomas**. Esta molécula de DNAccc sirve de templado transcripcional para la síntesis del RNAPg y de los RNAm virales por la RNA polimerasa II celular (que es la enzima responsable de la síntesis de los RNAm celulares). Estos mensajeros virales que son luego transportados al citoplasma donde serán traducidos se encuentran, –al igual que el RNAPg, poliadenilados en el extremo 3'– y presentan un capuchón (7-metil guanosina) en el 5'. Los hepadnavirus se caracterizan por presentar una "vía de conversión intracelular" en la que las nucleocápsides recién sintetizadas, más que adquirir la envoltura viral para ser secretadas, son dirigidas nuevamente hacia el núcleo celular para incrementar el *pool* de DNAccc.

2) Síntesis del RNAPg. Utilizando como templado a la cadena L (-) del DNAccc, la RNA-polimerasa II celular sintetiza un transcritop de 3,5 kb denominado **RNAPg**; proceso que está regulado por el promotor del *core*. Este transcritop, que termina en el único sitio de poliadenilación ubicado en el marco abierto de lectura de la nucleocápside (Figura 24.3.3), comprende a la **secuencia del genoma viral completo más una terminal redundante** denominada **R**, presente tanto en su extremo 3' como en el 5' (Figuras 24.3.3, 24.3.10.A y B). Esta terminal R, consiste en una secuencia de 120 nucleótidos que contiene una segunda copia del DR1 y de la señal de encapsidación ϵ (que tiene una estructura en horquilla; Figura 24.3.5), más un tracto de poli-A. Esta secuencia redundante es debida a que la enzima inicia la transcripción cerca del comienzo del marco abierto de lectura del *pre-core/core*, prosigue (en sentido horario en el esquema de la Figura 24.3.3) a través de las señales de clivaje y adenilación durante la primera recorrida del templado, ignorando esas señales, y finaliza en la segunda vuelta al arribar nuevamente a la señal de poliadenilación. El RNAPg se origina inmediatamente después del

primer codón de iniciación ATG del marco abierto de lectura de la nucleocápside. Es posteriormente transferido al citoplasma, donde va a ser traducido a los polipéptidos *core* y Pol (Figura 24.3.9B); éste al asociarse con el complejo proteico de estrés térmico que incluye Hsp-90 (*Heat shock protein*) y las 4 co-chaperonas Hsp70, Hop, Hsp40 y p23 forma un complejo de inicio de replicación que –con gasto de energía– activa Pol transitoriamente (denominada P*). De esta manera, se produce la encapsidación del RNAPg con la enzima Pol unida a la región genómica ϵ (letra "epsilon" del alfabeto griego) del extremo 5' de dicho transcritop.

3) Síntesis de la cadena L (-). Dentro de las nucleocápsides se produce la transcripción inversa. La región ϵ también interviene en la activación de la Pol para iniciar la síntesis del DNA del HBV mediante el proceso de transcripción inversa. Se inicia con una reacción en la que la Tyr-63 del dominio PT de Pol se une covalentemente a un determinado nucleótido del ϵ del RNAPg. Aún se desconoce si esta reacción ocurre antes o inmediatamente después de la encapsidación. Producida la síntesis de los tres primeros nucleótidos (5' G-A-A \rightarrow 3'), la polimerasa viral y dicho oligonucleótido al que está covalentemente unida, son translocados desde la región ϵ a una región complementaria de 3 ó 4 nucleótidos del DR1 presente en la secuencia redundante R del extremo 3' del RNA pg (Figuras 24.3.3 y 24.3.10A). Este proceso de translocación se encuentra facilitado merced a dos elementos presentes en el DNA: una región Phi (Φ) localizada corriente arriba de la región DR1, que contiene la secuencia complementaria de la porción superior izquierda del asa de ϵ (Figura 24.3.5) y una región contigua y parcialmente superpuesta a DR1 denominada Omega (ω). ϵ , Φ y ω interactúan entre sí, lo que favorece la translocación del oligonucleótido de DNA. Después de producida la misma, la síntesis de la cadena L (-) continúa, degradándose simultáneamente el templado de RNAPg mediante la actividad del dominio RNAsa H de la Pol, y dejando sin clivar unos 11-16 nucleótidos del extremo 5' de dicho RNAPg. La síntesis de la cadena L (-) finaliza con la lectura del extremo 5' de ese RNAPg, y contiene una terminal redundante "r" de 10 bases de longitud aproximadamente. Posteriormente, la secuencia remanente del RNAPg, que comprende en su extremo 3' el oligorribonucleótido de 11 nt poliadenilado que contiene la secuencia DR1, es translocado a un sitio homólogo dentro de la cadena L (-): el DR2. Este oligorribonucleótido va a actuar después como cebador para la síntesis de la cadena S (+) del DNA viral.

4) Síntesis de la cadena S (+). La cadena L (-) neosintetizada sirve de templado para la síntesis de la cadena S (+). Como se explicó anteriormente, un oligorribonucleótido proveniente del RNAPg es translocado a la región DR2 de la cadena L (-), produciéndose un apareamiento de bases (Figura 24.3.10B). Este oligorribonucleótido actúa como cebador para la síntesis de la cadena S (+). Esta cadena se elonga sin interrupción hasta que la polimerasa viral alcanza el extremo 5' de la cadena L (-). En este punto, Pol se va a translocar desde el extremo 5' al 3' de la cadena L (-), formándose así una molécula de DNA circular, laxa, parcialmente bicatenaria. La síntesis de la cadena S (+) es habitualmente incompleta con relación a su templado L (-), desconociéndose las razones de ello. Algunos autores proponen que podría deberse a una restricción espacial del lumen de la nucleocápside viral, previniendo así que se complete la síntesis de dicha cadena S (+). Desde este punto de vista, una mayor elongación de esa cadena luego de la infección de nuevas células, desestabilizaría la nucleocápside, produciéndose así el desnudamiento del genoma viral.

Finalmente, las nucleocápsides maduras y los viriones contienen al DNA genómico del HBV de 3.2 kb covalentemente unido a Pol. Estas nucleocápsides maduras pueden seguir dos vías: retornar al núcleo para originar nuevo DNAccc y reproducir el ciclo o bien adquirir la envoltura viral con los antígenos de superficie y ser liberadas desde las células como viriones, formando las partículas de Dane (Figura 24.3.9B). Después de múltiples ciclos –en la infección crónica– el DNA viral puede integrarse al genoma celular.

4.3 INFECCIÓN LATENTE

Cierta proporción de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con hepatitis B persistente (aquellos que presentan serología positiva para HBs Ag –o antigenemia HBs– por un período mayor a 6 meses) posee formas monoméricas o multiméricas del DNA viral. Los estudios de separación celular sugieren que dicho DNA está presente en linfocitos B (LB), monocitos, células linfoblásticas de la médula ósea y leucocitos polimorfonucleares.

4.4 INTEGRACIÓN VIRAL

En algunos pacientes con hepatitis B crónica y –habitualmente– en aquellos con hepatocarcinoma, el DNA del HBV se integra en sus hepatocitos. El DNA integrado es siempre de tamaño subgenómico; puede ser colineal o invertido, y contiene numerosos reordenamientos, incluyendo deleciones y duplicaciones.

Conforme con la estructura física y el grado de metilación de las secuencias integradas, se obtienen diversas expresiones proteicas: HBs Ag; Hbc Ag; Hbx Ag o productos de la polimerasa.

La integración parece ser mayoritariamente un evento al azar que ocurre en diversos cromosomas celulares, siendo las secuencias cercanas al **DR1** y **DR2** del genoma viral las que aparecen con mayor frecuencia integradas, lo cual sugiere que la integración de estas regiones no sería un hecho casual.

Mediante técnicas de PCR se pudo confirmar que la inserción del HBV en genes celulares es un evento frecuente que ocurre en los estadios tempranos de la infección por HBV, aun en el curso de una hepatitis aguda autolimitada. Este evento puede ocurrir tanto en **genes reguladores de las cascadas de transducción de señales intracelulares**, como en aquellos que controlan la **proliferación y viabilidad celular**. Se ha demostrado la integración del genoma del HBV en los genes que codifican para la **ciclina A**, el **receptor beta del ácido retinoico** y la **mevalonato quinasa**, entre otros. Recientemente se ha documentado que el **gen de la telomerasa** es blanco de la mutagénesis insercional llevada a cabo por HBV en el hepatocarcinoma. Este último evento es de especial relevancia teniendo en cuenta la participación de la ribonucleoproteína telomerasa en el proceso de immortalización celular, etapa inicial necesaria para la transformación.

El análisis genético de muchos hepatocarcinomas revela extensos reordenamientos de las secuencias virales integradas y de aquellas del genoma celular que las flanquean. Es probable que la estimulación producida por el HBV conduzca a un estado de injuria persistente que estimule la regeneración del hepatocito, la que podría de algún modo favorecer la acumulación de mutaciones del genoma celular, algunas de las cuales podrían ser transformantes y por ende producir un cambio fenotípico maligno.

5. ANTÍGENOS VIRALES Y RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR

5.1 RESPUESTA INMUNE INNATA

El rol de esta respuesta en el control de la infección es motivo de intensa investigación y debate científico. Dado que no se dispone de datos suficientes acerca de la etapa inicial de la infección de seres humanos, algunos de los mecanismos mencionados a continuación fueron conocidos a partir de estudios en modelos experimentales con ratones transgénicos y subsiguientemente otros –en cierta medida contrapuestos– en primates.

Los estudios en chimpancés experimentalmente infectados con HBV revelaron que este virus permanece relativamente invisible desde el momento de la infección hasta la aparición de la respuesta adaptativa, dado que estudios seriados de microarreglos (*microarrays*) de DNA en biopsias hepáticas no demostraron la expresión de genes de la respuesta innata. Ello podría estar vinculado a la localización de sus transcritos de RNA en el núcleo, cuya estructura es semejante a la de los RNAm celulares (con capuchón y poliadenilados) y al secuestro del genoma replicativo viral dentro de

las nucleocápsides. Todo ello contribuiría a una relativa ausencia de inducción de IFN- α /- β , lo que facilitaría la diseminación inicial no-citopática del HBV en los hepatocitos.

Sin embargo, la participación de la respuesta innata en el control de la infección no debería ser totalmente descartada, ya que la expresión génica podría ocurrir por debajo del umbral de detección de la técnica de microarreglos de DNA.

Más aún, en los ratones transgénicos que exhiben copias "cromosómicas" del DNA del HBV y que son competentes para su replicación, la respuesta innata puede controlar la replicación viral en las etapas tempranas, inclusive antes de la detección de infiltrados de células inflamatorias o cualquier tipo de daño hepático. Una importante limitación de este modelo es la ausencia de DNAcc episomal, templado transcripcional del HBV en la infección natural de pacientes. La administración experimental de ligandos específicos para los TLR-3, -4, -5, -7 y -9 inhibe la replicación del HBV en un modo **IFN- α / - β dosis-dependiente**. La producción de IFN- α / - β en la infección por HBV produce: **a)** la reducción a un décimo del número de cápsides virales conteniendo el RNAPg; **b)** la activación de la **PKR** con la consiguiente inhibición de la síntesis de proteínas virales; y **c)** el reclutamiento y la activación de las **células presentadoras de Ag (CPA)** –en especial células de **Küpferr**–, de Ito y dendríticas (CD). **El principal efecto del IFN- α e IFN- β contra el HBV es mediado por el proteasoma**. Las CPA –a su vez– producen **IL-18** y la **quimioquina CCL3**, induciendo la actividad de las células **NK** y **NKT**. Esta última estirpe celular inhibe directamente la replicación del HBV mediante la producción de **INF- γ** . **Las dos subpoblaciones de NK (CD16^{bright} CD56^{dim} y CD16^{dim} CD56^{bright}) participan en la inmunovigilancia a través de la producción de mecanismos citotóxicos pro-apoptóticos y mediante la síntesis de IFN- γ** , respectivamente. Por otra parte, las **células de Küpferr** coordinan el reclutamiento y maduración de los **linfocitos T (LT) específicos** a través de la síntesis de diferentes citoquinas y quimioquinas como **IFN- γ** , **CXCL9** y **CXCL10**. Si bien las **células NK** y **NKT** pueden participar directamente (mediante la lisis celular) o indirectamente (mediante la producción de citoquinas y quimioquinas antivirales, reclutando células pro-inflamatorias y modulando la respuesta adaptativa) en eventos de patogénesis, **los datos experimentales obtenidos en primates sugieren que no contribuirían significativamente al control de la viremia ni a la patogénesis de la infección en el hígado humano infectado por HBV**.

5.2 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

Se ha demostrado que las proteínas constitutivas del antígeno del *core* y de los antígenos de envoltura (pre-S1, pre-S2 y S) contienen epítopes que son reconocidos por los anticuerpos y otros que –algunas veces superponiéndose– son reconocidos por los LT. Estos linfocitos T también reconocen epítopes de las proteínas X y Pol.

Los antígenos de la envoltura viral son T-dependientes. Ello implica que para que se produzca la síntesis de los correspondientes anticuerpos, debe existir un linfocito T capaz de reconocerlos y responder ante ellos, emitiendo una señal estimuladora para el LB.

Para que ocurra el reconocimiento de la célula T son necesarios los siguientes requisitos: **1)** el antígeno en cuestión debe exhibir determinantes T-dependientes; **2)** el antígeno debe ser procesado correctamente por la CPA (célula dendrítica, macrófago o linfocito B o células de Ito); **3)** las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) deben unirse adecuadamente dentro de la célula al epítope T-dependiente y este complejo debe ser apropiadamente expuesto en la superficie de la CPA; y **4)** el LT debe poseer el receptor de reconocimiento para el complejo formado por moléculas del CMH / epítope T-dependiente. Si todos estos factores están presentes, el LT activado producirá una señal inductora sobre el LB específico para ese antígeno, que sólo entonces reconocerá los determinantes B conformacionales sobre la superficie de la proteína nativa (no sobre el antígeno procesado) a través de sus inmunoglobulinas de superficie que actúan como receptores.

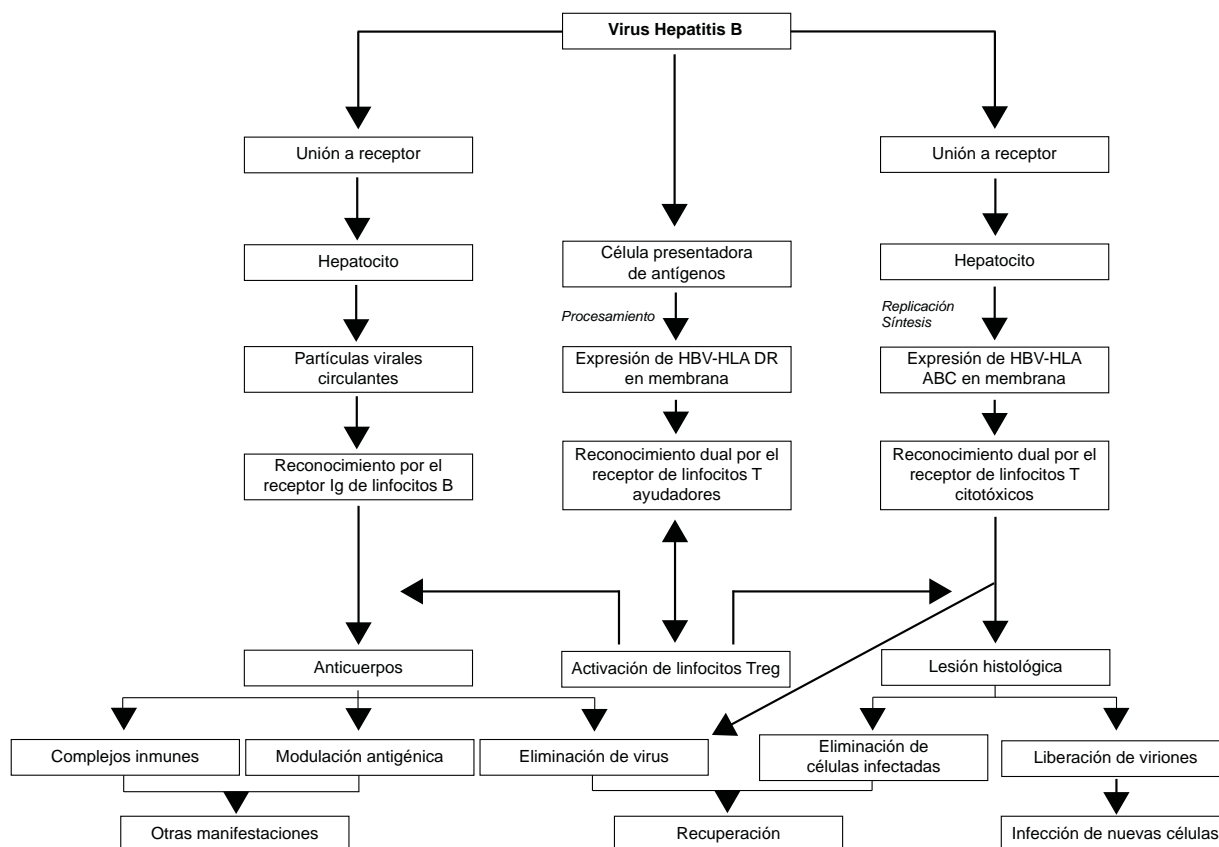


Figura 24.3.11. Modelo hipotético de la patogénesis de la eliminación viral y de la injuria hepatocelular en la infección con virus de la hepatitis B.

Si bien los anticuerpos neutralizantes anti-HBs son sintetizados tempranamente en la infección, no son detectables como anticuerpos libres durante los primeros 3 – 6 meses debido a que forman inmunocomplejos con el HBs Ag producido en exceso durante la replicación viral. Por el contrario, los anticuerpos anti-HBc son detectados tempranamente en la infección debido a que el antígeno hacia el cual están dirigidos se encuentra dentro de la partícula viral, impidiéndose así la formación de complejos inmunes.

Teniendo en cuenta que esta respuesta está restringida por las moléculas del CMH, el nivel de anticuerpos dirigidos contra cada uno de los tres antígenos de la envoltura viral es regulado independientemente por los LT y es variable según el fenotipo del CMH de cada individuo. De esta manera, un individuo vacunado con HBs Ag puede no responder a dicho estímulo debido a la ausencia de moléculas del CMH requeridas para el reconocimiento de este antígeno por la célula T. Sin embargo, este mismo individuo podría desarrollar una respuesta adecuada contra el HBs Ag, si se lo inocula junto con antígenos de la región pre-S. Ello se debe a dos factores: 1) el reconocimiento independiente de las regiones pre-S1, pre-S2 y S por las moléculas del CMH de los linfocitos T; y 2) el efecto colaborador de la región pre-S sobre el proceso de formación de anticuerpos no sólo dirigidos contra los determinantes exclusivos de esa región, sino también contra los de la región S. Es por ello que algunos laboratorios están preparando, mediante técnicas de DNA recombinante, vacunas contra HBV que, además de contener como inmunógeno a moléculas de HBs Ag, contienen antígenos pre-S, con el objeto de disminuir la población de individuos que no responden a la inmunización (alrededor de un 5-10% de adultos jóvenes inmunocompetentes).

También el HBe Ag es T-dependiente. Por el contrario, el HBc Ag se comporta de manera diferente: posee características de epítipo

T-dependiente y T-independiente. Debido a esta última propiedad es que un antígeno determinado puede unirse a las Igs de superficie que poseen los LB como receptores e inducir la síntesis de los anticuerpos específicos correspondientes, sin la colaboración de los LT. A su vez, la respuesta T-dependiente hacia este antígeno es enérgica. Ambos factores contribuyen a que la respuesta contra el HBc Ag sea 100 veces superior a la dirigida contra el HBs Ag, tanto a nivel de LB como de LT. Además, se ha observado un efecto colaborador de los LT específicos para el HBc Ag con los LB específicos para el HBs Ag. Ello se debería a que estos LB -que se unen al virión a través de sus receptores para los antígenos S o pre-S- pueden actuar como CPA. Por este mecanismo, dichas CPA pueden presentar determinantes T-dependientes del HBc Ag. Por ende, al producirse el reconocimiento dual (molécula de clase II del CMH-epítipo del HBc Ag en la superficie del LB) por los LT específicos para el HBc Ag, se genera la señal inductora también para estos LB que sintetizan anticuerpos contra la envoltura viral (anti-HBs / anti-pre-S). Estas observaciones han sugerido la utilización potencial de determinantes del HBc Ag en futuras vacunas para HBV como potenciadores de la respuesta inmune.

Se ha demostrado que en pacientes con infección crónica con HBV coexisten en los sitios de injuria hepática hepatocitos infectados con importante expresión de antígenos de histocompatibilidad de clases I y II en presencia de LT funcionalmente activos CD8⁺ y CD4⁺ en el tracto periportal. Estos datos sugieren que los hepatocitos infectados son reconocidos y destruidos por los LT citotóxicos. Además, se han aislado líneas de LT citotóxicos restringidos por moléculas HLA-A2 específicos para péptidos de core a partir de sangre periférica de pacientes con infección limitada. Se ha observado que ciertos LT HBc Ag específicos pueden secretar IL-2, TNF- α e IFN- γ , los que a su vez podrían participar en la patogénesis del daño hepatocítico y la erradicación viral.

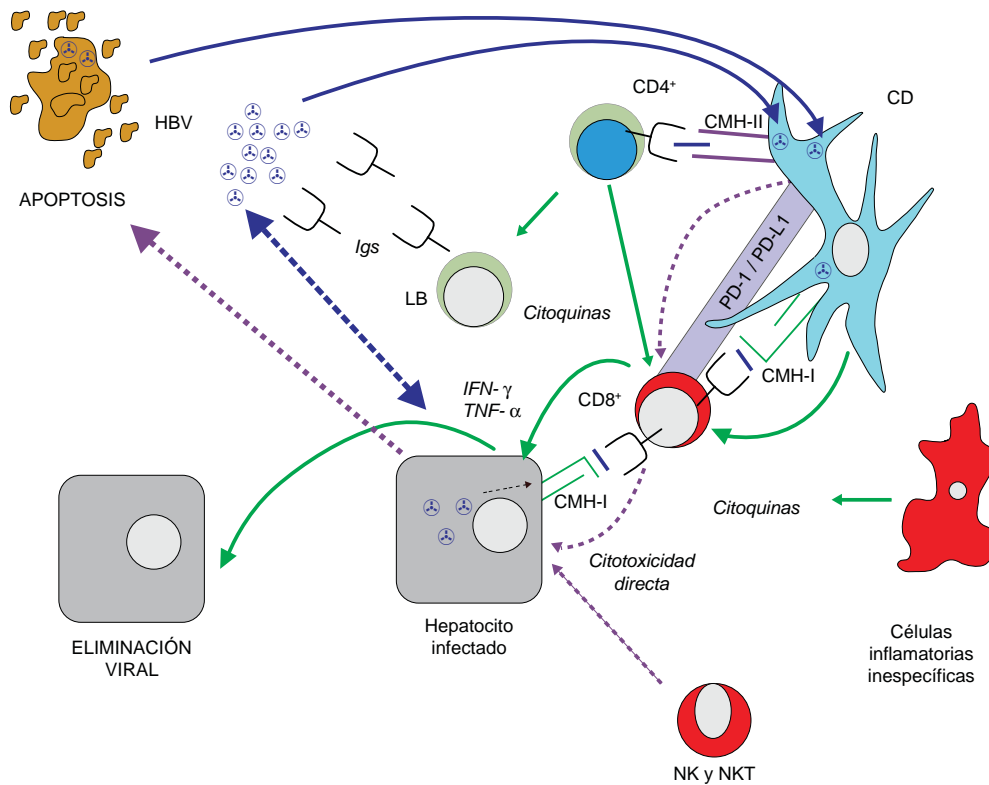


Figura 24.3.12. Esquema simplificado de la inmunopatogénesis de la infección del hepatocito por el HBV. Las células dendríticas (CD) desempeñan un papel regulatorio importante en la respuesta de los LT CD4⁺ y CD8⁺. El ingreso a las CD de viriones libres o la endocitosis de cuerpos apoptóticos infectados con HBV, permiten el procesamiento antigénico de las proteínas virales. Las CD pueden también inhibir clones CD8⁺ específicos que expresan en su superficie la proteína de muerte celular programada PD-1 al interactuar con el ligando específico PD-L1 expresado en la célula presentadora, lo que favorece la persistencia viral. Los anticuerpos anti-HBs producidos por los LB son neutralizantes y facilitan la eliminación de la circulación del virus libre.

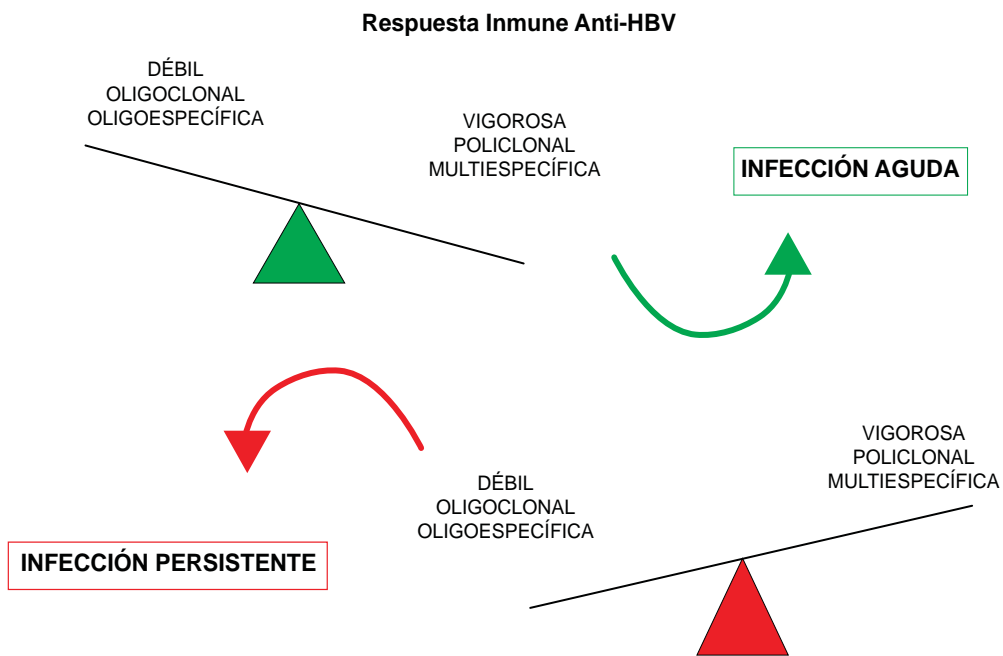


Figura 24.3.13. Implicancias de la respuesta inmune anti-HBV en el curso de la infección.

La **población de los LT CD4⁺ es multispecífica**, ya que está dirigida contra péptidos de *core*, de la envoltura y de la polimerasa. En la hepatitis aguda esta población es detectada al momento de observarse elevado nivel de DNA (antes del pico del daño hepático), persistiendo mucho después de la recuperación de la infección.

La **población de LT CD8⁺ es la responsable de la eliminación viral y del daño hístico**. Dado que en las infecciones agudas, no todos los individuos son sintomáticos, se infiere que mecanismos no citolíticos son también capaces de erradicar la infección.

Estudios realizados **en primates** infectados con HBV documentaron que la depleción de LT CD4⁺ no afecta significativamente el curso de la infección. En contraste, **la depleción temporal de LT CD8⁺, pospuso la eliminación viral y el daño hepático** hasta que dicha población reapareció en circulación y los clones específicos de HBV entraron al hígado. De hecho, el pico máximo de DNA viral se prolongó, demorándose la dismi-

nución de la carga viral y la elevación de los niveles séricos de transaminasas.

6. PATOGENIA

Como se mencionó anteriormente, los datos que sustentan el modelo de patogénesis molecular de la infección se basan fundamentalmente en estudios experimentales realizados en primates y en ratones transgénicos.

El HBV sólo pudo propagarse eficientemente mediante la infección de cultivo de células en 1996, aproximadamente 3 décadas después de su descubrimiento. Los hepatocitos de *Tupaia belangeri* (un pequeño mamífero no roedor filogenéticamente cercano a los primates) permiten reproducir la infección tanto *in vitro* (cultivo primario) como *in vivo*. En 2002 se reportó que la línea de hepatocarcinoma humano HepaRG en presencia de corticoides y dime-

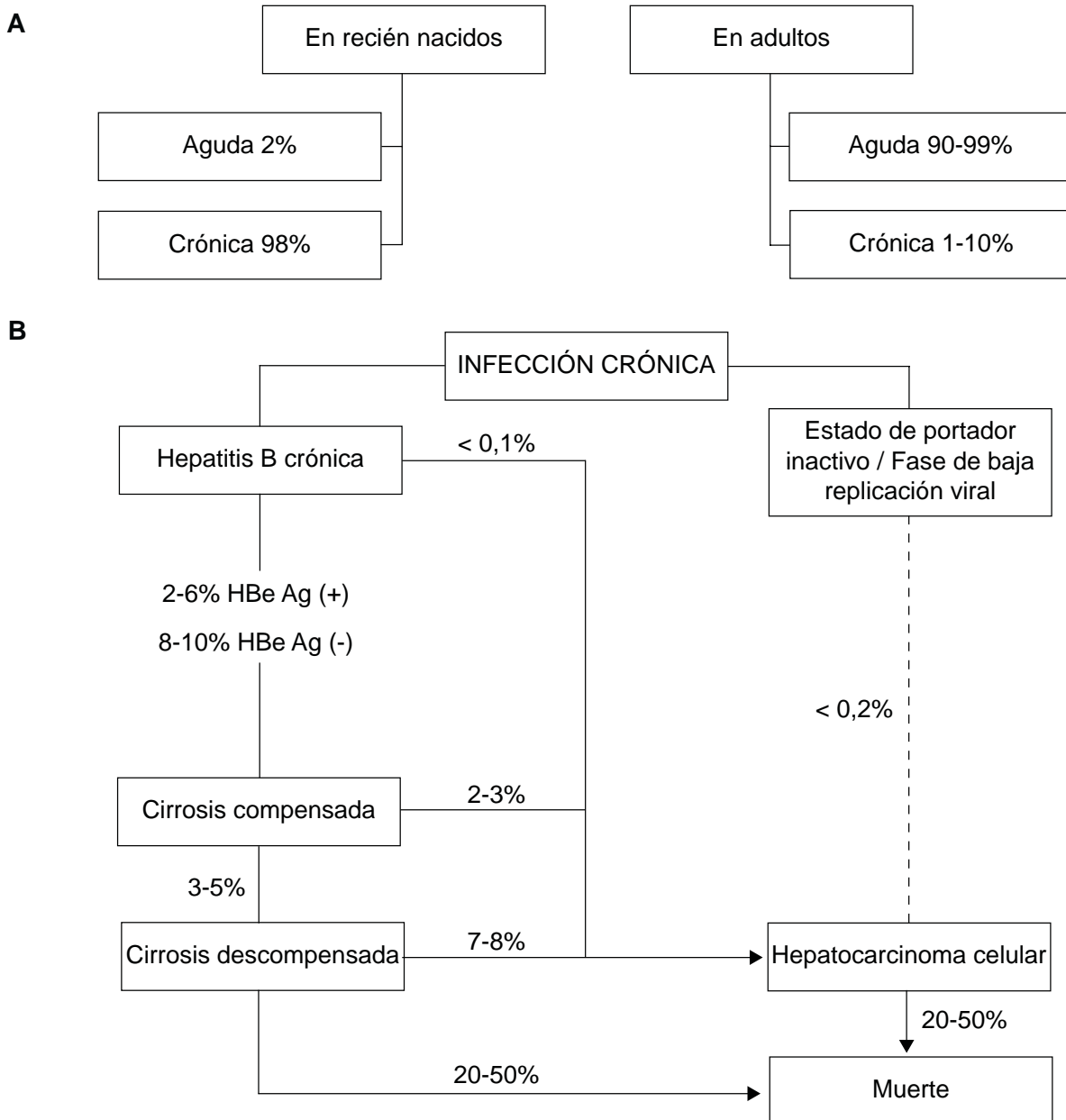


Figura 24.3.14. Evolución de la infección por HBV. A. Disímil evolución de la infección según la misma ocurra en la etapa perinatal o en la adultez. **B. Tasas anuales** estimadas de progresión a través de diferentes estadios clínicos observadas durante la infección crónica en adultos (Adaptado de Fattovich *et al*, *Gastroenterology* 127: S35-S50, 2004).

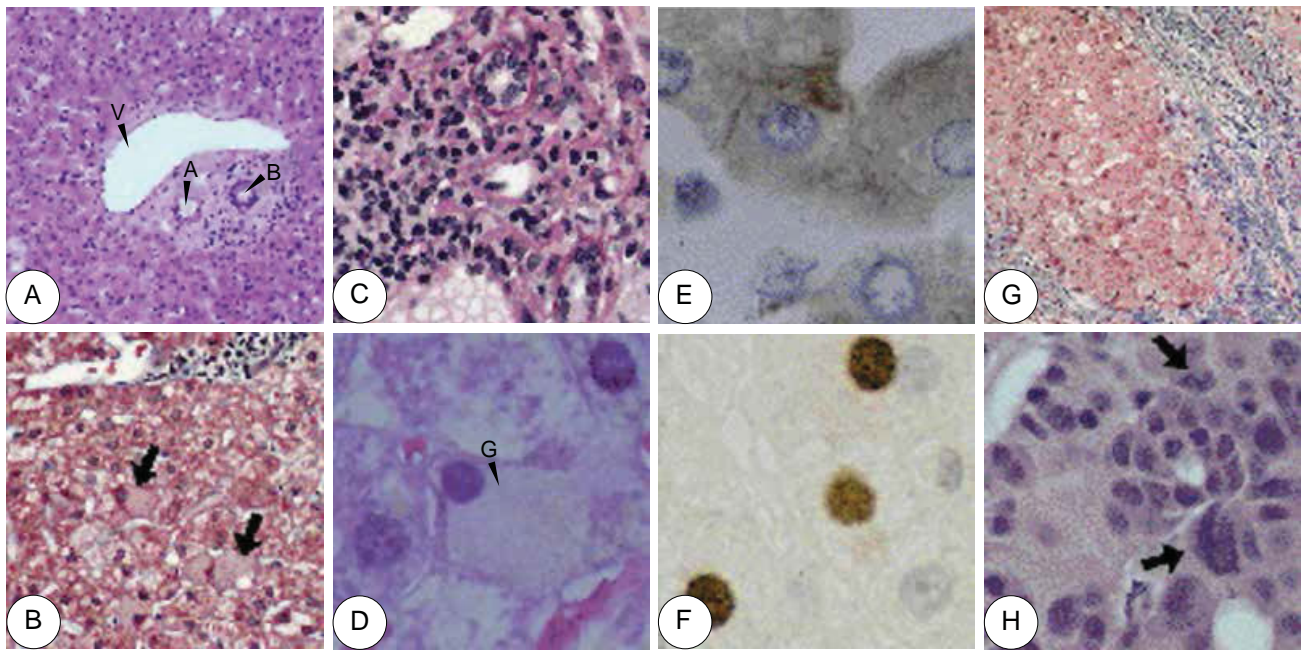


Figura 24.3.15. Patrones histológicos de la infección por HBV. Panel A: Hígado normal en el que se señala un ducto biliar (B), una arteriola (A), y una vénula (V) (hematoxilina y eosina, x40). Panel B: hepatitis B crónica con necrosis y sin fibrosis; la flecha muestra hepatocitos con citoplasma en forma de vidrio esmerilado (tinción de Masson x100). C: hepatitis crónica con moderada a intensa actividad (PAS, x200). Panel D: imagen en vidrio esmerilado. (G). Única célula en el centro con citoplasma homogéneo que contiene grandes cantidades de HBs Ag (H-E, x1000). Panel E: Inmunoperoxidasa para HBs Ag (teñido de marrón, avidina-biotina, x 1000). Panel F: Inmunoperoxidasa para HBc Ag, con distribución nuclear e hepatocitos (avidina-biotina, x1000). Panel G: cirrosis debida a hepatitis B crónica. Fibras gruesas rodean nódulos de regeneración, con leve infiltrado inflamatorio (Tricrómico de Masson, x200). Panel H: carcinoma hepatocelular moderadamente indiferenciado. Las células tumorales simulan pequeñas rosetas. Las flechas indican numerosas células en mitosis (H-E, x600). Fotografías del Dr. Ihsan Housini, *University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, EE.UU.*



til sulfóxido también posibilita la propagación del virus. En 2007 se reportó que el cultivo primario de hepatocitos fetales humanos también es permisivo a la infección por HBV. Estas líneas celulares no se utilizan con fines diagnósticos, sino de investigación de la patogénesis de la infección.

En general, se acepta que la **respuesta inmune celular** dirigida contra antígenos virales expresados en la superficie del hepatocito es **responsable tanto de la injuria hepatocítica como de la eliminación viral** de esa célula. Existen también evidencias que indican la posible participación de ciertos **mecanismos directos de injuria en individuos inmunosuprimidos**.

Una de las evidencias que apoyan la naturaleza inmunopatogénica de la lesión hepatocítica fue provista por el hallazgo de que las células linfomonocitarias de pacientes con hepatitis B crónica eran citotóxicas *in vitro* contra hepatocitos autólogos infectados. Esta citotoxicidad era bloqueada mediante la adición de anticuerpos anti-HBc. Por otra parte, los LT CD8⁺ predominan en los sitios donde hay lesión tisular *in vivo*.

Estudios pioneros realizados en primates por Francis V. Chisari y colaboradores documentaron que **la eliminación de la infección aguda del HBV en el hígado** ocurre fundamentalmente mediante **mecanismos no citolíticos** mediados por IFN- γ y TNF- α secretadas por células CD8⁺, a los que sucede **una fase complementaria** mediada por la **actividad citotóxica** de dichas células. Las observaciones realizadas por dicho investigador en ratones transgénicos, documentaron que las mencionadas células citotóxicas activadas median a través del IFN- γ la inducción de quimioquinas (tales como CXCL9 y CXCL10) que atraen localmente a **células proinflamatorias inespecíficas que amplifican el daño histico**. Entre las células que participan de dicha amplificación de la lesión necroinflamatoria tisular deben mencionarse a los **polimorfonucleares**, que a través de la síntesis de las metaloproteasas 8 y 9, facilitan

el **reclutamiento subsiguiente de linfomonoculares inespecíficos**. Muy recientemente se observó que los LT CD8⁺ son atraídos inicialmente hacia los hepatocitos infectados merced a la **respuesta inflamatoria mediada por el sistema inmune, que modifica la pared de los vasos** y promueve la **activación de plaquetas**, lo cual **acumula a los CD8⁺ in situ**.

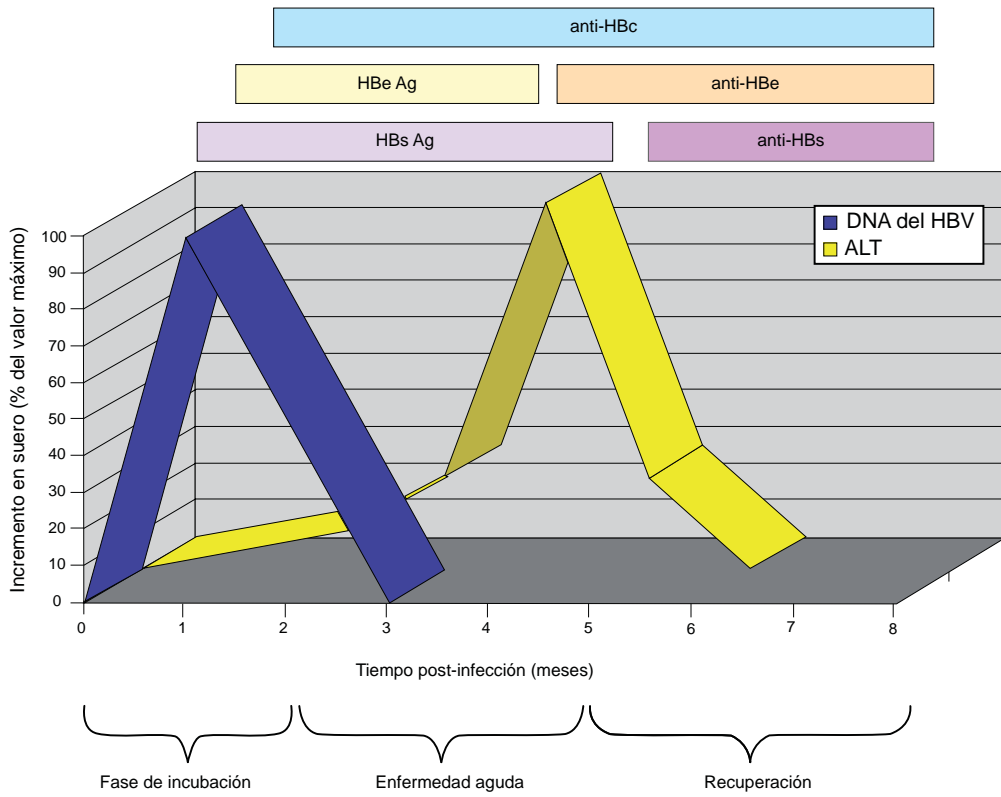
Los datos experimentales obtenidos en ratones transgénicos indican que el IFN- γ media la **eliminación no citolítica de nucleocápsides** conteniendo el RNAPg evitando su ensamblaje citoplasmático, en una manera **proteasoma- y quinaso-dependiente**. A su vez, el **RNAPg es desestabilizado en el núcleo** a través de la interacción con una proteína de unión al genoma monocatenario denominada **SSB (Single Strand Binding)** acomplejada con la proteína La.

En las Figura 24.3.11, se representa un esquema general de la inmunopatogenia postulada para la infección por HBV. En él se observan dos compartimientos separados: el hígado y los sitios extrahepáticos. Los mecanismos que participan en cada uno de ellos son diferentes. En las Figuras 24.3.12 y 24.3.13 se describen algunos mecanismos generales que participan en la lesión hepatocítica.

De acuerdo con el modelo propuesto, **bajo la modulación de LT colaboradores CD4⁺ Th1, los LT citotóxicos CD8⁺ responden a uno o más antígenos expresados en la membrana del hepatocito ejerciendo funciones efectoras, que producen la injuria celular y la eliminación de la célula infectada del tejido hepático** (véase el ítem 2.4 del capítulo 5). A su vez, **bajo la influencia de LT colaboradores CD4⁺ Th2 (actualmente denominados T foliulares helper o Tfh), los LB sintetizan anticuerpos necesarios para la eliminación del HBV circulante** (Figura 24.3.12).

Todas las **funciones mencionadas** podrían ser a su vez **reguladas por LT supresores** (T regulatorias [Tregs] con fenotipo CD4⁺ o CD8⁺). La población de **Tregs naturales con expresión**

A



B

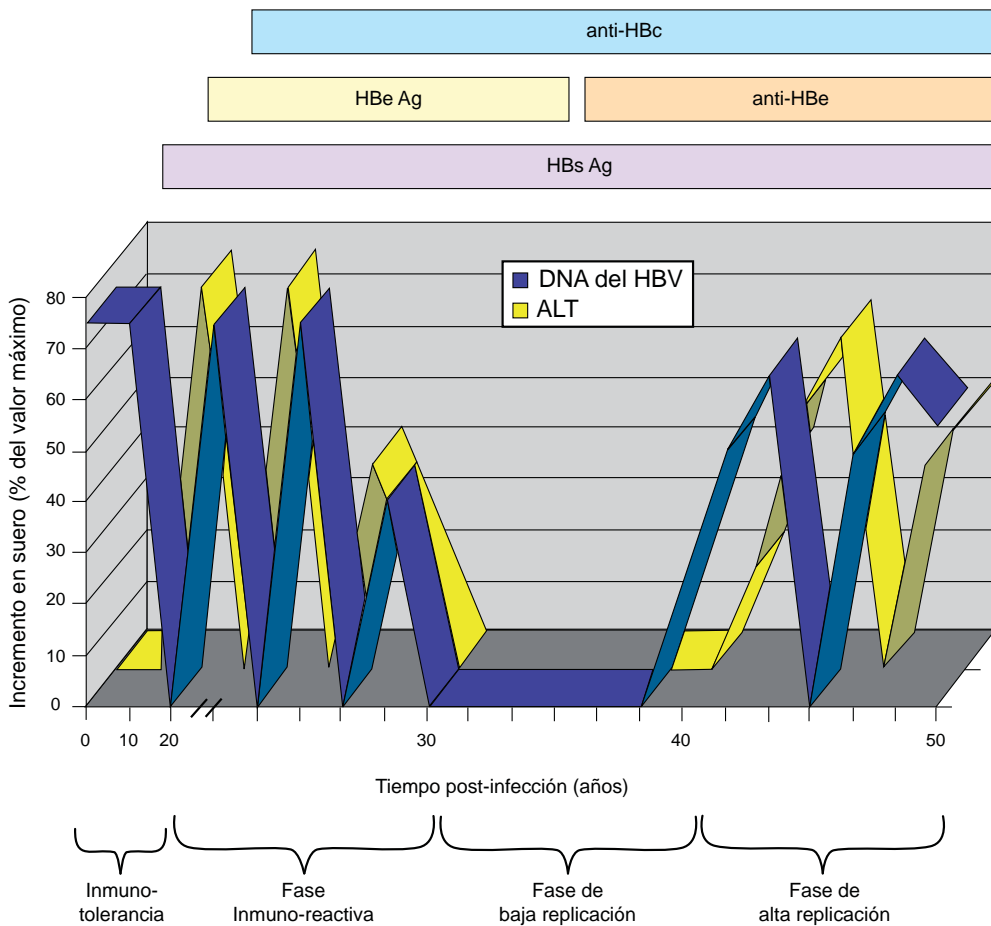


Figura 24.3.16. Evolución de la hepatitis B aguda (A) y crónica (B): correlación con los marcadores virológicos y serológicos.

Marcador	Portador inactivo	Hepatitis crónica
Lesión hepática	No o mínima	Sí
Antígenos virales en hepatocitos	HBs Ag + HBc Ag -	HBs Ag + HBc Ag +
HBs Ag sérico	+	+
HBe Ag sérico	+ → -	+ (frecuente) o -
Anticuerpos anti-HBe circulantes	+ (frecuente)	Variable
Anticuerpos anti-HBc circulantes	+	+
Actividad de DNA polimerasa viral	- o mínima	+
Carga viral HBV	<10 ⁵ copias/mL	>10 ⁵ copias/mL

Tabla 24.3.3. Cuadro comparativo entre un portador crónico inactivo del HBV y un paciente con hepatitis crónica por HBV.

constitutiva de las moléculas **CD4** y **CD25** (y del factor de transcripción **FoxP3**) suprime mediante el **contacto célula-célula** una variedad de células inmunes y de respuestas incluyendo la de células **CD4⁺CD25⁺**, la producción de **IL-2** y la proliferación de células **CD8⁺**, la producción de **IFN- γ** y la actividad citotóxica. Si bien estas células Tregs requieren la activación con antígenos específicos para adquirir el fenotipo supresor, una vez activadas ejercen los efectos inhibitorios tanto en una manera antígeno-específica, como antígeno-inespecífica (promoviendo dicho efecto sobre células que son "testigos inocentes" de su actividad supresora [efecto *bystander*]). Los **LT CD8⁺ supresores** pueden también inhibir la proliferación T y la citotoxicidad **tanto mediante contacto célula-célula, como a través de la secreción de IL-10**. Esta citoquina puede inhibir la expresión de moléculas del CMH-I, y contribuir por ende a la inhibición de la citotoxicidad mediada por células **CD8⁺**.

Se acepta que una **respuesta vigorosa, policlonal y multiespecífica de los LT CD8⁺ (dirigida contra epítopes de las proteínas S, C, Pol o X)** promueve la **limitación de la infección durante la fase aguda** de la infección. Por el contrario, una **respuesta débil, oligoclonal y oligo- o monoespecífica de LT CD8⁺, se asocia a la infección persistente** (Figura 24.3.13).

Recientemente, se ha demostrado que la **persistencia viral está favorecida por: a) la interacción entre el receptor inmune de muerte programada PD-1 (*Programmed cell Death 1*) expresada en los linfocitos T y el ligando PDL-1 expresado en células presentadoras de antígenos, así como por b) la actividad de las Tregs FoxP3⁺**. La interacción entre PD-1 y PD-L1 promueve señales intracelulares en los linfocitos T (**CD4⁺ o CD8⁺**) que inhiben su activación y favorecen su agotamiento (Véanse en el capítulo 8, el ítem 2.4.1 y la Figura 8.7). La población de linfocitos T **CD8⁺** específicos para HBV está disminuida en los pacientes que no pueden controlar la infección, debido a mecanismos proapoptóticos mediados por la proteína Bim (***Bcl-2 interacting mediator***).

Entre las evidencias que sugieren que también podrían participar otros mecanismos patogénicos en la infección del hepatocito merecen destacarse las siguientes:

1) Estudios experimentales realizados *in vitro* demostraron que líneas celulares que son transfectadas con el gen del *core* -pero no con el gen del antígeno de superficie- muestran efecto citopático al producirse la expresión del **HBc Ag**, probablemente por su capacidad de unión al DNA. En un modo análogo, **ratones quiméricos inmunodeficientes SCID (*Severe Combined Immuno Deficient*) que portan un hígado humanizado y que fueron infectados *in vivo* con HBV, exhiben daño hepático. Estos hallazgos enfatizan el rol de la respuesta inmune, no sólo para promover las lesiones hepáticas inmuno-mediadas y eliminar subsiguientemente la infección, sino que limitan**

el daño atribuible al propio virus, el que no se observa en el paciente inmunocompetente.

2) La utilización de ratones transgénicos que portan el gen viral de interés y, por ende, son inmunológicamente tolerantes a la proteína codificada- permite actualmente diferenciar los eventos mediados únicamente por la expresión viral de los producidos por la respuesta inmune. En este modelo se ha observado que la sobreproducción de la proteína pre-S1 inhibe la liberación a la circulación de la proteína S. Como consecuencia, las células adoptan un aspecto histológico de *vidrio esmerilado* en las que se observa al microscopio electrónico una acumulación de partículas filamentosas en su retículo endoplásmico. Subsiguientemente, ocurre la muerte celular en presencia de una respuesta inflamatoria, asociada con elevación de las transaminasas. La gravedad de la lesión es proporcional al grado de acumulación de los filamentos en el retículo endoplásmico de los hepatocitos. Dichas partículas filamentosas también se detectan en hepatocitos humanos infectados con HBV con aspecto de vidrio esmerilado como resultado de una desregulación de la síntesis de las proteínas de envoltura. Como se ha mencionado anteriormente la inhibición de la secreción de la proteína S debido a un exceso del pre-S1 ocurre en pacientes crónicamente infectados con cepas del HBV que presentan mutaciones o deleciones en las regiones promotoras de pre-S1 y pre-S2 / S. De ahí que algunos autores postulen que en la infección crónica el daño hepático es producido, al menos parcialmente, por la propia infección viral y no únicamente por la respuesta inmune.

Finalmente, se ha observado que la coinfección del HBV con HDV es capaz también de producir injuria celular.

A nivel extra-hepático, el daño hístico producido por el depósito de inmunocomplejos formados por HBs Ag e Igs específicas con participación del sistema del Complemento, se asocia a glomerulonefritis, arteritis y artritis. Estos inmunocomplejos están presentes en el 100% de los pacientes en la etapa aguda, pero perduran más allá de la 4ta. semana de enfermedad sólo en aquellos que desarrollan la infección persistente. La detección de dichos inmunocomplejos circulantes (conformados por el HBs Ag y anticuerpos específicos de clase IgM, IgG y también IgA) es frecuente durante las fases de replicación viral activa.

6.1 EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA INFECCIÓN POR HBV Y SU CORRELACIÓN CON LOS MARCADORES SEROLÓGICOS Y VIROLÓGICOS

El período de incubación de la enfermedad puede oscilar entre un mínimo de 4 a 6 semanas hasta un máximo de 4 a 6 meses. Durante este período hay replicación viral y en suero se pueden detectar HBs Ag, DNA viral y HBe Ag. Luego del período de incubación, la infección con HBV puede dar lugar a dos cursos de evolución: agudo o persistente. Sin embargo, es menester recordar que puede haber infecciones subclínicas

autolimitadas en la etapa aguda, o bien que evolucionen hacia la persistencia (este caso es el habitual cuando se adquiere en la etapa perinatal).

En las Figuras 24.3.14 y 24.3.15 se indican algunas posibilidades evolutivas de la infección con HBV y su imagen histológica, y en las Figuras 24.3.16 y 24.3.17 la correlación de cada etapa de la infección con los diversos marcadores de la infección.

6.1.1 Infección aguda

Gran parte de los individuos infectados puede presentar una infección subclínica o inaparente, seguida de una rápida eliminación viral. Esto es debido a una respuesta inmune adecuada con producción de altos títulos de **anticuerpos neutralizantes anti-HBs**. **Estos anticuerpos confieren habitualmente inmunidad protectora frente a la reinfección con el mismo genotipo o a la primoinfección con cualquier otro genotipo del HBV**. Por otra parte, una cuarta parte de los individuos jóvenes / adultos infectados con HBV desarrolla una hepatitis clínica. Antes de la aparición de ictericia, y otros síntomas de hepatitis, el paciente puede presentar artritis, artralgiás, mialgiás, neuralgiás, vasculitis, *rash* cutáneo, glomerulonefritis y otros trastornos. Como se mencionó anteriormente, todas estas manifestaciones son debidas a la formación de inmunocomplejos circulantes y al subiguiente depósito tisular.

Cuando un individuo entra por primera vez en contacto con el virus, los marcadores de la infección con HBV comienzan a ser detectables recién aproximadamente 6 a 10 semanas post-infección, con la aparición del HBs Ag y del HBe Ag, mientras que el DNA viral puede ser detectado en suero desde alrededor de 21 días antes de la aparición de los antígenos mencionados. Posteriormente, el individuo infectado exhibe un incremento de los niveles séricos de las transaminasas hepáticas (generalmente > 500 U/L), con niveles de ALT (TGP) mayores a los de la AST (TGO). Alrededor de la semana 10 post-infección, pueden aparecer síntomas inespecíficos como fatiga, náuseas, vómitos, dolor en el hipocondrio derecho e ictericia. En esta etapa comienzan a detectarse anticuerpos séricos IgM anti-HBc. En la fase de recuperación de la infección con HBV, los niveles séricos de las aminotransferasas hepáticas retornan a sus valores normales, desaparece el HBe Ag y los anticuerpos anti-HBe se tornan detectables; finalmente se produce la seroconversión de HBs Ag hacia anticuerpos anti-HBs. Estos últimos pueden persistir en circulación por varios años. Cuando los niveles de IgM anti-HBc comienzan a declinar, los niveles de anticuerpos IgG anti-HBc aumentan, permaneciendo por más tiempo en circulación que los anti-HBs, e inclusive, pueden persistir durante toda la vida. Si bien es indudable que **los verdaderos anticuerpos neutralizantes son aquellos dirigidos contra la envoltura viral, el éxito en la limitación de la infección depende de una respuesta inmune potente, policlonal y multiespecífica celular citotóxica contra los diferentes antígenos del HBV**. Estos anticuerpos anti-HBs permiten la eliminación de los virus circulantes y aparecen al finalizar el período de estado (generalmente son marcadores de resolución de la infección). **Sin embargo, se ha comprobado que el DNA del HBV detectado por PCR puede persistir por muchos años, aun luego de la seroconversión a anti-HBs**. El período de estado de la hepatitis B aguda es variable: entre 4 y 6 semanas cuando la evolución es favorable. Se caracteriza por la presencia de una importante necrosis de los hepatocitos, como consecuencia de la destrucción de las células infectadas por HBV a través de mecanismos inmunológicos mediados por células citotóxicas (CD8⁺, NK y NKT), dado que HBV no es un virus primariamente citopático en el individuo inmunocompetente.

Durante el breve período que corresponde a la seroconversión de HBs Ag a anti-HBs, no se detectan dichos marcadores serológicos. Se conoce a este lapso como **período de ventana inmunológica**. El diagnóstico en este período sólo puede hacerse en función de otros marcadores, como por ejemplo mediante la detección de anticuerpos anti-HBc (habitualmente presentes), aunque también pueden detectarse anticuerpos anti-HBe. (Figura 24.3.16A).

En las **hepatitis agudas fulminantes, las 4 fases** que se describen en el devenir **de las infecciones crónicas** (véase la sección 24.3.6.1.2.1) **se suceden rápidamente** combinándose diversos

factores que agravan su gravedad. Existen evidencias iniciales que sugieren la participación de una respuesta ectópica inmune humoral (anticuerpos IgM e IgG anti-HBc masivamente producidos por plasmocitos hepáticos, que se unirían al HBc Ag expresado en hepatocitos, con depósito de complemento) en la patogénesis de la hepatitis B fulminante.

6.1.2 Infección persistente con HBV

La presencia de HBs Ag en suero por más de 6 meses indica progresión de la infección hacia la forma persistente, irrespectivamente de la presencia o ausencia de lesión necroinflamatoria (hepatitis crónica documentada mediante análisis histopatológico de una biopsia). En la Tabla 24.3.3 se enumeran las diferencias principales entre un portador crónico inactivo del HBV y un paciente con hepatitis crónica por HBV.

6.1.2.1 Fases de la infección crónica desde el punto de vista patogénico.

Pueden reconocerse cuatro fases: **1)** la de inmunotolerancia; **2)** la de eliminación viral por una activa respuesta inmune / hepatitis crónica HBe Ag⁺; **3)** la del estado de portador inactivo de HBs Ag; y **4)** la de reactivación de la replicación del HBV / hepatitis crónica HBe Ag⁻ (Figura 24.3.16B). No todos los pacientes atraviesan estas 4 etapas.

Fase de Inmunotolerancia. Esta fase se caracteriza por la presencia de **elevada carga del HBV plasmática** (> 10⁵ copias/ml), **HBe Ag⁺ y normalidad de las transaminasas séricas**. El HBV induce inmunotolerancia mediante la secreción de HBe Ag. Esta proteína soluble puede invadir el timo e inducir la delección funcional de LT CD4⁺ restringidos por moléculas de histocompatibilidad de clase II específicos para ese antígeno. Teniendo en cuenta la reactividad cruzada que existe entre el HBe y el HBc Ag a nivel de la respuesta mediada por los LT, este fenómeno explicaría la evolución habitualmente persistente en neonatos infectados en la etapa perinatal, en contraposición con lo observado en adultos jóvenes crónicamente infectados en los que su timo involucionado ya no es capaz de deleccionar funcionalmente clones de LT HBc / HBe específicos. Es probable que el grado de tolerancia varíe según los antígenos de histocompatibilidad del hospedador (como se ha demostrado en el modelo murino). Ello se traduciría en diferencias para la seroconversión del HBe Ag hacia anticuerpos anti-HBe en individuos crónicamente infectados. A su vez, la emergencia de mutantes de HBV e⁻ (el lector observará su indistinta designación como mutantes e⁻ *minus*, que exhiben el codón 28 de terminación en el pre-*core*) en infectados crónicos, se asocia a pérdida de la tolerancia y a la consiguiente seroconversión para este antígeno. De modo análogo, la infección perinatal a partir de madres infectadas con estas mutantes e⁻ (y con anticuerpos anti-HBe) conduce a infecciones agudas autolimitadas. En resumen, en esta fase la síntesis del HBe Ag se asocia con mayor probabilidad de evolucionar a la tolerancia inmune con persistencia viral, mientras que las mutantes e⁻ se asocian más frecuentemente a la inmunoeeliminación del HBV con lesión del hepatocito. **Esta fase de inmunotolerancia puede durar 1 a 4 décadas en los neonatos infectados pero es de corta duración o está ausente en quienes adquieren la infección en la infancia o la adultez**. Durante esta fase, la seroconversión espontánea o mediada por tratamiento es infrecuente (<5%). Estudios prospectivos realizados con pacientes de Taiwán demostraron que sólo una proporción mínima de los que están en esta fase (5%) evolucionan a cirrosis u ocasionalmente al HCC al cabo de 10,5 años de seguimiento.

Fase de inmunoeeliminación / hepatitis crónica HBe Ag⁺. Se caracteriza por la presencia de **HBe Ag asociado a altos o fluctuantes niveles de carga viral de HBV, persistente o intermitente elevación de las transaminasas séricas e inflamación activa del hígado**.

Los hepatocitos infectados que expresan antígenos neosintetizados son reconocidos por LT citotóxicos CD8⁺. Tanto los LT colaboradores CD4⁺ como los citotóxicos CD8⁺ con especificidad

para HBc / HBe Ag son relevantes en la eliminación de la célula infectada. Se han detectado LT citotóxicos restringidos por moléculas de clase I HLA-A2 específicos para un epítipo común al HBc y al HBe Ag constituido por los aminoácidos 18-27 del polipéptido *core*. Esta respuesta citotóxica limita la infección en la etapa aguda. Además, se han documentado cambios aminoacídicos en otra pequeña región del *core* (residuos 84-101) que se correlacionan con la enfermedad crónica. **Los pacientes con hepatitis B crónica que presentan hepatocitos expresando en su citoplasma HBs Ag (imagen en vidrio esmerilado al microscopio óptico) pueden eventualmente eliminar estas células infectadas como resultado de la secreción de IFN- γ por parte de LT específicos para péptidos del HBc/HBe Ag.** Este IFN- γ , a su vez, es responsable del reclutamiento de una respuesta inflamatoria inespecífica que también puede conducir a la necrosis.

Esta fase –de manera inversa a la anterior– si bien presenta fluctuaciones en los niveles séricos de DNA viral, exhibe un aumento en los niveles séricos de las transaminasas hepáticas, lo que denota el grado más grave de la afectación del hígado. **El elevado nivel de las transaminasas, que suelen ascender súbitamente (flares) se puede asociar al descenso transitorio del DNA viral y sólo ocasionalmente a la seroconversión a anti-HBe.** La **duración y la frecuencia de esos ascensos súbitos, se correlacionan con el riesgo de cirrosis y carcinoma hepatocelular.** El desenlace de esta fase de inmunoeeliminación está relacionado con la conversión desde HBe Ag hacia anticuerpo anti-HBe. Factores tales como la mayor edad, mayores niveles de transaminasas, reagudizaciones, etnicidad no asiática y genotipo viral (B>C) se asocian con mayor frecuencia a dicha seroconversión. Estudios con pacientes asiáticos donde prevalecen los genotipos B y C demostraron que los infectados con genotipo B exhiben una menor prevalencia de HBe Ag, una mayor precocidad para la seroconversión a anti-HBe y una sostenida respuesta virológica y bioquímica luego de la misma.

Fase de portador inactivo de HBs Ag. Se caracteriza por la ausencia de HBe Ag, detección de anticuerpos anti-HBe, con niveles séricos bajos (<10⁵ IU/ml) de HBV, niveles normales de transaminasas e histología de la biopsia exhibiendo mínima hepatitis en ausencia de fibrosis. Concomitantemente, se observa una mejoría en la enfermedad necroinflamatoria hepática. La aparición de anticuerpos anti-HBe –con la consiguiente desaparición del HBe Ag– es, en general, una señal favorable de evolución de la infección, con declinación de la multiplicación viral activa. Sin embargo, en años recientes se ha documentado que existen hepatitis crónicas activas aun en presencia de anticuerpos anti-HBe, sin HBe Ag circulante detectable (véase mutantes de *pre-core/core*). Ello significa que la seroconversión del HBe Ag hacia anti-HBe no necesariamente implica que la infección se está resolviendo; sino que también podría significar que el virus ha pasado al estado latente (por ejemplo, persistencia del DNAcc sin producción de progenie viral), o que emergieron mutantes de *pre-core* y/o del BCP que impiden la síntesis del HBe Ag. **En Argentina, la mutante del pre-core G1896A (e⁻) se observó asociada a una significativa proporción de hemodonantes (portadores asintomáticos) infectados con el genotipo F.**

Esta etapa puede persistir indefinidamente, lo cual tiene un pronóstico favorable, especialmente si se alcanza tempranamente en el curso de la infección. Sin embargo, algunos portadores inactivos del HBs Ag, exhiben eventos de reactivación, lo cual puede –aunque no obligatoriamente– ser la consecuencia de eventos de inmunosupresión.

Fase de reactivación de la replicación viral (hepatitis crónica HBe Ag⁺). Esta fase se caracteriza por la ausencia del HBe Ag, la detección de anticuerpos anti-HBe, elevados y fluctuantes niveles de DNA viral y de transaminasas, en presencia de continua necroinflamación. Por lo general, la fase anterior que se caracteriza por una baja o indetectable replicación viral puede durar toda la vida, pero un grupo de pacientes puede experimentar una elevación en los niveles del DNA viral en suero, lo que denota un aumento en la replicación viral. Todo lo anterior conlleva a un

incremento en la respuesta inmune inflamatoria que puede terminar en la necrosis y/o apoptosis de las células hepáticas. A esta fase se llega habitualmente luego de un período variable como portador inactivo, aunque algunos pacientes lo hacen directamente desde la segunda fase (hepatitis crónica con HBe Ag⁺). Si bien el nivel de DNA viral es menor que en la hepatitis crónica HBe Ag⁺, en la cuarta fase los valores pueden alcanzar 10⁸-10⁹ UI/l, aunque es característica de esta etapa la fluctuación de los mismos, así como el de las transaminasas. Dado que no se ha podido establecer un valor de corte de DNA de HBV sérico que diferencie la hepatitis crónica HBe Ag⁺, de ésta que es HBe Ag⁻, se acepta que es más importante la cuantificación seriada del DNA viral que una única determinación. En otros términos, imagine el lector que es **más importante "el video" del curso evolutivo, que "la foto"** del mismo. Aproximadamente un 0,5-1% de los individuos infectados crónicamente con HBV eliminan la infección espontáneamente cada año.

6.1.2.2 Mecanismos que determinan la persistencia viral

El mecanismo de persistencia viral no se ha dilucidado totalmente, pero se reconocen múltiples factores –virales y celulares– que permiten la permanencia del virus en el hospedador con o sin replicación viral. Entre los mismos se pueden mencionar: **a)** características generales del hospedador; **b)** supresión específica del sistema inmune; **c)** generación de variantes / mutantes del HBV que permitan la evasión a la respuesta inmune; **d)** persistencia de formas genómicas estables del HBV dentro de la célula (DNAcc); **e)** infección de sitios privilegiados (linfocitos, etc.); y **f)** integración del genoma viral al genoma celular.

a) Características generales del hospedador. Diversos factores propios del hospedador parecerían influir en la instalación y/o mantenimiento de la persistencia viral como son:

La edad del paciente en el momento de la infección: el 90-95% de los recién nacidos infectados desarrollan una infección crónica, mientras que sólo un 1-10% de los adultos evolucionan a la cronicidad. El HBe Ag, polipéptido que comparte epítopes T CD4⁺ y CD8⁺ con el HBc Ag (como se mencionó en la Sección 24.3.2.3), atraviesa la placenta induciendo tolerancia inmunológica en el recién nacido; mientras que en los adultos el HBe Ag produce un cambio de la respuesta Th1 a Th2. Además, se observó que en el adulto un defecto en la producción de IFN- α e IFN- γ produce una menor expresión de antígenos de clase I del CMH sobre la membrana hepatocítica, por lo cual los LT citotóxicos no podrían reconocer a las células infectadas, favoreciendo de este modo la persistencia viral (véase el capítulo 8, Mecanismos de evasión viral).

El sexo: se observó que las mujeres son menos afectadas que los hombres, ya que la cirrosis como consecuencia de una infección crónica por HBV ocurre en una relación 2:1 entre hombres y mujeres, mientras que el HCC tiene una incidencia 5 a 7 veces superior en los hombres. Recientemente se ha determinado que la proteína X está implicada en el **aumento de la transcripción de los genes regulados por andrógenos** de manera directamente proporcional a los niveles de esta hormona. Esta proteína viral actúa sobre-activando **al receptor para andrógenos mediante su fosforilación a través de la vía de la quinasa c-Src.**

La raza: Si bien no se ha encontrado hasta el momento una relación definida y estricta entre antígenos de histocompatibilidad y persistencia viral, parecería que la transmisión vertical del virus (madre / hijo) está en cierto grado influida por diferencias étnicas. Se ha observado una fuerte correlación a nivel mundial entre el HLA DR13 y la limitación de la infección por HBV, así como a una significativamente restringida transmisión perinatal de este agente en neonatos de China e Italia. De modo inverso, los alelos HLA DRB1*11/*12 y DQB1*0301 están mayoritariamente asociados con la persistencia viral. A su vez, se ha observado un marcado predominio de los alelos DRB1*03 y *07 en la población de no respondedores a la vacunación para HBV.

b) Supresión específica del sistema inmune. En los pacientes infectados crónicamente con HBV la respuesta de los LT CD4⁺ y

CD8⁺ específicos para epítopes virales está significativamente disminuida. Esta disminución es más acentuada en la población de LT CD8⁺ específicos contra diversos epítopes del *core*, donde no sólo esta estirpe celular se torna indetectable, sino que inclusive se ve disminuida su habilidad para producir IFN- γ en estudios *ex vivo*. En estos pacientes también se ha observado una baja respuesta de los LT CD4⁺, probablemente debida a una disminución en la función de las células dendríticas (CDs) infectadas con HBV, las cuales presentan una disminución en la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-12. Si bien el mecanismo de acción de HBV sobre las CDs que infecta no es del todo conocido, se ha observado una reducción en la habilidad de éstas para activar a los LT.

Además de la disfunción de las CDs, la infección crónica por HBV tiene efectos sobre otros componentes involucrados en la respuesta inmune innata. Es así como se ha observado una **disminución en la expresión del receptor TLR-2 en monocitos, especialmente en pacientes HBe Ag⁺**. Más aún, el HBe Ag modula las vías de transducción de señales de la respuesta innata interactuando con proteínas tales como TRAM, Mal y TLR-2 (véase la Figura 7.4 del Capítulo 7), suprimiendo la transcripción de NF κ B y la actividad del promotor de IFN- β .

c) Significación clínica de la variación genómica del HBV.

Variaciones en la región pre-core / core. En la infección por HBV se ha asociado estrechamente la infectividad a la detección del HBe Ag en suero. Sin embargo, diversos estudios demostraron que en aproximadamente un 70% de los pacientes con hepatitis B crónica con serología negativa para HBe Ag, se detecta DNA viral en circulación y niveles séricos fluctuantes de las aminotransferasas he-

páticas. A estas variantes virales se las denomina **HBe minus (HBe⁻)**. En algunos de estos pacientes, también se ha observado actividad necroinflamatoria intensa en hígado, e inclusive falla hepática fulminante. Ello puede deberse a mutaciones en la región del *core* o *pre-core*. Las mutación más común es la sustitución del nucleótido G por el A en la posición 1896 de la región genómica de *pre-core* (codón 28), que se traduce en el cambio del triplete codificador de triptofano (TGG) por un codón de terminación (TAG) como se observa en las Figuras 24.3.4. y 24.3.5, promoviendo así la terminación traduccional prematura de esta proteína. De esta manera, al verse interrumpida la síntesis completa de la proteína *pre-core* de la cual deriva el HBe Ag se inhibe la síntesis de este último. Por el contrario, la síntesis de la proteína del *core* no se ve afectada y por ende las partículas de Dane pueden formarse. Como se observa en la Figura 24.3.5 cuando esta región genómica viral se transcribe a RNA se forma una estructura con forma de asa-bucle que es estable, constituyendo la base molecular de la señal de encapsidación ϵ .

La frecuencia con la que aparece la mutación puntual G1896A varía entre los distintos genotipos, dependiendo si el nucleótido presente en la posición covariante 1858 es una C o una T en la región complementaria con la que hibrida. La presencia del nucleótido C, observada en los genotipos A, H y en algunas cepas del genotipo C, es desfavorable para el desarrollo de la mutación G1896A, debido a la inestabilidad que produciría a la estructura espacial de esta región de la molécula del RNA viral; en cambio, la presencia del nucleótido T en la posición 1858 del DNA, como sucede con los genotipos B, C, D, E y F favorece que la mutación G1896A ocurra con frecuencia (resultando el codón de terminación TAG, en lugar de TGG).

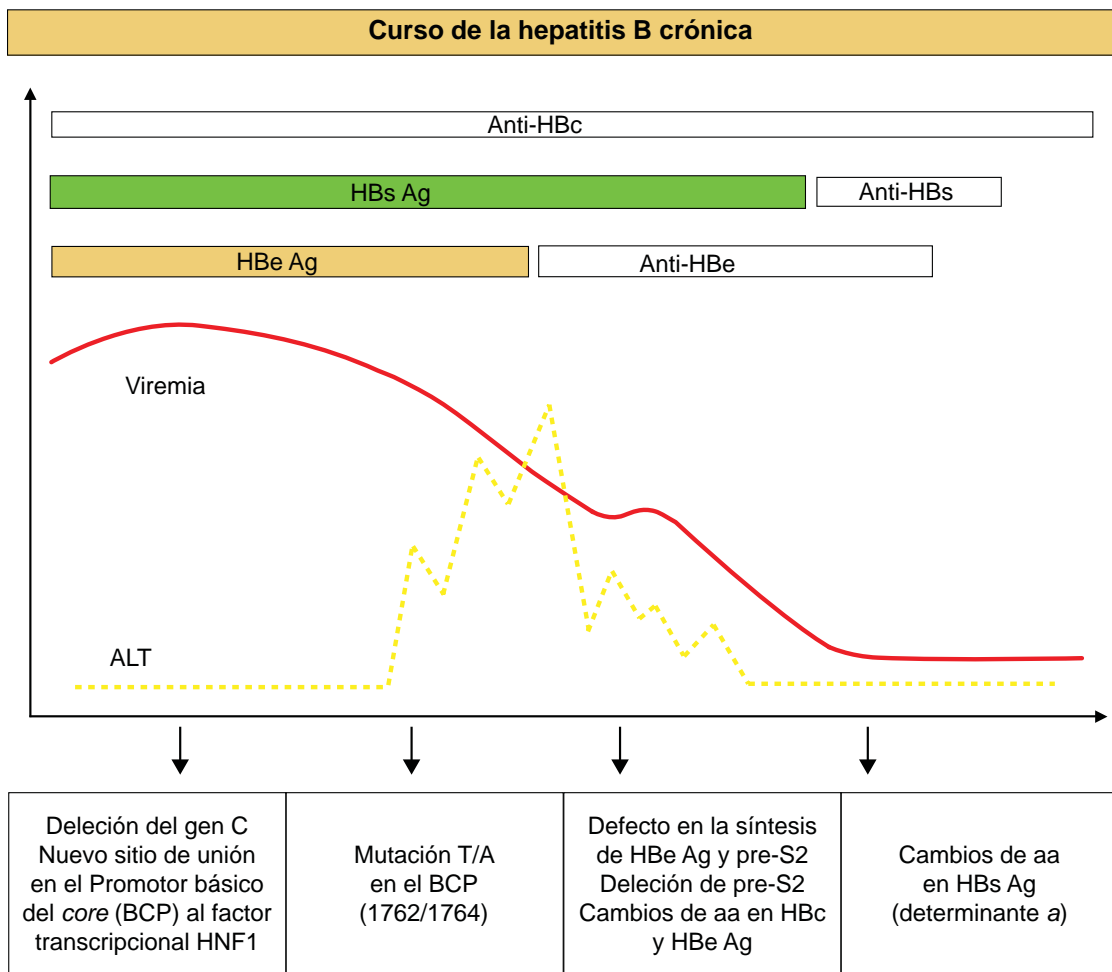


Figura 24.3.17. Fases de la infección crónica por HBV y su correlación con la evolución del genoma viral.

Otra mutación que se observa con frecuencia es la sustitución nucleotídica G por A en la posición 1899 del ORF que codifica el pre-core. Este cambio, resulta también en un codón de terminación prematura de la traducción, que va a ser responsable de la síntesis de una proteína pre-core truncada. Como consecuencia de ello, también va a estar inhibida la síntesis del HBe Ag. Es común encontrar que esta mutación puntual acompañe a la sustitución nucleotídica G1896A.

Las mutaciones más usuales a nivel del **promotor básico del core** (BCP) (véase la Figura 24.3.5A y B) son la sustitución del nucleótido A por el T en la posición 1762; y la del nucleótido G por el A en la posición 1764 de la región genómica del core. Estas mutaciones, que pueden aparecer solas o combinadas entre sí, se traducen en una disminución de la expresión del HBe Ag. Dichas variantes están asociadas a un **10% de los casos de hepatitis B fulminantes**, y a un **27% de casos de hepatitis B crónica progresiva** (Figura 24.3.17).

El significado clínico de las mutaciones en el pre-core parecería diferir en distintas áreas geográficas. Así, por ejemplo, en Japón, la infección con HBV productor de HBe Ag se asocia a infecciones agudas autolimitadas, no observándose aparición de mutantes HBe minus luego de la seroconversión. Sin embargo, en ese país las hepatitis B fulminantes parecerían estar asociadas a dichas mutantes. Por el contrario, sólo una mínima proporción de hepatitis fulminantes ha sido recientemente asociada a mutantes HBe minus en EE.UU. La observación de que el curso de la infección por HBV sin antigenemia HBe puede variar entre subclínica y fatal sugiere que, además de la mencionada, otras mutaciones podrían intervenir en el desenlace de aquella, como se observara en la infección experimental de primates.

Al respecto, recientemente se ha asociado en China la gravedad de hepatitis crónicas activas a mutaciones sin sentido en tres regiones del core (codones 48-60, 84-101 y 147-155), las que coexistiendo con el codón 28 de terminación, podrían constituir mecanismos de adaptación viral que favorecieran su persistencia.

Variaciones en la región X. Dado que el marco abierto de lectura de pre-core/core se yuxtaponen con el de X, los cambios nucleotídicos A1762T y G1764A que ocurren en la secuencia del BCP en el ORF de pre-core/core son responsables de los cambios

nucleotídicos en X que se traducen a su vez, en los cambios aminoácidos K130M y V131I, respectivamente (Figura 24.3.5 A). Estos cambios incrementan la unión del factor hepatocitario nuclear 1 (HNF1) al DNA produciendo un potente efecto transactivador. Diversos estudios demostraron, que los pacientes con hepatitis B crónica infectados con dichas mutantes de HBx, presentan un mayor riesgo de desarrollar HCC.

Variaciones en la región pre-S / S. Algunas de las variantes fenotípicas observadas en la envoltura viral pueden tener relevancia por tres motivos: a) escape a la respuesta inmune del hospedador; b) escape a la detección diagnóstica; y c) escape dual a ambos eventos.

Si bien las **vacunas contra la hepatitis B** que contienen como inmunógeno el HBs Ag, inducen **protección completa contra la infección por el virus salvaje**, diferentes estudios demostraron la posibilidad de adquirir la infección por dicho virus aun en aquellos casos en los cuales se había administrado una adecuada inmunización activa / pasiva. Todas las vacunas anti-HBV actualmente comercializadas están compuestas por HBs Ag salvaje; es decir que en ellas no están incluidos los antígenos de superficie mutantes descritos hasta el momento en el mundo. Algunas de estas variantes que contienen HBs Ag mutado, además pueden escapar a la detección inmunológica por parte de algunos de los equipos comerciales usados para el diagnóstico de la infección por HBV y en los tamizajes de los bancos de sangre. Diversos autores documentaron la selección de mutantes de escape del HBV durante la aplicación de inmunoprofilaxis pasiva específica a pacientes que recibieron trasplante de hígado y a pacientes hemodializados, así como también en niños vacunados contra el HBV, que presentaban títulos protectores (igual o mayor a 10 mUI/ml) de anticuerpos anti-HBs. Estos estudios postulan que las mutaciones en el HBs Ag son inducidas o seleccionadas por exposición prolongada a altos niveles de anticuerpos anti-HBs y que los cambios producidos en la polimerasa viral (debido a que el marco abierto de lectura de la envoltura se yuxtaponen con el de Pol) podrían afectar, en diferente medida, la sensibilidad del virus a la terapia antiviral.

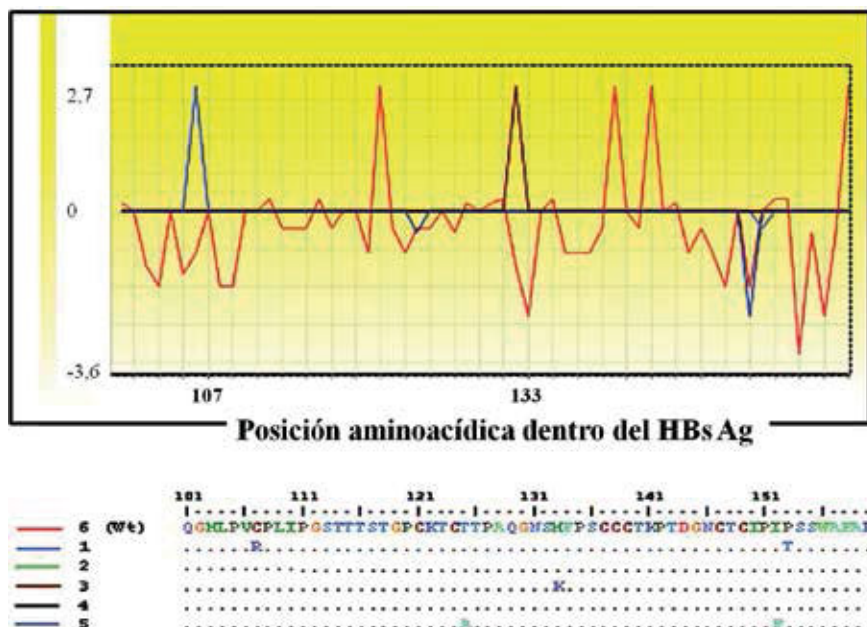


Figura 24.3.18. Perfil de hidrofiliidad de variantes del HBs Ag en un paciente con hepatitis crónica en presencia de anticuerpos anti-HBs cocirculantes en sangre periférica. Obsérvese por ejemplo el cambio del perfil hidrofílico ante el reemplazo de la cisteína 107 por arginina (mutación C107R). La sustitución de cisteínas involucradas en puentes disulfuro altera significativamente la estructura secundaria de la proteína y puede permitir la evasión a los anticuerpos neutralizantes. (De Cuestas *et al*, 2006; *J Clin Microbiol* 44:2191-8, 2006; reproducido con autorización de la *American Society for Microbiology Press*).

En 1988 Zanetti describió por primera vez una mutante S de escape al sistema inmune, que había sido aislada de un niño del sur de Italia que había recibido inmunización activa y pasiva post-exposición. La caracterización de dicha mutante permitió determinar que la sustitución en el gen S del nucleótido A por el G en la posición 587 (codón 145) era capaz de promover un cambio aminoacídico en el determinante *a* del HBs Ag (arginina en lugar de glicina) que permitía a este virus mutante **G145R** escapar al reconocimiento de los anticuerpos neutralizantes preexistentes.

Subsiguientemente se fueron reportando en otras partes del mundo, mutantes de escape S **naturales** (es decir, que aparecen en el curso natural de la infección por HBV) o **inducidos**, ya sea por inmunización activa (vacunas) o pasiva (gammaglobulina estándar o hiperinmune específica) con distintas mutaciones dentro del determinante *a*, e inclusive fuera de la RHP del HBs Ag (Figura 24.3.8A). Algunas mutaciones ocurridas por fuera de la RHP podrían a su vez de manera indirecta alterar la conformación del determinante *a*.

En la Figura 24.3.18 se observa el perfil de hidrofobicidad correspondiente a diferentes variantes virales detectadas en un paciente de Argentina con hepatitis crónica en presencia de anticuerpos anti-HBs. Obsérvese el efecto producido por el reemplazo de un residuo de cisteína por uno de arginina (C107R) o tirosina C107Y al modificarse el perfil de hidrofobicidad (asociado a la antigenicidad) del determinante *a*. El reemplazo de dicha cisteína impide la formación de enlaces disulfuro que mantienen la estructura secundaria de la proteína salvaje (Figura 24.3.8A). Si bien la emergencia de estas mutantes de escape en la proteína S no constituye aún un problema para la Salud Pública globalmente considerada, modelos matemáticos anticipan que la inmunización activa que masivamente se lleva a cabo a nivel mundial, dejará sin nicho al HBV salvaje, por lo que se ha estimado que al cabo de las próximas 5 décadas un virus mutado en la envoltura (por ejemplo G145R) reemplazará al salvaje.

La emergencia de mutantes de escape plantea un desafío a los planes de profilaxis activa y pasiva para HBV y al diseño de equipos comerciales usados para la detección del HBs Ag en el diagnóstico de la hepatitis B.

En la infección natural por HBV se han descrito además de las mutantes de escape a la respuesta inmune **humoral**, mutantes de escape a la respuesta inmune **celular**. De esta manera, mutaciones ocurridas naturalmente en epítopes del HBs Ag reconocidos por los LT citotóxicos, no permiten el reconocimiento de la célula infectada por parte de aquellos LT citotóxicos inicialmente sensibilizados.

Con respecto a mutantes del pre-S, merece destacarse la descripción de un caso clínico de un paciente con hepatitis B crónica avanzada y con hepatocarcinoma del que se aislaron variantes del HBV con mutaciones en la región pre-S. Dichas mutantes se caracterizaron por presentar una secuencia pre-S con 183 nucleótidos menos. Ello implica que la envoltura viral carecía de 61 aminoácidos, lo cual tiene obvias consecuencias para la interacción -y el reconocimiento- con los anticuerpos específicos.

Asimismo, otro estudio, demostró la emergencia de mutantes de escape en las que no se sintetizaba la proteína de envoltura pre-S2 por estar mutado el codón de iniciación ATG correspondiente, formándose entonces una proteína pre-S1 de tamaño subnormal expresando diferentes epítopes.

Diferentes estudios también han demostrado actividad transactivadora en proteínas pre-S2 truncadas.

Del conjunto de estos estudios se infiere la posibilidad de obtener resultados falsamente negativos en ensayos de diagnóstico inmunológico que utilizan como reactivo a anticuerpos monoclonales específicos para los antígenos pre-S circulantes o expresados en hepatocitos. Esta limitación ha sido recientemente superada mediante el uso de anticuerpos policlonales en algunos equipos de diagnóstico actualmente utilizados.

Variaciones en la región Pol. Aunque la introducción de la terapéutica antiviral llevó a la selección de varias mutantes de Pol que confieren resistencia a la mayoría de las drogas antivirales utilizadas actualmente en el tratamiento de la hepatitis B crónica (véase

"Tratamiento antiviral"), se debería tener en cuenta que si bien las mutantes naturales de la Pol son poco frecuentes, existen. Se entiende como mutante natural de la Pol, aquella que es detectada antes de iniciar la terapéutica antiviral, capaz de conferir resistencia primaria natural al tratamiento específico. Es decir, dicha mutante no emerge ni es seleccionada bajo la acción de fuerza alguna de selección ejercida por la terapéutica antiviral. De acuerdo con este concepto, es de gran relevancia clínica la detección de mutantes resistentes a los antivirales análogos de nucleósidos / nucleótidos actualmente utilizados en el tratamiento de la hepatitis B crónica antes de comenzar el régimen terapéutico con los mismos.

d) Persistencia de formas genómicas estables del HBV dentro de la célula. Luego del ingreso del HBV a la célula, las nucleocápsides son direccionadas al núcleo donde es liberado el DNA genómico viral. Este DNA circular, laxo, parcialmente bicatenario es convertido en DNAcc, el cual es utilizado como templado para la síntesis de los RNAm y del RNApp. El DNAcc puede permanecer en el núcleo celular por largos períodos de tiempo -meses o inclusive años- sin producción de los RNA antes mencionados y -por ende- sin replicación viral (Figura 24.3.9B).

Esta forma de DNAcc es de relevancia clínica, ya que se asocia a la resistencia viral al Interferón.

e) Infección de sitios privilegiados. El HBV puede infectar otras estirpes celulares -además de los hepatocitos- como son los linfocitos, las CDs y las células neuronales. Si bien por estudios de microscopía electrónica se documentó la presencia de partículas subvirales en vesículas endocíticas así como DNA del HBV en el citoplasma de CDs infectadas, en estas mismas células no se detectaron cápsides ni tampoco viriones. Esto último demuestra que las CDs actuarían solamente como CPA y no serían permisivas a la infección por HBV. Este hecho produce un desbalance en la acción de estas células del sistema inmune, como es la alteración en el perfil de citoquinas producido o de los receptores celulares expresados (por ejemplo, una disminución de TLR2). A su vez, se ha demostrado la presencia de HBs Ag y HBe Ag por inmunohistoquímica en el citoplasma de neuronas, células de la glía y del endotelio vascular, así como DNA del HBV -detectado por PCR- en líquido cefalorraquídeo. Mas aún, la prevalencia de infección por HBV es significativamente más elevada en aquellos pacientes que presentan enfermedades asociadas a desórdenes en las neuronas motoras, comparados con aquellos que padecen otros tipos de desórdenes relacionados con el SNC.

f) Integración del genoma viral al genoma celular. Si bien la integración del genoma del HBV al genoma celular no es un paso necesario para la replicación viral, este mecanismo permite también la persistencia viral.

La integración del genoma viral puede producir deleciones y/o rearrreglos en el genoma celular, que a su vez, pueden causar una desregulación del ciclo celular. Por dicho motivo, se considera que este evento tiene importantes implicancias en el desarrollo del carcinoma hepatocelular (HCC).

Como se discutirá más adelante (*Véase "Relación entre el HBV y el hepatocarcinoma celular [HCC]"*) en la mayoría de los genomas de HBV integrados los ORFs para las proteínas X y pre-S2 están conservados de tal manera que estos genes pueden ser transcritos normalmente. Ambas proteínas actúan regulando diferentes vías de transducción de señales con consecuencias tanto para la apoptosis como para la transformación celular.

6.1.2.3 Relación entre el HBV y el HCC.

Este es uno de los tumores más frecuentes del mundo ya que se observan 500 000 a 1 000 000 de casos nuevos cada año. Tiene especial incidencia en el sudeste asiático y en ciertas regiones de África al sur del Sahara, donde alcanza una tasa de 500 casos cada 100 000 habitantes (0,5 %). La principal causa asociada a este tumor es la **infección por HBV y/o por HCV (85-90% del total de los HCC. Aunque el riesgo de desarrollar este tumor es su-**

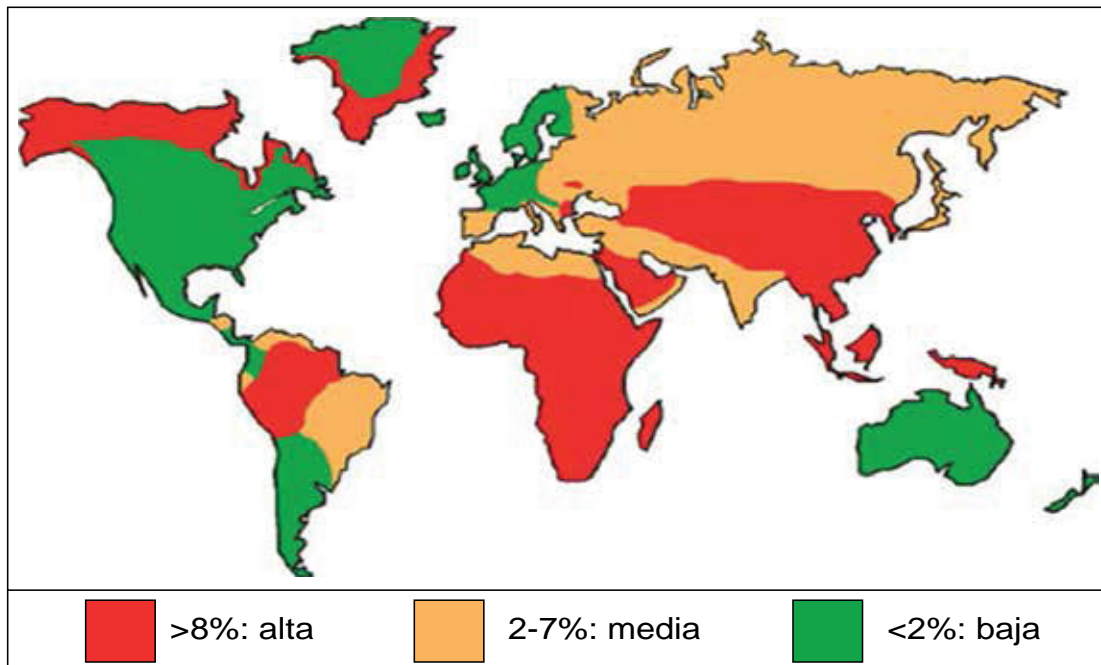


Figura 24.3.19. Prevalencia mundial de la infección por HBV.

perior en la infección por el HCV, el HBV es globalmente la principal etiología. La infección crónica por uno o ambos virus asociada a cirrosis constituye un perfil frecuente entre los factores de riesgo asociados al hepatocarcinoma. Entre un 60 y un 90% de los tumores ocurre en pacientes con cirrosis macronodular, cuyo riesgo es 5 veces superior al de los pacientes sin cirrosis. Existen evidencias epidemiológicas y genético-viroológicas que asocian al HBV con el cáncer hepático.

Epidemiología. Se ha documentado que en áreas endémicas de alta prevalencia del HBV (alta prevalencia de pacientes crónicamente infectados) existe una elevada incidencia de HCC (Figura 24.3.19). Cerca del 50 % de los pacientes con este cáncer exhiben HBs Ag o anticuerpos anti-HBc. La infección humana por HBV en estas áreas usualmente ocurre en la etapa perinatal. El riesgo de desarrollar un cáncer de hígado en estos pacientes está incrementado de 25 a 37 veces en comparación con los no portadores del HBV. Dado que otros factores que también se asocian al desarrollo de este tumor (hepatitis C, aflatoxina B1, alcohol, obesidad, diabetes, tabaco, anticonceptivos orales, etc.) existen desigualmente distribuidos en áreas de alta y baja prevalencia de individuos con hepatitis B crónica, se considera que el HBV puede inducir HCC aun en ausencia de otros agentes. En ciertas poblaciones, el riesgo de HCC en pacientes crónicos del sexo masculino alcanza un 40%, falleciendo casi el 50 % de los mayores de 40 años por esta causa. Como se mencionó anteriormente, existe un incremento de receptores funcionalmente activos para andrógenos en células hepáticas tumorales, lo cual podría contribuir a la elevada **incidencia de este cáncer en hombres (5-7 veces superior respecto a las mujeres)**. Otro factor que podría participar es la presencia en el genoma del HBV del *elemento de respuesta a los glucocorticoides*. Es posible que por un mecanismo análogo a la interacción entre los glucocorticoides y el DNA nuclear, ciertos corticoides puedan actuar sobre el DNA viral promoviendo la expresión de uno o más de sus genes. La estimulación permanente del **ERG** podría contribuir a la alta incidencia del HCC en la población masculina.

Factores genético-virales. Como se mencionó anteriormente, la integración del genoma del HBV al cromosoma celular no es una etapa requerida para la replicación viral. De ahí que la presencia de DNA viral insertado en el cromosoma probablemente sea el resultado de una recombinación ilegítima. Si bien la integración ocurre

al azar, los sitios con un contenido en GC similar al genoma viral podrían servir de blancos preferidos. Es un rasgo saliente que desde el punto de vista del genoma viral la integración ocurre a menudo en o alrededor de las secuencias **DR** (de 11 nucleótidos), lo cual ha servido para postular que los templados virales para la integración provendrían de los intermediarios replicativos del DNA viral. En la integración del genoma del HBV al cromosoma participa la enzima celular topoisomerasa 1. Más relevante que el sitio de la integración en el cromosoma celular es la **inestabilidad genómica** que de ello resulta. Una síntesis de los factores involucrados en la progresión de la infección por HBV que puede culminar en la cirrosis y en el carcinoma hepático se exhibe en la Figura 24.3.20 y en la Tabla 24.3.4.

Las alteraciones del genoma humano habitualmente detectadas consisten en deleciones, duplicaciones y traslocaciones. Los efectos dependerán del gen afectado y del grado de alteración de su expresión. Teniendo en cuenta que se han detectado estructuras invertidas repetidas de DNA viral y celular, es factible que los efectos de esta integración se ejerzan a miles de bases del sitio de inserción

Aproximadamente un 80-90% de los hepatocarcinomas exhiben secuencias de DNA del HBV integrado. El 61 % de los tumores hepáticos analizados hasta el presente muestran secuencias de DNA viral en los cromosomas 3, 11, 17 y 18. Se desconoce el significado de esta preferencia. El proceso carcinogénico reconoce múltiples fases asociadas a la iniciación, promoción y progresión tumorales.

Entre los diversos factores que podrían estar involucrados en la génesis del HCC se reconocen los siguientes: 1) integración al azar del genoma del HBV al cromosoma celular; 2) generación de insertos virales defectuosos en la región X (superpuesta con pre-C) y/o S; 3) expresión del transactivador X; 4) acumulación intracelular de la proteína S; y 5) actividad del promotor pre-S2/S. Concomitantemente, la respuesta inmune podría contribuir a la injuria celular, la inflamación y la regeneración hepática, factores de riesgo para la transformación hepatocítica. Los cambios genéticos múltiples del hepatocito podrían estar mediados por el HBV, ya sea mediante mutagénesis insercional o mediante la pérdida de la actividad de genes supresores de tumores. Como ejemplo de ello se ha documentado que la expresión de la proteína **p53** exhibe una

Factores asociados a un aumento del riesgo de progresión a cirrosis		
Del hospedador	Virales	Ambientales
Edad avanzada	Alta tasa de replicación viral	Co-infección con HDV, HIV o HCV
Sexo masculino	Genotipo (C>B)	Consumo de alcohol
Estado inmune	Variantes de HBV (mutaciones en el promotor del core)	Diabetes mellitus
		Obesidad
Factores asociados con riesgo aumentado de progresión a HCC		
Del hospedador	Virales	Ambientales
Edad avanzada	Alta tasa de replicación viral	Co-infección con HDV, HIV o HCV
Sexo masculino	Genotipo (C>B)	Consumo de alcohol
Cirrosis	Variantes de HBV (mutaciones en el promotor del core)	Diabetes mellitus
Historia familiar de HCC	Efecto transactivador de X sobre genes celulares	Obesidad
Etnia (asiáticos, africanos)		Tabaquismo

Tabla 24.3.4. Factores asociados a un aumento del riesgo de progresión a cirrosis y HCC.

mutación en el tercer nucleótido del codón 249 (transversión de G hacia C o T), la cual se atribuye a un efecto selectivo de la aflatoxina B1. En otros términos, la proteína p53 funciona habitualmente como un factor supresor de tumores, pero al estar mutada en el sitio crítico mencionado pierde su capacidad de detectar y reparar el DNA celular dañado, de detener el ciclo celular y disparar la apoptosis. Asimismo, la proteína X puede unirse a p53 e inhibirla (véase más adelante).

La pérdida funcional de genes supresores de tumores por inserción, mutación espontánea o mediante cofactores como la aflatoxina constituye uno de los factores necesarios en la emergencia del cáncer hepático.

El análisis del perfil de restricción del DNA de tumores hepáticos ha identificado regiones delecionadas en los cromosomas 4q, 5q, 10q, 11p, 13q, 16q y 17p. Se desconoce si existe una eventual relación causal entre la integración del genoma viral y estas delecciones cromosómicas alélicas. La delección tumor-específica sobre el cromosoma 17p incluye la pérdida del gen supresor p53. Este proceso ocurriría en dos eventos sucesivos: primero, la aparición de la mutación en la posición 249; posteriormente, la selección de una población celular que ha delecionado al gen "salvaje" p53.

Recientemente se documentó la integración del HBV en el gen de la telomerasa lo que promueve una activación de esta ribonucleoproteína asociada a la inmortalización celular.

Las proteínas X y pre-S2 pueden participar también de la transformación hepatocítica.

La proteína X regula la movilización intracelular de Ca⁺⁺ alterando la permeabilidad mitocondrial al interactuar con la proteína VDAC-3 (*Voltage Dependent Anion Channel 3l*) que es parte del complejo del poro de transición mitocondrial. Ello deviene en la activación de quinasas Ca⁺⁺ dependientes (como la tirosina quinasa PyK-2) que influye en la actividad de NF-κB y modifica múltiples genes y polipéptidos celulares indirectamente (Figura 24.3.21).

Teniendo en cuenta que la proteína X actúa como transactivadora de procesos transcripcionales, ésta puede participar en la proliferación de células ya transformadas por una mutación espontánea o por la integración genómica viral, o bien iniciar la transformación transactivando genes como *c-myc*, *c-fos* y *c-jun* para promover un crecimiento anómalo. La actividad transactivadora se realiza mediante interacciones proteína-proteína, actuando corriente arriba en las cascadas de transducción de señales intracelulares. Estas cascadas culminan con la activación de los factores de transcripción AP-1,

NF-κB, SP1 y Oct-1. HBx interactúa también con otras proteínas tales como las subunidades del proteasoma y los factores transcripcionales RPB5, TFIIB, TBP, TFIIF, ATF/CREB, ATFIII, c/EBP, NF-IL6, Ets, Egr, SMAD4, RXR alfa (un receptor nuclear de hormona), CBP-P300, p53, p53^{sen} e IκBα, entre otros, los cuales regulan la expresión de una gran variedad de genes involucrados en el control del ciclo celular, la proliferación o la apoptosis. Se cree que HBx modifica la localización y/o la actividad de dichas proteínas celulares. Por ejemplo, **HBx retiene a p53 en el citoplasma, impidiendo su actividad como supresora de tumores**. En forma análoga, la interacción de **HBx con IκBα impide la inhibición de ésta sobre NF-κB**, permitiendo que dicho factor transcripcional **promueva la resistencia a la apoptosis** (al inducir la expresión de las proteínas IAP [*Inhibitory Apoptosis Protein*] que aumentan la sobrevida) **y la proliferación celular**.

La mayor incidencia del HCC en hombres se debe a la activación del receptor para andrógenos inducida por la proteína X al promover un aumento de su fosforilación a través de la vía de señalización de c-Src quinasa (Figura 24.23.21) en un modo dosis de andrógeno-dependiente.

Asimismo, la proteína celular **Pin1** —una peptidil prolil isomerasa [PPIasa]— tiene una **influencia crucial sobre HBx**.

Pin1 se une específicamente a grupos fosfato promoviendo su isomerización en un conjunto de proteínas que contienen los motivos Ser/Thr-Pro, lo que induce cambios en su conformación, dado que dichos grupos fosfato pueden existir en *cis* o *trans*, debido a la naturaleza en anillo de 5 átomos de C del aminoácido prolina. La fosforilación de proteínas es un mecanismo crítico de regulación de su funcionalidad.

Si bien era conocido que la mayoría de las quinasas celulares modifican la actividad y localización de proteínas críticas del ciclo celular (como la ciclina D1, β cateninas, NF-κB, c-Jun y p53), actualmente se postula que más que el evento de fosforilación *per se* son críticos los cambios conformacionales promovidos por Pin1 luego de dicha fosforilación. **HBx posee una secuencia aminoácídica Ser-Pro que posibilita su fosforilación por quinasas y su regulación por Pin1. Esta PPIasa estabilizaría HBx aumentando su capacidad transactivadora**, y por ende, sinérgicamente a la actividad de la propia Pin1, inhibiría la apoptosis y promovería la proliferación celular. Se ha observado que un 20-50% de los HCC (en occidente y China, respectivamente) exhibe sobreexpresión de Pin1 (Figura 24.3.22).

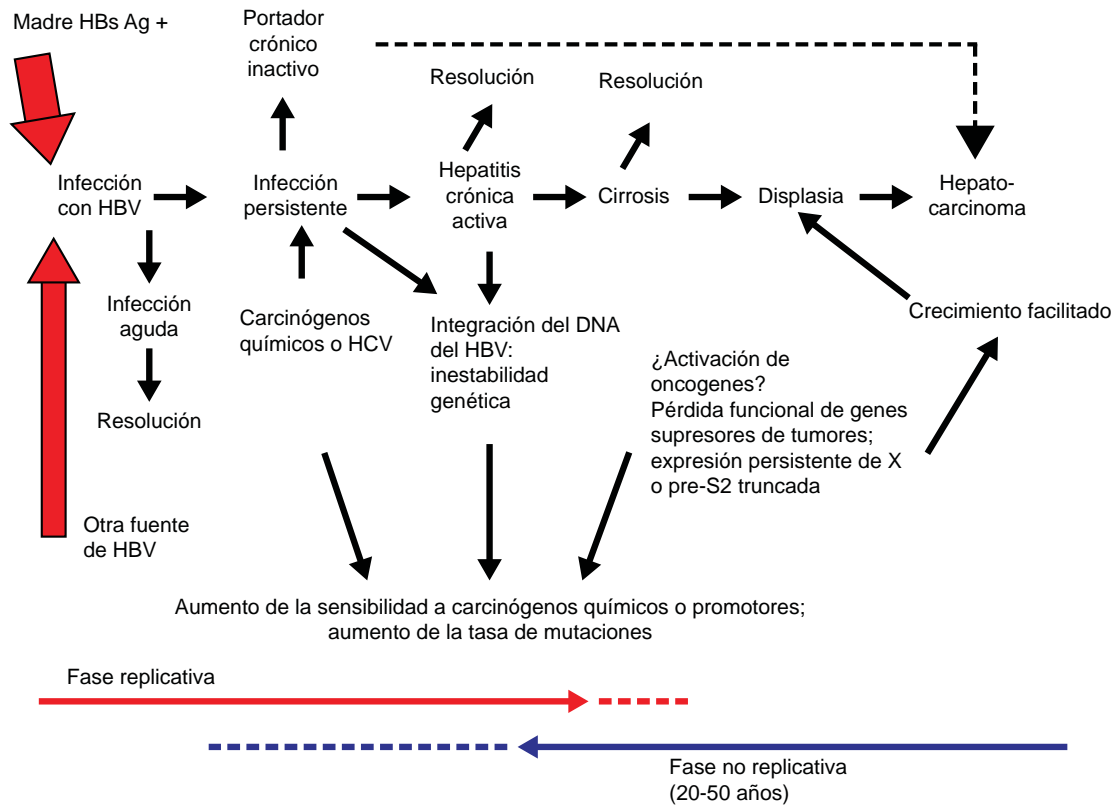


Figura 24.3.20. Síntesis de los factores que contribuyen al desarrollo del hepatocarcinoma en individuos infectados crónicamente con HBV. (De: Fetelson M; *Clin Microb Rev* 5:275-301, 1992).

La integración del genoma viral produce con frecuencia interrupciones del gen x; sin embargo, este gen truncado mantiene su capacidad transactivadora.

La proteína pre-S2 truncada en el extremo 3' posee también potencial transactivador. Estos productos génicos del HBV en el citoplasma se unen a la proteína PKC, produciendo la activación de la cascada de transducción de señales c-Raf-1 / MEK / ERK. El evento antes mencionado culmina con la activación del factor de transcripción AP-1, cuya acción desencadena la proliferación de los hepatocitos.

Como se mencionó anteriormente, la acumulación de la proteína S en el citoplasma de los hepatocitos de los pacientes crónicamente infectados produce las características imágenes en *vidrio esmerilado*. Esta permanente acumulación de proteína en el citoplasma es uno de los factores que produce la inflamación permanente del hígado.

7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El diagnóstico de la hepatitis B se basa en criterios epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. El diagnóstico de certeza se obtiene mediante la detección de los distintos antígenos virales y sus correspondientes anticuerpos: 1) HBs Ag / anti-HBs; 2) HBe Ag/anti-HBe; y 3) anti-HBc. El HBc Ag sólo puede detectarse en los hepatocitos y no en suero porque no circula libre, sino rodeado de la envoltura viral formando parte de la partícula de Dane. Estos marcadores serológicos permiten establecer el estadio evolutivo de la infección (aguda vs crónica), y en algunos casos tienen valor pronóstico.

Las técnicas más utilizadas en la actualidad para el diagnóstico serológico de la infección con HBV son los ensayos de inmunoenzimología (EIE) como el ELISA y el MEIA, que son técnicas de tercera generación altamente sensibles y específicas.

El radioinmunoensayo (RIA), también es una técnica de tercera generación con una sensibilidad y especificidad similar a la de los EIE. Sin embargo, su uso es muy limitado debido a que se trabaja con material radiactivo. A modo de ejemplo, estas pruebas son capaces de detectar hasta 0,1-0,5 ng de HBs Ag/ml de suero, a diferencia de las técnicas de primera, segunda y tercera generación utilizadas anteriormente como la inmunodifusión (sensibilidad: 5000 ng/ml), la contraelectroforesis (sensibilidad: 1000 ng/ml) y la hemaglutinación pasiva (sensibilidad: 100-500 ng/ml), respectivamente. También se utilizó en el pasado para la detección del HBs Ag la reacción de hemaglutinación reversa pasiva, técnica de tercera generación que poseía una alta sensibilidad (20-50 ng/ml) pero una baja especificidad (más del 20% de las reacciones correspondían a resultados falsamente positivos).

A pesar de la exquisita sensibilidad de las técnicas de ELISA, MEIA y RIA, éstas no permiten asegurar con un 100% de certeza la ausencia del HBV en una muestra sérica.

La transfusión de sangre proveniente de hemodonantes HBs Ag-negativos por ELISA produce la infección en aproximadamente el 1% (y hasta el 4% en el sudeste asiático) de los receptores transfundidos. La –así denominada– infección oculta por HBV (DNA viral detectable en suero o hígado en ausencia de HBs Ag, irrespectivamente de la presencia o no de anticuerpos específicos; véase el ítem 24.3.7.3) ha sido documentada en porcentajes variables mediante la tecnología NAT (*Nucleic Acid - Amplification Testing*) especialmente en países donde la prevalencia de los anticuerpos anti-HBc es superior al 10%.

7.1 MARCADORES SEROLÓGICOS A SOLICITAR

En la Figura 41.7 del Capítulo 41 (Diagnóstico de Hepatitis virales) se indica conjuntamente la secuencia temporal de marcadores a solicitar durante el curso de una infección por HAV, HBV o HCV.

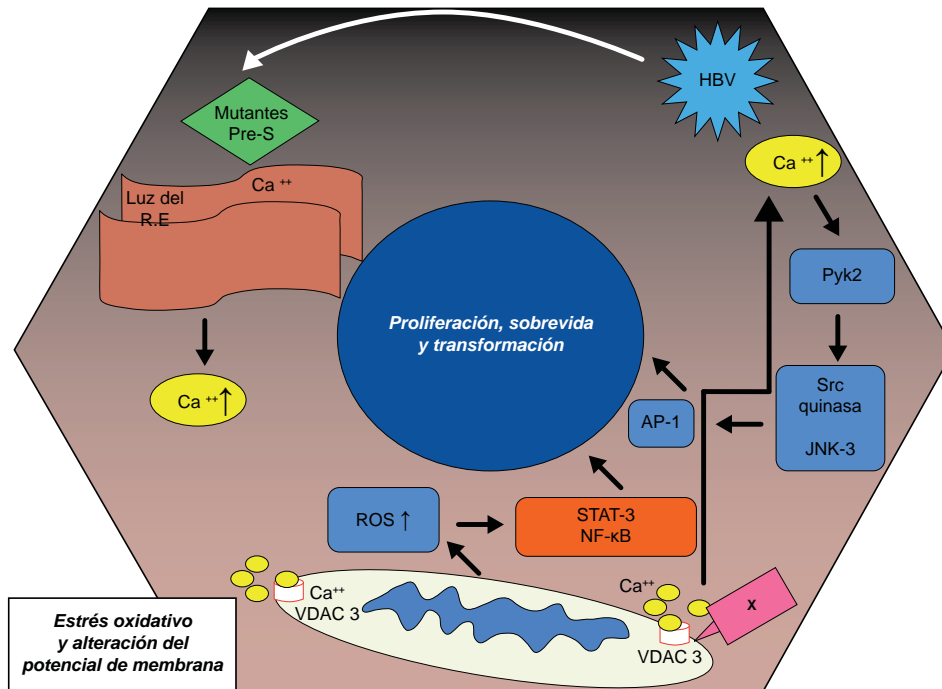


Figura 24.3.21. Cascadas de algunas de las señales activadas por HBV durante la oncogénesis. La expresión de las proteínas S y X se asocia a un aumento del nivel del Ca⁺⁺ citosólico. X también reside en la mitocondria, lo que promueve una alteración del potencial de membrana mitocondrial. Al ingresar Ca⁺⁺ a través de porinas integrales de membrana como VDAC3 (*Voltage-Dependent Anion Channel 3*) –un componente del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial– se promueve el estrés oxidativo mitocondrial, y la liberación de especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*). Ello deviene en la activación constitutiva de factores de transcripción tales como STAT-3 y NF-κB, que traslocados al núcleo participan en la inhibición de la muerte celular, la proliferación y la transformación celular. La proteína X –a través del aumento del Ca⁺⁺ citosólico– también activa una Tirosina quinasa (Pyk2) que activa la vía de la Src quinasa y de JNK-3, las que mediante cascadas de señales, promueven la formación del dímero transcripcional AP-1 (c-fos unido a c-jun) que también traslocado al núcleo participa en la proliferación celular.

Es importante mencionar que las pruebas serológicas detectan la presencia de antígenos o anticuerpos libres en circulación, y no los que están formando inmunocomplejos. Es decir que cuando ambos están presentes, sólo se detecta la fracción en exceso (que no forma un complejo inmune) del analito correspondiente. En las figuras 24.3.16A y B y en la Tabla 24.3.5 se esquematizan los marcadores detectados en los diferentes estadios de la infección por HBV.

HBs Ag: es el primer marcador serológico que aparece tras la infección aguda con HBV. Generalmente, se comienza a detectar entre las semanas 6 y 10 post-infección, antes de la aparición de los síntomas y del incremento en los niveles séricos de las aminotransferasas hepáticas, aunque en algunos casos puede llegar a detectarse ya a la semana de haber sido expuesto al virus. Si la infección aguda se resuelve, los niveles séricos de HBs Ag comienzan a declinar a los 4-6 meses post-infección, instancia en la que los niveles serológicos de los anticuerpos anti-HBs comienzan a aumentar. **Si el HBs Ag se detecta en suero durante más de 6 meses se considera que el paciente ha evolucionado hacia una infección persistente por HBV.** Se busca dicho antígeno en los tamizajes serológicos de hemodonantes realizados en los Bancos de sangre para descartar portadores. Si el resultado es positivo, significa que esa sangre está infectada y por ende se descarta; si es negativo se investiga la existencia de anticuerpos anti-HBc totales. Si con esta última determinación se obtiene un resultado positivo –por una recomendación de la Asociación Argentina de Hemoterapia– se descarta esa unidad de sangre. Se puede cuantificar el HBs Ag, con objeto de monitorear la terapéutica antiviral. Las tasas más elevadas entre el HBs Ag y el DNA del HBV corresponden al estado de portador inactivo.

Anticuerpos anti-HBs: son los anticuerpos neutralizantes. Cuando se detectan en suero indican habitualmente que el paciente resolvió la

infección y que está inmunizado contra el virus. Es el único marcador serológico que aparece en individuos vacunados. El título de anti-HBs asociado a inmunidad protectora se considera que es igual o mayor a 10 mUI/ml. Si el paciente está cursando una hepatitis B aguda, y en el momento en que los niveles de HBs Ag comienzan a declinar (4-6 meses post-infección), los niveles séricos de anti-HBs aumentan, significa que la infección tiende a remitir y que el enfermo no evolucionará hacia una infección persistente. Estos anticuerpos permanecen detectables durante varios años. En la infección aguda existe un **período de tiempo de 2-4 semanas en el cual en suero no se detectan ni HBs Ag ni anticuerpos anti-HBs, lo cual se denomina período de ventana inmunológica.** Dada la alta sensibilidad de las técnicas utilizadas en la actualidad, es muy infrecuente observar dicho período de ventana.

IgM anti-HBc: son los primeros anticuerpos en aparecer tras la infección con HBV. Se detectan en suero poco tiempo después de la aparición del HBs Ag, y permanecen detectables durante 6-24 meses post-infección. La determinación de estos anticuerpos es muy útil para el diagnóstico de la hepatitis B aguda. Los IgM anti-HBc también pueden detectarse durante las reactivaciones de la hepatitis B crónica o las exacerbaciones de la enfermedad hepática, aunque en estos casos la IgG específica exhibe niveles séricos superiores.

IgG anti-HBc: estos anticuerpos indican que un individuo está o estuvo infectado con el virus, y persisten durante toda la vida. Cuando aparecen en el transcurso de la hepatitis B aguda, van paulatinamente reemplazando a los IgM anti-HBc. Cuando los anticuerpos IgG anti-HBc aparecen junto con los anti-HBs luego de haberse seronegativizado el HBs Ag, significa que el paciente resolvió la infección. La presencia de IgG anti-HBc en pacientes con antigenemia HBs (mayor a 6 meses) es indicativa de infección persistente por HBV. Es importante señalar, que en realidad los EIE comerciales

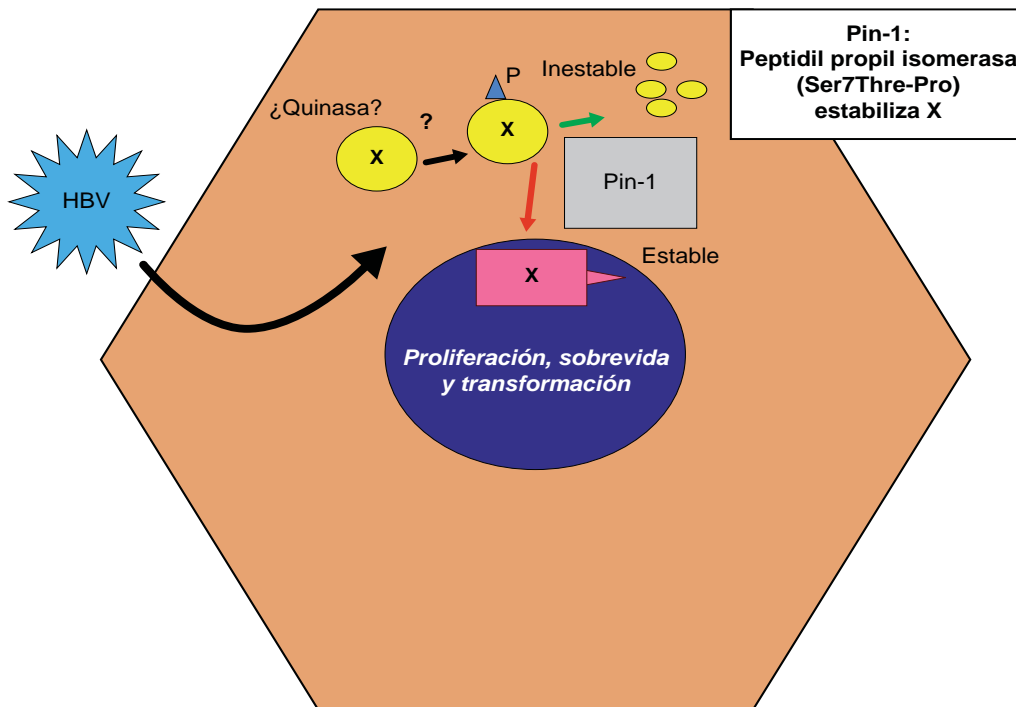


Figura 24.3.21. Papel de la proteína Pin-1 en la estabilización de la proteína X, lo que potencia su papel en la génesis del hepatocarcinoma celular.

utilizados actualmente para la detección de anti-HBc, no detectan exclusivamente IgG anti-HBc, sino que detectan anticuerpos anti-HBc totales incluyendo IgM específica. De esta manera, la presencia de IgG se puede inferir cuando los anti-HBc totales están presentes y los IgM anti-HBc no son detectables.

HBe Ag: su presencia, junto con el HBs Ag, generalmente indica que el virus se está replicando en forma activa, que el paciente es altamente infeccioso (mayor contagiosidad) y –habitualmente– que hay inflamación hepática, pero no establece si la infección es aguda o crónica. Se lo detecta en suero entre la semana 6 y 12 post-infección. En aquellos pacientes donde se limite la infección, los niveles séricos del HBe Ag van a declinar con seroconversión a anti-HBe y disminución marcada de los niveles del DNA viral. La persistencia en circulación del HBe Ag por más de 3-4 meses generalmente no es un marcador de buen pronóstico, dado que sugiere que el individuo va a evolucionar hacia la cronicidad. La mayoría de los individuos que son seropositivos para HBe Ag, tienen DNA viral circulante. Sin embargo, alrededor de un 10% de los pacientes con hepatitis crónica activa que exhiben antigenemia HBe, no tienen DNA viral sérico. En las cirrosis, ese porcentaje de discrepancia se eleva al 30%. En la mayoría de los casos la discrepancia es transitoria, ya que posteriormente se observa seroconversión a anti-HBe. En muy pocos casos, sin embargo, existe antigenemia HBe persistente, en ausencia de DNA sérico viral, atribuible a la posible síntesis del HBe Ag a partir del DNA viral integrado.

Anticuerpos anti-HBe: la presencia de estos anticuerpos se asocia en general con una menor infectividad (menor contagiosidad) del paciente, y con un buen pronóstico de la infección, dado que habitualmente implica que el virus dejó de replicar y que el paciente está comenzando a resolver la infección. Sin embargo, en algunos individuos que son seronegativos para HBe Ag pero seropositivos para anti-HBe se les detecta replicación viral activa, con niveles séricos de DNA viral elevados ($>10^6$ copias/ml) y niveles séricos fluctuantes de las aminotransferasas hepáticas. La ausencia de HBe Ag en estos casos se debe a mutantes de *pre-core* y/o del BCP (véase variantes de *pre-core/core*). Estas mutantes se las puede encontrar en el 10-15% de los pacientes con hepatitis B crónica en EE.UU. y Europa, y en el 40-80% de los pacientes con hepatitis

B crónica en el sudeste europeo, Medio Oriente, y Asia. Cuando se comparan a estos pacientes infectados con cepas HBe-*minus* con aquellos que presentan infección crónica pero con seropositividad para el HBe Ag, se observa que los primeros poseen menores niveles séricos de DNA viral y períodos intermitentes de actividad necroinflamatoria en hígado con respecto a los segundos. Además este grupo de pacientes –infectados con mutantes HBe-*minus*– requiere generalmente un tratamiento con antivirales por un período de tiempo más prolongado para suprimir la replicación viral, en relación a los pacientes crónicos con HBe Ag positivo.

Además de las determinaciones serológicas, en algunos casos se realizan pruebas de biología molecular para la detección o cuantificación del DNA viral. Los estudios de biología molecular no son necesarios para el diagnóstico de la hepatitis B aguda; sin embargo, en los pacientes con infección crónica por HBV la detección cuantitativa del DNA viral (carga viral) es de gran utilidad. El diagnóstico y la necesidad de tratamiento requieren la interpretación conjunta de los niveles del DNA viral, las aminotransferasas hepáticas y los hallazgos histológicos. Evidencias recientes sugieren que la genotipificación del HBV también puede ser de utilidad para situaciones definidas, como pronosticar la progresión y severidad de la infección con ciertos genotipos, la respuesta a la terapéutica y la resistencia a los antivirales (véase el ítem 24.3.7.2).

7.2 APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El diagnóstico de la infección aguda o crónica con HBV se efectúa mediante las pruebas serológicas descriptas anteriormente. Sin embargo, en determinadas situaciones es útil la realización de ensayos para detectar, cuantificar y caracterizar el DNA viral en suero.

PCR cualitativa: En la gran mayoría de los casos, el diagnóstico de la infección aguda se realiza mediante la detección serológica del HBs Ag y de los anticuerpos IgM anti-HBc. Como se mencionó anteriormente, conjuntamente con el HBs Ag pueden detectarse en suero marcadores de replicación viral activa tales como el HBe Ag y el DNA viral. Este último se detecta en suero 21 días antes de la aparición del HBs Ag. Si los resultados obtenidos en los ensayos

Estado del paciente	HBs Ag	Anticuerpos anti-HBs	HBe Ag	Anticuerpos anti-HBe	Anticuerpos anti-HBc	DNA del HBV
<i>Infección aguda</i>						
- Temprana	+	-	+	-	IgM	+
- Período de ventana	-	-	-	+/-	IgM	+/-
- Recuperación	-	+	-	+	IgG	+/-
<i>Infección persistente</i>						
- Estado activo	+	-	+	-	IgG, IgM ¹	>10 ⁵ copias/mL
- Estado inactivo	+	-	-	+	IgG	<10 ⁵ copias/mL
- Reactivación	+	-	+/-	-	IgG, IgM	>10 ⁵ copias/mL
- Con variante HBe Ag-minus (mutantes de pre-core/core)	+	-	-	+	IgG	>10 ⁵ copias/mL
- Oculta	-	+/-	-	+/-	+/-	+
<i>Infección pasada</i>	-	+	-	-	IgG	-
<i>Vacunado</i>	- ²	+	-	-	-	-

Tabla 24.3.5. Marcadores séricos que identifican el estado del paciente. ¹Se pueden detectar bajos niveles de IgM. ²El HBs Ag podría detectarse transitoriamente en suero durante las primeras 24 horas luego de haber recibido la vacuna.

para determinar la presencia del HBs Ag son discordantes, la detección del genoma viral en suero es una herramienta de máxima utilidad para el diagnóstico de la infección aguda. Dicha determinación también es útil para el diagnóstico rápido de infección ante un accidente percutáneo en alguna de las poblaciones de riesgo como por ejemplo en profesionales de la salud.

Otras indicaciones de solicitud de PCR para HBV son: **1)** la investigación de replicación viral en pacientes con HBs Ag y anticuerpos anti-HBe circulantes; **2)** la determinación de una infección oculta en individuos sin antigenemia HBs y eventual positividad para otro marcador serológico del HBV; **3)** seguimiento de la infección en programas de trasplante hepático; etc.

Genotipificación: Como se mencionó anteriormente existen cada vez más evidencias que asocian la evolución del curso natural de la infección, el cuadro clínico inicial y la respuesta al tratamiento antiviral, con el/los genotipo/s del HBV involucrados. Más aún, se ha postulado que la genotipificación del HBV debería implementarse antes de iniciar la terapéutica antiviral. Si bien actualmente se cuenta con diferentes técnicas para la genotipificación del HBV, las más utilizadas son la secuenciación nucleotídica, la RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) y el LiPA (*Line Probe Assay*; Innogenetics Gent, Belgium). También se ha desarrollado un equipo de tipificación mediante microdisposiciones (*microarrays*) del DNA (HBV DNA-Chip assay prototype; bioMerieux, France); véase el fundamento de la técnica en el capítulo 9 "Diagnóstico virológico".

Secuenciación nucleotídica: El genotipo viral de una cepa de HBV puede determinarse luego de la secuenciación nucleotídica del genoma completo o de una porción de éste (por ejemplo, región pre-S/S) o pre-core/core y su posterior análisis filogenético con programas de computación específicos. La secuenciación nucleotídica directa de los fragmentos de PCR –sin previo clonado– puede no detectar coinfecciones con diferentes genotipos del HBV, ya que se requiere un umbral cercano al 30% del total de DNA viral a amplificar por PCR para ser observable en la secuencia nucleotídica. Debido a la circulación de cepas recombinantes, una adecuada genotipificación del HBV debe ser realizada con la secuencia del genoma completo de la cepa analizada. Es importante tener en cuenta que ésta es una metodología costosa que requiere de equipos especializados y personal altamente entrenado, por lo que su utilización en la genotipificación del HBV no se realiza rutinariamente para diagnóstico o estudios de epidemiología molecular (véase la Figura 9.31 del Capítulo "Diagnóstico virológico").

RFLP: Se realiza una digestión con enzimas de restricción al producto de la amplificación por PCR de una porción de la región pre-S/S de la cepa a analizar. El genotipo del HBV es asignado al comparar el perfil de fragmentos de restricción obtenido con patrones característicos de cada genotipo. Es una técnica menos costosa que la secuenciación nucleotídica, y de más fácil acceso para los laboratorios de mediana complejidad. Es por esto que es muy utilizada para el diagnóstico y los estudios de epidemiología molecular. A diferencia de la secuenciación nucleotídica directa, con la RFLP se pueden detectar coinfecciones con diferentes genotipos que contribuyen hasta con sólo un 10% al total de la población viral analizada. A su vez una desventaja de esta técnica es que puede no detectar cepas recombinantes debido a que realiza un análisis parcial del genoma viral, a diferencia de la secuenciación nucleotídica de genomas completos (véase la Figura 9.29 del Capítulo "Diagnóstico virológico").

LiPA: Se realiza una hibridación en soporte sólido con sondas específicas para cada genotipo utilizando el producto de PCR biotinilado obtenido al amplificar el DNA de la cepa a estudiar (región pre-S/S). El genotipo del HBV se determina al comparar las bandas reactivas en la muestra a estudiar y un patrón de referencia. Los equipos para realizar el ensayo de LiPA se comercializan mundialmente, lo que hace que esta técnica además de poseer bajo costo y fácil realización sea comparable entre diferentes estudios. Comparada con la secuenciación nucleotídica, el LiPA exhibe una sensibilidad del 99,3% y una especificidad del 100%.

Microdisposiciones del DNA (HBV DNA-chip): se utilizan *spots* de oligonucleótidos del HBV (sondas de captura) dispensados en superficies de vidrio para promover la hibridación con amplicones obtenidos mediante PCR de la muestra de DNA del HBV del paciente que son marcados con biotina. Después de la tinción con un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, la intensidad de la fluorescencia emitida es escaneada con un lector láser y los resultados obtenidos, son analizados con un *software* apropiado en una computadora. Se utilizan más de 83 000 sondas por chip en una superficie total de 8 x 8 mm² en *spots* de 20 µ². Comparado con la secuenciación nucleotídica, el HBV DNA-Chip exhibe una sensibilidad del 97,5% y una especificidad del 97,8%.

Carga viral: La cuantificación del genoma viral en suero se puede realizar mediante **técnicas de amplificación de la señal** (hibridación líquida, sistema de captura híbrida, *branched DNA*), mediante **técnicas de amplificación de la secuencia blanco** (Am-

plicor HBV Monitor Test, Cobas Amplicor HBV Monitor Test, TMA/NASBA) o por PCR a "tiempo real" (*real-time* PCR).

La determinación de la carga viral del HBV (genomas/ml) está indicada en las siguientes situaciones:

a) Para distinguir estados activos, inactivos, y reactivaciones en la infección crónica: los pacientes con hepatitis B crónica pueden presentar de manera continua marcadores de replicación viral activa o pueden alternar entre un estado activo (con replicación viral activa) y uno inactivo (sin replicación viral activa). Se considera que hay reactivación viral cuando los pacientes pasan de un estado inactivo a uno activo, independientemente de la reaparición del HBe Ag en suero. El punto de corte que permite distinguir un estado de otro ha sido definido en 10^5 copias de DNA viral/ml. De esta manera, si los niveles del genoma del HBV están por debajo de este valor de corte, se considera que el individuo se encuentra en un estado inactivo de la infección viral; si están por encima de dicho valor, el individuo se encuentra en un estado de replicación viral activa. La ausencia de replicación viral en portadores crónicos del HBV parece asociarse a un menor riesgo de HCC, aun en presencia de cirrosis. En pacientes infectados con mutantes de *pre-core/core* (cepas con fenotipo *e minus*), el HBe Ag (ausente) deja de ser un marcador de replicación viral activa, y en estos casos la detección del DNA del HBV en suero es una herramienta útil para la confirmación de una reactivación o de un estado activo de replicación viral. Los pacientes con variantes de *pre-core/core* pueden alternar períodos de inactividad (niveles séricos de aminotransferasas normales, y DNA viral $<10^5$ copias/ml) con reactivaciones espontáneas, caracterizadas por la aparición de viremia y elevación de las transaminasas. Además, en las infecciones por las mencionadas mutantes de *pre-core/core* la carga viral suele ser más baja que en aquellas por cepas salvajes.

b) Para monitorear la respuesta al tratamiento antiviral: el nivel sérico de DNA del HBV en suero es útil para predecir la respuesta al tratamiento antiviral. Una carga viral baja se asocia a una mayor respuesta virológica en pacientes tratados con IFN- α o antivirales orales. También es de gran utilidad para el seguimiento de los pacientes con hepatitis B crónica que están recibiendo tratamiento. Es aconsejable determinar la carga viral antes, durante y después del tratamiento. La emergencia de cepas del HBV resistentes a la terapéutica con antivirales análogos de nucleósidos / nucleótidos se caracteriza por la reaparición del DNA viral en suero luego de declinar sus niveles a valores muchas veces indetectables.

Estudios genómicos de resistencia a antivirales: Es de suma utilidad determinar la eventual resistencia de una cepa del HBV a un antiviral específico antes y durante el tratamiento con esa droga. Existen varias técnicas que pueden utilizarse para determinar la resistencia del HBV a los antivirales y en todas ellas se analiza la región con actividad de **transcriptasa inversa/DNA polimerasa-DNA dependiente de la Pol.** Las mutantes del HBV resistentes al tratamiento antiviral con análogos de nucleósidos/nucleótidos presentan mutaciones puntuales en los subdominios A, B, C, D o E de la polimerasa viral. Como se mencionó anteriormente, dentro del subdominio C, las mutaciones puntuales en el motivo YMDD [Tyr-Met-Asp-Asp], son las más frecuentes y son clínicamente significativas, dado que la mayoría son seleccionadas durante el tratamiento antiviral con análogos de nucleósidos, tales como lamivudina, contribuyendo así al fracaso terapéutico. Las técnicas utilizadas para determinar la resistencia a diferentes antivirales son la RFLP, la secuenciación nucleotídica directa y en el caso particular de la detección de cepas resistentes a lamivudina el ensayo de LiPA.

7.3 INFECCIÓN OCULTA CON HBV

Se define a la infección oculta por la detección del DNA viral en suero o en hígado de pacientes HBs Ag (-), con o sin marcadores serológicos de infección previa, y sin ningún otro marcador serológico específico que avale la presencia del HBV.

En Buenos Aires se observó que entre pacientes HBs Ag (-) con anticuerpos anti-HBc (+), coinfectados con HIV y/o HCV, la infección oculta por HBV alcanzó un 2%.

7.4 CAUSAS DE SERONEGATIVIDAD PARA HBs Ag EN INDIVIDUOS VIRÉMICOS

- 1) Bajos niveles de HBs Ag para ser detectados en suero mediante los EIE convencionales, ya sea por la coinfección con HCV o HDV, o bien por la emergencia de mutaciones en el ORF de la envoltura del HBV. Se observó que estos factores pueden disminuir la expresión o secreción del HBs Ag.
- 2) Mutaciones en el gen S que afectan la antigenicidad y por ende su detección por los EIE convencionales que se disponen en la actualidad.
- 3) La presencia de inmunocomplejos. Los EIEs comerciales para la detección de HBs Ag no detectan el antígeno que se encuentra formando inmunocomplejos, sino el que está en exceso libre en circulación.

7.5 CAUSAS DE CODETECCIÓN DE HBs Ag Y ANTICUERPOS ANTI-HBs

- 1) Presencia de una mutante S de escape al sistema inmune del hospedador que no pueda ser neutralizada por anticuerpos anti-HBs previos.
- 2) El EIE comercial para la detección del anti-HBs puede detectar una variedad de anticuerpos subtípicos, incluyendo anti-y, anti-d y anti-w además del anti-a. De esta manera, un paciente previamente infectado con una cepa del HBV de subtipo *ayw* presentará en circulación anticuerpos anti-y, anti-w y anti-a. Si bien en una subsiguiente infección con un subtipo *adw* los anticuerpos anti-a son eficientes para lograr la neutralización viral, los anti-y previos quedarían libres para ser detectados por los equipos comerciales de EIE.

8. EPIDEMIOLOGÍA

El material más infectante es la sangre del enfermo o portador del HBV, donde se han detectado hasta 10^{14} partículas / ml (al menos 10^7 son partículas de Dane), y una concentración menor en el semen y otros fluidos o secreciones. Son necesarias 100 partículas para infectar a primates susceptibles no inmunes.



8.1 RESERVORIO

Está constituido por los enfermos de hepatitis B y los portadores crónicos del virus. Se estima actualmente que hay aproximadamente 350 000 000-460 000 000 de portadores crónicos del HBV en el mundo. Los portadores crónicos –asintomáticos– del HBV constituyen un problema complejo, debiéndose tomar medidas en el ambiente familiar y del trabajo. Un contacto familiar íntimo con un portador crónico tiene un 25% de probabilidades de adquirir la infección.

Pese a que los chimpancés y los mamíferos *Tupaia belangeri* son susceptibles a la infección con HBV, no se ha reconocido un reservorio animal en la naturaleza.

8.2 FUENTES DE INFECCIÓN

Aunque se ha detectado HBs Ag en diversos fluidos corporales, sólo la sangre y sus derivados, la saliva y el semen han sido documentados fehacientemente como fuentes de infección en experimentos de transmisión a primates. Las secreciones vaginales, el calostro, la orina y las heces humanas pueden ser también vehículos del HBV. Por otra parte, se ha detectado HBV en el líquido cefalorraquídeo y el líquido pleural. La transmisión a través de las heces es muy infrecuente, probablemente debido a la acción de enzimas secretadas desde la mucosa o bien producidas por la flora intestinal bacteriana normal.

8.3 VÍAS DE TRANSMISIÓN

La principal vía de transmisión es la exposición percutánea y de mucosas a fluidos corporales infectados. El ingreso por vía parenteral se produce especialmente mediante transfusiones de sangre o derivados (actualmente sólo en productos con un control inadecuado, o conteniendo mutantes de escape a la detección en el HBs Ag,

o bien con infección oculta por HBV), por compartir agujas contaminadas para inyección de drogas ilícitas, hemodiálisis, tatuajes, acupuntura o accidentes percutáneos. El virus también se transmite por vía sexual y vertical (generalmente perinatal, aunque un 5-10% de los neonatos serían infectados en la vida intrauterina). Dado que el HBV conserva su viabilidad durante períodos iguales o mayores a 7 días en superficies ambientales (y en algunos casos hasta varios meses), es posible también la transmisión indirecta mediante objetos inanimados. La presencia de HBe Ag en el suero se correlaciona con elevados títulos virales y con mayor infectividad.

8.4 PREVALENCIA E INCIDENCIA

Según la frecuencia de detección de los marcadores HBs Ag y anti-HBs en una población determinada, ésta puede ser ubicada entre las áreas de baja, mediana o alta prevalencia del HBV. Los valores correspondientes a diferentes áreas del planeta se observan en la Tabla 24.3.6. En el año 2006 la seroprevalencia de HBs Ag y anti-HBc en donantes de sangre de Argentina fue de 0,31 % y 3,08 %, respectivamente. La Argentina está ubicada entre las áreas de baja prevalencia. Como era esperable estas seroprevalencias fueron mayores en poblaciones de alto riesgo de Argentina, como se muestra en la Tabla 24.3.7.

La **incidencia de hepatitis B es mayor en hombres** que en mujeres, aunque se observan variaciones en relación con la edad y el modo de transmisión. Análogamente, es más probable la instalación del estado de portador en hombres que en mujeres. Presumiblemente, estas diferencias entre ambos sexos se relacionarían tanto con disimilitudes en la respuesta inmune al virus, como con la **influencia de los niveles de andrógenos en la mayor vulnerabilidad masculina a la infección, atribuida a la actividad de la proteína X**, que a su vez activa al receptor de andrógenos (un factor transcripcional presente en hepatocitos) en un modo dosis de andrógeno-dependiente.

8.5 MORTALIDAD

Se presenta más frecuentemente asociada a la enfermedad crónica que a la hepatitis aguda. En la etapa aguda, la mortalidad de los infectados asciende al 0,2-0,5%, y entre los casos ictericos al 0,5-1,5%. En las hepatitis fulminantes, la mortalidad oscila en alrededor del 1-4 %. Entre el 15 y el 25% de los infectados crónicos fallecen prematuramente debido a cirrosis y/o a HCC.

8.6 CONTROL

Para un adecuado control se requiere: **1)** detectar HBs Ag y anti-HBc en bancos de sangre mediante técnicas de alta sensibilidad; **2)** no efectuar mezclas de plasmas; **3)** esterilizar todo material quirúrgico; **4)** utilizar material estéril descartable; **5)** proveer la inmunización pasiva y/o activa contra el HBV cuando corresponda; **6)** practicar adecuadas normas de higiene, cumpliendo estrictamente con las normas de bioseguridad. Sería deseable una adecuada identificación de los portadores crónicos inactivos del virus. Recientemente se ha introducido en algunos bancos de sangre la tecnología NAT, con el objeto de descartar muestras conteniendo ácidos nucleicos del HBV (así como del HIV y del HCV; véase el Capítulo 44: "Infecciones virales transmisibles por vía transfusional").

9. PROFILAXIS

La profilaxis para la hepatitis causada por el HBV puede ser activa o pasiva. En el primer caso, se utilizan vacunas preparadas con HBs Ag (con o sin la adición de preS-2), y en el segundo, gammaglobulina humana hiperinmune específica para HBV (HBIG), o –sólo si ésta no estuviera disponible– gammaglobulina estándar (también denominada normal).

9.1 PROFILAXIS ACTIVA

En 1970, el plasma proveniente de un individuo infectado con HBV fue inactivado mediante ebullición, se lo diluyó 1/10 y se lo

inoculó a individuos sanos. Debido a que el plasma de esta manera había perdido las propiedades infectivas del HBV pero no las inmunogénicas, los receptores no desarrollaron enfermedad ante la vacunación y estuvieron protegidos frente al desafío posterior con el virus. Fue la primera evidencia que dio lugar al subsiguiente desarrollo de la vacuna obtenida mediante plasmaféresis de portadores crónicos humanos del HBV. En 1981, como consecuencia de los trabajos dirigidos por W. Szmunes, se otorgó en EE.UU. la licencia a la primera vacuna contra hepatitis B de uso humano generalizado. Esta vacuna es hoy identificada como de **"primera generación"**. Desde 1986 se cuenta, además con vacunas recombinantes obtenidas por ingeniería genética que también son seguras y efectivas contra la infección por HBV.

Tanto las vacunas derivadas del plasma de portadores crónicos inactivos como las vacunas recombinantes, tienen como inmunógeno al HBs Ag. Esta proteína de envoltura contiene en su molécula al determinante inmunológico *a* presente en todas las cepas de los 8 genotipos del HBV conocidos hasta el presente, por lo que su administración fue instituida para conferir inmunoprotección cruzada contra los mismos. Todas estas vacunas estimulan la síntesis activa de anticuerpos anti-HBs, confiriendo así inmunidad protectora a los individuos vacunados. También se les puede detectar en forma transitoria HBs Ag en suero dentro de las 24 hs de haber sido inmunizados. Otros inmunógenos en evaluación para ser potencialmente empleados como vacunas (profilácticas o terapéuticas) anti-hepatitis B se encuentran en diversas fases de ensayo y se describen en el Capítulo 48 "Vacunas virales".

Vacuna de primera generación. Consiste en los partículas subvirales de 22 nm del HBV purificadas (conteniendo el HBs Ag) y tratadas con formol o con calor. Si bien las partículas de 22 nm carecen de DNA y por ende no son infectivas, el tratamiento con formol o con calor se instituye para prevenir el efecto de potenciales contaminaciones del plasma con partículas infectivas (por ejemplo, HDV, parvovirus, retrovirus, o eventuales partículas de Dane del HBV).

Para la obtención de dichas partículas subvirales de 22 nm se recurría a portadores crónicos de HBs Ag como donantes, y luego se preparaba la vacuna con métodos físicos de separación y químicos o térmicos de inactivación.

La seroconversión (desarrollo de anticuerpos anti-HBs) se producía en el 95% de los vacunados luego de 3 dosis inmunizantes (20 µg/ml) y los anticuerpos persistían por varios años.

Estas vacunas derivadas de plasma han sido reemplazadas por las vacunas recombinantes, decayendo el uso de las primeras por el temor a la eventual transmisión del HIV, aunque hasta el presente no existe registro alguno de este potencial accidente.

Vacuna de segunda generación. La utilización de plásmidos recombinantes que contengan al gen *S* del DNA del HBV permitió la expresión del HBs Ag en bacterias transformadas. La escasa producción del HBs Ag sumada al riesgo potencial de contaminación con toxinas bacterianas motivó la subsiguiente utilización de levaduras.

Las dos vacunas que utilizan a la **levadura *Saccharomyces cerevisiae*** como vector de expresión (Recombivax-HB™ y Engerix-B™, de Merck Sharp & Dohme y Smith Kline Biologicals, respectivamente) obtuvieron la licencia correspondiente en EE.UU. a mediados de la década de 1980 y son actualmente comercializadas en todo el mundo. Estas vacunas consisten en partículas de HBs Ag no glicosiladas producidas mediante clonación y expresión del gen *S* en la levadura *S. cerevisiae*. Estas partículas de HBs Ag neosintetizadas son posteriormente extraídas mediante lisis de las levaduras, purificadas mediante métodos fisicoquímicos, adsorbidas en hidróxido de aluminio (adyuvante) y preservadas con timerosal.

Hoy son –junto a la vacuna que contiene HBs Ag y antígenos pre-S– las más difundidas para prevenir la hepatitis B. Al igual que las vacunas de primera generación, su utilización en niños y jóvenes promueve la seroconversión de hasta el 90% de los individuos vacunados. Recombivax-HB™ y Engerix-B™ se diferencian entre sí en la masa inmunogénica a administrar por dosis y en el empleo

Determinación o característica	Baja	Mediana	Alta
HBs Ag	< 2%	2-7%	≥8%
Anticuerpos anti-HBs	4-6%	20-55%	70-95%
Infección en niños y neonatos	Infrecuente	Frecuente en niños	Muy frecuente
Distribución geográfica	Australia, Nueva Zelanda Europa Central, América del Norte, Argentina	Europa del Este y región mediterránea, Asia Central, Japón, Oriente Medio, regiones de América del Sur	Sudeste asiático, China, África tropical, Islas del Pacífico

Tabla 24.3.6. Prevalencia de la infección por HBV en el mundo.

Población	Seroprevalencia (%)	
	HBs Ag	Anticuerpos anti-HBc
Hemodonantes	0,3	3,1
Pacientes con serología (+) para HIV	14,5	58,5
Homosexuales masculinos	S/D	37,7
Trabajadoras sexuales	S/D	14,4
UDIs	S/D	42,5

Tabla 24.3.7. Seroprevalencia del HBs Ag y de los anticuerpos anti-HBc en diferentes grupos poblacionales de Argentina. UDIs: Usuarios de drogas inyectables; S/D: Sin datos.

o no de formaldehído (10 µg de HBs Ag tratados con inactivante frente a 20 µg de HBs Ag sin tratar, respectivamente). El plan de vacunación sugerido consiste en administrar luego de una primera dosis, otras dos aplicaciones de refuerzo (una al mes de la primera dosis, y otra a los 6 meses) para la obtención de **títulos de anti-HBs mayores a 10 mUI/ml (título protector)**. También se recomienda aplicar una dosis de refuerzo cada 10 años.

La vacuna Recombivax-HB™ también está disponible, asociada con la vacuna anti-*Haemophilus influenzae* tipo b, la que es comercializada con el nombre de Comvax™ y destinada a la inmunización pediátrica. Por su parte, el antígeno HBs presente en la vacuna Engerix-B™ puede administrarse conjuntamente con la vacuna anti-hepatitis A inactivada con formaldehído (ambas con la denominación comercial de Twinrix™) especialmente a adultos, aunque también puede administrarse a adolescentes y niños. La especial formulación de esta vacuna conteniendo sales de fosfato de aluminio y Lípido A permite la eficaz inmunización al cabo de dos dosis, en lugar del clásico esquema de tres. El mismo HBs Ag recombinante mencionado existe también en una formulación conjunta con la vacuna DTP (correspondiente a las iniciales de las palabras difteria-tétanos-pertussis) y anti-polio para niños (Pediatrix™).

Además de *S. cerevisiae*, se han utilizado **otras levaduras** para la obtención de HBs Ag recombinante para la producción de vacunas, como *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. En Argentina el Laboratorio Pablo Cassara SRL, creó y desarrolló una vacuna contra la hepatitis B derivada de *H. polymorpha*, licenciada y comercializada con la denominación de AgB®. Esta vacuna contiene aluminio como adyuvante y demostró ser segura y muy inmunogénica. La utilización de *H. polymorpha* como vector de expresión tiene como ventaja con respecto a *S. cerevisiae* que el HBs Ag recombinante obtenido se encuentra glicosilado y por ende se asemeja más al HBs Ag de las partículas subvirales presentes en la infección natural. Estudios preliminares con la adición de un segundo adyuvante (el monosacárido sintético RC-529 que mimetiza al monofosforil lípido A), han mostrado una inmunización adecuada al cabo de dos dosis, administradas con un mes de diferencia.

Vacunas de tercera generación. Contienen los antígenos S y pre-S2 (GenHevac B™, Pasteur Merieux). Se las obtienen mediante ingeniería genética utilizando células de ovario de hámster chino

(CHO) transfectadas con un plásmido que contiene las secuencias nucleotídicas de las regiones genómicas S y pre-S2.

La característica más importante observada en vacunados con este producto es la aparición temprana y en elevados títulos de anticuerpos anti-pre-S2, lo cual puede constituir una ventaja en la prevención de la hepatitis B (Véase el ítem 24.3.5: "Antígenos virales y respuesta inmune del hospedador").

La vacuna consiste en 20 µg de los antígenos mencionados anteriormente con el agregado de hidróxido de aluminio y formaldehído.

El esquema de vacunación recomendado consiste en la administración de 3 dosis con un mes de intervalo, seguidas de una dosis de refuerzo al cabo de un año, y la aplicación posterior de un refuerzo cada 5 años. En el caso de hemodializados e inmunocomprometidos se recomienda una dosis extra –además del esquema señalado– después de transcurridos 2 meses al cabo de las tres primeras dosis.

Vacunas anti-hepatitis B y genotipos del HBV. Las vacunas en uso emplean HBs Ag recombinante codificado por el genotipo A (subtipo *adw*) y el D (subtipo *ayw*). Estudios recientes sugieren que sería importante evaluar la eficacia de las vacunas actualmente utilizadas en África para proteger frente a la infección con genotipo E (subtipo *ayw4*), ya que este último exhibe la mayor divergencia aminoacídica a nivel del determinante *a*, que –como se mencionó anteriormente– es el principal blanco para los anticuerpos neutralizantes anti-HBs. Esta característica, (véase un ejemplo en la Figura 9.31 del capítulo "Diagnóstico virológico"), desafía la eficacia de la vacuna anti-hepatitis B, tal como ha sido documentado en Gambia, donde el genotipo E predomina y en donde se reportaron infecciones por HBV en presencia de títulos de anticuerpos anti-HBs considerados protectores.

No hay estudios poblacionales que determinen la eficacia vacunal frente a la infección con el genotipo F (exhibe varias sustituciones aminoacídicas en el determinante *a* respecto a los remanentes genotipos), aunque empíricamente se infiere su efecto protector. Sin embargo, un reporte ha mostrado que es posible la infección humana por una cepa del genotipo F aun en presencia de niveles "protectores" de anticuerpos anti-HBs inducidos por la vacuna en un individuo inmunocompetente.

Vacuna anti-hepatitis B y mutantes de escape. Diversos estudios indican que la sustitución aminoacídica en posiciones críticas dentro de la región hidrofílica principal y especialmente dentro

Profilaxis para HBV en niños según recomendaciones del CDC
<p>Al nacer</p> <ul style="list-style-type: none"> • Administrar vacuna monovalente para hepatitis B (HepB) al momento del nacimiento. • Si la madre es HBs Ag positiva administrar HepB y 0.5 ml de gammaglobulina hiperinmune para hepatitis B (HBIG) dentro de las 12 horas de nacido. • Si se desconoce el estatus serológico de la madre, administrar HepB dentro de las 12 horas de nacido. Determinar el estatus de HBs Ag lo más pronto posible y si se determina la positividad para HBs Ag, administrar HBIG no más tarde de una semana.
<p>Luego del nacimiento</p> <ul style="list-style-type: none"> • La serie de vacunación con HepB debe ser completada con vacuna monovalente (HepB) o con alguna otra vacuna combinada que contenga HepB. • La segunda dosis debe ser administrada a la edad de 1 ó 2 meses (En Argentina, a los 2 meses[*]). • La dosis final debe ser administrada a la edad de 3 meses. (En Argentina, a los 6 meses de edad[*]). • Los niños nacidos de madres seropositivas para HBs Ag deben ser testeados para HBs Ag y anticuerpos anti-HBs luego de completado el esquema de vacunación con tres dosis, a la edad de 9 a 18 meses.
Profilaxis para HBV en personal de la salud según normas del CDC
<ul style="list-style-type: none"> • Todo el personal de la salud que pueda estar en contacto con sangre o fluidos corporales debe recibir 3 dosis de la vacuna para hepatitis B (HepB) a los 0, 1 y 6 meses. Se debe testear los anticuerpos anti-HBs luego de la 3ra. dosis de la vacuna. Si los valores de anti-HBs son iguales o mayores a 10 mUI/ml, el individuo es inmune para HBV. • Si los valores de anti-HBs son menores a 10 mUI/ml, el individuo no está protegido contra la infección por HBV. Se debe revacunar con una serie de tres dosis de vacuna según el esquema antes mencionado y testear los anticuerpos anti-HBs luego de la 3ra. dosis de la vacuna. Si los valores de anti-HBs son iguales o mayores a 10 mUI/ml, el individuo es inmune para HBV. • Si los valores de anti-HBs son menores a 10 mUI/ml, el individuo es no respondedor. El personal de salud que sea no respondedor debe ser considerado susceptible a la infección por HBV. Se le debe aconsejar tener precaución en la práctica diaria para prevenir la infección por HBV y la necesidad de administrarse la HBIG ante cualquier probable exposición a sangre o fluidos corporales positivos para HBs Ag.

Tabla 24.3.8. Inmunoprofilaxis para HBV. *Según el calendario oficial de vacunación vigente.

del determinante *a* puede facilitar el escape de dichos virus mutantes a la acción de los anticuerpos anti-HBs. La mutante más frecuentemente observada es Gly145Arg, aunque también se han observado –entre otras– cambios aminoácidos en las posiciones 141 ó 144. Las sustituciones en los residuos de cisteína involucrados en la formación de puentes disulfuro pueden promover cambios en la estructura secundaria de la proteína, y –por ende– también en su antigenicidad (Figuras 24.3.8A y 24.3.18), lo cual puede permitir también la circulación del virus aun en presencia de anticuerpos neutralizantes.

Modelos matemáticos predicen que un potencial patrón de emergencia de mutantes de escape a la vacuna podría ser dominante en una región dada (por ejemplo, Gambia) al cabo de un lapso no menor a los 20 años de comenzada la vacunación poblacional masiva (a mediados de la década de 1980) debido a la baja tasa de contactos infecciosos entre individuos infectados y susceptibles.

Se está evaluando la producción de vacunas con HBs Ag mutado (con o sin los antígenos pre-S) que confieran protección frente a las mutantes de escape S descriptas hasta el momento.

¿Por qué debe vacunarse contra la hepatitis B? Un modelo matemático estableció que en el año 2000, unas 620 000 personas fallecieron en el mundo a causa de la infección por HBV: 580 000 (94%) debido a la cirrosis y el HCC asociados a la infección crónica, y unos 40 000 (6%) a la hepatitis B aguda. En la cohorte de nacidos vivos al año 2000 este modelo predijo que de no vacunarse, se infectarían unos 64,8 millones de individuos, de los cuales 1,4 millones morirían por causas relacionadas al HBV. La vacunación rutinaria de los bebés, con una cobertura del 90% y la administración de la primera dosis al nacer, podría evitar el 84% de las muertes globales relacionadas con el HBV. La administración del plan completo de vacunación (tres dosis incluyendo una al momento de nacer) tiene una eficacia del 95% para prevenir la infección que

Vacunación y respuesta de anticuerpos anti-HBs en el personal de salud expuesto*	CONDUCTA MÉDICA		
	Fuente HBs Ag [+]	Fuente HBs Ag [-]	Fuente desconocida o no disponible para el estudio
No vacunado	HBIg [#] (x 1) e iniciar plan de vacunación	Iniciar plan de vacunación	Iniciar plan de vacunación
Previamente vacunado			
Respondedor [§]	No tratar	No tratar	No tratar
No respondedor [¶]	HBIg (x 1) e iniciar revacunación ó HBIg (x 2) ^{¶¶}	No tratar	Si la fuente es de alto riesgo, considerarla como HBs Ag [+]
Con nivel desconocido de anticuerpos anti-HBs	Determinar título de anticuerpos anti-HBs en el individuo expuesto: 1. Si es adecuado [§] : no tratar 2. Si es inadecuado [¶] : HBIg (x 1) y refuerzo de vacuna	No tratar	Determinar título de anticuerpos anti-HBs en el individuo expuesto: 1. Si es adecuado [§] : no tratar 2. Si es inadecuado [¶] : HBIg (x 1), refuerzo de vacuna y medir el título de anti-HBs en 1 - 2 meses

Tabla 24.3.9. Profilaxis post-exposición al virus hepatitis B en personal de la salud, según normas del CDC, EE.UU.

* La persona previamente infectada con HBV que resolvió la infección, es inmune a la re-infección y no requiere profilaxis post-exposición. # Gammaglobulina hiperinmune anti-hepatitis B. § Individuo con adecuados niveles de anticuerpos anti-HBs (≥ 10 mUI/ml). ¶ Individuo con inadecuada respuesta de anticuerpos anti-HBs (< 10 mUI/ml). ¶¶ La opción de administrar HBIg y 3 dosis de vacuna es preferible para aquellos no respondedores ante la administración de una única serie de tres dosis de vacuna. Para aquellos que hubieran recibido dos series de tres dosis de vacuna y persistieran en su condición de no respondedores, se recomienda administrar dos dosis de HBIg separadas por un intervalo de 30 días.



podría acaecer en la etapa perinatal (profilaxis post-exposición) o en la infancia temprana o en la infección tardía (profilaxis pre-exposición). Se estima que el plan completo de inmunización provee una protección total contra la hepatitis B clínica aguda, así como contra la infección crónica por HBV.

¿Quiénes deben vacunarse? Desde 1992 la estrategia propuesta por la OMS para la prevención de la hepatitis B se basa en la vacunación universal de rutina de los recién nacidos y lactantes. En 2003, 151 de 192 países miembros (79%) habían adherido a tal iniciativa. Sin embargo, muchos países con alta endemicidad no introdujeron aún la vacunación anti-hepatitis B en sus respectivos planes de inmunización obligatoria. En otros, la cobertura de la inmunización es aún hoy baja. Países con alta endemicidad como China, estiman lograr el objetivo de una infección $< 1\%$ de los niños menores de 5 años en un futuro próximo, aplicando el plan de tres dosis de vacuna (que incluye una al nacer) con una cobertura del 90% de los neonatos.

Según la OMS también sería útil vacunar a los adolescentes ya que protege contra la transmisión por contacto sexual o por uso de drogas inyectables. El personal de salud y otros grupos de riesgo como contactos familiares de individuos positivos para el HBs Ag, enfermos sometidos a hemodiálisis, pacientes con trastornos hemorrágicos que reciben hemoderivados, viajeros internacionales que planean permanecer por más de 6 meses en zonas de alta o moderada endemicidad para el HBV también deberían vacunarse. El embarazo no constituye una contraindicación para recibir la vacuna contra la hepatitis B.

En el caso de neonatos hijos de madre HBs Ag (+) se recomienda vacunarlos dentro de las 12 hs. de vida y administrarles simultáneamente HBIg hiperinmune (véase profilaxis pasiva). La

segunda dosis (sin HBIg) se aplica no antes de los 2 meses de edad y no más allá de los 4, y finalmente la tercera dosis, también sin HBIg, se administra a los 6-18 meses de haberse aplicado la primera (véase la Tabla 24.3.8).

Desde 1992 rige en la Argentina la ley nacional 24151 que declara obligatoria la vacunación contra la hepatitis B para todas las personas que desarrollan actividades en el campo de la salud. A partir del 1º de noviembre del año 2000 se inició también en nuestro país por resolución 940/00 del Ministerio de Salud, la aplicación de la vacuna contra hepatitis B a todos los recién nacidos. En marzo de 2003, se incluyeron además para el calendario de vacunación a los preadolescentes, al cumplir los 11 años (junto con una dosis de la vacuna triple viral), en el marco del programa de Salud Escolar.

Si bien reportes esporádicos de la literatura internacional han sugerido una asociación entre la vacuna anti-hepatitis B y la artritis reumatoidea, la OMS ha declarado en 2008 que no existe evidencia convincente para avalar dicha asociación

9.2 PROFILAXIS PASIVA

La administración de anticuerpos dirigidos contra el HBs Ag es efectiva (por un período breve) para conferir protección contra la infección. Estas inmunoglobulinas pueden obtenerse mediante purificación a partir de mezclas de plasma de individuos "normales" (entre los cuales algunos pudieron haber padecido anteriormente la infección por HBV) o mezclas seleccionadas de plasma de individuos que exhiben altos títulos de anticuerpos anti-HBs por haber padecido una hepatitis B.

En el primer caso es posible detectar moderados títulos de anticuerpos contra los diversos virus que causan infecciones sistémicas

	Interferón-α	Lamivudina	Adefovir	Entecavir
Propiedades	Citoquina recombinante	Análogo del nucleósido citidina	Análogo nucleotídico de adenosina monofosforilada	Análogo del nucleósido guanosina
Mecanismo de acción	Inmunomodulador, antiviral, antiproliferativo	Inhibidor de la polimerasa viral, terminador de la cadena de DNA	Inhibidor de la polimerasa viral, terminador de la cadena de DNA	Inhibidor de la polimerasa viral, terminador de la cadena de DNA
Vía de administración	Subcutánea	Oral	Oral	Oral
Efectos adversos	Varios; el 10% discontinúa el tratamiento	Escasos	Nefrotoxicidad (a dosis altas)	Escasos
Resistencia	No	1 ^{er} año: 15-20% 2 ^{do} año: 30-40% 3 ^{er} año: 60%	2 ^o año: 3% 3 ^o año: 9% 4 ^o año: 18% 5 ^o año: 28%	Pacientes <i>naïve</i> : 0,8% al 3 ^{er} año Pacientes resistentes a LMV: 10% al 2 ^{do} año
Mutantes más frecuentes del HBV asociadas a resistencia	No	rtL180M+M204V/I; rtV173L+L180M+M204V; rtM204I	rtA181T/V ; rt L217R; rt N236T	En presencia de las sustituciones rt L 180M y/o rtM204V/I, las sustituciones rtS184G; rtS202I y/o rtM250V confieren resistencia al ETV cuando son tratados con dicha droga

Tabla 24.3.10. Cuadro comparativo entre los distintos antivirales utilizados para el tratamiento de la hepatitis B crónica.

en humanos provenientes de la región geográfica en la que se obtuvieron los (más de 1 000) plasmas: es la llamada **inmunoglobulina estándar o normal**. Habitualmente el título de anticuerpos anti-HBs, medido por RIA, es igual a 100 UI/ml. En el segundo caso, la selección de plasma de individuos que curaron de su hepatitis B permite obtener una mezcla con un mayor título de anticuerpos específicos anti-HBs (100 000 UI/ml): es la **inmunoglobulina específica o hiperinmune para el HBV (HBIg)**. En muchos países en desarrollo, la HBIg no está disponible en razón de su elevado costo. La utilización de un método de fraccionamiento adecuado del plasma (fracción II de Cohn), seguido de la inactivación por 10 hs a 60°C (pasteurización) elimina la posibilidad de transmitir virus en la preparación.

La diferencia de los títulos de anticuerpos específicos para HBV entre la inmunoglobulina estándar y la HBIg hiperinmune implica la indicación selectiva de esta última con fines profilácticos. **La Ig estándar sólo está indicada ante la carencia de la HBIg.**

Si bien la dosis óptima de HBIg a administrar no ha sido determinada, el suministro de 250-600 UI de anticuerpos anti-HBs ha mostrado efectividad. En adultos se recomienda la administración de (usualmente) 3 ml de HBIg (200 UI/ml). Se debe administrar lo más pronto posible después de la exposición al virus (dentro de las 24 hs. y habitualmente no más allá de las 48 hs). Se recomienda la administración de una segunda dosis al cabo de 30 días de haber recibido la inicial en no respondedores a la administración de dos series de tres dosis de vacuna anti-hepatitis B. (Tabla 24.3.9).

En el caso del neonato hijo de madre con HBs Ag o de status desconocido, la administración de la HBIg y de la vacuna anti-hepatitis B debe hacerse dentro de las 12 hs de ocurrido el nacimiento. Se recomienda la administración de 1-2 ml de HBIg (200 UI/ml) según la OMS y de 0,5 ml según el CDC (EE.UU.). En el caso de que sea

hijo de una madre con HBs Ag, ello reduce el riesgo de que el recién nacido desarrolle una infección persistente en un 70%. Con dicho objetivo, la inmunización anti-hepatitis B pasiva y activa combinada es eficaz en aproximadamente un 90%.

Son indicaciones de la administración de HBIg:

a) Todas las personas que –desde su nacimiento– hayan estado expuestas a un incremento del riesgo de infección (preferentemente como profilaxis simultánea a la administración de la vacuna anti-hepatitis B), principalmente ante un único evento de exposición, como es –por ejemplo– la inoculación, ingesta o salpicadura de mucosas (incluida la conjuntival) de sangre conteniendo HBV.

b) Personas que se presume no desarrollarán una adecuada protección (por ejemplo, pacientes dializados) y que hayan estado expuestas a un riesgo de infección (por ejemplo, miembros de la familia o contactos sexuales con personas con antígeno de hepatitis B positivos).

No se debe administrar la HBIg al cabo de 7 o más días de transcurrida la exposición al HBV. Tampoco se recomienda la inmunización pasiva previa a la exposición a dicho virus. Aquellos individuos en los que se ha producido la seroconversión a anticuerpos anti-HBs (por vacunación o por haber padecido la infección) no necesitan de la administración de HBIg ante una nueva exposición al HBV.

10. TRATAMIENTO ANTIVIRAL

Generalmente, el tratamiento antiviral no está indicado en pacientes con **hepatitis B aguda** dado que gran parte de los adultos inmunocompetentes infectados resuelven favorablemente y en forma espontánea la infección. En estos pacientes, el tratamiento es más bien sintomático. En la **hepatitis fulminante** se deben controlar la hemostasia y las complicaciones nerviosas en una unidad de cuidados intensivos para el trasplante ortotópico hepático.

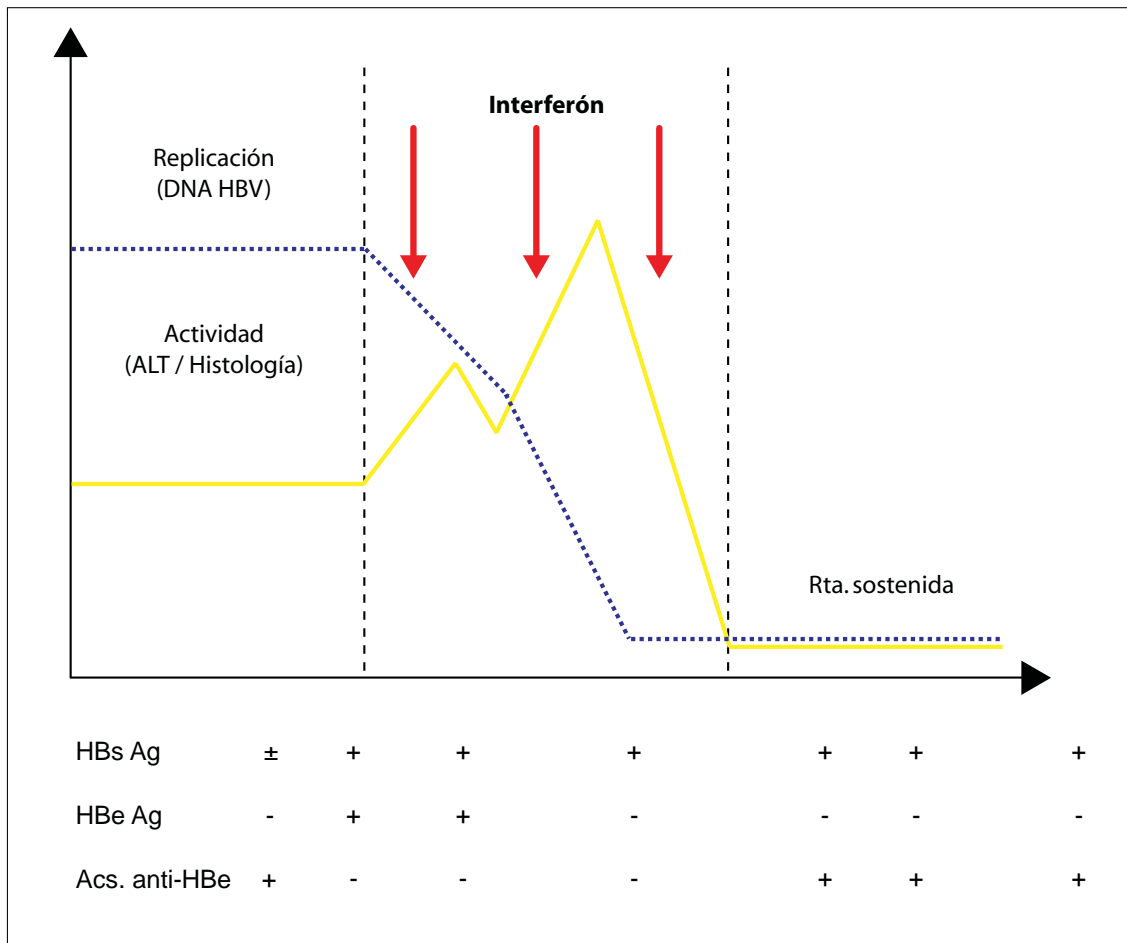


Figura 24.3.23. Respuesta al tratamiento con Interferón en individuos crónicamente infectados con HBV.

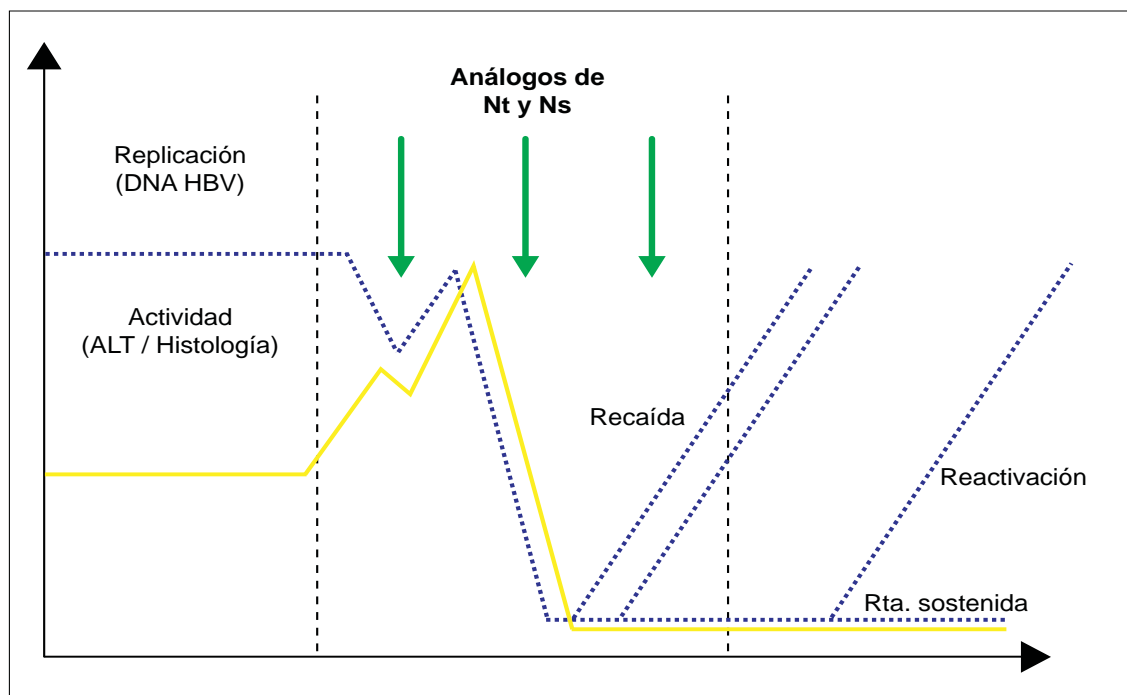


Figura 24.3.24. Respuesta al tratamiento con análogos de nucleósidos o de nucleótidos en individuos crónicamente infectados con HBV.

En cambio, los pacientes con **hepatitis B crónica con elevados niveles de aminotransferasas séricas y replicación viral activa** sí tienen indicado un tratamiento antiviral. Sin embargo, no se deben tratar aquellos pacientes que presenten aminotransferasas séricas persistentemente normales, ya que con los fármacos disponibles, la respuesta no es significativa.

Desafortunadamente, hasta el día de hoy no se dispone de antiviral alguno para un tratamiento eficaz de la hepatitis B crónica que logre erradicar al HBV del organismo en todos los casos. La monoterapia con el **interferón α** (IFN- α) convencional no es muy efectiva y está limitada por la gran cantidad de efectos adversos que presenta en forma dosis-dependiente. Además, la mayoría de los pacientes que reciben este tratamiento permanece crónicamente infectada y con riesgo de desarrollar cirrosis hepática y hepatocarcinoma celular. La monoterapia con los distintos **análogos de nucleósidos o nucleótidos** (por ejemplo, lamivudina y adefovir, respectivamente) tampoco resulta del todo satisfactoria. Por un lado, con el uso de los mismos, se han obtenido resultados prometedores en cuanto al efecto antiviral y a que son bien tolerados por los escasos efectos adversos que presentan. Pero por otra parte, se observó que el tratamiento a corto plazo con estos análogos no es suficiente para erradicar la infección viral, y que el tratamiento a largo plazo está asociado con la emergencia de mutantes resistentes a los mismos.

Actualmente están disponibles en el mercado nuevas drogas como el IFN- α pegilado (PEG-IFN- α) y el análogo de nucleósido entecavir que si bien muestran ser más eficaces que los antivirales mencionados anteriormente, todavía se deben hacer más avances para lograr que el tratamiento sea óptimo. Entre los **factores que dificultan un tratamiento satisfactorio** merecen señalarse dos: la **presencia nuclear del DNAccc** del HBV y, en etapas tardías, la **transcripción del DNA viral integrado al genoma celular**. Ninguno de los antivirales utilizados actualmente para el tratamiento de la hepatitis B crónica logra erradicar al DNAccc, lo que contribuye a la reaparición de la actividad viral tras el cese del tratamiento.

Los **objetivos generales de la terapéutica** son: **a)** inducir el cese de la replicación viral (determinado mediante negativización del DNA viral sérico y la desaparición del HBe Ag circulante); **b)** normalizar el nivel de transaminasas séricas; y **c)** mejorar la histología hepática. Las figuras 24.3.23 y 24.3.24 muestran esquemáticamente la respuesta que se puede observar en pacientes con hepatitis B crónica tratados con interferón o análogos de nucleósidos / nucleótidos, respectivamente.

Hasta el presente se han ensayado diversos protocolos para tratar a los individuos virémicos utilizando sólo IFN- α o en combinación con análogos de nucleósidos/nucleótidos (Tabla 24.3.10). A continuación se detallan las características principales de cada uno de ellos.

IFN- α : No tiene una actividad antiviral directa. Actúa provocando en la célula hospedadora, la elaboración de proteínas con actividad antiviral con lo que, en forma indirecta, inhibe la replicación viral. También presenta efectos anti-fibróticos e inmunomoduladores que modifican y favorecen la respuesta inmunitaria frente a la infección viral.

Existen preparaciones comerciales de IFN obtenidas por ingeniería genética (IFN- α 2a, Roferón, Roche; IFN- α 2b, Intron A, Schering) o a partir de una línea celular linfoblastoide (IFN- α In, Wellferon, Wellcome). Se lo administra por vía subcutánea y las dosis recomendadas suelen ser de 5 millones UI/día ó 10 millones UI 3 días a la semana durante 4-6 meses.

La **pegilación** o unión del polietilenglicol a una molécula de IFN- α permite retrasar su eliminación, prolongar su actividad y, por lo tanto, mejorar su rendimiento. En la actualidad existen dos interferones pegilados: **PEG-IFN- α 2a** y **PEG-IFN- α 2b**. Ambos poseen propiedades fisicoquímicas diferentes, son muy estables y se administran por vía subcutánea en una dosis única semanal, a diferencia del esquema de tres inyecciones semanales del IFN- α no pegilado. También se observó que se obtienen mejores resultados clínicos con

el IFN- α pegilado que con el IFN- α sin pegilar. El tratamiento de la infección crónica por HBV con IFN- α o con PEG-IFN- α se recomienda en pacientes con enfermedad hepática compensada en los que se detecte HBs Ag, HBe Ag, y DNA viral en suero, con valores de transaminasas altos y sin evidencia de insuficiencia hepática avanzada. La exacerbación subclínica de la hepatitis observada al inicio del tratamiento en pacientes que responden sugiere que el efecto del IFN estaría mediado por un aumento de la respuesta inmune contra el virus promovida por el efecto de linfocitos T citotóxicos.

Tras el tratamiento con IFN se logra la seroconversión a anti-HBe, la eliminación del DNA viral sérico, y la mejoría bioquímica e histológica hasta en un 40% de los casos, a veces meses después de cesar el tratamiento. Las remisiones en la hepatitis B crónica inducidas por el IFN persisten en más del 80% de los pacientes tratados; a menudo son seguidas por pérdida del HBs Ag, mejoría o estabilización histológica, riesgo disminuido de complicaciones relacionadas con el hígado y de la mortalidad. En el caso de pacientes con anti-HBe y DNA viral detectable (variante "HBe-minus") la respuesta es menor, por lo que puede requerirse prolongar el tratamiento y aumentar la dosis.

Análogos de nucleósidos y de nucleótidos. En general, actúan bloqueando la transcriptasa inversa por un mecanismo competitivo y como terminadores de la síntesis de la cadena del DNA viral. Al competir con el sustrato natural inhiben funcionalmente las tres actividades de la polimerasa del HBV (transcriptasa inversa): **1)** iniciación de la transcripción; **2)** transcripción inversa del RNA mensajero pregenómico (síntesis de la cadena de DNA negativa del HBV); y **3)** síntesis de la cadena positiva. Tres son las drogas más utilizadas para el tratamiento de la hepatitis B crónica: lamivudina, adefovir dipivoxil y entecavir. Recientemente se ha comparado a la lamivudina con una nueva droga aprobada para el tratamiento de la hepatitis crónica por HBV denominada telbivudina.

Lamivudina (LMV o 3TC): Es un análogo del nucleósido citosina. El tratamiento de la hepatitis B crónica con LMV por más de un año disminuye la carga viral en aproximadamente 2 log₁₀, y se relaciona con la normalización bioquímica y mejorías histológicas de la inflamación y progresión de la fibrosis. También puede beneficiar a pacientes con cirrosis descompensada. Sin embargo, sólo una minoría de los pacientes (~20%) presenta seroconversión de HBe Ag a anticuerpos anti-HBe, la que parece ser duradera. Más aún, en la mayoría de los pacientes, la carga viral del HBV retorna a los niveles previos al tratamiento, a veces con exacerbación de la hepatitis después de suspender la administración del mismo.

Aunque la **terapia con LMV es segura y eficaz, se asocia con una alta tasa de resistencia viral**, que fue reportada en un 14%, 38%, 49%, 66% y 69% al cabo de 1, 2, 3, 4 y 5 años de tratamiento, respectivamente. La resistencia aparece por mutaciones en el motivo altamente conservado **YMDD** correspondiente al sitio activo del subdominio C del dominio de la transcriptasa inversa viral (Figura 24.3.2), donde la metionina del codón 552 es reemplazada por isoleucina o valina (YIDD o YVDD, respectivamente). Dichas mutaciones en el codón 552 (frecuentemente, aunque no siempre denominado así; véase más adelante) son referidas también como **rt204** en la nueva nomenclatura internacionalmente consensuada, cuyo codón 1 indica el de inicio de la transcriptasa inversa [rt: *reverse transcriptase*]). La nueva nomenclatura utilizada para precisar la ubicación aminoacídica de una mutación es independiente de los genotipos del HBV, ya que, por ejemplo, para **rtM204V** la literatura científica había empleado la designación M552V, M550V, M549V o M539V, induciendo a innecesaria confusión.

La resistencia del HBV a la LMV se relaciona con una reducción de la sensibilidad *in vitro* de 40 a 10⁴ veces. Se han descrito resistencias cruzadas con otros análogos de nucleósidos. La LMV es activa frente a las cepas resistentes al adefovir N584T (**rtN236T** según la nueva nomenclatura).

No parece que el tratamiento combinado LMV-IFN mejore los resultados de cada uno de ellos por separado, aunque la combinación puede relacionarse con una mayor frecuencia de seroconversión del HBe Ag y quizás menor surgimiento de resistencia. Se está

ensayando su asociación con otros análogos de nucleótidos como el adefovir tanto conjunta como secuencialmente. Finalmente, la emergencia de mutantes de HBV resistentes al tratamiento antiviral con LMV es 20 veces mayor en las infecciones con HBV del subtipo *adw* que con el *ayw*.

Adefovir-dipivoxil (ADV): Es un análogo nucleotídico de la adenosina monofosforilada. Está indicado para el tratamiento de la hepatitis B crónica en adultos con enfermedad hepática tanto compensada como descompensada, con evidencia de replicación viral activa, niveles de aminotransferasas persistentemente elevados y evidencia histológica de inflamación hepática activa y fibrosis. Es una droga activa frente a las cepas mutantes en el dominio YMDD, que causan resistencia del HBV a LMV. La resistencia a ADV es ~0% al cabo del primer año de tratamiento, pero puede alcanzar ~28% luego de cinco años. Las **variantes virales asociadas** con mayor frecuencia a la resistencia al ADV son **rtN236T y rtA181V**. ADV está indicado en combinación con LMV (y sorprendentemente no como monoterapia) en pacientes con resistencia a esta última.

Entecavir (ETV): Es un análogo del nucleósido guanosina. Posee una potente actividad como inhibidor de la replicación viral frente a las cepas salvajes del HBV (*in vitro* es 30 veces más potente que LMV) como a las cepas resistentes a LMV y al ADV, siendo eficaz para el tratamiento de pacientes LMV- o ADV- resistentes, aunque no lo es tanto en quienes son refractarios a LMV. El ETV está indicado para el tratamiento de la hepatitis B crónica en pacientes adultos mayores de 16 años, con evidencia de replicación viral activa y de aumentos persistentes de las aminotransferasas séricas o enfermedad histológicamente activa, ya sea fibrosis hepática avanzada o cirrosis. Diferentes estudios han demostrado que ETV es superior a LMV respecto a las mejorías histológicas, bioquímicas y virológicas que produce.

La terapéutica con ETV también puede ofrecer una ventaja clínica en pacientes con hepatitis B crónica por cepas HBe-*minus* por la muy potente supresión de la replicación viral que produce. Hay que considerar que esta población de pacientes, no presenta un mecanismo de escape inmunológico que permita definir la duración del tratamiento, por lo que la medicación suele mantenerse en forma prolongada, lo que hace que la supresión viral efectiva sea un objetivo muy importante para ellos. No se ha reportado resistencia a ETV en pacientes no tratados previamente con análogos de nucleósidos. En cambio, estudios clínicos han demostrado que en el 10% de los pacientes resistentes a LMV tratados con ETV emergieron variantes virales asociadas con resistencia a este último antiviral a los 2 años de tratamiento. Estas variantes virales presentaron **además de** las sustituciones aminoacídicas previas **rtL180M y/o rtM204V** resistentes a LMV, otras **sustituciones en los residuos rtS/T184, rtS202, y/o rtM250**.

No se ha demostrado que la monoterapia con LMV, ADV o ETV logre una respuesta sostenida ni la desaparición del HBs Ag.

Telbivudina (LdT): Estudios muy recientes han demostrado que este análogo de timidina es activo contra HBV, pero no contra HIV. Se ha demostrado la superioridad de esta droga comparada con la LMV y el ADV, observándose una mayor tasa de negativización del DNA detectado por PCR (*vs* LMV), y de negativización del HBe Ag y supresión viral al 6to. mes de tratamiento de pacientes crónicamente infectados (*vs* ADV). Lamentablemente, la mutante M204I que puede seleccionarse durante el tratamiento con LMV confiere resistencia cruzada a LdT.

Otras drogas y perspectivas del tratamiento. Si bien se encuentran en fase III de ensayo clínico drogas tales como el tenofovir (un análogo del nucleósido adenosina), la valtorcitabina y la emtricitabina (análogos del nucleósido citidina) y otras en fase II (racivir, pradofovir, clebudina, amdoxovir), no existe aún una única droga que promueva una respuesta sostenida que erradique la infección por HBV y las diversas mutantes resistentes que emergen ante el tratamiento. Instituir la terapéutica adecuada para estas cepas de HBV resistentes constituye uno de los principales desafíos actuales del médico. Un adecuado monitoreo de la dinámica del DNA viral circulante, su caracterización genotípica y posiblemente de las características fenotípicas de su transcripción inversa puedan brindar al profesional evidencias para elegir el mejor antiviral en cada caso. Se requieren nuevos ensayos clínicos controlados para establecer si la combinación de monoterapia con nuevos y potentes antivirales como el entecavir y el tenofovir pueden ofrecer alta eficacia y bajo riesgo de emergencia de mutantes resistentes.

11. PERSPECTIVAS

El conocimiento de la biología molecular de la infección por HBV ha producido significativos avances en los últimos años que han permitido la comprensión de mecanismos inmunopatogénicos y la institución de terapéuticas progresivamente más eficaces. Sin embargo, nuevos desafíos comienzan a surgir para el médico del siglo XXI, tales como la emergencia de mutantes de escape a la vacuna (altamente eficaz para conferir protección contra las cepas salvajes del HBV), a la HBIg y a los análogos de nucleósidos / nucleótidos utilizados como antivirales. Un conocimiento más profundo de los eventos que participan en la generación de la variabilidad del HBV y de los mecanismos inmunológicos asociados a la persistencia viral y a su limitación, devendrá en una fundada esperanza para las más de 350 000 000 de personas crónicamente infectadas por este virus que aún aguardan por un tratamiento más eficaz.



Bibliografía

- Baurert TF, Thimme R, von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 13: 82-90, 2007.
- Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 895: 16-23, 2007.
- Cuestas M, Mathet VL, Ruiz V *et al.* Unusual naturally occurring humoral and cellular mutated epitopes of hepatitis B virus in a chronically infected argentine patient with anti-HBs antibodies. *J Clin Microbiol* 44:2191-8, 2006.
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132: 2557-76, 2007.
- França PH, González JE, Munne MS *et al.* Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen-negative variants among HBV-infected argentinean blood donors. *J Clin Microbiol* 42:5015-21, 2004.
- Ganem D, Prince AM. Hepatitis B Virus infection Natural history and clinical consequences. *N Eng J Med* 350:1118-29, 2004.
- Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. En: *Ann Rev Pathol: Mechan Dis* 1: 23-62, 2006.
- Günther S. Genetic variation in HBV infection: genotypes and mutants. *J Clin Virol* 36: S3-S11, 2006.
- Mathet VL, Cuestas ML, Ruiz V *et al.* Detection of hepatitis B virus (HBV) genotype E carried –even in the presence of high titers of anti-HBs antibodies– by an Argentinean patient of African descent who had received vaccination against HBV. *J Clin Microbiol* 44:3435-9, 2006.
- Mathet VL, Cuestas ML, Trinks J, *et al.* Genetic diversity and variability of hepatitis B virus (HBV) in Latin America and the Caribbean region: implications in epidemiological, clinical, diagnostic, prophylactic and therapeutic approaches. Chapter X. En: *Progress in Hepatitis B Research. Nova biomedical books.* New York. 2007.
- Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and Hepatitis C virus infection. *Nature Rev Immunol* 5: 215-29, 2005.
- Rehermann B. Chronic infections with hepatotropic viruses: mechanisms of impairment of cellular immune responses. *Semin Liver Dis* 27:152-60, 2007. Review.
- Telenta PF, Poggio GP, López JL *et al.* Increased prevalence of genotype F hepatitis B virus isolates in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol* 35:1873-5, 1997.
- Thomas H, Lemon S, Zuckerman A. *Viral Hepatitis*. 3rd. Edition. Blackwell Publishing Ltd. Oxford United Kingdom. 2005.
- Weber B. Diagnostic impact of the genetic variability of the Hepatitis B Virus surface antigene gene, *J Med Virol* 78: S59-S65, 2006.
- Yim HJ, Lok AS-F. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 43:S173-81, 2006.

24.4

Hepatitis D

Julieta Trinks - José Raúl Oubiña

1. INTRODUCCIÓN

En 1977, el gastroenterólogo italiano Mario Rizzeto describió un nuevo antígeno nuclear, observado por inmunofluorescencia, en hepatocitos de individuos crónicamente infectados con virus hepatitis B (HBV), que padecían episodios de hepatitis aguda grave. En 1980, ese antígeno –denominado delta– fue reconocido como componente de un nuevo virus responsable de la exacerbación de la enfermedad hepática de aquellos pacientes, lo que fue demostrado por la transmisión exitosa de hepatitis infecciosa a chimpancés (previamente infectados con HBV), seguida de la posterior identificación de partículas virales en el suero de estos primates. Desde entonces, ese agente infeccioso –anteriormente designado agente delta asociado (al HBV) y hoy denominado virus hepatitis D (HDV)– fue exhaustivamente estudiado.

El HDV es un agente subviral que comparte algunas características con los viroides de las plantas y con los virus satélites. Tiene la peculiaridad de recibir su envoltura del HBV, por lo que depende de este último para su transmisión.

2. MORFOLOGÍA

El HDV es un agente esférico de 36 a 43 nm de diámetro, similar en su aspecto –aunque de menor tamaño– a las partículas de Dane del HBV. EL HDV posee una envoltura sin espículas en su superficie externa.

Los estudios de microscopía electrónica no han detectado estas partículas completas en el interior de los hepatocitos, aunque sí en el suero de los pacientes infectados (Figura 24.4.1).

Se han demostrado complejos de ribonucleoproteínas en el virión, formando un *core* o nucleocápside de apariencia esférica, y aproximadamente 19 nm de diámetro. El *core* contiene el genoma viral, así como cerca de 60 copias de la proteína antigénica del *core* de HDV (HDV Ag) en sus dos formas (24 y 27 kDa).

Mediante tratamiento con detergentes no iónicos, la estructura de nucleocápside es liberada de la partícula completa y el HDV Ag se torna detectable.

3. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN FUNCIONAL

El HDV es deficiente en su capacidad replicativa. Su organización estructural necesita de la colaboración del HBV, ya que depende de la presencia del antígeno de superficie del HBV (HBsAg) para la formación de los viriones.

Hacia el interior de la envoltura se ubica(n) la(s) proteína(s) del *core* del HDV (véase *constitución proteica del HDV*; Figura 24.4.1A). Esta proteína es la que fue detectada originalmente por Rizzeto como antígeno delta (HDV Ag) en hepatocitos de humanos infectados. Las interacciones entre los polipéptidos del *core* y el RNA genómico son presumiblemente mínimas para conformar una nucleocápside estable, habiéndose postulado que esas interacciones conferirían estabilidad al RNA viral.

En la Tabla 24.4.1 se comparan diferentes propiedades de un virión del HBV y otro del HDV.

La organización tan particular de este virus quimérico (del griego *chimeira*: animal hipotético con cabeza de león, cuerpo de cabra y cola de dragón) ha suscitado el interés de los virólogos.

Su organización estructural posee ciertas semejanzas con la de diversos patógenos de las plantas como los viroides, los virus satélites y los RNA satélites (Tabla 24.4.2). Además de su estructura circular, el HDV se parece a los viroides y algunos virusoides vegetales por la presencia intramolecular de extensas secuencias complementarias (70% de la extensión), así como por tener una actividad autocatalítica de clivaje y ligado. Sin embargo, los viroides se diferencian del HDV por no necesitar de un virus ayudador (en el caso del HDV, dicha función la cumple el HBV), por presentar genomas pequeños (200 a 450 nucleótidos) y no codificar proteína alguna.

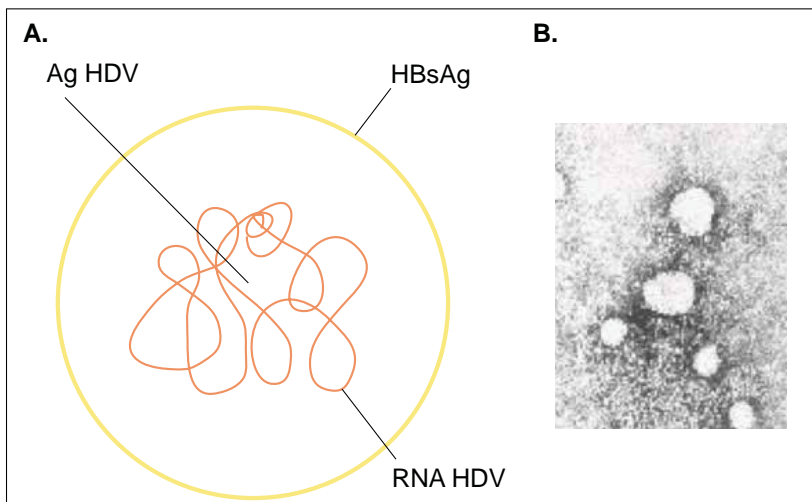


Figura 24.4.1. A) Representación esquemática del HDV. B) Microscopía electrónica del HDV. Modificado del sitio web del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, EE.UU.

Característica	HBV	HDV
Diámetro	40-42 nm	36-43 nm
Envoltura	Sí	Sí
Antígenos de envoltura	Antígenos HBs, Pre-S1, Pre-S2	Antígenos de envoltura de hepadnavirus*
Nucleocápside	Sí	No hay estructura forme o es inestable (?) al tratamiento con detergentes no iónicos, necesario para su detección
Antígeno del core	HBc Ag (de la nucleocápside)	Antígeno delta: HD Ag
Genoma	DNA parcialmente bicatenario	RNA monocatenario

Tabla 24.4.1. Propiedades comparativas entre el HBV y el HDV. * La envoltura que cubre al HDV que infecta al hombre posee HBs Ag, mientras que –posiblemente– adquiere la cubierta de otros hepadnavirus cuando infecta distintos hospedadores (del virus de la hepatitis de la marmota –y posiblemente– el de la hepatitis B del pato pekinés) infectados con ellos.

Característica	HDV	Viroide	Virus satélite	RNA satélite
Replicación	Autónoma*	Autónoma	Depende del virus ayudador	Depende del virus ayudador
Traducción del RNA propio	Sí	No	Sí	Sí o no
Encapsidación	Las proteínas del core no se detectan como una cápside estructural; cubierta exterior: envoltura de hepadnavirus	No	Proteína del virus satélite	Proteína del virus ayudador
Homología con el RNA viral del virus ayudador	--	--	No	No
Homología con DNA de la célula hospedadora	No	No	No	No
Homología con RNA 7 S de la célula hospedadora	Sí	Sí	No	No

Tabla 24.4.2. Cuadro comparativo entre el HDV y otros agentes. * En la infección humana, la incorporación de la envoltura del HBV al virión del HDV serviría para proveer la especificidad del tropismo de éste, y para mantener la estabilidad del core de la partícula. La(s) proteína(s) del core está(n) codificada(s) por el HDV.

Debido a estas características particulares del HDV que lo asemejan pero, a su vez, lo distinguen de los viroides y virus satélites, el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) lo clasifica como único miembro del género *Deltavirus*, sin asignarle familia viral alguna, reconociéndolo como un **agente subviral con características compartidas con viroides/virus satélites**.

3.1 GENOMA VIRAL

Está constituido por RNA monocatenario de polaridad (-), el que dentro de la célula se dispone en una conformación circular. El genoma consta de 1679/1683 nucleótidos y contiene cerca de un 60% de contenido C+G.

El HDV es el único virus animal conocido que posee un genoma a RNA circular. Esta disposición responde a un elevado grado de complementariedad intramolecular que permite al 74% de los nucleótidos aparearse entre sí, para formar una estructura estable análoga a una varilla indivisible que permite al virus mantener su infectividad aun a 60° C durante 30 minutos.

El RNA genómico se replica a través de una molécula de RNA intermediario presente en una cantidad 10 veces menor al genoma

viral y exactamente complementaria a éste, denominado RNA anti-genómico. Estos dos tipos de RNA no están poliadenilados y presentan un único dominio de ribozima de 85 nucleótidos de longitud aproximadamente, por lo que pueden llevar a cabo reacciones de auto-clivaje y auto-ligado (Figura 24.4.2).

Un tercer tipo de molécula de RNA del HDV está presente en la célula infectada, en una proporción 500 veces menor a la del genoma, y presenta la misma polaridad que el RNA anti-genómico. Este RNA es lineal y posee una estructura de *cap* en el extremo 5' y señal de poliadenilación en el 3', consistente con su rol como RNA mensajero para la síntesis del HDV Ag. Es más pequeño que las secuencias de RNA genómico (-) y anti-genómico (+), ya que sólo consiste en 0,8 kb (Figura 24.4.2).

Se han detectado al menos cinco marcos abiertos de lectura (ORFs) tanto en el RNA genómico (-) como anti-genómico (+). Sólo se ha demostrado que el ORF de mayor tamaño (ORF₃) en el RNA anti-genómico es el único funcional y conservado, ya que codifica una proteína viral específica: el HDV Ag. Este marco abierto de lectura –que se extiende a lo largo de menos del 50% de la secuencia nucleotídica– se expresa como dos péptidos diferentes: p24 y p27, según el nucleótido central (1012) del codón 196 consista en una U o en una C (véase replicación).

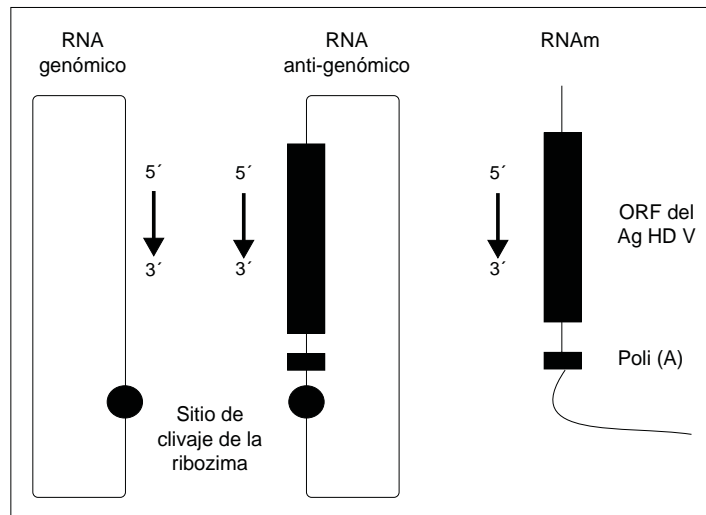


Figura 24.4.2. Esquema correspondiente a los tres tipos de moléculas de RNA del HDV que se acumulan durante la replicación viral.

3.1.1 Origen del genoma viral

A medida que nuestros conocimientos sobre la estructura genómica del HDV y los procesos involucrados en la replicación viral se incrementan, resulta interesante hacer uso de esta información para especular sobre el posible origen de HDV. Las hipótesis iniciales, basadas en las características comunes existentes entre los viroides y el HDV, condujeron a los investigadores a proponer que el genoma viral podría haber surgido de la captura celular de un RNA símil-viroides. Llamativamente, un homólogo celular del HDV Ag, llamado DIPA (*delta-interacting protein A*), ha sido identificado, siendo éste capaz de modular la replicación del HDV. Sin embargo, ulteriores análisis cuestionaron la homología propuesta para ambas proteínas.

Por otra parte, estudios recientes han sugerido que el HDV posee su origen en el transcriptoma humano. Esta hipótesis se basa en la observación que, desde el punto de vista evolutivo, las ribozimas del HDV y las encontradas en el intrón del gen humano CPEB3 están relacionadas. En la naturaleza, el HDV ha podido ser aislado solamente en el ser humano. Por lo tanto, la ausencia de infección natural detectable en animales sugiere que este virus es de origen reciente y que deriva del transcriptoma humano, adquiriendo la proteína del antígeno delta y las ribozimas de su hospedador.

3.1.2 Diversidad genética

Inicialmente, el análisis filogenético de los aislamientos de HDV disponibles, permitió clasificar a todas las cepas en 3 genogrupos o genotipos (I-III) al observarse una divergencia nucleotídica entre las mismas de hasta el 40% en la totalidad del genoma viral. Sin embargo, la reciente inclusión al estudio de secuencias de HDV obtenidas en el continente africano ha demostrado la existencia adicional de 5 genotipos (IV a VIII), que se suman a los tres ya descritos.

La elevada divergencia nucleotídica presente entre cepas de HDV provenientes de diversas regiones geográficas es un reflejo de la rápida tasa de evolución que caracteriza a este virus. Cabe destacar que, aun entre clones obtenidos de un mismo individuo infectado con el virus, las secuencias exhiben hasta un 1,43% de divergencia nucleotídica. La tasa de fijación de mutaciones del RNA del HDV oscila aproximadamente entre 3×10^{-2} y 3×10^{-3} por sitio nucleotídico por año. Esta tasa varía en diferentes regiones del genoma. Se ha observado que esas mutaciones se asocian con cambios en el cuadro clínico: cuanto más drásticos son estos cambios clínicos, mayor es el número de nucleótidos mutados.

Se ha postulado que la elevada heterogeneidad genómica del HDV respondería a la conjunción de diversas causas, como por ejemplo: 1) la ausencia de lectura correctora de prueba de la RNA

polimerasa que conduce a la incorporación anómala de nucleótidos durante la replicación; 2) el proceso de edición que modifica el genoma viral para dar origen a la proteína p24 ó p27; y 3) el mecanismo de cambio de templado (*template-switching*) que ocurre durante la transcripción por la acción de la RNA polimerasa celular sobre el templado de RNA y que se asocia con deleciones o inserciones del genoma.

Los eventos de recombinación inter-genotípica pueden producirse durante la infección natural con HDV, tal como se documentó en cepas recombinantes de Taiwán, donde es frecuente la cocirculación de múltiples genotipos (I, II y IV) y, por lo tanto, predominan las infecciones mixtas.

A pesar de la heterogeneidad genética observada entre los aislamientos de HDV, no existen hasta el momento diferencias serológicas entre los mismos. Esto significa que, con respecto a la antigenicidad viral, todas las cepas de HDV están relacionadas.

3.2 PROTEÍNAS

La única proteína expresada por el HDV (HDV Ag) no se encuentra expuesta en la superficie externa del virión, sino que está presente en la nucleocápside interna. Tiene dos formas de presentación: una de 24 kDa y otra de 27 kDa, como consecuencia del proceso de edición (C por U) en el nucleótido 1012 (*véase replicación*).

La proteína HDV Ag, en cualquiera de sus dos isoformas, es una fosfoproteína no glicosilada. Posee actividad de unión al RNA y se sugiere que se une al genoma del HDV en la partícula viral. También existe evidencia que establece que dicha proteína puede facilitar *in vitro* la elongación de la transcripción del RNA por la RNA polimerasa celular. En las células infectadas, el HDV Ag se localiza en el núcleo.

Las dos proteínas codificadas son idénticas, aunque la de mayor peso molecular presenta una extensión de 19 aminoácidos en su extremo carboxilo-terminal. La forma corta (195 aa, HDV-S Ag ó p24) es sintetizada primero siendo necesaria para la replicación viral, mientras que la forma larga (214 aa, HDV-L Ag ó p27) se torna detectable sólo luego de una replicación prolongada del RNA viral y ejerce efectos inhibitorios sobre aquélla, a la vez que es requerida para el empaquetamiento del genoma viral usando las proteínas de envoltura del HBV.

El HDV-L Ag puede estar isoprenilado en una cisteína ubicada a 4 residuos del extremo carboxilo-terminal. Se ha observado que la mutación de esta cisteína puede bloquear la isoprenilación y el ensamblaje de HDV.

Entre los dominios funcionales de la proteína viral se incluyen: a) la señal de localización nuclear situada en el extremo amino ter-

minal; b) el motivo de unión al RNA presente en el tercio medio del genoma, sugiriéndose que la alta proporción de arginina en los 2/3 colindantes al extremo amino de esta proteína promovería la interacción con el genoma viral; y c) un tercer dominio constituido por los 19 aminoácidos del extremo carboxilo-terminal posiblemente involucrado en la interacción con el HBs Ag durante el ensamblado de los viriones y la inhibición de la replicación del genoma del HDV.

La envoltura del HDV es provista por un virus ayudador. En la infección natural humana ese papel es desempeñado por el HBV. Experimentalmente se ha logrado infectar primates y marmotas (*Marmota monax*) con hepadnavirus que proveen la envoltura necesaria: el HBV y el virus de la hepatitis de la marmota, respectivamente.

El ensamblado de los viriones de HBV, aun en ausencia de HDV, es un proceso ineficiente, ya que la mayoría de las partículas ensambladas están vacías y carecen de la estructura de la nucleocápside del HBV o del genoma viral, por lo que no son infecciosas. El suero de un paciente infectado puede contener entre mil a un millón de partículas vacías por cada una de las que contiene la nucleocápside (partícula de Dane). La mayoría de las partículas vacías son esféricas y filamentosas—de aproximadamente 22 nm de diámetro—y compuestas predominantemente por la proteína S del HBs Ag. La nucleocápside puede ser cubierta por la envoltura, formando así partículas infecciosas de 40–42 nm, solamente cuando la proteína pre-S1—y específicamente, una señal de miristilación unida a su extremo amino-terminal— está presente. La proteína pre-S2 es aparentemente innecesaria tanto para el ensamblaje como para la infectividad.

El HDV se beneficia con la producción excesiva de partículas vacías del HBV, utilizándolas para su propio proceso de ensamblaje y, de esta manera, inserta el genoma y el antígeno viral dentro de la cubierta externa proporcionada por el HBV (constituida por lípidos y por la proteína del HBs Ag en sus tres formas conocidas pre-S1, pre-S2 y S). Cabe destacar que la proporción en la que estas proteínas se encuentran en la envoltura del HDV es distinta a la hallada en viriones del HBV. En el caso del HDV, predomina la forma pequeña (proporción S: pre-S2: pre-S1 de 95: 5: 1). Si bien la sola presencia de la proteína S es suficiente para el ensamblaje de las partículas de HDV, éstas no son infecciosas. Al igual que lo que ocurre con HBV, la proteína pre-S1 es necesaria para conferir infectividad.

Hasta el momento, se desconoce evidencia alguna que sugiera que las proteínas derivadas del HBV sean modificadas al formar parte de la envoltura del HDV.

3.3 REPLICACIÓN

La replicación del genoma de casi todos los virus a RNA necesita de la intervención de enzimas codificadas por el propio virus como RNA polimerasas-RNA dependientes o bien transcriptasas inversas, mientras que los virus satélites dependen de la polimerasa del virus ayudador para su replicación.

Sin embargo, el HDV parecería constituir un caso especial. El HDV es un *satélite subviral* del HBV, que codifica una transcriptasa inversa para su propia replicación. Sin embargo, no se ha podido detectar intermediario alguno de DNA durante la replicación del HDV, sugiriendo que este proceso depende de una RNA polimerasa celular. Estudios recientes revelaron que la transcripción del RNAm y la síntesis del genoma del HDV están mediadas por la RNA polimerasa celular tipo II. Más aún, el hecho de que el RNAm del HDV experimente el mismo procesamiento postranscripcional que los transcritos de RNAm derivados del DNA celular apoya aquella hipótesis.

En el interior celular, el RNA genómico se duplica de manera análoga a la utilizada por los viroides. El proceso de replicación ocurriría en el núcleo del hepatocito y el modelo propuesto ha sido designado *rolling circle* o círculo rodante. Según este modelo, el RNA genómico sirve como templado para la síntesis de las bases complementarias que constituyen el RNA anti-genómico. Éste, a

su vez, es utilizado como templado para la síntesis de más RNA genómico o bien experimenta modificaciones en sus extremos 5' y 3' dando origen al RNAm que codifica al HDV Ag. En este proceso, a partir de cada templado se forman múltiples lineales que son luego clivados para originar monómeros lineales, finalmente ligados en sus extremos, originando las formas genómicas circulares cerradas covalentemente (Figura 24.4.3).

Durante la replicación en el núcleo, algunas de las moléculas de RNA genómico experimentan un proceso de edición mediado por una enzima denominada ADAR-1 (*Adenosine Deaminase Acting on RNA*). La forma pequeña de esta adenosina deaminasa sería la encargada de generar cambios en la molécula de RNA genómico del HDV. Este proceso no ocurre hasta que se sintetizan elevados niveles de RNA viral y de p24. El cambio nucleotídico C por U (transición) tiene especial relevancia en la regulación de los procesos de replicación y ensamblado, ya que tiene como objetivo la síntesis de p27 que, a su vez, inhibe la polimerización del RNA genómico e interviene en el empaquetamiento viral. El sitio que experimenta dicho cambio corresponde a la segunda posición del triplete AUC en la posición 1012 del RNA genómico. Como la cadena del genoma viral es de polaridad (-), el triplete genómico AUC originará un codón de terminación UAG en el RNAm, dando origen a un polipéptido de 195 aminoácidos (p24). Cuando actúa ADAR-1 este triplete es modificado (AUC es reemplazado por ACC). De esta manera, el cambio nucleotídico devendrá en un nuevo codón UGG, que codifica en la cadena de RNAm (complementaria al RNA genómico de polaridad (-) al aminoácido triptófano permitiéndose así, la síntesis de un polipéptido con 19 aminoácidos extras (p27; figura 24.4.4). Es por ello que en la infección natural se observan dos tipos de genoma: S (*Small*) y L (*Large*), los que codifican respectivamente para p24 y p27.

4. PATOGENIA

Dado que el HDV comparte las proteínas de la envoltura con el HBV, se ha postulado que los dos virus poseen un mecanismo de ingreso celular muy similar, o inclusive idéntico. Estudios recientes sugieren que existiría una asociación espacial o nexo físico entre la señal de miristilación ligada al extremo amino de la proteína pre-S1 del HBs Ag y un dominio pequeño de 5 a 20 aminoácidos en la misma molécula que permitiría el ingreso de ambos virus al hepatocito.

El genoma del HDV, al ingresar, es transportado por el HDV-S Ag al núcleo donde se produce la replicación. La unión de este antígeno al genoma viral protegería también al RNA del HDV de la degradación.

Después de iniciado el proceso de replicación, el mecanismo de edición anteriormente descrito permitirá la síntesis del HDV-L Ag. De esta manera, esta proteína puede iniciar el empaquetamiento viral mediado por su interacción con HBs Ag. Sin embargo, el antígeno del HDV se encuentra en el núcleo mientras que el HBs Ag está en el citoplasma celular. Todavía se desconoce cómo pueden entrar en contacto dos proteínas ubicadas en comportamientos celulares tan distantes. Se especula que el RNA genómico empaquetado en una nucleocápside con las dos formas del HDV Ag (p24 y p27) interactuaría con el HBsAg insertado en la membrana del retículo endoplásmico. Las partículas virales ensambladas ingresarían al aparato de Golgi y luego serían liberadas de la célula.

Numerosos estudios experimentales y clínicos indican que la infección por HDV es patogénica para el hepatocito.

La acción citopática directa del HDV con la consecuente destrucción celular es producto de la expresión del HDV Ag y la replicación del genoma viral. La citopatogenicidad asociada a la replicación viral podría explicar cómo en el pico de la infección aguda por HDV, dicho evento puede ser tan patogénico, pero durante la infección crónica, en comparación, la producción viral y la patogenicidad son mucho menores. Con el devenir del tiempo, la replicación del genoma viral declina gradualmente. Esto se debe a la presencia de formas alteradas del HDV Ag—como la proteína de 27 kDa y otras surgidas

de procesos anómalos de edición o errores en la incorporación de bases durante la replicación— que no favorecen la replicación o, aún peor, actúan como inhibidores dominantes negativos de la misma. Por lo tanto, la replicación genómica es en principio lo suficientemente rápida como para que se induzca en la célula la síntesis de elevados niveles del HDV-S Ag y se transcriban y acumulen elevados niveles de RNA viral. Esto conduce a que la célula entre en un estado de quiescencia y promueva la apoptosis antes de que se produzcan niveles adecuados de HDV-L Ag para suprimir la síntesis de RNA. El proceso de edición parecería ser, entonces, indispensable para garantizar la supervivencia celular.

El RNA genómico —unas 300 000 copias por célula— constituye hasta el 1% del total de RNA celular. Esta acumulación excepcionalmente alta de material genético viral contribuiría a la alteración de la funcionalidad del hepatocito. A su vez, la detección de complementariedad entre el RNA anti-genómico y el RNA celular de 7S podría ser otro potencial mecanismo citopático que afecte la traducción normal de las proteínas celulares.

Probablemente, mecanismos de autoinmunidad también contribuirían a la muerte del hepatocito, ya que se han detectado una alta frecuencia de anticuerpos anti-lámina nuclear C y anti-LKM3 (*Liver-Kidney-Microsomal*) en pacientes con hepatitis crónica por HDV.

El curso evolutivo de la infección puede ser modificado por diversos factores, entre ellos el/los genotipo/s del HDV infectante/s, o si la sobreinfección ocurre en portadores de ciertas cepas mutantes del HBV. En este último caso, la replicación del HDV ocurre con menor eficiencia, por lo que se observa un curso clínico asintomático sin exacerbación aguda de la afección hepática. También es importante conocer el estatus de portación persistente del HBV (latente o replicativo). De esta manera, en caso de una infección latente (ausencia de producción de progenie viral, y por ende, con HBe Ag y DNA del HBV indetectables en suero), la infección por HDV presenta una progresión lenta a la cronicidad. Por otra parte,

la replicación del HBV brinda las condiciones biológicas ideales al HDV para diseminarse de célula a célula, incrementado su agresividad.

La patogenia de la infección por HDV se relaciona con el hecho de que el paciente esté o no previamente infectado con HBV. Como resultado pueden originarse dos situaciones: 1) **coinfección con HBV y HDV**; ó 2) **sobreinfección con HDV en un individuo con infección activa por HBV**. En este último caso, a su vez, la sobreinfección puede producirse ante 3 circunstancias: a) en un paciente que cursa una hepatitis aguda; b) en un portador crónico de HBV (fase de inmunotolerancia; véase el ítem 3.6.1.2.1 del Capítulo 24.3 *Hepatitis B*); o c) en un paciente con hepatitis crónica por HBV.

La coinfección HBV/HDV en un individuo no inmune contra el HBV es habitualmente autolimitada. Las manifestaciones clínicas no difieren de las que producen la infección única por HBV. El rango de cuadros detectables comprende desde infecciones inaparentes hasta hepatitis fulminantes (excepcionales). Parecería que la replicación del HDV es dependiente del nivel de diseminación de la progenie de partículas del HBV para asegurar la infección dual de un hepatocito dado, ya que el HDV requiere de la cubierta exterior del HBV para adsorberse a esa célula. La síntesis de antígeno delta induciría la disminución en la producción de antígenos del HBV, por lo que sus interrelaciones son complejas. En este proceso de regulación negativa podría intervenir el interferón. Además de los mecanismos inmunológicos desencadenados por la infección con HBV, los hepatocitos estarían también afectados por un efecto citopático inherente al HDV.

La **sobreinfección con HDV en un paciente con hepatitis aguda por HBV agrava las manifestaciones clínicas y puede progresar a la cronicidad —más frecuentemente que la infección única por HBV—, ya sea como hepatitis crónica activa o persistente**. Es motivo de controversia si existe o no una mayor asociación entre hepatitis crónicas HBs Ag⁺ y hepatocarcinoma cuando además hay sobreinfección por HDV.

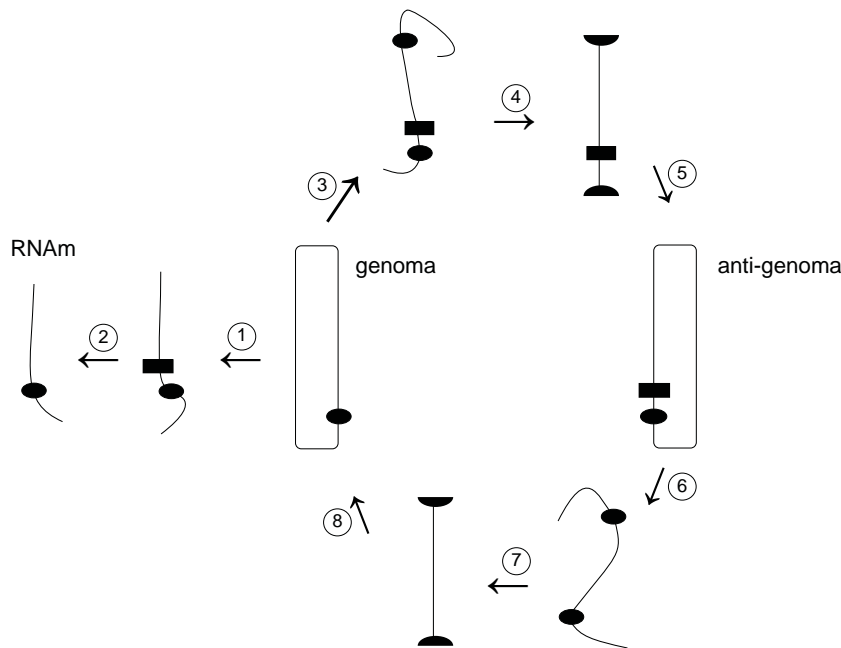


Figura 24.4.3. Proceso de replicación del HDV. 1. El RNA genómico actúa como molde para la transcripción de RNA anti-genómico. 2. Este transcripto experimenta el procesamiento de sus extremos 5' (adición del cap) y 3' (señal de poliadenilación), originando una molécula de RNAm. 3. El RNA genómico actúa como molde para otros transcriptos de RNA anti-genómico, algunos de los cuales, al ser transcriptos desde un molde de RNA circular pueden alcanzar una longitud superior a la del genoma. 4. Estos transcriptos anti-genómicos de mayor longitud experimentan un clivaje mediado por las ribozimas liberando anti-genomas lineales de longitud esperada. 5. Éstos se pliegan y ligan para producir nuevas moléculas de RNA anti-genómico. 6-8. Como ocurrió en los pasos 4 a 6, los anti-genomas pueden actuar como molde para la transcripción y procesamiento de nuevos RNA genómicos.

En un portador crónico asintomático de HBV la sobreinfección con HDV puede desencadenar la sintomatología de una hepatitis aguda. La contribución del HDV a las hepatitis fulminantes en portadores crónicos es tema de controversia.

La **sobreinfección con HDV en pacientes con hepatitis B crónica puede agravar la evolución de la enfermedad.** Ello está relacionado con la actividad del HBV más que con el nivel de replicación del HDV. El examen histopatológico confirma el diagnóstico de hepatitis crónica, aunque se observa una relativa falta de elementos inflamatorios, lo que es congruente con la noción de que el HDV puede ejercer efectos citopáticos *per se*. Se ha observado en pacientes con hepatitis crónica por dicho virus y coinfectados también con HIV, un alto título de HDV y supresión del número de linfocitos T CD4⁺ circulantes. Asimismo, al igual que lo observado en la hepatitis virales crónicas por HBV o HCV, la respuesta de linfocitos T citotóxicos para epítopes específicos del HDV desempeñaría un rol esencial en la limitación de la actividad lesional crónica por HDV.

Las partículas virales del HDV pueden ser neutralizadas por los anticuerpos anti-HBs, pero no por las inmunoglobulinas dirigidas hacia epítopes del HDV Ag.

5. EPIDEMIOLOGÍA

5.1 VÍAS DE TRANSMISIÓN

En la naturaleza, el virus se transmite principalmente a través de la vía parenteral y, en menor medida, por vía sexual, presentando los mismos mecanismos de transmisión que el HBV. La transmisión perinatal del HDV depende de la infectividad del HBV, siendo factible en madres portadoras de HBV con signos serológicos de replicación viral, por ejemplo, HBe Ag⁺ o anticuerpos anti-HBe⁺/HBV DNA⁺.

En determinadas áreas endémicas del norte de América del Sur, como por ejemplo la Amazonia brasileña y venezolana, el contagio del HDV podría ocurrir como resultado de una exposición inaparente, sobre todo relacionada con efracciones cutáneas por picaduras de insectos o a través de las mucosas. Estudios realizados en siete comunidades originarias del estado de Amazonas en Brasil concluyeron que, si bien la transmisión de carácter horizontal e

intra-familiar existe, el mecanismo de diseminación más importante del HDV en esta población es el sexual. Factores ambientales y culturales relacionados con el comportamiento humano y –potencialmente– con la presencia eventual –y hasta hoy no documentada– de reservorios animales o infección de insectos podría influenciar la circulación del HDV.

5.2 PREVALENCIA E INCIDENCIA

En el mundo, entre los más de 350-460 millones de portadores crónicos del HBV existen aproximadamente 18 millones de individuos infectados con HDV. El principal factor epidemiológico para la propagación del HDV es el estado de portador crónico de HBV (fase de inmunotolerancia de la infección persistente), aunque también se aplica a los grupos de alto riesgo para HBV como los drogadictos endovenosos, hemodializados y politransfundidos.

Con relación a los datos demográficos, la infección por HDV, al igual que la de HBV, afecta principalmente a pacientes del sexo masculino. En general, el grupo etario con mayor prevalencia de HDV es el ubicado entre los 30 a 40 años. En cambio, en la Amazonia brasileña, la precocidad de la infección por HBV se asocia a una mayor prevalencia de HDV en individuos menores de 15 años de edad.

Estudios de prevalencia de anticuerpos anti-HDV en pacientes que exhiben el HBs Ag revelaron que el HDV presenta una distribución global, pero no uniforme (Figura 24.4.5). Las áreas de elevada prevalencia incluyen la región mediterránea, Medio Oriente, Asia central, África occidental, la cuenca del Amazonas y algunas islas del Océano Pacífico Sur. A pesar de la alta tasa de portadores crónicos de HBV en el continente asiático, el HDV es poco común allí, aunque está presente en Taiwán, China e India en grupos de riesgo para HBV. Esto podría responder a una resistencia genética de esas poblaciones a la infección por HDV.

Se ha observado un incremento de la penetración de la infección por HDV en comunidades con prácticas de riesgo, como los usuarios de drogas ilícitas inyectables en Europa central y en grandes ciudades de América. De la misma manera, nuevos focos de elevada prevalencia del HDV han sido identificados en la isla de Okinawa en Japón, en el norte de India y en Albania. Reportes recientes demostraron que la prevalencia de hepatitis aguda y crónica por HDV está

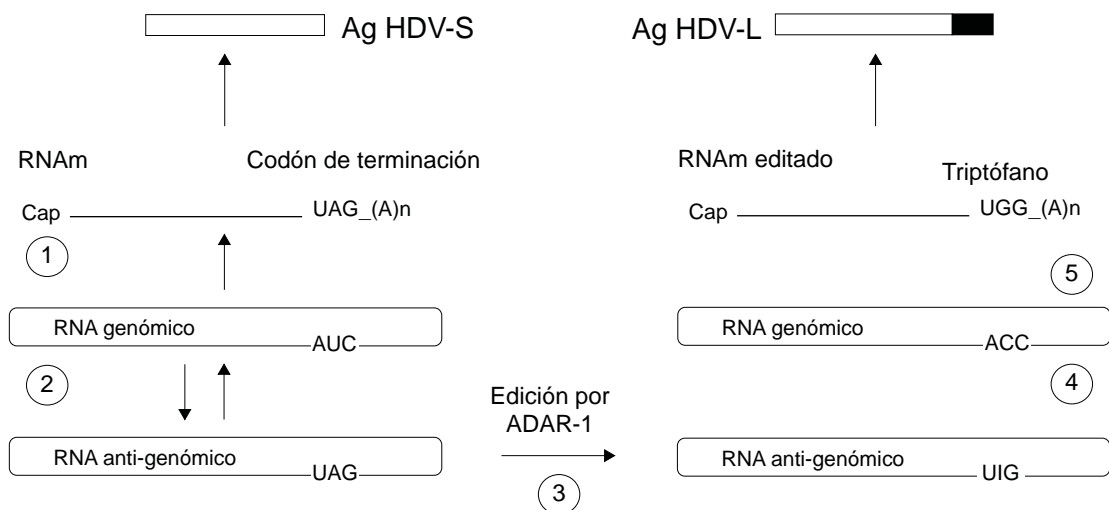


Figura 24.4.4. Proceso de edición del RNA del HDV. 1. La transcripción del genoma origina una molécula de RNAm que codifica al Ag HDV-S. 2. El Ag HDV-S permite la replicación del genoma viral por la RNA polimerasa II celular, generando una molécula de RNA anti-genómico. 3. ADAR-1 actúa sobre el RNA anti-genómico convirtiendo la adenosina del triplete en la posición 1012 en inosina. 4. Al igual que la guanosina, la inosina se aparea con una citosina; por lo tanto, después de la replicación el genoma posee una C en lugar de una U. 5. El genoma editado se transcribe dando origen a una molécula de RNAm que codifica al Ag HDV-L. Dicha proteína contiene una extensión de 19 aminoácidos más, inhibe la replicación y es necesaria para el ensamblaje viral.

tendiendo a decrecer en la región mediterránea europea y muchas otras partes del mundo, lo que ha sido atribuido a la reducción mundial en el número de portadores crónicos de HBV.

Existe un reservorio importante en América Latina en el occidente amazónico, que no sólo comprende a Brasil, sino que alcanza a Venezuela, Colombia y Perú. Numerosos estudios demostraron en esta zona una asociación entre la ocurrencia de formas endémicas de hepatitis aguda grave y brotes epidémicos de hepatitis fulminante con alta mortalidad y la existencia —en la misma región— de sobreinfección por HDV entre portadores crónicos de HBV residentes en áreas de alta endemicidad para este último.

La *hepatitis de la Sierra Nevada de Santa Marta* ha sido reconocida como una forma inusual de hepatitis grave que afecta desde la década de 1930 al noroeste colombiano perteneciente a la cuenca del río Amazonas. En el norte de Brasil, donde la tasa de portadores crónicos de HBV es una de las más elevadas en el mundo (5-20%), el cuadro es similar al observado en Colombia, ya que también se ha descrito un tipo de hepatitis endémica conocida como *Fiebre de Labrea*.

Se han reportado brotes epidémicos de hepatitis fulminante en numerosas zonas de la Amazonia que afectaron gravemente a los grupos indígenas residentes. Merecen mencionarse entre ellos, las epidemias documentadas a finales de la década de 1960 en la cuenca del río Orinoco perteneciente al Amazonas venezolano, y en el límite norte y noreste de la selva peruana entre 1992 y 1993. Es necesario mencionar también la epidemia que azotó entre 1979 y 1981 comunidades originarias de la región montañosa de Perija (noroeste de Venezuela) ya que este área, aunque desde el punto de vista topográfico no forma parte de la cuenca del Amazonas, presenta los mismos factores de riesgo que las mencionadas anteriormente: endemicidad del HDV y gran número de portadores crónicos de HBV.

Si bien se han observado los mismos factores de riesgo en otras zonas del continente americano (por ejemplo, el estado de Chiapas en México, la Amazonia boliviana, los valles de Huanta y Abancay en Perú, y la región occidental del Amazonas brasileño), hasta el momento no se han registrado brotes epidémicos en ellos.

5.3 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Los diferentes genotipos del HDV presentan una distribución geográfica variada. El genotipo I se encuentra ampliamente diseminado a nivel mundial; el genotipo II circula exclusivamente en Asia, y los genotipos V a VIII se localizan en el continente africano. El IV se distribuye en las islas de Taiwán y Okinawa (Japón). Finalmente, el genotipo III es específico de Sudamérica y, en áreas endémicas de Venezuela y Perú, se lo ha observado asociado al genotipo F del HBV.

6. CUADRO CLÍNICO

La infección por HDV requiere una infección asociada por HBV. El pronóstico de la infección depende si se trata de una coinfección HBV-HDV o una sobreinfección de HDV en un individuo crónicamente infectado con HBV.

La coinfección simultánea con HBV-HDV deviene, generalmente, en hepatitis agudas autolimitadas tipo B y D. La hepatitis crónica por HDV es inusual entre pacientes coinfectados (menos del 5%).

Aunque el período de incubación depende del título de HBV en el inóculo infectante, éste varía entre 3 a 7 semanas en la hepatitis D aguda. Inmediatamente después, se da inicio a una fase pre-ictérica con manifestaciones inespecíficas (letargia, fatiga, anorexia y náuseas) que se extiende por 3 a 7 días. Durante esta fase, es común la alteración de los valores de transaminasas séricas. La etapa ictérica comienza con la ictericia típica, mientras que la fatiga y las náuseas persisten y se evidencia coluria, acolia e hiperbilirrubinemia. En los pacientes con infecciones agudas y autolimitadas, el período de convalecencia se inicia con la desaparición de los síntomas y signos clínicos, aunque la fatiga puede persistir por tiempo prolongado.

En contraposición con la situación anteriormente descrita, la sobreinfección con HDV en un individuo con hepatitis B crónica se asocia generalmente a infecciones agudas graves con períodos cortos de incubación que progresan a hepatitis D crónica en más del 80% de los infectados. También, es común la asociación con hepatitis viral fulminante y con la infección hepática crónica activa grave con tendencia a la cirrosis (60-70%). En comparación con la infección por HBV, la sobreinfección aguda y la infección crónica por HDV se encuentran asociadas a mayores chances de presentar una evolución más tórpida hacia hepatitis fulminante y daño hepático progresivo. Más aún, en pacientes coinfectados con HBV y HIV, la sobreinfección con HDV incrementa el riesgo de cirrosis hepática, descompensación y muerte.



Distribución geográfica de la Infección por HDV

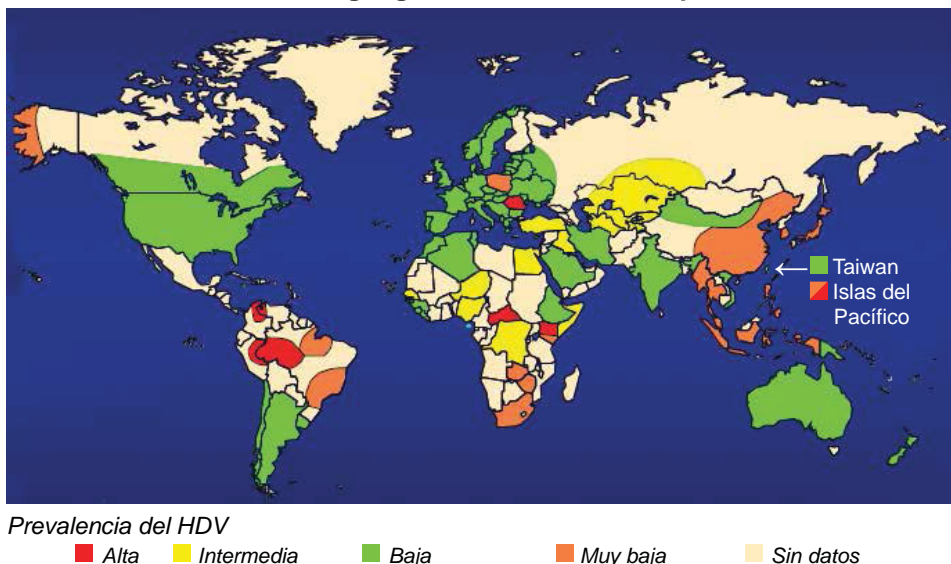


Figura 24.4.5. Prevalencia mundial del HDV. Modificado del sitio web del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, EE.UU.

Durante la fase aguda de la infección por HDV, las síntesis de HBs Ag y DNA del HBV permanecen inhibidas hasta que la infección se resuelve.

La hepatitis viral fulminante es inusual. Sin embargo, en comparación con el resto de los virus de hepatitis, es 10 veces más común en casos de sobreinfección de HBV y HDV. Esta forma de presentación clínica se caracteriza por cambios en la personalidad, alteraciones del sueño, confusión, déficit de concentración, trastornos en la conducta, somnolencia y coma; englobados todos en una encefalopatía hepática. La tasa de mortalidad de la hepatitis D fulminante alcanza el 80%, por lo que el trasplante hepático está indicado.

La hepatitis D crónica se manifiesta en un comienzo como una infección aparentemente aguda con síntomas más leves. Mientras que las transaminasas séricas se mantienen elevadas, los niveles de bilirrubina y albúmina permanecen normales, al igual que el tiempo de protrombina. Los niveles de HBs Ag están habitualmente disminuidos, respecto de los infectados crónicamente sólo con HBV en las instancias de replicación del HDV.

La infección crónica por HDV progresa a cirrosis en 5 a 10 años, aunque en algunos casos reportados ese tiempo se reduce a 2 años.

La prevalencia del carcinoma hepatocelular en pacientes crónicamente infectados con HDV con enfermedad hepática avanzada es similar a la observada en pacientes con infección crónica exclusiva por HBV. El carcinoma hepatocelular podría ser producto de un efecto secundario de la cirrosis asociada, y no del efecto oncogénico directo del virus.

En resumen, se han propuesto tres fases en la evolución de la hepatitis crónica por HDV: a) fase activa temprana con replicación activa del HDV y supresión del HBV; b) fase moderadamente activa con descenso en la replicación del HDV y reactivación del HBV; y c) fase tardía con desarrollo de cirrosis y hepatocarcinoma o con remisión, producto de una marcada supresión de ambos agentes infectantes.

La tasa de mortalidad de la infección por HDV varía entre el 2 al 20%, valores 10 veces mayores a los reportados para HBV.

6.1 SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS GENOTIPOS DEL HDV

La infección por el genotipo I del HDV ha sido asociada a un espectro diverso de afección hepática, desde formas clínicas fulmi-

nantes hasta enfermedad crónica grave. En cambio, el genotipo II presenta un pronóstico menos desfavorable.

Los brotes epidémicos de hepatitis fulminante ocurridos en áreas endémicas de Venezuela y Perú han sido atribuidos al genotipo III del HDV asociado al genotipo F del HBV, el más prevalente en la región. Sin embargo, en otras regiones sudamericanas, por ejemplo, la Amazonia brasileña, la elevada prevalencia de la infección por HDV y HBV se asocia también a epidemias de hepatitis grave, aunque predomina el genotipo A del HBV y no el F.

7. DIAGNÓSTICO

La sospecha de la infección por HDV ocurre ante un proceso de reactivación y agravamiento en una hepatitis crónica, frente a una evolución tórpida de ésta o ante la presentación de una hepatitis aguda –que puede o no ser fulminante– en un portador crónico de HBs Ag.

El diagnóstico de la infección por HDV es complejo como consecuencia de la propia historia natural de la infección y por la necesidad de interpretar diversos marcadores virales de HBV y HDV. (Tabla 24.4.3)

La detección del antígeno delta puede intentarse en el hígado o en el suero, constituyendo el principal examen utilizado en el diagnóstico de diversas formas clínicas de hepatitis por virus D. La búsqueda del antígeno mediante inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa en material de biopsia hepática revela su presencia en el núcleo de los hepatocitos con un aspecto reticular, sin tinción nucleolar. En fases avanzadas de afección hepática, puede detectarse en el citoplasma. Nunca coexisten en una misma célula la expresión de antígenos HBc y el HDV Ag (correspondiente al *core* de HDV, inicialmente denominado antígeno delta).

En el suero de pacientes con infección aguda, la detección de este antígeno mediante ELISA es dificultosa, debido a la fugacidad de su presencia y a la necesidad del tratamiento con detergentes no iónicos para lograr la disrupción del HBs Ag. El HDV Ag es considerado como el marcador serológico de infección aguda precoz. Los niveles de antigenemia delta son variables durante la infección aguda, mientras que durante la etapa crónica es raramente detectado.

<p>Ag HDV</p> <ul style="list-style-type: none"> - marcador serológico de infección aguda precoz - marcador de tejido hepático: fase aguda, fulminante y crónica <p>IgM anti-HDV</p> <ul style="list-style-type: none"> - marcador de infección aguda - transitorio y limitado en formas agudas - reactivo por tiempo prolongado en formas crónicas - altos títulos: infección activa persistente - marcador en la respuesta anti-viral (tratamiento) <p>IgG anti-HDV</p> <ul style="list-style-type: none"> - incremento tardío en formas agudas - altos títulos en cronicidad - altos títulos en replicación viral activa - asociado a anti-HBs y/o anti-HBc, infección pasada <p>RNA HDV</p> <ul style="list-style-type: none"> - marcador de replicación en fase aguda - marcador de replicación en fase crónica - marcador utilizado para monitoreo del tratamiento
--

Tabla 24.4.3. Significado de los marcadores serológicos y del tejido hepático en la infección por HDV.

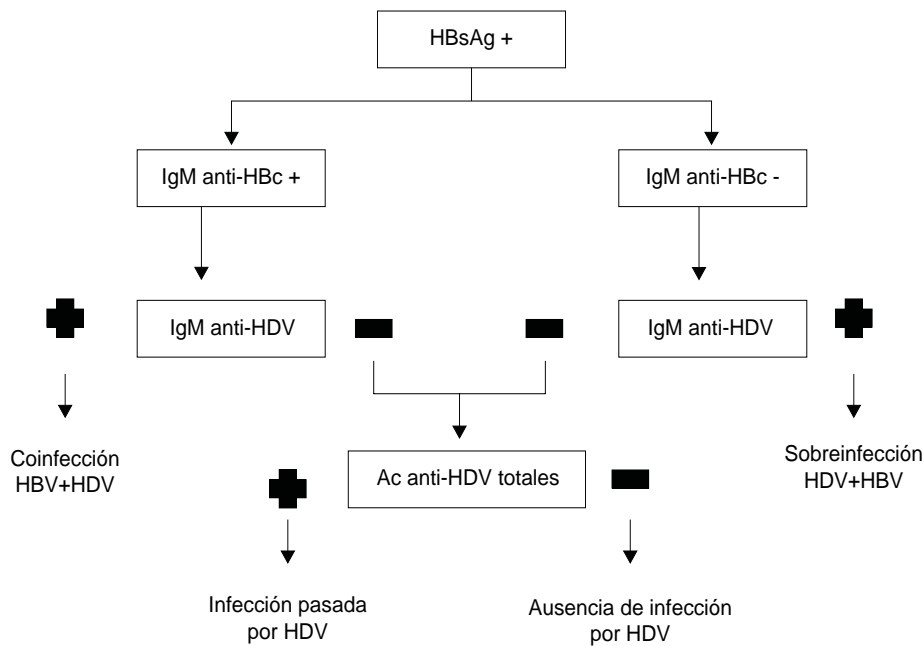


Figura 24.4.6. Diagrama de flujo para el diagnóstico de la infección por HDV.

Para el serodiagnóstico de hepatitis aguda por HDV, tanto en casos de coinfección como de sobreinfección, se destaca la detección de la fracción IgM anti-HDV a través de técnicas de ELISA. La detección de anticuerpos IgM para HDV permite diferenciar una infección actual de una anterior por este virus (Figura 24.4.6). Su presencia se correlaciona con la del antígeno delta en el hígado del paciente y persiste en títulos variables en individuos crónicamente infectados. Se detecta al cabo de 10-25 días de aparición de la hepatitis D aguda, y puede persistir por años en individuos infectados crónicamente. Por el contrario, se detecta únicamente IgG anti-HDV en individuos que se han recuperado de la infección.

En coinfecciones agudas HBV-HDV, se detectan HBs Ag, HBe Ag y DNA del HBV en el suero durante el período de incubación, mientras que los anticuerpos IgM e IgG anti-HBc aparecen al inicio de las manifestaciones clínicas. Dos marcadores serológicos de infección por HDV (RNA del HDV y HDV Ag) aparecen tempranamente durante la infección y desaparecen cuando aumentan los títulos de los anticuerpos anti-HDV (IgM e IgG). Todos los marcadores de replicación viral se tornan indetectables en la fase de convalecencia temprana, mientras que los anticuerpos IgG anti-HDV permanecen elevados durante meses. Las transaminasas séricas experimentan dos picos de incremento en su título, el primero provocado por la expresión inicial del HBV y el segundo al expresarse el genoma del HDV (Figura 24.4.7).

En la sobreinfección por HDV en portadores crónicos de HBV, es decir, en pacientes con antigenemia preexistente para el HBs Ag, el perfil serológico es distinto. Por tratarse de una infección crónica, no se detecta habitualmente IgM anti-HBc. La positividad para HBe Ag o anti-HBe depende del estado de portador del paciente. El título de HBs Ag declina cuando el HDV Ag aparece inicialmente en el suero y luego retorna a niveles detectables. Existe un único pico de incremento en las transaminasas séricas luego de la expresión del HDV. Cuando la sobreinfección HDV-HBV se manifiesta a través de formas clínicas agudas, los marcadores de infección por HDV (RNA del HDV, HDV Ag, IgM e IgG anti-HDV) declinan con el devenir del tiempo (Figura 24.4.8).

En cambio, en hepatitis crónicas por HDV, estos marcadores pueden ser detectados persistentemente (Figura 24.4.9). El diagnóstico de hepatitis crónica por HDV debe confirmarse mediante la detección del antígeno viral en tejido hepático.

La tendencia a la cronicidad y a la cirrosis puede predecirse desde etapas agudas de la infección por los títulos elevados y per-

sistentes de inmunoglobulinas anti-HDV, lo que indica el mantenimiento de la actividad replicativa del HDV por un período prolongado.

En el caso de portadores asintomáticos del HBV donde se detecta un episodio de hepatitis aguda es muy importante –y difícil– el diagnóstico diferencial con una hepatitis aguda por HBV, si es que se ignora la historia previa de portación viral en el paciente. Para ello, es menester solicitar la detección de IgM anti-HBc, ya que sólo su presencia indicará una hepatitis aguda por HBV. Por el contrario, el diagnóstico de HDV se sospechará ante la antigenemia HBs en ausencia de IgM anti-HBc (Figura 24.4.8). El diagnóstico final se podrá obtener mediante la biopsia hepática en busca del HDV Ag o mediante la detección sérica de IgM anti-HDV.

Se han documentado casos de individuos transplantados que padecen una infección por HDV con antigenemia HBs no detectable. Se presume que esto sería atribuible a la administración de Ig específica para HBV (HBIg), que puede enmascarar la presencia del HBs Ag.

La aplicación de técnicas de biología molecular ha permitido establecer que las pruebas más sensibles y por ende más confiables para determinar el diagnóstico de infección activa por HDV consisten en la detección del RNA viral en el suero o el hígado. Recientemente se han observado en la comunidad originaria Mbya Guaraní de Misiones, Argentina, casos de infección oculta por variantes del HDV (RNA detectable con serología no reactiva) en individuos que exhibían también infección oculta por HBV. El aislamiento del genoma del HDV en tejido hepático es importante en el diagnóstico de afección crónica por HDV, ya que indica alta infectividad. El RNA viral persistentemente positivo en el suero durante el estadio agudo de la infección, indica mayor chance de progresión a la cronicidad.

8. PROFILAXIS

Dado que el HDV depende de la presencia del HBV para su ensamblado y transmisión, todas las medidas destinadas a prevenir la infección por este último serán de utilidad en la prevención de la transmisión del HDV.

Se acepta que la presencia de anticuerpos anti-HBs en la inmunoglobulina hiperinmune para hepatitis B protege pasiva y transitoriamente contra la infección por HDV, ya que ambos virus comparten los antígenos de su cubierta exterior.

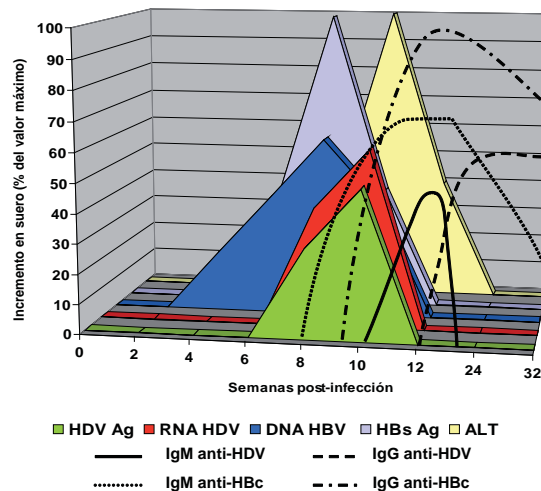


Figura 24.4.7. Patrones serológicos en la coinfección por HBV y HDV.

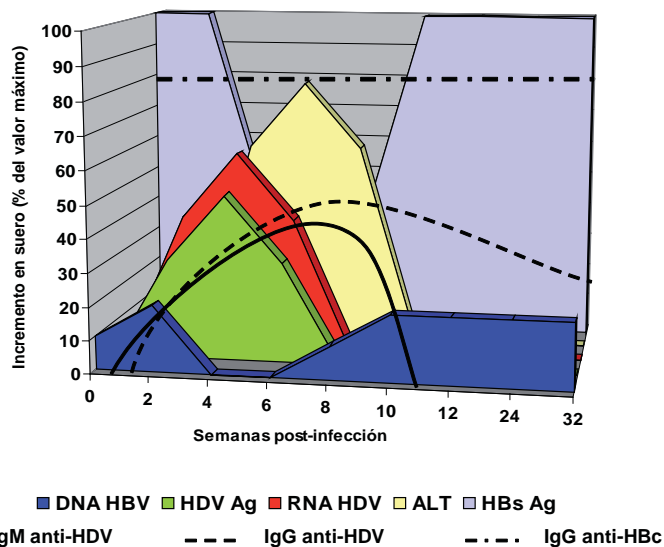


Figura 24.4.8. Patrones serológicos en la hepatitis aguda por HDV en un paciente con portación crónica del HBV.

Aunque hasta el momento no existe una vacuna comercial específica para el HDV, la utilización de la correspondiente al HBV induce la formación de anticuerpos anti-HBs que confieren protección frente al ingreso del HDV. Por lo tanto, la vacunación contra el HBV está recomendada para evitar la coinfección HBV-HDV.

Lamentablemente, las medidas de profilaxis pasiva y activa contra el HBV no pueden ser aplicadas –por no ser efectivas– al grupo de mayor riesgo de contraer la infección por HDV existente en el planeta: los más de 350 000 000 de portadores crónicos del HBV.

Se han realizado estudios parcialmente exitosos de inmunización activa con antígeno delta recombinante en marmotas (*Marmota mormax*) crónicamente infectadas con el virus hepatitis B de la marmota. Resultados todavía preliminares sugieren –por analogía– que la vacunación de individuos crónicamente infectados con HBV utilizando antígeno delta recombinante podría atenuar el riesgo de sobreinfección.

Publicaciones recientes documentaron que en China se han producido vacunas a DNA contra el HDV –todavía en fase experimental– para ser aplicadas a los portadores crónicos de HBV. Para obtener una vacuna efectiva es necesario contar con respuestas protectoras tanto humorales como celulares. Se han construido vacunas a base de plásmidos que expresan al HDV-L Ag o al HDV-S Ag.

En ambos casos se logró una significativa proliferación de linfocitos T con inducción de una respuesta Th1 con linfocitos T citotóxicos CD8⁺ específicos para HDV productores de IFN- γ . En cambio, la magnitud de la respuesta humoral inducida por ambos antígenos es diferente. En el caso de vacunas con HDV-L Ag, aunque se producen títulos elevados de anticuerpos contra el HBsAg, los niveles de inmunoglobulinas anti-HDV son bajos o indetectables. En cambio, la administración de vacunas basadas en plásmidos que expresan el HDV-S Ag genera una potente respuesta inmune humoral anti-HDV. Esta diferencia respondería a la presencia de un motivo de isoprenilación en la proteína de 27 kDa (y no en la de 24 kDa) que enmascara a una de las regiones inmunodominantes más importantes.

9. TRATAMIENTO

El tratamiento de la infección crónica por el HDV tiene como objetivos la eliminación precoz del virus, la interrupción de su replicación (evidenciada mediante la conversión serológica y el RNA viral indetectable en suero), y la reducción de las aminotransferasas séricas y del proceso inflamatorio crónico del hígado. El tratamiento debe contemplar también la infección concomitante por el HBV.

Hasta el momento, el interferón- α (IFN- α) constituye la única opción terapéutica para el tratamiento de las hepatitis crónicas por

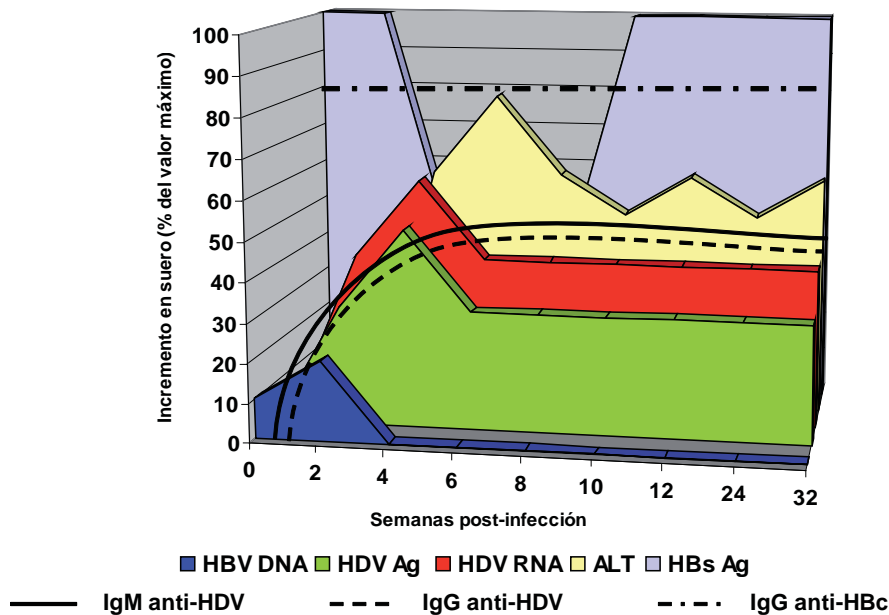


Figura 24.4.9. Patrones serológicos en la progresión hacia la hepatitis D crónica en un paciente con portación crónica del HBV.

HDV. Considerando la rápida progresión de la infección por HDV hacia formas crónicas de afección hepática, el único factor determinante de respuesta al IFN- α sería el tiempo de duración de la infección viral. Por lo tanto, cuanto más precoz es el diagnóstico y el inicio de la terapéutica, mejor será la respuesta clínica.

En pacientes infectados, se han logrado remisiones con la administración de dosis masivas de interferón- α por un tiempo prolongado (9 millones de unidades 3 veces/semana durante 12 meses ó 5 millones de unidades/día por un año como máximo), lo que implica un alto riesgo de aparición de efectos colaterales al tratamiento. A pesar de la mejoría clínica y de la disminución de los valores séricos de las aminotransferasas, el genoma viral persiste detectable en la mayoría de los pacientes y, al finalizar el tratamiento, muchos padecen recaídas, o más aún, exacerbaciones de la afección hepática. En el caso de pacientes con la triple infección HBV, HDV y HIV, la administración de IFN- α logró mantener una respuesta bioquímica (aminotransferasas), serológica y virológica favorable luego de dos años de finalizado el tratamiento.

El efecto del interferón sobre el HDV respondería, probablemente, a un mecanismo indirecto, producto de la acción de éste sobre el HBV y/o sobre la respuesta inmune desencadenada frente a las infecciones. El interferón- β ha surgido como opción terapéutica para pacientes no respondedores al IFN- α .

Numerosos estudios demostraron que otros antivirales e inmunosupresores no son efectivos para el HDV. Por ejemplo, la

lamivudina, capaz de reducir los títulos del HBV, no presenta el mismo efecto con HDV. Por otro lado, la ribavirina, que en combinación con interferón constituye la principal terapia antiviral para infecciones crónicas por HCV, no ha probado ser exitosa para el tratamiento del HDV, a pesar de bloquear su replicación en cultivos celulares.

En modelos animales, se ha demostrado que el uso de inhibidores de la isoprenilación reduce transitoriamente el ensamblaje viral, al actuar sobre el sitio específico presente en el HDV-L Ag. Sin embargo, resulta poco probable que esta estrategia pueda ser aplicada a seres humanos debido a su toxicidad potencial.

El trasplante hepático estaría indicado en el caso de hepatitis agudas fulminantes o estadios terminales de formas crónicas de infección por HDV. La tasa de supervivencia a 5 años para pacientes con diagnóstico de cirrosis terminal por HDV fue estimada en el 88%, con recidiva del HBs Ag en sólo 9% de los casos bajo profilaxis pasiva por tiempo prolongado.

Cabe mencionar los resultados obtenidos por investigadores que evaluaron en cultivos celulares infectados con HDV la capacidad de ribozimas y oligonucleótidos anti-sentido para inhibir la replicación viral. El uso combinado de ribozimas u oligonucleótidos anti-sentido en combinación con IFN- α 2b logró incrementar significativamente la eficacia de este último en la inhibición del RNA viral, constituyendo este tipo de terapéutica una nueva propuesta para el tratamiento de la infección crónica por HDV.

Bibliografía

- Abou-Jaoudé G, Molina S, Maure P, Sureau C. "Miristoylation signal transfer from the large to the middle or the small HBV envelope protein leads to a loss of HDV particles infectivity". *Virology* 2007;365:195-209.
- Chao, M. "RNA recombination in hepatitis delta virus: implications regarding the abilities of mammalian RNA polymerases". *Virus Res* 2007;127:208-15.
- Da Fonseca, JC. "Hepatitis D". *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35:181-90.
- Delfino CM, Eirin ME, Berini C, Malan R, Gentile E, Castillo A, *et al.* "HDAg-L variants in covert hepatitis D and HBV occult infection among Amerindians of Argentina: new insights". *J Clin Virol* 2012; 54:223-8.
- Huang Y-H, Wu J-C, Hsu S-C, Syu W-J. "Varied immunity generated in mice by DNA vaccines with large and small hepatitis delta antigens". *J Virol* 2003;77:12980-5.
- Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. "Hepatitis delta virus". *Lancet* 2011; 378:73-85.
- Salehi-Ashtiani K, Lupták A, Litovchick A, Szostak JW. "A genome wide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene". *Science* 2006;313:1788-92.
- Shiau YT, Huang Y-H, Wu J-C, Tao M-H, Syu W-Jr, Chang F-Y *et al.* "Analysis of humoral immunity of hepatitis D virus DNA vaccine generated in mice by using different dosage, gene gun immunization, and in vivo electroporation". *J Chin Med Assoc* 2006;69:7-13.
- Taylor, JM. "Hepatitis delta virus". *Virology* 2006;344:71-6.

Hepatitis C

María Laura Minassian - Cintia Wanda Rivero - José Raúl Oubiña

1. ASPECTOS HISTÓRICOS

En 1975 se reconoció por primera vez la existencia de un virus causante de hepatitis no-A no-B transmitido a través de la sangre. Éste fue el primer virus descubierto mediante clonado molecular utilizando la tecnología del DNA recombinante, sin recurrir a procedimientos biológicos o biofísicos, que posibilitaran su aislamiento y caracterización.

En 1989 los equipos dirigidos por Michael Houghton, George Kuo y Que Lim Choo (*Chiron Corporation*, Emeryville) y por Daniel W. Bradley (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, EE.UU.) publicaron los hallazgos que permitieron identificar al agente etiológico, luego de 8 años de investigación. Para ello, habían utilizado el plasma de un chimpancé contaminado con el "presunto virus" productor de hepatitis no-A no-B al que —una vez identificado— se denominó *virus Hepatitis C* (HCV). El cDNA correspondiente al RNA viral se clonó y expresó en *Escherichia coli* utilizando el bacteriófago λ (lambda) gt 11 como vector, lográndose la síntesis de proteínas recombinantes (conteniendo un fragmento HCV-específico). Estas proteínas con especificidad antigénica para HCV fueron detectadas mediante un tamizaje inmunológico de la genoteca enfrentándolas con el suero de un individuo infectado con el hasta entonces denominado agente de la hepatitis no-A no-B post-transfusional (Figura 24.5.1).

El diseño experimental del grupo Chiron sirvió inicialmente para obtener dos proteínas recombinantes capaces de reaccionar con anticuerpos específicos en ensayos de ELISA o RIA. Estas reacciones inmunológicas posibilitaron la detección de anticuerpos presentes en la sangre de hemodonantes involucrados en la transmisión del virus hepatitis C por transfusiones. Este tipo de análisis constituyó el primer instrumento válido para evitar la transmisión inter-humana del virus.

2. EVOLUCIÓN NATURAL DE LA INFECCIÓN

El HCV es uno de los principales agentes asociados a la hepatopatía crónica. La enfermedad aguda —aunque muy infrecuentemente observada— tiene un período de incubación que oscila entre las 3 a 20 semanas. Cuando existen, las manifestaciones agudas se asemejan a las de las hepatitis A y B, observándose a veces formas leves. Las hepatitis fulminantes son inusuales. Sin embargo, esta etapa inicial de la infección suele ser generalmente asintomática.

La evolución de la infección es determinada por la intensidad de la respuesta inmune, el tipo de citoquinas secretadas y la actividad persistente de células citotóxicas específicas para el HCV. El 80-85% de los pacientes con infección aguda desarrolla una infección crónica. El nivel de transaminasas raramente excede 10 veces los límites normales, y es común comprobar ascensos y descensos metafóricamente designados como tipo "yo-yo". La hepatitis crónica es el mayor factor de riesgo para el desarrollo del carcinoma hepatocelular (HCC), el que ocurre en la mayoría de los casos como consecuencia de la cirrosis. Si bien el mecanismo por el cual este virus conduce al cáncer no está totalmente dilucidado, se ha demostrado que algunas proteínas del virus podrían actuar como transactivadoras, afectando la homeostasis celular y contribuyendo a la generación del HCC.

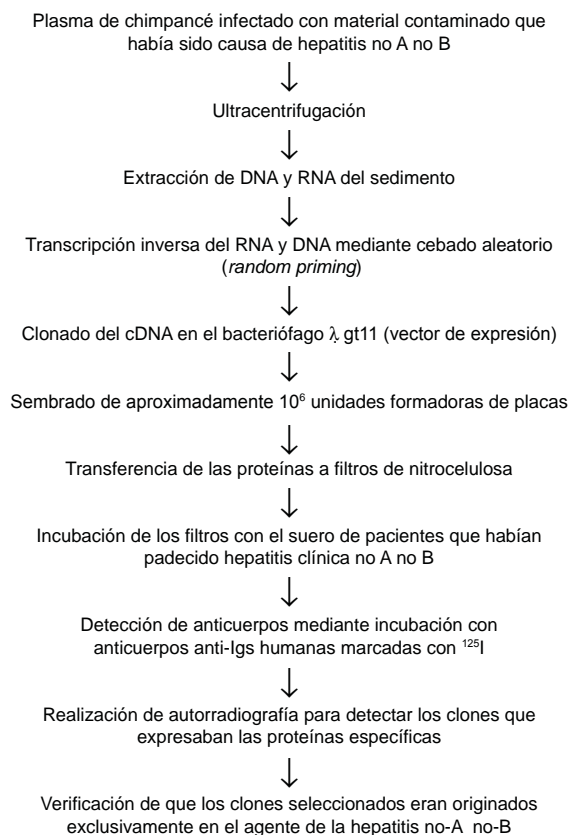


Figura 24.5.1. Estrategia de detección molecular y caracterización del virus hepatitis C.

3. AGENTE ETIOLÓGICO

3.1. MORFOLOGÍA

Mediante diversos métodos se había establecido que el agente responsable de las hepatitis C debía ser un virus de aproximadamente 30-60 nm con envoltura lipídica. Recién en 1994 —cinco años después de haberse conocido la primera secuencia nucleotídica del HCV— M. Kaito y colaboradores publicaron convincentes imágenes del virus obtenidas mediante inmunomicroscopía electrónica. El agente mide 55-65 nm, con un *core* interno de 30-35 nm (Figura 24.5.2). Alrededor de la envoltura viral se observan espículas de 6 nm. El diámetro de la partícula completa es algo menor que el de los flavivirus y semejante a los pestivirus de la familia *Flaviviridae*, en la cual el HCV ha sido incluido como prototipo del género *Hepacivirus*. También se han detectado en circulación nucleocápsides aisladas.

3.2. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL

El HCV posee un genoma a RNA monocatenario de polaridad positiva, de aproximadamente 9 600 bases. Posee un marco abierto de

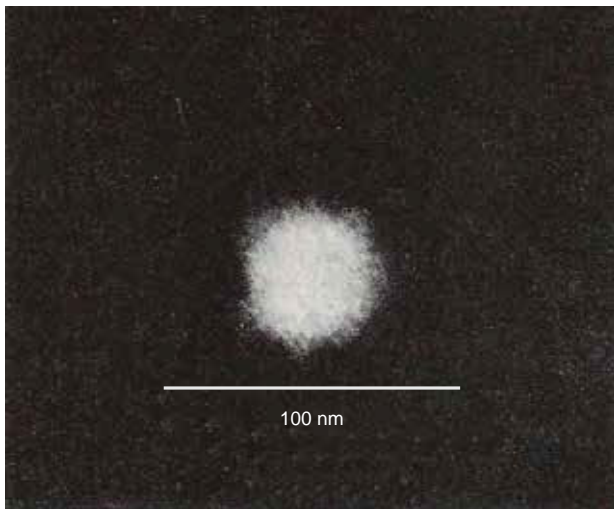


Figura 24.5.2. Microscopía electrónica del virus hepatitis C. Partícula de 55-65 nm con finas proyecciones espículas. La barra representa 100 nm. (De Kaito *et al. J Gen Vírol* 75:1755-1760, 1994).

lectura (*Open Reading Frame* u ORF) que se encuentra flanqueado por dos regiones no codificantes (5'UTR [*Untranslated Region*] y 3'UTR) importantes para la traducción y replicación del mismo. Superpuesta a la región 5'UTR (aproximadamente unos 340 nucleótidos) y extendiéndose unas pocas bases en la región codificante del *core* se encuentra un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES [*Internal Ribosomal Entry Site*]), el que permite la traducción cap-independiente de una poliproteína de aproximadamente 3 000 aminoácidos, que es clivada tanto por proteasas celulares como virales en al menos 10 proteínas: estructurales (*core*, E1, E2 y p7) y no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Figura 24.5.3). Además, se ha identificado una proteína adicional de 16 kDa (proteína F o ARFP [*Alternative Reading Frame Protein*]) que es codificada por un ORF alternativo dentro de la región que codifica para la proteína del *core*.

Comparada con el resto del genoma viral, la **región 5' UTR** es altamente conservada y desempeña un importante rol en el ciclo de replicación viral. Dicha conservación nucleotídica posibilita su utilización para el diagnóstico molecular (mediante la detección del genoma) y la clasificación genotípica. Esta región presenta una estructura secundaria compleja, en la cual se han demostrado cuatro dominios (I, II, III, IV). En el dominio III reside una *loop* cuya secuencia apical es complementaria a la del RNA 18S humano, lo cual reviste particular importancia biológica. En dicha región se detectan tres pequeños marcos abiertos de lectura (ORF 1, 2 y 3). Sin embargo, no son traducidos debido a que el genoma no se desliza por los ribosomas desde el extremo 5', sino que penetra en ellos a través del IRES. Este hecho es semejante al observado con los picornavirus y se diferencia de lo que ocurre con otros miembros de la familia *Flaviviridae*.

El IRES dirige la unión de los ribosomas en las cercanías del codón de iniciación de la traducción (*Start* o +1). Este sitio no requiere obligatoriamente los factores de pre-iniciación de la misma y varía su actividad con el ciclo celular, interactuando con diferentes factores celulares. Secuencias virales localizadas en regiones distales del IRES modulan la eficiencia de su actividad, estimulando o suprimiendo la traducción.

A continuación se describe sucintamente la **región genómica codificante de la poliproteína viral**, así como las funciones inherentes a los productos peptídicos derivados, y finalmente, la **región 3' UTR**.

Codificada en la región genómica C, la proteína del *core* es uno de los principales constituyentes de la nucleocápside; es sintetizada

como un polipéptido de aproximadamente 21 kDa, no glicosilado, rico en prolina (12%), arginina y lisina, cuya carga positiva posibilita la interacción con el genoma viral.

Las regiones genómicas E1 y E2 codifican las glicoproteínas **gp 33/35 (E1)** y **gp 58/70 (E2)** de la envoltura viral, las que son procesadas por peptidasas de la célula hospedadora. Forman heterodímeros y se asocian con la proteína del *core* para formar el virión. Se reconocen una o dos subregiones hipervariables en E2 (HVR-1 y HVR-2), según los genotipos. Las variaciones que ocurren con el devenir de la infección en un mismo individuo a nivel del extremo amino-terminal de E2 constituyen un mecanismo de evasión a la respuesta inmune humoral del hospedador, ya que cambios aminoacídicos puntuales alteran la conformación espacial de la proteína de envoltura viral, por lo cual no pueden ser reconocidas por anticuerpos inicialmente dirigidos hacia una estructura secundaria diferente.

P7 es un polipéptido pequeño muy hidrofóbico, compuesto por dos dominios transmembrana que está involucrado en la formación de canales iónicos de transmembrana (actividad de viroporina).

NS2 es también una proteína transmembrana de 23 kDa que junto con la región amino-terminal de NS3 constituye una proteasa que cataliza el clivaje entre ellas mismas. El dominio de proteasa de NS2, pero no su actividad enzimática, es indispensable para el ensamblaje y la consiguiente formación de viriones.

La **proteína NS3** (69-72 kDa) tiene dos funciones principales: el dominio amino-terminal actúa como una proteasa dependiente de serina y es la responsable del clivaje de la poliproteína en la región comprendida entre NS3 y NS5; el dominio carboxi-terminal actúa como RNA-helicasa, permitiendo el desenrollamiento del genoma.

La **proteína NS4A** (8 kDa), actúa como cofactor de NS3, aumentando su actividad. Además, mediante la asociación con NS5A desempeña un importante rol en la hiperfosforilación de esta última.

La **proteína NS4B** (27 kDa) tiene cuatro segmentos transmembrana; estaría involucrada en la formación del complejo replicativo asociado a membrana, indispensable para la replicación viral.

La **proteína NS5A** posee en su región amino-terminal una α -hélice que permite la asociación a membranas celulares. También se asocia al complejo de replicación, desempeñando un rol importante. Puede detectarse como polipéptido de 56 kDa o 58 kDa, dependiendo del grado de fosforilación en residuos conservados de serina y treonina.

NS5B es una fosfoproteína de 65 kDa asociada a membrana con actividad de RNA polimerasa RNA-dependiente.

La **región 3' UTR** es reconocida por la RNA polimerasa viral. Está compuesta por tres regiones diferentes: una secuencia corta no conservada de longitud variable (42-287 bases), una región rica en pirimidinas, poli-(U/UC) (20-200 bases) y una secuencia de 98 bases denominada 3'X con estructura altamente conservada que consta de tres *stem loops* (estructuras tipo asa-rulo). Tanto la segunda como la tercera región serían esenciales para la infectividad *in vivo* del virus. La **región homopolimérica poli-(U) y la complementaria poli-(A) del intermediario replicativo del RNA viral representan los PAMPs** (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) reconocidos por la helicasa celular RIG-1 (*Retinoic acid Inducible Gene-1*) que mediante la estimulación del factor transcripcional IRF-3 promueve la síntesis de los interferones α y β , disparando la respuesta inmune innata.

Todos o la mayoría de los productos de clivaje de la poliproteína (en particular NS3-5B) son requeridos para la replicación del RNA viral, mediante la formación de un complejo replicativo asociado a membranas intracelulares. La región genómica NS3-NS5B junto a las regiones no codificantes del RNA viral constituyen -en sinergismo con factores celulares- la unidad mínima de replicación del HCV.

4. REPLICACIÓN VIRAL

A pesar de que el hígado es el principal sitio de replicación del HCV, existen evidencias que documentan la presencia de reservo-

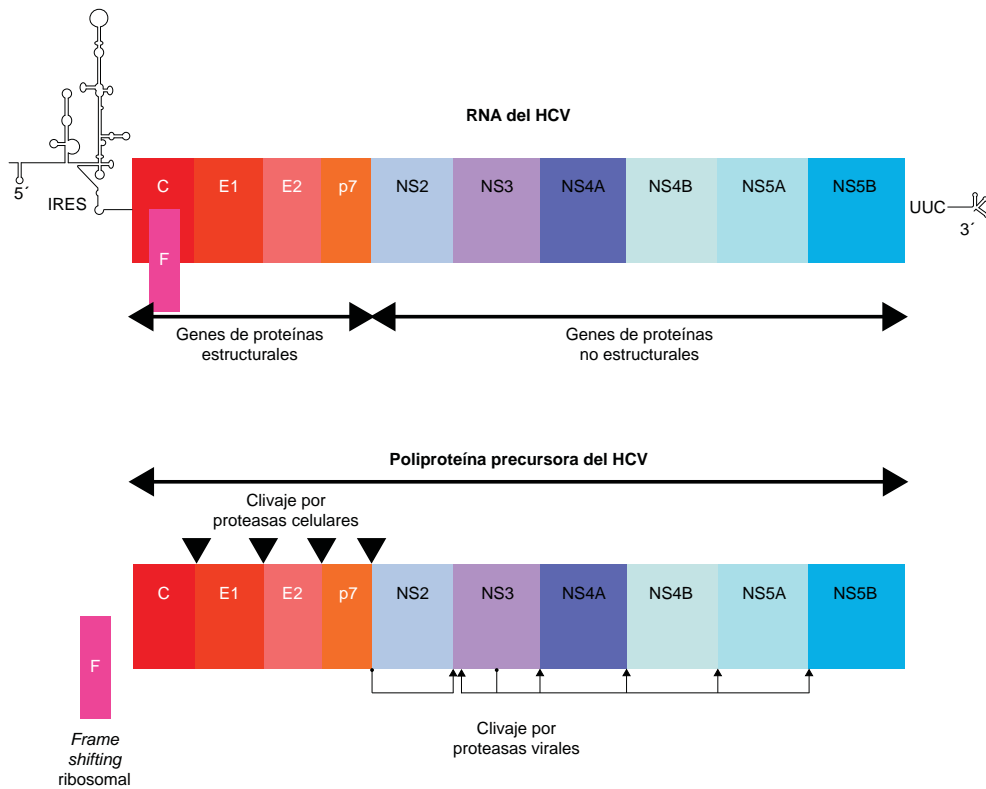


Figura 24.5.3. Estructura genómica y proteica del HCV. Un marco abierto de lectura rodeado por dos regiones no codificantes 5'UTR (*untranslated region*) y 3' UTR codifica una poliproteína. Hacia el extremo 5' del RNA reside el IRES. La poliproteína precursora es clivada por proteasas celulares y virales (NS2 y NS3) que permiten la expresión de las proteínas no estructurales individuales. La proteína F (también denominada ARF o *core +1*) es generada mediante un cambio de marco (*Frameshifting*) ribosomal.



rios extra-hepáticos, incluyendo linfocitos de sangre periférica y el sistema nervioso central. La participación de las células dendríticas en la patogénesis de la infección se encuentra aún en estudio, ya que no se ha documentado la producción de progenie viral en ellas, aunque sí la presencia del HCV en dicha estirpe celular.

Las partículas virales interactúan con los receptores de superficie específicos y son probablemente internalizadas por endocitosis. La molécula **CD81** (*human tetraspanin*: una molécula que atraviesa cuatro veces la membrana plasmática) fue inicialmente identificada como un receptor para el HCV, al observarse una interacción de alta afinidad con la **glicoproteína viral E2**. CD81 se expresa en una variedad de tipos celulares, incluidos los hepatocitos, lo cual no explica el cuasi-circunscripto hepatotropismo del HCV. Por otra parte, se han identificado otras moléculas como potenciales candidatas a receptores del virus. Entre ellas, se incluyen las siguientes: el **receptor para LDL** (*Low Density Lipoprotein Receptor*, o *LDL-R*), el receptor **scavenger SR-BI** (*Scavenger Receptor class B, type-I*), **L-SIGN**, **DC-SIGN**, el **receptor para asialoglicoproteínas** y **ciertos glicosaminoglicanos (GAG)**, del tipo **heparán-sulfato**, y la **proteína Claudina- (CLDN) 1** (así como **CLDN 6 o 9**), un componente de la unión estrecha intercelular. *In vivo*, SR-BI se localiza en tejidos esteroidogénicos, macrófagos e hígado, CD81 –como se mencionó– es ubicua, y CLDN-1 está presente en múltiples tejidos, aunque se expresa significativamente en el hígado. Se ha demostrado la formación de complejos entre CLDN-1 y CD81, y entre CLDN-1 y el receptor para LDL.

Se ha sugerido que el virus ingresaría a la célula hepática luego de un contacto inicial con receptores de baja afinidad (como GAG), y del LDL-R con moléculas de LDL asociadas al virus, que luego posibilitaría la interacción con otros de alta afinidad, tales como CD81 y SR-BI. Además dicho ingreso viral estaría facilitado por la interacción del virus con lipoproteínas de alta densidad (HDL) en un

modo dependiente del receptor *scavenger* SR-BI (principal receptor de las lipoproteínas HDL). Se ha demostrado que CLDN-1 es requerida en la etapa tardía del ingreso viral a la célula, por lo que actúa también como correceptor, junto a CD81 (Figura 24.5.4).

La fusión entre la membrana viral y la celular, presumiblemente gatillada por el bajo pH del compartimento endocítico, induce la liberación del **genoma viral en el citoplasma** de la célula recientemente infectada. Este genoma desempeña múltiples roles dentro del ciclo de replicación viral: inicialmente como RNA mensajero (mRNA) para la traducción de la poliproteína viral y posteriormente como templado para la replicación del RNA (Figura 24.5.5).

La traducción del genoma del HCV depende del IRES y se desarrolla en **áreas cercanas al retículo endoplásmico rugoso (RER)**. El IRES se une directa y ávidamente a la subunidad ribosomal 40S. El complejo IRES-40S luego recluta al factor de iniciación eucariótico eIF3 y al complejo Met-tRNA-eIF2-GTP para formar el complejo activo 80S. Una vez iniciada la traducción del genoma viral, se produce una poliproteína que es luego clivada (evento proteolítico) para originar las 10 proteínas virales mencionadas anteriormente. Las proteínas estructurales son procesadas por peptidasas señal de la célula hospedadora, las que clivan las uniones entre C/E1, E1/E2, E2/p7 y p7/NS2. El posterior procesamiento proteolítico de las proteínas no estructurales ocurre a través de dos enzimas virales: la autoproteasa NS2-3, que cliva la unión NS2/3; y la serin-proteasa NS3-4A que lo hace en los sitios restantes ubicados entre NS3-5B.

La replicación del RNA del HCV ocurre **en asociación con membranas citoplásmicas alteradas**. Para que ocurra la replicación viral, debe formarse un complejo replicativo compuesto por proteínas virales y RNA viral asociadas a membranas intracelulares alteradas y diversos factores celulares. La formación de vesículas membranosas que se acumulan hasta constituir una red membranosas

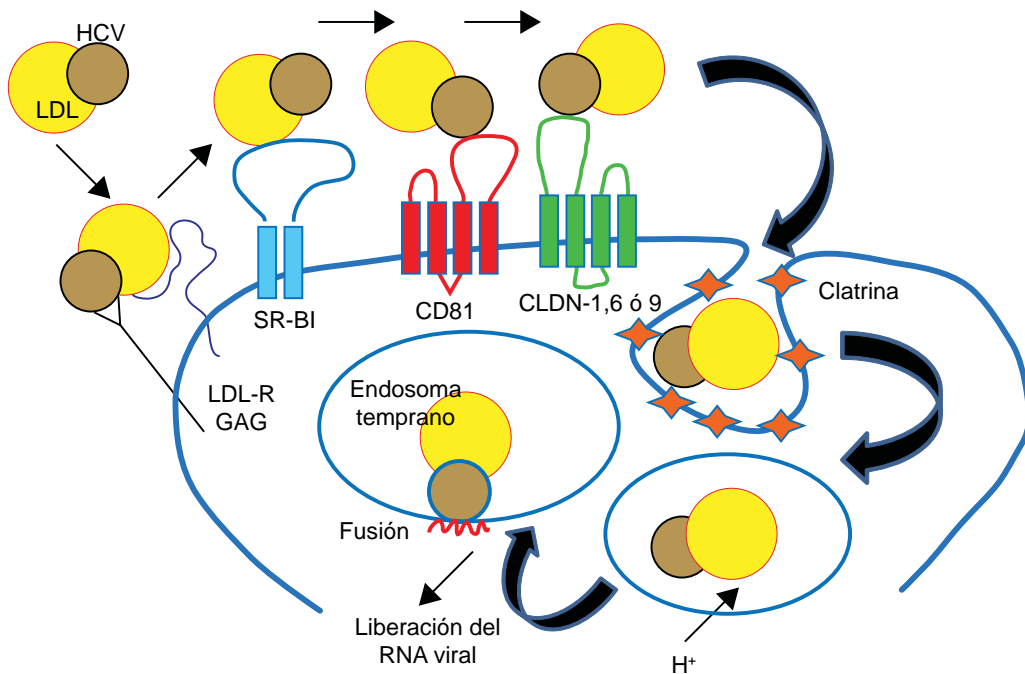


Figura 24.5.4. Modelo propuesto para el ingreso del virus hepatitis C (HCV) a los hepatocitos. A partir de la interacción entre glicoproteínas del virus con receptores de baja afinidad como GAG y el receptor para LDL, con las lipoproteínas asociadas al virus se producen sucesivas interacciones con receptores diversos como SR-BI, CD81 y finalmente CLDN-1, 6 o 9, que facilitan el ingreso por el polo apical del hepatocito mediante la endocitosis mediada por receptor a través de vesículas rodeadas de clatrina. Luego de la acidificación de las mismas, se produce la fusión entre la membrana viral y vesicular (endosomas tempranos), con la concomitante liberación del genoma viral al citosol. LDL: lipoproteínas de baja densidad; LDL-R: receptor de LDL; GAG: glicosaminoglicanos; SR-BI: *Scavenger Receptor class B, type I*; CLDN: Claudina.

Corpus Editorial

Ciclo de replicación del HCV

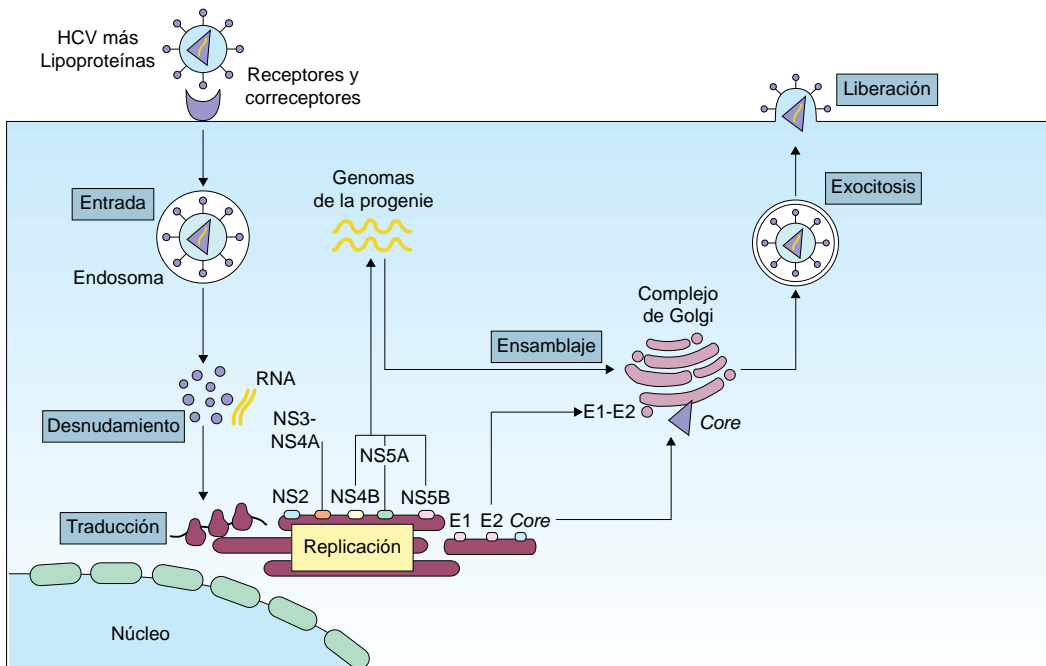


Figura 24.5.5. Modelo de replicación viral del virus hepatitis C (HCV). Adaptado de la publicación de Rehmann B y Nascimbeni M en *Nat Rev Immunol* 5:215-29, 2005; con permiso de *Nature Publishing Group*.

(*membranous web*) es inducida por NS4B, probablemente en forma sinérgica con NS5A, la cual interactúa con factores celulares como la proteína VAP-A (*Vesicle-associated membrane protein-Associated Protein*) y su isoforma VAP-B, así como de la proteína FBL2 (*F Box multiple rich Leucine domains*) cuya prenilación es requerida para la replicación viral. VAP es una proteína localizada en RE / Golgi involucrada en el tráfico intracelular de vesículas, e implicada en direccionar a las proteínas no estructurales virales hacia membranas ricas en colesterol, donde ocurre la replicación del HCV. La participación de **FBL2** está relacionada con el metabolismo lipídico celular –ya que requiere de eventos de prenilación–, habiéndose observado que dicho proceso modula la replicación viral, al permitir la interacción de **FBL2 con NS5A, complejo que es indispensable para la replicación del genoma del HCV**, por lo que podría ser un eventual blanco terapéutico.

NS5B –presumiblemente en cooperación con proteínas virales como NS3/4A y NS5A y factores celulares– se une al extremo 3' de la cadena (+) de RNA para iniciar la síntesis *de novo*. Las cadenas (-) de RNA generadas sirven de templado para la producción de cadenas (+). Estos RNAs con polaridad de mensajero, pueden ser luego utilizados para la traducción, una nueva ronda de replicación o ser empaquetados en partículas virales. Se ha observado también la generación de RNA subgenómicos que requieren cuasiespecies salvajes del HCV que coinfecten la misma célula y que actúan como virus ayudador (*helper*) permitiendo la propagación de aquéllos. Este fenómeno ocurre en ciertos individuos que carecen de la presión de selección de la respuesta inmune específica anti-HCV.

La decisión molecular de elegir entre la continuación de la transcripción del RNA viral o la replicación viral, está modulada por el grado de fosforilación de NS5A.

La formación de las partículas virales puede ser iniciada por la interacción de la proteína *core* con el genoma RNA. La encapsidación genómica ocurre en el retículo endoplásmico. Probablemente, las nucleocápsides virales adquieren su envoltura por brotación a través de las membranas del retículo endoplásmico y del cis-Golgi (donde maduran). Los viriones son liberados por exocitosis a través de la vía secretoria desde la célula al espacio pericelular (Figura 24.5.5).

5. DIVERSIDAD, VARIABILIDAD GENÓMICA Y SUS IMPLICANCIAS CLÍNICO-PATOGÉNICAS

La diversidad y la variabilidad genómica del HCV son dos características íntimamente relacionadas entre sí, que contribuyen a la evolución viral (Figura 24.5.6).



Figura 24.5.6. Interrelación entre variabilidad y diversidad genética del virus hepatitis C (HCV).

En la "2da. Conferencia Internacional de HCV y Virus relacionados" celebrada en 1994 se propuso una nomenclatura consenso utilizada hasta la actualidad para grupos (genotipos) y subgrupos

(subgenotipos o [habitualmente referidos como] subtipos) del HCV. De acuerdo a esta nomenclatura, este virus es clasificado en base al porcentaje de identidad entre secuencias nucleotídicas completas de diferentes aislamientos, obteniéndose así la designación de **genotipos** (en números arábigos del 1 al 6, según el orden de su descubrimiento) y **subtipos** (en letras, por orden alfabético; se conocen hasta el presente más de 70) (Tabla 24.5.1). Este agrupamiento de secuencias nucleotídicas provenientes de individuos infectados en diferentes áreas geográficas constituye la base de la **diversidad** entre los distintos "aislamientos" del HCV. Téngase en cuenta que el término "aislamiento" aquí utilizado, proviene del inglés *isolate*, aunque no corresponde en un sentido virológico estricto a una genuina propagación viral en un sustrato celular vivo.

La diversidad del HCV exhibe la **paradoja de combinar el conservacionismo** viral que le permite su adaptación a la especie humana (con una exitosa transmisión inter-hospedador) a pesar de mostrar divergencias mayores a un 30% entre genotipos prevalentes en distintas regiones geográficas, **con una fulgurante capacidad de adaptación** frente a las presiones inmunológicas de selección creadas en cada infección ocurrida *de novo* en un nuevo hospedador. En otros términos, el primer evento constituye una contribución muy importante a esta diversidad, debido a la ocurrencia de cambios nucleotídicos neutrales (**evolución neutral** según la teoría de Kimura, es decir, sin alteración del fenotipo), que acaecen como resultado de mutaciones al azar que se fijan al no alterar sustantivamente la "aptitud replicativa" (*fitness*) viral. Complementariamente, existe **también una adaptabilidad darwiniana**, como la observada en la envoltura viral frente a la presión de selección de la respuesta inmune humoral del hospedador.

A su vez, en un mismo individuo existe una población heterogénea de secuencias genómicas virales (correspondientes a genomas viables), constituidas por una principal (o *master sequence*) –que puede o no ser mayoritaria respecto al total de la población viral–, y otras relacionadas, que surgen de la acumulación de mutaciones durante la replicación viral, como consecuencia de un proceso de evolución y selección de los genomas. A esta población heterogénea de variantes virales en un mismo paciente se la denomina genéricamente con el término de **cuasiespecies**. Los porcentajes de similitud requeridos para la asignación de tipos y subtipos teniendo en cuenta el genoma completo se detallan en la Tabla 24.5.2.

Se ha sugerido que la existencia de cuasiespecies confiere una ventaja para el virus, ya que posibilita la coexistencia de variantes múltiples que rápidamente generan otras nuevas que contribuyen al polimorfismo poblacional, facilitando la emergencia de mutantes de escape a anticuerpos neutralizantes y/o linfocitos T citotóxicos generados por el sistema inmune del hospedador. Esta aparición de mutantes está íntimamente relacionada con la ausencia de lectura de prueba (*proof reading*) de la RNA polimerasa viral. La tasa de fijación de mutaciones es de alrededor de 10^{-3} a 10^{-4} por sitio nucleotídico por año de continua replicación en un paciente dado. Esta tasa es variable en distintos individuos infectados y en un mismo paciente a través del curso de la infección, acelerándose con el progreso de ésta.

Genotipo	Subtipos
1	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m
2	a, b, c, d, e, f, g, h, i, k, l, m, n, o, p, q, r
3	a, b, c, d, e, f, g, h, i, k
4	a, c, d, e, f, g, h, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u
5	a
6	a, b, d, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s

Tabla 24.5.1. Genotipos y subtipos del HCV asignados hasta la actualidad.

Terminología	Definición	Porcentaje de similitud nucleotídica
Genotipos	Heterogeneidad genética entre diferentes aislamientos de HCV	65-69
Subtipos (también denominados subgenotipos)	Aislamientos estrechamente relacionados dentro de cada genotipo	77-80
Cuasiespecies	Complejo de variantes genéticas dentro de aislamientos individuales	91-99

Tabla 24.5.2. Terminología habitualmente utilizada en el estudio de la heterogeneidad genómica del HCV.

La tasa de fijación de mutaciones es equivalente a la del HIV (virus RNA con una transcriptasa inversa), y es hasta un millón de veces mayor que las DNA polimerasas celulares. Las mutaciones habitualmente observadas consisten en transiciones (una base púrica o una base pirimidínica reemplazada por otra base del mismo grupo). Sin embargo, en la región E2 se detectan muy frecuentemente transversiones (cambios de bases púricas por pirimidínicas o viceversa).

Teniendo en cuenta que se producen aproximadamente 10^{11} - 10^{12} partículas de HCV por día (unas 10 – 100 veces más que lo reportado para la infección por HIV; Tabla 24.5.3), es esperable la generación de genomas que se adapten mejor a la presión de selección de la respuesta inmune o de eventuales terapéuticas instituidas.

La variabilidad genómica no se distribuye de modo uniforme a lo largo del RNA viral, dado que el genoma puede evolucionar velozmente *in vivo* con distintas tasas de fijación de mutaciones en diferentes regiones, siendo la región 5' UTR la más conservada, seguida de la que codifica para el *core* y proteínas no estructurales, mientras que –como contrapartida– las regiones E1 y E2 exhiben la mayor variabilidad.

Dentro de la región genómica E2 se ha observado un fragmento de 39 nucleótidos que exhibe gran diversidad entre los diferentes aislamientos, a la que se designó región hipervariable I (HVR-1). La evolución genómica de esta región y algunos de los consiguientes cambios nucleotídicos no sinónimos (producen cambios de aminoácidos) pueden estar asociados al desarrollo de mutantes de escape a los anticuerpos neutralizantes y en consecuencia el establecimiento de infecciones persistentes, ignorándose si dicha variabilidad es causa o consecuencia de la cronicidad. Estudios de evolución viral realizados en primates documentaron que las mutaciones observadas a través de años de infección son de naturaleza sinónima en los genes que codifican el *core* y E1, aumentando gradualmente. Por el contrario, en este animal experimentalmente infectado, las mutaciones que ocurren en la región HVR-1 son no sinónimas (Figura 24.5.7) y decrecen con el devenir del tiempo de infección. En otros términos, HVR-1 no es genuinamente hipervariable en la población viral de un mismo aislamiento a través del tiempo. En humanos, se ha establecido que la **variabilidad en la región HVR-1 es promovida fundamentalmente por la presión de selección de la respuesta inmune sobre subpoblaciones de cuasiespecies pre-existentes**, más que por la acumulación de mutaciones puntuales. Pacientes que exhiben enfermedad hepática leve exhiben a través de sus respectivos cursos de infección una mayor similitud aminoacídica en E1 y HVR-1, que los pacientes con enfermedad grave.

Hasta la fecha, han sido identificadas algunas recombinantes naturales inter-genotípicas: 2k/1b en San Petersburgo (Rusia), 2i/6p en Vietnam, 2b/1b en Filipinas, y 2k/5a en Francia; mientras

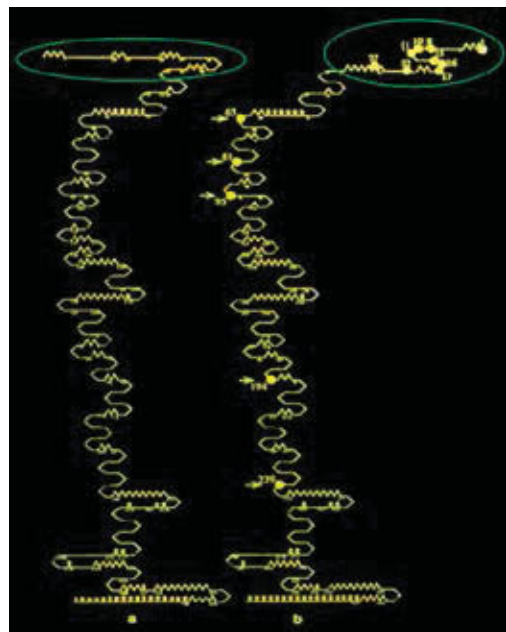


Figura 24.5.7. Variabilidad de la envoltura del HCV. Representación de la estructura secundaria de la envoltura del HCV correspondiente a la proteína E2 de una cepa estudiada al cabo de 8,2 años de infección en un primate. Los puntos observados en la imagen de la derecha (b), indican sustituciones aminoacídicas respecto a la secuencia inicial (a). Una significativa proporción de los cambios están concentrados en la porción más expuesta en la superficie de la proteína, lo que le confiere una estructura antigénica diferente. (De: Okamoto *et al*, *Virology* 190: 894-9, 1992)

que el análisis filogenético de muestras provenientes de Perú demostró la existencia de una posible recombinante intra-genotípica 1a/1b.

6. PATOGENESIS MOLECULAR

Solamente un 10 - 30% de las infecciones agudas por HCV son resueltas en esta etapa; la mayoría de los individuos infectados desarrolla –en ausencia de un tratamiento eficaz– una infección crónica, la que es definida por la persistencia por más de 6 meses del RNA del HCV en suero. Se cree que tanto factores virales como del hospedador contribuyen a la incapacidad del sistema inmune para resolver

Característica Virus	HBV (adefovir)	HBV (lamivudina)	HIV (ritonavir)	HCV (interferón alfa)
Producción viral diaria	$2,1 \times 10^{12}$	10^{11}	10^{10}	$1,1-12,7 \times 10^{11}$
Vida media del virus en plasma	26,4 h.	14 h.	5,8 h.	2,7-7,2 h.
Vida media de las células infectadas	11-30 días	10-100 días	1,6 días	2,4-4,9 días

Tabla 24.5.3. Cuadro comparativo entre los virus hepatitis B, HIV y hepatitis C y sus respectivas infecciones. Los valores mostrados fueron obtenidos al evaluarse el efecto de los tratamientos antivirales indicados entre paréntesis.

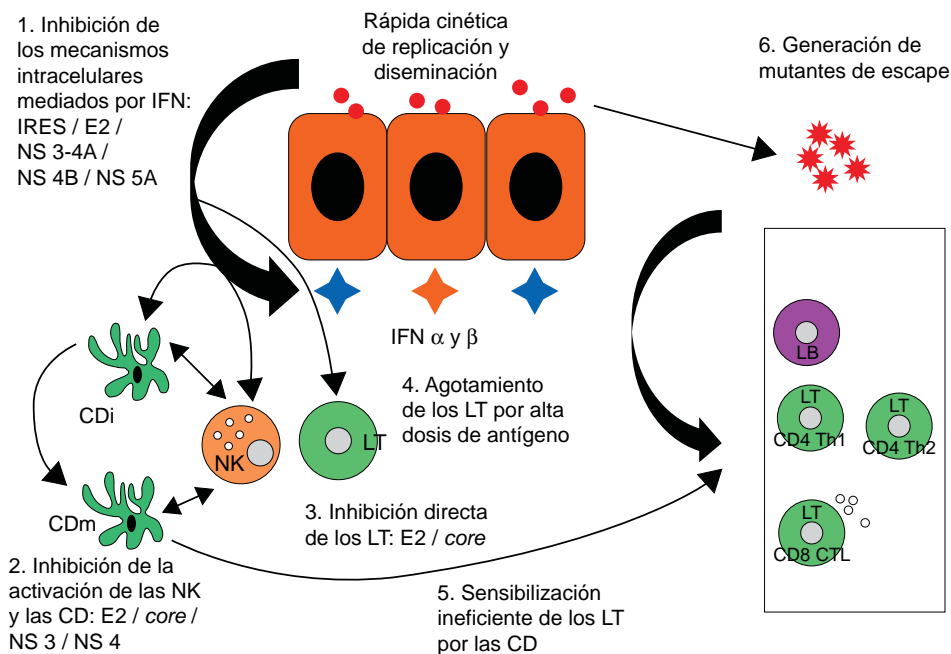


Figura 24.5.8. Mecanismos de evasión del virus hepatitis C (HCV) a la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador. (Véase la explicación en el texto).

la infección inicial conduciendo a una infección crónica. Esta lesión persistente puede culminar en una cirrosis al cabo de 10 años en un 5-10 % de los pacientes. Eventualmente algunos de estos pacientes cirróticos (17% en occidente vs 30% en Japón) pueden progresar al HCC al cabo de otros 5 años de evolución. Tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa desempeñan un rol importante en el curso clínico de la infección por HCV.

El conocimiento de la patogénesis molecular de la infección por HCV es fragmentario aún, dado que: a) el hombre es el único hospedador natural conocido; b) sólo existe un modelo animal para la infección experimental (el chimpancé); y c) el HCV no es un virus cultivable *in vitro*. Sin embargo, en los últimos años se ha desarrollado un sistema de propagación en cultivos celulares (replicón genómico de HCV) que ha permitido comenzar a dilucidar algunos aspectos básicos de la replicación viral y la patogénesis de la infección. Sin embargo, los resultados obtenidos *in vitro* no necesariamente pueden extrapolarse a la infección natural humana.

6.1. INFECCIÓN AGUDA

Respuesta inmune innata. Estudios en chimpancés infectados experimentalmente han demostrado que el HCV induce inicialmente una vigorosa respuesta intra-hepática de IFN tipo I (IFN- α /

IFN- β) dentro de la primera semana de infección. Sin embargo, este tipo de respuesta en el hígado **no se correlaciona con el desenlace de la infección**, ya que aquélla es similar tanto en los animales que resuelven la infección como en los que resultan persistentemente infectados. El HCV parecería ser resistente a los efectos antivirales del IFN tipo I, ya que muy frecuentemente establece una infección crónica. Más allá de su función, **la respuesta inmune intracelular innata probablemente tenga un rol en controlar la infección, ya que el virus ha desarrollado diferentes estrategias para evadirla** (Figura 24.5.8).

El HCV es eficiente tanto para interrumpir la expresión de IFN tipo I, como para inhibir sus efectos antivirales. Inicialmente, el virus ingresa a los hepatocitos gatillando sólo en forma muy limitada la actividad de las helicasas RIG-1 (*Retinoic Acid Inducible Gene 1*) y MDA-5 (*Melanoma Differentiation Associated protein 5*). Por ello, **el HCV evade inicialmente la actividad del factor de transcripción IRF-3 por un "mecanismo pasivo"** (Figura 24.5.9). Una vez traducido el genoma viral, la serin-proteasa NS3 (junto a su cofactor NS4A) cliva proteínas intermediarias de la cascada de inducción de la expresión del IFN tipo I, como IPS-1 (*Interferon Promoter Stimulator 1*, también designada CARDIF, MAVS [*Mitochondrial Antiviral Signaling protein*], o VISA [*Virus Inducing*

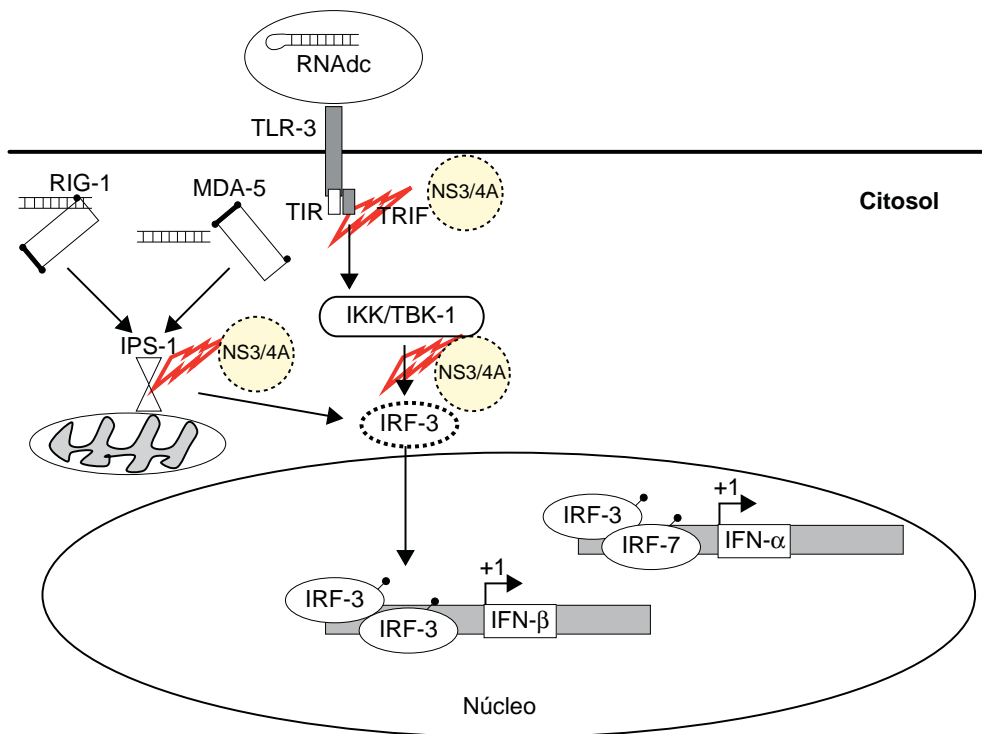


Figura 24.5.9. Mecanismo de inhibición de la síntesis del Interferón por el virus hepatitis C (HCV). Al menos 3 vías de señalización de IRF-3 (*Interferon Regulatory Factor 3*; factor regulador del interferón 3) están afectadas, lo que impide la transcripción del Interferón: la degradación proteolítica de IPS-1 (*Interferon Promoter Stimulator 1*, también denominada CARDIF, MVAS [*Mitochondrial Antiviral Signaling protein*; proteína mitocondrial de señalización antiviral] o VISA [*Virus Inducing Signaling Adaptor*; adaptador de la señalización inducido por virus]) y de TRIF-1 (*Toll/IL-1 Receptor domain-containing adaptor inducing IFN-α*; Dominio del receptor para Toll/IL-1 que contiene un adaptador inductor de IFN-α), por NS3/4A disrumpe la señalización promovida por las helicasas RIG-1 (*Retinoic Acid Inducible Gene 1*; gen 1 inducible por ácido retinoico) y MDA-5 (*Melanoma Differentiation Associated protein 5*; proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma) y de TLR-3, respectivamente; la interacción de NS3/4A con TBK (*TANK Binding Kinase-1*; quinasa 1 unida a TANK), impide su unión a IRF-3. La imagen con forma de rayo indica un efecto inhibitorio sobre la vía de señalización.

Signaling Adaptor) y TRIF (*Toll/IL-1 Receptor domain-containing adaptor inducing IFN-β*), lo cual **bloquea la activación de IRF-3 y -por ende- la transcripción del IFN, a pesar de la liberación de RNA bicatenario durante el ciclo de replicación viral**. También NS3 interactúa con otra proteína intermediaria de dicha cascada, TBK-1 (*TANK Binding Kinase-1*), inhibiendo su asociación con IRF-3 y por lo tanto la activación de este último. Asimismo, NS4B también contribuye a la inhibición de la vía RIG-1 → IPS-1. **Estos son "mecanismos activos" de evasión viral a IRF-3**. No está aún definido el grado de contribución del receptor extracelular TLR-3 en la vía de activación de IRF-3 durante la infección por HCV (Figura 24.5.9; véase el capítulo 7 "Mecanismos de defensa").

Además, la proteína viral *core* interfiere con la vía de señalización JAK/STAT (activando SOCS-3, un inhibidor de dicha vía), bloqueando así la expresión de los genes inducibles por IFN (Figura 24.5.10).

Se han detectado secuencias aminoacídicas específicas dentro de la proteína de envoltura E2 y de NS5A que –al igual que la región genómica del IRES– inhiben a la PKR. Estos tres elementos de regulación negativa de la PKR evitan que dicha quinasa inhiba la síntesis de proteínas a través de la fosforilación del factor eucariótico de iniciación 2α (eIF2α) (Figura 24.5.10). E2 puede funcionar como un blanco señuelo para la PKR debido a la homología de su secuencia aminoacídica con los sitios de fosforilación tanto de la enzima como de su sustrato, eIF2α. A su vez, NS5A forma un heterodímero con la PKR inhibiendo su función. Una región de 40 aminoácidos dentro de NS5A, denominada ISDR (*IFN Sensitivity Determining Region*), fue correlacionada con la respuesta a la

terapia con IFN por investigadores japoneses; sin embargo, otros grupos de occidente no han observado una conexión entre la sensibilidad viral al IFN y la denominada ISDR, aunque ello no excluye la posibilidad que NS5A desempeñe algún rol en la inhibición de la eliminación viral.

NS5A también interfiere con la vía 2'-5' OAS (oligoademilato sintetasa)/RNasa L, uniéndose a la 2'-5' OAS. Por otra parte, dicha proteína no estructural induce la expresión de IL-8, la cual inhibe las acciones antivirales del IFN.

La región aminoacídica de E2 correspondiente al genotipo 1 del HCV -relativamente resistente a la terapia con IFN-, inhibe a la PKR más eficientemente que la correspondiente a los genotipos 2 y 3, los cuales responden mucho mejor a la terapia con IFN. Correlaciones similares fueron reportadas para secuencias de NS5A, pero éstas estaban limitadas a aislamientos virales de Japón.

La inhibición de la actividad de la PKR por el IRES del HCV estaría relacionada a la estructura espacial del RNA viral, que podría inhibir por competición el efecto inductor del RNA bicatenario (producido durante la replicación) sobre dicha enzima.

Por otra parte, la respuesta inmune inicial en la infección por HCV también involucra a las células dendríticas, macrófagos residentes, células NK y NKT. Se ha postulado que el HCV ha desarrollado estrategias para evadir a las células NK, las cuales desempeñan un rol importante en la fase temprana de la infección. Estudios experimentales demostraron que la proteína recombinante E2 truncada produce el entrecruzamiento del receptor CD81 en la superficie de las células NK inhibiendo su capacidad citotóxica y la producción de IFN-γ. Sin embargo, en contraposición con estos estudios, el grupo

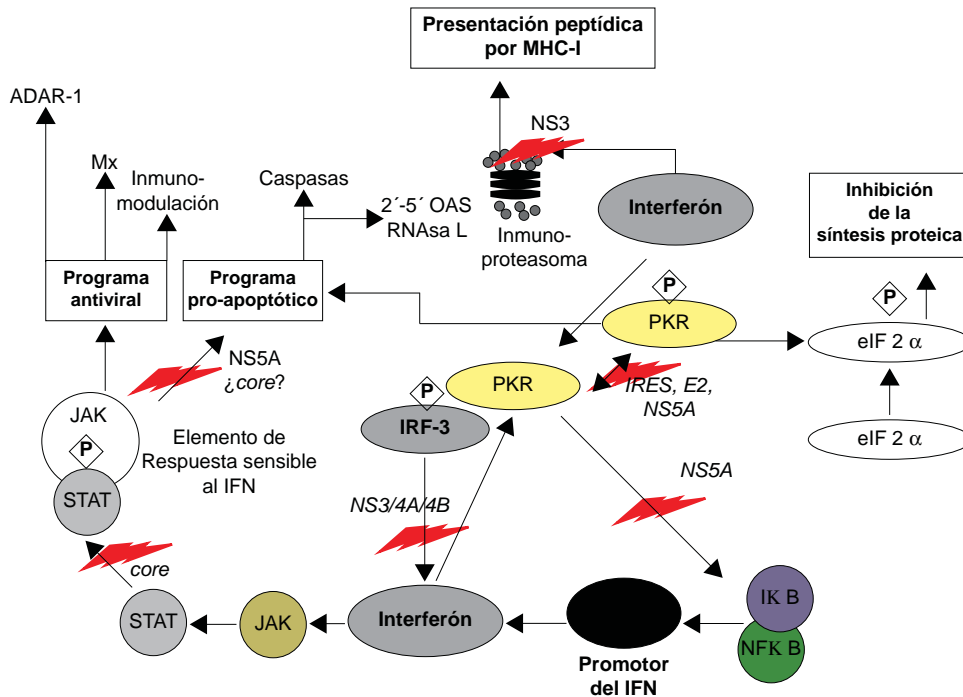


Figura 24.5.10. Blancos de acción del virus hepatitis C (HCV) para inhibir diferentes vías de la respuesta antiviral o –selectivamente– moléculas efectoras antivirales inducidas por el Interferón. La imagen con forma de rayo indica un efecto inhibitorio sobre la vía de señalización.

de Bárbara Rehmann documentó subsiguientemente que la función de las células NK no está afectada al promoverse la interacción de las mismas con la proteína E2 cuando forma parte de partículas virales infecciosas, independientemente de la presencia o ausencia de anticuerpos que se unen al HCV, y de la presencia o ausencia de otras poblaciones celulares de sangre periférica.

Por otra parte, las células NK de pacientes infectados con HCV son incapaces de activar adecuadamente a las células dendríticas debido a la sobre-expresión del receptor CD94/NKG2A y a la producción de IL-10 y TGF- β . Se ha demostrado que los pacientes homocigotas para el receptor inhibitorio de las células NK KIR-2DL3, que –a su vez– exhiben HLA-C1, son más proclives a la recuperación de la infección aguda que aquellos con otro haplotipo, sugiriendo que el umbral de activación de las células NK sería menor en estos pacientes, favoreciendo la eliminación viral.

Respuesta inmune adaptativa. El RNA viral se detecta en el suero a los pocos días de iniciada la infección y el pico de viremia se alcanza típicamente a las 6-10 semanas (Figura 24.5.11). En paralelo, ingresan al hígado células T activadas específicas contra el virus; sin embargo, esta respuesta inmune celular está retrasada por lo menos un mes tanto en humanos como en chimpancés. La aparición de una respuesta de células T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ específicas para HCV junto con la coexpresión de IFN- γ en el hígado coincide con la disminución de la carga viral y el control transitorio o permanente de la replicación viral. Una falla en dicha respuesta se correlaciona con un patrón de viremia poco controlado con altos niveles de replicación viral e infección persistente. La resolución de la infección aguda está asociada a una respuesta inmune de células T CD4 $^{+}$ tipo Th1 vigorosa, sostenida y multi-epitope-específica. Por el contrario, los casos que progresan a una hepatitis crónica tienden a tener una respuesta de células T CD4 $^{+}$ débil, transitoria y restringida hacia un número muy circunscrito de epítopes específicos. De la misma manera, una respuesta de células T CD8 $^{+}$ vigorosa, persistente y multi-específica es observada en la mayoría de los pacientes que resuelven la infección aguda. Todavía no se ha dilucidado la razón por la cual la respuesta inmune celular está retrasada varias semanas en la infección por HCV, aun en humanos (Figura 24.5.11) y chimpancés que logran resolver la infección. La

frecuencia de células T CD8 $^{+}$ específicas para el HCV es alta durante la fase aguda de la infección (2 - 8% de células T CD8 $^{+}$ en sangre periférica), pero disminuye luego de la instauración de la persistencia viral en la infección crónica (0,01-1,2%). La expansión en la fase aguda de linfocitos T citotóxicos específicos para HCV coincide temporalmente con el daño hepático evidenciado por el aumento de las transaminasas.

Llamativamente, al comienzo de la infección aguda, los linfocitos T citotóxicos específicos no son capaces de producir IFN- γ ni de proliferar en respuesta a los antígenos virales. Estas capacidades pueden ser luego recuperadas coincidiendo con la disminución de la viremia y eventual resolución de la enfermedad hepática. Esto implica que las células T CD8 $^{+}$ específicas contribuyen a la eliminación viral. Ello ocurre tanto por mecanismos citolíticos como no citolíticos en el curso de la infección aguda. El mecanismo no citolítico es sugerido por la observación de que algunos pacientes resuelven la infección aguda sin que haya aumento del nivel de las transaminasas, aunque también es posible que en estos pacientes estén infectados relativamente pocos hepatocitos, lo que limitaría la extensión del daño hepático mediado por los linfocitos T citotóxicos.

Si bien la ictericia –atribuible a un daño hepático mediado por células T citotóxicas– es raramente observada en la infección aguda por HCV, se ha establecido que los pacientes sintomáticos tienen mayor probabilidad de recuperación que los individuos infectados en forma asintomática.

Los anticuerpos específicos para el HCV son detectados en suero luego de la aparición de la respuesta inmune celular, aproximadamente 2 meses luego de la infección (Figura 24.5.11). Sin embargo, en algunos casos pueden detectarse más tardíamente o no detectarse. En ciertos individuos inmunosuprimidos o con defectos selectivos en la respuesta anti-HCV que exhiben ausencia de anticuerpos anti-HCV (individuos sero-silentes; véase el ítem 6.3: Infección oculta) y elevada viremia, se generan RNAs subgenómicos con deleciones de tal magnitud, que requieren cuasiespecies salvajes del HCV que coinfecten la misma célula y que actúen como virus ayudadores para permitir su propagación.

Todavía no se ha establecido si los anticuerpos pueden neutralizar la infectividad del virus. En un estudio realizado con chim-

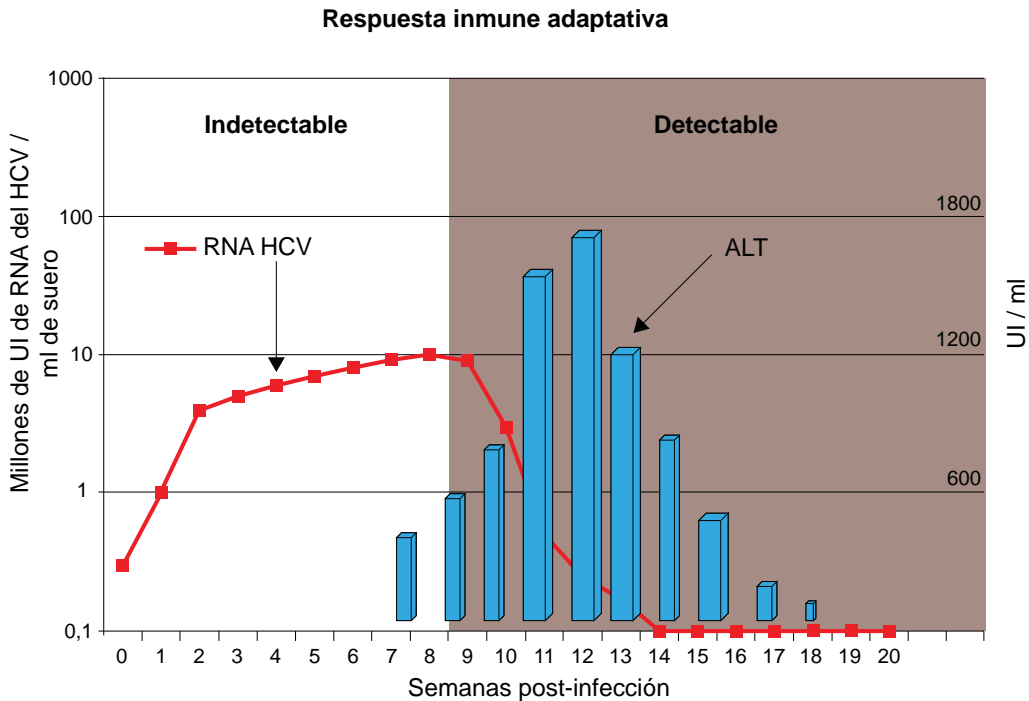


Figura 24.5.11. Respuesta inmune adaptativa en la infección aguda por virus hepatitis C (HCV). Por razones desconocidas, dicha respuesta es indetectable antes de las 6-8 semanas, a pesar de la significativa replicación viral, que se traduce en elevados niveles de viremia.

pancés experimentalmente inoculados, la infectividad del HCV fue neutralizada por tratamiento *in vitro* con anticuerpos específicos contra las glicoproteínas de envoltura (E1 y E2). Sin embargo, el rol de los anticuerpos en la protección ha sido cuestionado, ya que no previenen la reinfección en chimpancés o humanos que resolvieron la infección aguda. Es más, la resolución de la infección puede ocurrir sin el desarrollo de anticuerpos específicos en ambos hospedadores, evidenciando que la inmunidad humoral no se correlaciona inequívocamente con un desenlace favorable de la infección.

Estudios en pacientes que resolvieron la infección revelaron que los títulos de anticuerpos específicos contra el virus declinan y pueden desaparecer completamente al cabo de 10-20 años (serorreversión), mientras que la respuesta celular CD4⁺ y CD8⁺ específica persiste aún varias décadas después.

Todavía no se ha esclarecido si existe o no una inmunidad protectora contra el HCV en los casos humanos autolimitados. Múltiples episodios de hepatitis C aguda reportados en niños talasémicos politransfundidos y reinfecciones en chimpancés que previamente habían resuelto la infección sugieren que una inmunidad completamente protectora no existiría para el HCV. Sin embargo, también existen evidencias que indicarían lo contrario. A pesar de que los chimpancés recuperados de la infección por HCV y desafiados nuevamente con el virus fueron susceptibles a la reinfección, se observó una marcada reducción en la duración y el nivel máximo de la viremia, y un curso atenuado de la infección sin evidencia de enfermedad hepática. Estudios experimentales en dichos primates documentaron también que la depleción *in vivo* de células T CD8⁺ antes de un tercer desafío viral resulta en una viremia prolongada, la cual sólo es controlada cuando las células T CD8⁺ reaparecen en el hígado. La depleción *in vivo* de células CD4⁺ en un experimento paralelo también resultó en persistencia viral, estableciendo la necesidad de esta población para la cooperación con las CD8⁺. En conjunto, estos estudios evidencian el **rol crucial que desempeñan las células T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria en la prevención de la infección persistente por**

HCV. Estudios en usuarios de drogas ilícitas por vía endovenosa demostraron que el riesgo de viremia es menor en individuos que previamente habían eliminado el virus respecto de aquellos que no tenían evidencia de infección previa. Estas observaciones apoyan la hipótesis que sugiere la existencia de una inmunidad protectora contra el HCV en humanos, enfatizando el rol de las células T de memoria.

En la etapa aguda, los individuos infectados con HCV exhiben una significativa expresión de PD-1 en los LT CD8⁺ (véase el capítulo 7 "Mecanismos de defensa"). Aquellos que autolimitan la infección, muestran una disminución de dicha molécula receptora con aumento concomitante de la producción de IFN-γ. Por el contrario, aquellos que evolucionan hacia la persistencia viral, los niveles de PD-1 se mantienen elevados, con lo cual se favorece el agotamiento de la respuesta citotóxica, a través de la interacción con el ligando PD-L1 expresado tanto por los hepatocitos infectados como por las células presentadoras de antígeno. La expresión de PD-1 es estimulada por la IL-10 producida por diversas estirpes celulares (como por ejemplo, las células de Küpffer, y ciertas subpoblaciones de linfocitos).

6.2. INFECCIÓN CRÓNICA

Las células T CD8⁺ específicas pueden estar presentes durante años / décadas en un hígado crónicamente infectado. Dichas células podrían –al menos en parte– controlar la replicación viral y/o –paradójicamente– contribuir a la progresión de la enfermedad hepática. Han sido reportados resultados contrapuestos respecto a la **relación entre linfocitos T citotóxicos (CTLs) intrahepáticos y carga viral; es por ello que aún no se ha establecido definitivamente el rol de estas células en el control de la replicación viral en la hepatitis C crónica.** A pesar de que los CTLs específicos para el virus están concentrados en el hígado en la infección crónica, tampoco han sido inequívocamente correlacionados con la severidad de la enfermedad. Algunos estudios han documentado una asociación entre transaminasas elevadas e infiltración hepática de células T CD8⁺, pero es posible que sólo una fracción minoritaria del infil-

trado sea HCV-específico y/o que su espectro de especificidad antigénica fuere restringido a unos pocos epítopes virales. Los niveles aumentados de mRNA de citoquinas pro-inflamatorias intrahepáticas han sido correlacionados con la severidad de la inflamación portal y la fibrosis hepática. Sin embargo, no se ha establecido si la principal fuente de citoquinas pro-inflamatorias (como el IFN- γ) en la hepatitis C crónica corresponde a los linfocitos específicos que infiltran el hígado, ya que en dicha enfermedad otros LT CD8⁺ *bystander* ("testigos inocentes" de la infección) están presentes por reclutamiento y/o atrapamiento en el hígado y contribuirían al daño tisular, al igual que otros tipos de células inflamatorias.

Un rol decisivo de la IL-10 en el desenlace de la infección por HCV fue demostrado recientemente al observarse que el genotipo 1082GG del promotor de IL-10 (asociado a la alta producción de dicha citoquina) está frecuentemente presente en mujeres que exhiben alta carga viral con un bajo *score* de daño histopatológico (ausencia de cirrosis). Por el contrario, el genotipo del promotor de IL-10 asociado a baja producción de esta citoquina, está frecuentemente presente en individuos con baja carga viral y lesión cirrótica.

Al margen de que la patogénesis molecular de la infección crónica por HCV dista de ser comprendida en su totalidad, es evidente que **la respuesta inmune citotóxica del hospedador enfrenta el dilema de promover un daño hístico importante que puede limitar la infección o –por el contrario– atenuar dicha respuesta mediante una atmósfera local predominantemente regulada por IL-10 que evita la injuria tisular prominente, pero no puede erradicar la infección.** Las células Treg podrían desempeñar un rol en la modulación del daño hepático mediado por la respuesta inmune. (Tabla 24.5.4)

Se ha establecido que el **genotipo 3 del HCV** está asociado *per se* a la génesis de la **esteatosis** de origen exclusivamente viral, relacionada con un mayor nivel de copias de RNA (-) del HCV en el citoplasma celular (indicador de la replicación viral), lo que promueve dicho **efecto citopático directo**. Esta enfermedad puede

Escasez de linfocitos T citotóxicos (CTLs) CD8 ⁺ específicos para epítopes de HCV en el hígado
Anergia funcional de los CTLs CD8 ⁺ asociada a un fenotipo inmaduro
Menor capacidad proliferativa y funcional de los linfocitos T asociada a la interacción del <i>core</i> de HCV con el receptor gC1qR
Agotamiento de los CTLs CD8 ⁺ asociado a la interacción PD-1 / PD-1 ligando
Baja avidéz de los receptores T de CTLs CD8 ⁺ por epítopes de HCV
Regulación de la actividad de CTLs CD8 ⁺ por linfocitos T reguladores (Treg) Foxp3 ⁺
CTLs CD8 ⁺ testigos dañinos que no eliminan la infección pero potencian la lesión tisular
Altos niveles de IL-10 producida por las células de Kúpffer, células dendríticas, CD4 ⁺ Th1 y Th2, CD8 ⁺ y Tr1

Tabla 24.5.4. Factores asociados a la infección crónica por virus hepatitis C.

también observarse en pacientes con hepatitis C, asociada a factores del hospedador (consumo de alcohol, sobrepeso, dislipidemia y diabetes). La esteatosis se observa aproximadamente en un 55% de los enfermos con hepatitis C, y en el 20-30% de la población general adulta de occidente. Un 40% de los pacientes no diabéticos con sobrepeso infectados con el genotipo 3 del HCV exhiben esteatosis moderada a severa, comparado con un 10-15% de aquellos infectados con los genotipos 1 ó 4.

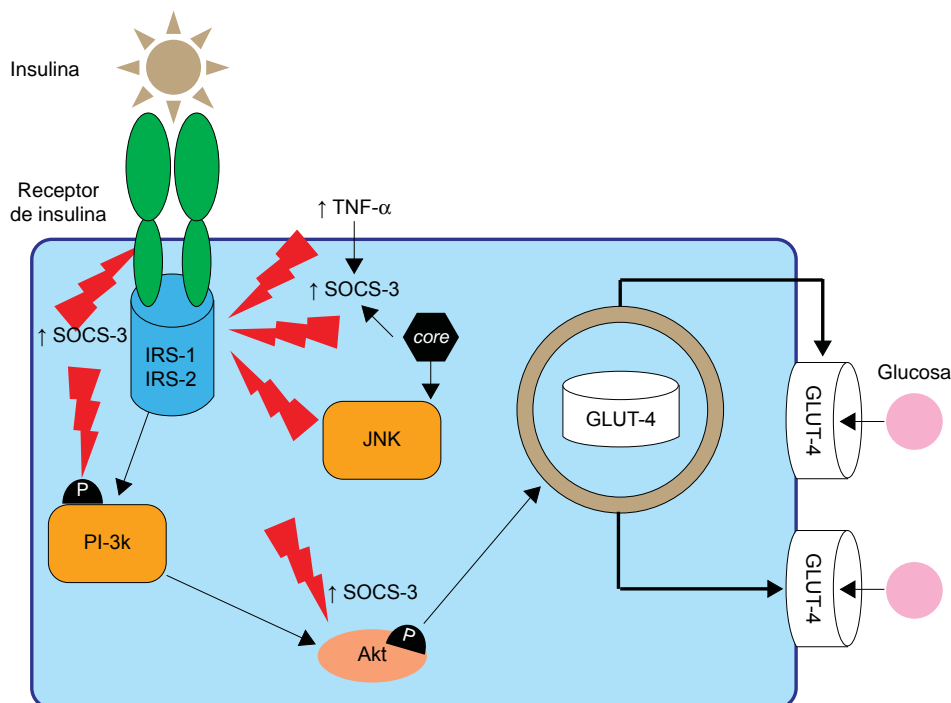


Figura 24.5.12. Vía de señalización de la insulina y blancos de acción de los inhibidores inducidos durante la infección por virus hepatitis C (HCV) que promueven insulino-resistencia. (Véase el texto). IRS: (*Insulin Receptor Substrate*: sustrato del receptor de Insulina); SOCS (*Suppressor of cytokine Signaling*: supresor de la señalización de citoquinas); PI-3K: fosfatidil inositol 3 quinasa; Akt: serina-treonina quinasa celular (homóloga a la descubierta en timomas de ratones AKR) también denominada PKB (proteína quinasa B); GLUT-4: (*Glucose transporter 4*: Transportador 4 de glucosa). La imagen con aspecto de rayo indica un efecto inhibitorio sobre la vía de señalización.

La patogénesis de la esteatosis por HCV no ha sido totalmente dilucidada. Se postulan dos mecanismos (no excluyentes entre sí): uno vinculado a un efecto directo viral producido por la proteína *core* sobre el metabolismo lipídico, y el otro asociado a la insulino-resistencia (Figura 24.5.12).

La proteína *core* del HCV promueve la esteatosis mediante la **inhibición de una proteína microsomal de transferencia de triglicéridos**; dicha esteatosis induce insulino-resistencia. También se ha demostrado que la proteína *core* del HCV promueve el **estrés oxidativo mitocondrial, lo cual contribuye a la acumulación lipídica intracelular**.

Como se mencionó anteriormente, la **resistencia a la insulina** es el **otro principal mecanismo que contribuye a la génesis de la esteatosis**. El HCV promueve dicha resistencia, la que –a su vez– induce resistencia al Interferón. El mecanismo de producción de la insulino-resistencia está asociado a la **producción aumentada de TNF- α** junto a la **del supresor de la señalización de citoquinas (en inglés, SOCS)-3** (Figuras 24.5.12 y 24.5.13).

Ambos eventos inhiben la fosforilación de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) y de su principal blanco, Akt (una serina/treonina quinasa celular antiapoptótica, homóloga a la descubierta en timomas de ratones AKR). La fosforilación de ambas es imprescindible para promover la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina. Tanto el **HCV como el TNF- α** (producido en respuesta a la infección por HCV) **disminuyen la fosforilación de residuos de tirosina (impidiendo el evento activador) de IRS (Insulin Receptor Substrate, sustrato del receptor de insulina) 1 y 2 al aumentar la actividad de SOCS-3, que –a su vez– degrada el receptor para insulina** (una tirosina quinasa). El *core* del HCV además promueve a través de la MAP quinasa JNK (*Jun N-terminal Kinase*, Jun N-Terminal quinasa) un evento de fosforilación de residuos de serina de IRS-1, lo que también regula negativamente la activación de éste. Asimismo, se ha postulado que el *core* del HCV promueve la degradación proteasómica de IRS-1 e IRS-2 por mecanismos

mediados por SOCS-3. Tanto el **HCV como el TNF- α** también **inhiben la vía de señalización de la insulina**, lo que **impide el traslado a la membrana citoplasmática del transportador de glucosa 4 (GLUT-4)**, lo cual evita la captación celular de glucosa, **aumentando la glucemia e insulinemia (resistencia a la insulina)**. La insulino-resistencia ha sido asociada a la elevada carga viral observada en ciertos pacientes con hepatitis C crónica, a los genotipos 1 y 4, así como –independientemente– a la fibrosis.

El **TNF- α** a su vez, **disminuye la expresión del factor de transcripción PPAR- γ** (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*; receptor del factor activado de proliferación de peroxisomas), lo que **disminuye la sensibilidad a la insulina**. PPAR- γ pertenece a la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de **transcripción** activados por ligandos; participa en la detección de ácidos grasos, a los que se le adjudica un rol importante en el síndrome metabólico. Se ha documentado que el *core* del genotipo 3a de HCV difiere del 1b en el mecanismo utilizado para promover la esteatosis: el primero lo hace mediante la degradación de IRS-1 por sobreexpresión de SOCS-7 y disminución de PPAR- γ , **mientras que el genotipo 1b, lo hace por aumento de la actividad de la serina-quinasa mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*; blanco de la Rapamicina en mamíferos)** (Figura 24.5.13).

La **insulino-resistencia es relevante también por la posible evolución a la fibrosis y por la falta de respuesta al tratamiento con PEG-Interferón más ribavirina**. Dado que la **cirrosis promueve resistencia a la insulina**, se había asociado inicialmente a dicha enfermedad con la diabetes tipo 2. Sin embargo, su prevalencia es diferente entre la cirrosis causada por HBV respecto a la producida por HCV (9,4% versus 23,6%). Ello sugiere que **el HCV per se promueve la insulino-resistencia y predispone al disparo de la diabetes tipo 2**. El HCV se correlaciona en un modo dosis-dependiente con la resistencia a la insulina, independientemente de la superficie de tejido adiposo corporal. **La esteatosis está**

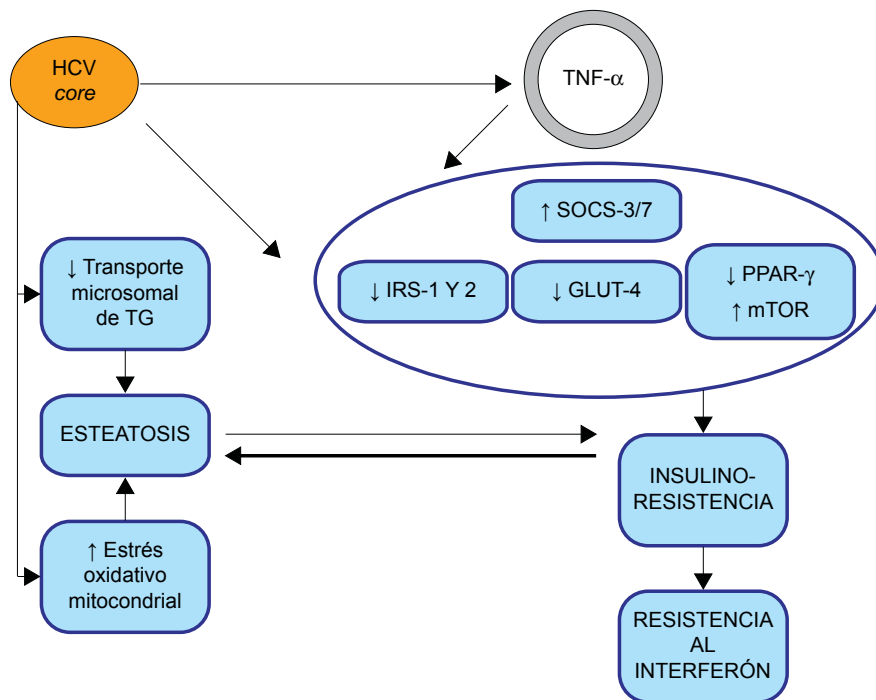


Figura 24.5.13. Patogénesis de la esteatosis y la insulino-resistencia asociadas a la infección por virus hepatitis C (HCV). (Véase el texto). TG: triglicéridos; IRS: (*Insulin Receptor Substrate*: sustrato del receptor de Insulina); SOCS (*Suppressor of cytokine Signaling*: supresor de la señalización de citoquinas); GLUT-4: (*Glucose transporter 4*: Transportador 4 de glucosa); PPAR- γ : (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ* : receptor y del factor activado de proliferación de peroxisomas).

asociada a la perturbación de la cascada de señalización del Interferón, así como a la disminución de la expresión de sus receptores. La hiperinsulinemia, la obesidad central, la hipertensión, el aumento de los triglicéridos y del LDL-colesterol en sangre, con o sin hiperglucemia, componen el síndrome metabólico (también denominado síndrome X). La hiperinsulinemia interfiere con la cascada de señalización del Interferón mediante la activación de SOCS-1 y -3 que inhiben la fosforilación de STAT-1, evitando así su translocación nuclear, lo que –de ocurrir– permitiría expresar genes activados por el Interferón. Dado que SOCS-1 y -3 son moléculas inhibitoras de la vía JAK/STAT y –a su vez– son inducidas por éstas, se establece un circuito de retroalimentación negativa. El *core* del HCV y el TNF- α también promueven la activación de SOCS-3. Esto sugiere que ciertas SOCS podrían ser un blanco terapéutico para mejorar la respuesta al tratamiento con Interferón en pacientes con hepatitis C que exhiben insulino-resistencia (Figura 24.5.12).

Evasión a la respuesta inmune y persistencia viral. En la figura 24.5.8 se mencionan las principales estrategias que utiliza el HCV para evadir la respuesta inmune, lo cual se asocia a la infección persistente.

Como se mencionó anteriormente, el control de la replicación viral está asociado a una respuesta inicial de células T CD4⁺ y CD8⁺ vigorosa, sostenida y multi-epitope-específica. Una falla en la inducción o el agotamiento de dicha respuesta predice la persistencia viral. El mecanismo responsable de este fenómeno no ha sido definido aún. Se ha sugerido que la presentación antigénica por parte de las células dendríticas (CDs) y macrófagos podría estar afectada en la infección por HCV. Existen evidencias que sugieren que las células dendríticas pueden estar infectadas con el virus. En la infección crónica, la diferenciación y maduración de ciertas subpoblaciones de CDs está alterada por una producción aumentada de IL-10 y disminuida de IL-12 por parte de estas células, las cuales además exhiben una capacidad disminuida de inducir la proliferación de células T. Esta pobre capacidad estimuladora de las CDs posiblemente es causada por el efecto inmunomodulatorio de ciertas proteínas virales como *core* y NS3. También se ha reportado que las proteínas virales NS3 y NS4 alteran la producción de citoquinas de los monocitos, así como su maduración a CDs. Si bien estos reportes indican que la función presentadora de antígenos en las CDs estaría alterada por las proteínas del HCV, se desconoce el mecanismo exacto. Con el advenimiento de las técnicas de estudio celular *ex vivo*, fue posible documentar una disminución cuantitativa de las CDs mieloides y plasmocitoides en sangre periférica de individuos infectados con HCV. Sin embargo, es motivo aún de controversia si existe también una disfunción cualitativa. Recientemente, se ha observado que las CDs plasmocitoides están funcionalmente afectadas por HCV (obtenido de cultivos celulares) para producir IFN tipo I. Dicha inhibición es probablemente dependiente del TLR-9, y no requiere la infección celular. Por el contrario, las CDs mieloides no exhiben alteraciones en su maduración, ni en la producción de IL-6, IL-10, IFN- γ o TNF- α . La limitada producción de IFN tipo I en el hígado por las CDs plasmocitoides alcanza para producir una discreta activación de los genes ISG (*Interferon Stimulated Gene*) dependientes de su estímulo. Se ha observado una baja cuantía de hepatocitos (2-18%) que expresan IRF-3 nuclear (isoforma activa) en biopsias hepáticas de una minoría de pacientes con hepatitis C crónica, no detectándose la proteasa NS3 en dichas células, lo que sugiere la participación de dicho factor transcripcional en el intento por controlar la infección. Sin embargo, este mecanismo es ineficaz para eliminar el HCV, como lo demuestra la frecuente detección de NS3 en ausencia de IRF-3 en un significativo número de hepatocitos de la mayoría de los pacientes con hepatitis C crónica (véase el mecanismo subyacente en el ítem 6.1).

Una explicación para el **agotamiento de las células T podría ser la delección de células T específicas en presencia de una carga viral continua.** Estudios recientes sugieren que la vía mediada

por PD-1 / PD-1 ligando desempeña un rol en el agotamiento de las células T, ya que el receptor PD-1 está sobre-expresado en las células T CD8⁺ específicas en la infección persistente, lo cual impide su apropiada activación (véase el Capítulo 8, Figura.8.7).

Otro posible mecanismo es la anergia funcional de las células T específicas. La disfunción de las células T CD8⁺ ocurre tanto en la fase aguda como crónica de la infección. De hecho, las células T CD8⁺ pueden tener afectada su capacidad proliferativa y citotóxica, así como su habilidad para secretar TNF- α e IFN- γ luego de la estimulación antigénica (*stunned phenotype* o fenotipo "aturdido" o funcionalmente anérgico). Esta disfunción en las células T fue observada en el curso temprano de la infección aguda de los pacientes, más allá del desenlace de la infección. En los pacientes con una infección autolimitada, la recuperación de las funciones de las células T CD8⁺ fue temporalmente asociada a la declinación de la viremia y a la resolución de la enfermedad. Por el contrario, la funcionalidad de estas células permaneció suprimida en los pacientes que progresaron a una infección crónica. Este impedimento en las funciones efectoras de las células T CD8⁺ específicas está asociado a un fenotipo de diferenciación inmaduro, donde la mayoría son CD28⁺ y/o CD27⁺ indicando que permanecen en un estadio temprano de diferenciación.

Se podría especular que los diferentes mecanismos vinculados con la falla de las células T CD8⁺ son el resultado directo de una respuesta débil y disfuncional por parte de las células T CD4⁺ que es común en las infecciones persistentes por HCV.

Hay evidencias que sugieren un **rol importante de las células T regulatorias CD4⁺ CD25⁺ en la supresión de la funcionalidad de las células T CD8⁺ específicas.** Estas células regulatorias están aumentadas en la infección crónica, e inhiben la producción de IFN- γ y la proliferación de las células T CD8⁺ específicas, ya sea secretando IL-10 (subpoblación Foxp3⁺ o también denominada Tr1), o bien a través del contacto directo (subpoblación Foxp3⁺). También se ha demostrado la presencia en el hígado infectado de células T regulatorias CD8⁺ CCR7⁺ que también secretan IL-10 inhibiendo la funcionalidad de las células T CD8⁺ específicas.

Asimismo, se demostró que la proteína *core* del HCV se une al dominio globular del receptor del componente del complemento C1q (gC1qR) en las células T, lo que se asocia a la disminución de su proliferación y de la producción de IFN- γ e IL-2.

Una de las principales estrategias de evasión del HCV consiste en la emergencia de mutaciones de escape a la respuesta inmune adaptativa. La alta tasa de replicación viral (hasta 10¹² partículas virales por día) asociada a la falta de lectura de prueba de la polimerasa viral contribuye a la rápida generación de cuasiespecies, las que se adaptan a la presión de selección ejercida por la respuesta inmune humoral y celular. De hecho, han sido descritos cambios en la secuencia de la región hipervariable 1 de la glicoproteína de envoltura E2 (el principal blanco de la respuesta de anticuerpos) durante la seroconversión en la infección aguda, los que han sido relacionados con el desenlace de la infección. En otros términos, **la mayor diversidad de cuasiespecies durante la infección aguda es un elemento predictivo de evolución hacia la persistencia;** por el contrario, un espectro restringido de variantes virales en la etapa aguda favorece la autolimitación de la infección.

También se han observado sustituciones aminoácidas en epítopes T, que inhiben el reconocimiento por parte de las células T en pacientes crónicamente infectados.

En contraposición con quienes eliminan la infección mediante la selección y sobrevida de LT CD8⁺ con TCRs de alta avidez (lo cual promueve una adecuada producción de IFN- γ), se ha documentado en individuos crónicamente infectados la proliferación de linfocitos T CD8⁺ con un TCR de baja avidez para epítopes del HCV.

Carcinogénesis hepática. Como en la mayoría de los distintos tipos de cáncer, la hepatocarcinogénesis es un proceso complejo multifactorial que incluye diferentes alteraciones genéticas que conducen finalmente a la transformación maligna del hepatocito. El HCV, por modulación directa de ciertas vías de transducción de

señales puede promover dicha transformación al cabo de un período de muchos años de infección. Se ignoran las razones por las cuales sólo un porcentaje minoritario de pacientes crónicamente infectados (y aún con cirrosis) evoluciona hacia el HCC.

El HCV –a diferencia del HBV– no se integra al genoma del hospedador. Sin embargo, las proteínas del HCV interactúan con proteínas celulares involucradas en un amplio rango de actividades, tales como la señalización celular, la regulación transcripcional y traduccional, la proliferación celular, la apoptosis, la reorganización de membranas y el tráfico vesicular.

Algunas de las proteínas del HCV como **core**, **E2**, **NS3** y **NS5A**, exhiben un importante rol en la **alteración de las distintas vías de señalización** intracelular potencialmente oncogénicas. Algunas proteínas del virus promueven también **estrés oxidativo**, el que contribuiría a la transformación de las células infectadas al dañar al DNA celular.

A continuación se detallarán algunos de los efectos que promueven las proteínas mencionadas anteriormente sobre la célula hospedadora.

La proteína del **core** del HCV induce el estrés oxidativo del RE y la generación de especies reactivas de oxígeno (**ROS**) en la mitocondria, lo cual podría coadyuvar a la carcinogénesis. El efecto de la expresión de la proteína del **core** en la apoptosis no ha sido definitivamente establecido, ya que se han publicado estudios con resultados opuestos. Así, por una parte, se ha postulado que la proteína del **core** inhibe la apoptosis *in vitro* mediada por **TNF- α** a través de un mecanismo que involucra interacciones con su receptor. El **TNF- α** es la principal citoquina pro-inflamatoria secretada por macrófagos y LT activados. Además, el **TNF- α** estimula la apoptosis mediada por **FAS** facilitando la eliminación de células infectadas. Por lo tanto, el bloqueo de la señalización mediada por **TNF- α** podría resultar en la sobrevida de los hepatocitos infectados, lo que facilitaría la persistencia de la infección. Sin embargo, otros estudios realizados en pacientes indican que la proteína del **core** aumenta la apoptosis inducida por **TNF- α** . Por otra parte, la proteína **core** se une a las proteínas supresoras de tumores **p53**, **p73** y **pRb**, lo cual sugiere su participación en la regulación del ciclo celular. Dado que **p53** y **p73** promueven la apoptosis incrementando la expresión de **p21^{WAF1}** (un inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas [CDKs]), un efecto inhibidor de la proteína **core** en dicha vía implica un efecto anti-apoptótico. Por otra parte, ha sido reportado que la proteína **core** del HCV activa la vía de señalización de las **MAPK**, promoviendo la proliferación celular de células quiescentes. **Core** ha sido implicada en la activación de la vía **Wnt/ β -catenina**, induciendo también la proliferación celular. Por último, la proteína del **core** podría tener una función dual en el sistema **TGF- β** , dependiendo de la fase de la enfermedad. En un estadio temprano de infección, el **core** podría contribuir al desarrollo de la fibrosis por aumento en la síntesis de **TGF- β** que estimula a las células de Ito para producir matriz extracelular, y luego, después de un prolongado período de fibrosis e inflamación la misma proteína viral puede contribuir a la transformación celular por inhibición de las vías anti-proliferativas dependientes de **TGF- β** .

Ensayos *in vitro* demostraron que la proteína de envoltura **E2** interfiere con la función antiviral del IFN mediante inhibición de la **PKR**. Además, como se mencionó anteriormente, **E2** interactúa específicamente con **CD81**, ejerciendo así un efecto inhibitorio sobre la activación de células T y NK (aunque con esta población, la inhibición observada *in vitro* no fue documentada *in vivo* en el primer estudio que la investigó). La interacción de **E2** con **CD81** y con **LDLR** en la superficie celular, activa la vía de señalización **MAPK/ERK**, contribuyendo también a la proliferación y sobrevida celular. Finalmente, **E2** es capaz de inhibir la liberación desde la mitocondria del **citocromo C**, uno de los eventos claves en la inducción de la apoptosis por la vía intrínseca.

Por otra parte, **NS3** interacciona con **p53** reprimiendo de esta manera la transcripción de **p21^{WAF1}**, lo que resulta (como se mencionó para **core**) en la proliferación y sobrevida celular. Además, modula varias cascadas de transducción de señales, como las que

involucran a la **PKA** y la **PKC**, lo cual tiene un efecto transformador potencial. Interactúa con la primera, inhibiendo su capacidad de trasladarse al núcleo y catalizar la fosforilación de diversas proteínas. Con respecto a la **PKC**, **NS3** posee secuencias aminoacídicas que pueden servir como sustratos señuelos para la fosforilación por dicha quinasa produciendo una inhibición (por competición con los sustratos celulares fisiológicos) de esta vía de señalización.

Finalmente, **NS5A** está implicada tanto en la modulación de la vía de transducción de señales citoplasmáticas como de la maquinaria transcripcional de la célula. Cuando esta proteína se encuentra en su forma intacta (previa al clivaje por caspasas o calpaínas) se localiza en el citoplasma celular principalmente unida a membranas y a gotas lipídicas. Una vez clivada, expone su señal de localización nuclear, lo que le permite translocarse al núcleo y actuar como factor de transcripción. Además, la proteína **NS5A** se une a **p53**. Dicho heterodímero colocaliza en la región perinuclear, provocando la inhibición tanto de la transactivación transcripcional, como de la apoptosis inducidas por **p53**. La interacción con **p53** reduce también (como **core** y **NS3**) la expresión de **p21^{WAF1}** promoviendo así la proliferación celular. La modulación del crecimiento celular y la diferenciación se ve influenciada por la interacción de **NS5A** con dos proteínas: **Grb2** (proteína adaptadora asociada al receptor de factores de crecimiento e involucrada en la vía de activación de **ERK** [*Extracellular signal Regulated Kinase; quinasa regulada por señal extracelular*]) y **CDK2** (proteína que regula el ciclo celular). Se ha demostrado que **NS5A** inhibe la apoptosis inducida por **TNF- α** , mediante su interacción con las proteínas adaptadoras del receptor homónimo, denominadas **TRADD** y **TRAF2**. Además, **NS5A** se une a **Bax** (proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2), lo que contribuye también al efecto general anti-apoptótico. La vía de la fosfatidil-inositol-3 quinasa (**PI3K**) que promueve la sobrevida celular es también activada por **NS5A**, mediante la activación de **Akt** que inactiva mediante fosforilación las proteínas pro-apoptóticas **Bad**, **caspa** 9 y **p21^{WAF1}**. Por último, **NS5A** altera los niveles intracelulares de **calcio**, induce la formación de **ROS** y la activación de **STAT-3** y **NF- κ B**. El **estrés oxidativo** promueve la activación de vías de señalización intracelular de las **MAPKs**. **NF- κ B** es un factor transcripcional que entre sus múltiples blancos regula la expresión de algunas citoquinas, y aumenta la expresión de proteínas inhibitorias de la apoptosis como las **IAP** (*Inhibitory Apoptosis Protein*; proteína inhibidora de la apoptosis). El rol que **STAT-3** puede desempeñar en la patogénesis mediada por HCV aún no se ha establecido, aunque se ha postulado que la activación de la misma sería otro mecanismo de promoción de la sobrevida de las células infectadas.

6.3. INFECCIÓN OCULTA

En 2004 se documentó por primera vez la infección oculta por HCV mediante la detección del RNA viral en hígado de individuos con niveles persistentemente elevados de transaminasas séricas por causas desconocidas, en ausencia de anticuerpos circulantes específicos y de genomas del HCV en plasma. Un importante porcentaje de estos individuos exhibe replicación en linfo-mononucleares de sangre periférica, por lo cual su sangre es potencialmente infecciosa. Estudios iniciales sugieren que estos individuos exhiben un cuadro clínico más leve que quienes padecen hepatitis crónica. La infección oculta, se ha reportado subsiguientemente también en pacientes que exhiben serología positiva para HCV y ausencia de RNA viral plasmático con niveles persistentemente normales de transaminasas. Estos resultados implican la preocupante posibilidad de que exista un porcentaje de individuos considerados respondedores sostenidos desde el punto de vista virológico (el RNA del HCV plasmático continúa indetectable al cabo de 6 meses de finalizado el tratamiento antiviral) que en realidad desarrollan una infección oculta. En 2007 se demostró que es posible detectar una muy baja carga de RNA del HCV en el plasma de pacientes con infección oculta, cuando se analizan volúmenes significativamente mayores de plasma luego de su ultracentrifugación en "colchón" de sacarosa.

6.4. MANIFESTACIONES EXTRA-HEPÁTICAS

Si bien el hígado es el órgano primario de replicación del HCV, existen también manifestaciones extra-hepáticas, como resultado de la participación de mecanismos inmunopatológicos que afectan diversos tejidos. Entre ellos, se incluyen los siguientes cuadros debido al depósito de inmunocomplejos: **vasculitis, glomerulonefritis membranosa, artritis y neuropatías**.

Además, la expansión mono- o policlonal de linfocitos B durante la fase crónica puede evolucionar a **crioglobulinemia mixta** y a enfermedades malignas de dicha estirpe celular, como el **linfoma no-Hodgkin**, habiéndose implicado en su génesis la mutación de protooncogenes. La información inherente a los mecanismos patogénicos de las enfermedades linfoproliferativas es parcial aún. La crioglobulinemia mixta es la manifestación extra-hepática más frecuente asociada a la infección por HCV (Tabla 24.5.5). Esta patología se define por la presencia de Igs séricas que son insolubles a temperaturas inferiores a 37° C, y que pueden disolverse por calentamiento sérico. Se clasifican en tipo I, II y III, según la naturaleza de la IgM e IgG: a) monoclonal ambas Igs; b) monoclonal (IgM) / policlonal (IgG); ó c) policlonal ambas Igs, respectivamente. En la crioglobulinemia mixta, la IgG y la IgM con actividad de factor reumatoideo (FR) participan en la composición de los complejos inmunes circulantes. En esta enfermedad el 50-60 % corresponden al tipo II, y el 30-40% al tipo III. Las crioproteínas están enriquecidas en RNA del HCV. Un 19-50% de los individuos infectados con HCV exhibe crioglobulinas séricas.

Sin embargo, dado que las crioglobulinas existen en bajos niveles, habitualmente este desorden es asintomático o presenta manifestaciones clínicas leves. Las manifestaciones del síndrome completo de crioglobulinemia mixta incluyen debilidad, púrpura y artralgias, y con menor frecuencia neuropatía periférica, compromiso del SNC (disartria transitoria o hemiplejía), renal (similar a la glomerulonefritis membranosa idiopática, con trombos capilares y

depósito de IgM en capilares) y hepático. El compromiso renal se observa en el 20% de los casos al momento del diagnóstico del síndrome completo de crioglobulinemia mixta y en el 30-60% de los pacientes monitoreados subsiguientemente. La expansión clonal de linfocitos B en sangre periférica, y/o en los infiltrados hepáticos, así como las características histopatológicas de los infiltrados en médula ósea e hígado confirman la naturaleza linfoproliferativa de la crioglobulinemia mixta. La proliferación clonal B, ocurre especialmente en aquellos linfocitos asociados a la producción del FR, lo que subyace a la crioglobulinemia mixta. Esta patología está asociada al rearreglo genómico *bcl-2* / *J_H*. El tipo II de crioglobulinemia mixta –a su vez– puede evolucionar al linfoma no-Hodgkin en un 8-10 % de los casos al cabo de prolongados períodos. Los linfomas asociados al HCV pueden ocurrir también en forma idiopática. Los pacientes con crioglobulinemia mixta ostentan un riesgo relativo 35 veces mayor que la población general para desarrollar linfomas no-Hodgkin (derivados de células B). Se ha descrito una especial asociación entre el HCV y ciertos linfomas de la zona marginal, entre los que sobresalen los linfomas asociados al tejido linfoide de las mucosas (en inglés, conocido por el acrónimo MALT), y las formas esplénicas. Se ha reportado que estos últimos remiten luego de la terapéutica anti-HCV, a pesar de la ineficacia de la quimioterapia previa.

La patogénesis molecular de los desórdenes linfoproliferativos involucra una serie compleja de eventos que ocurren sucesivamente. La infección persistente por HCV promueve una estimulación policlonal de linfocitos B que pueden favorecer la emergencia de dichos desórdenes. Entre los factores que favorecen la proliferación celular se encuentran: a) la interacción entre la envoltura viral (proteína E2) y el receptor CD81 en linfocitos B (disminuyendo el umbral de activación por epítopes diversos); b) la actividad de los linfocitos T reactivos para HCV; y c) diversas citoquinas. A su vez, la infección continua de linfocitos B con HCV podría favorecer la emergencia de eventos mutagénicos. Entre ellos merece especial atención la translocación t(14; 18) del gen *bcl-2*, observada

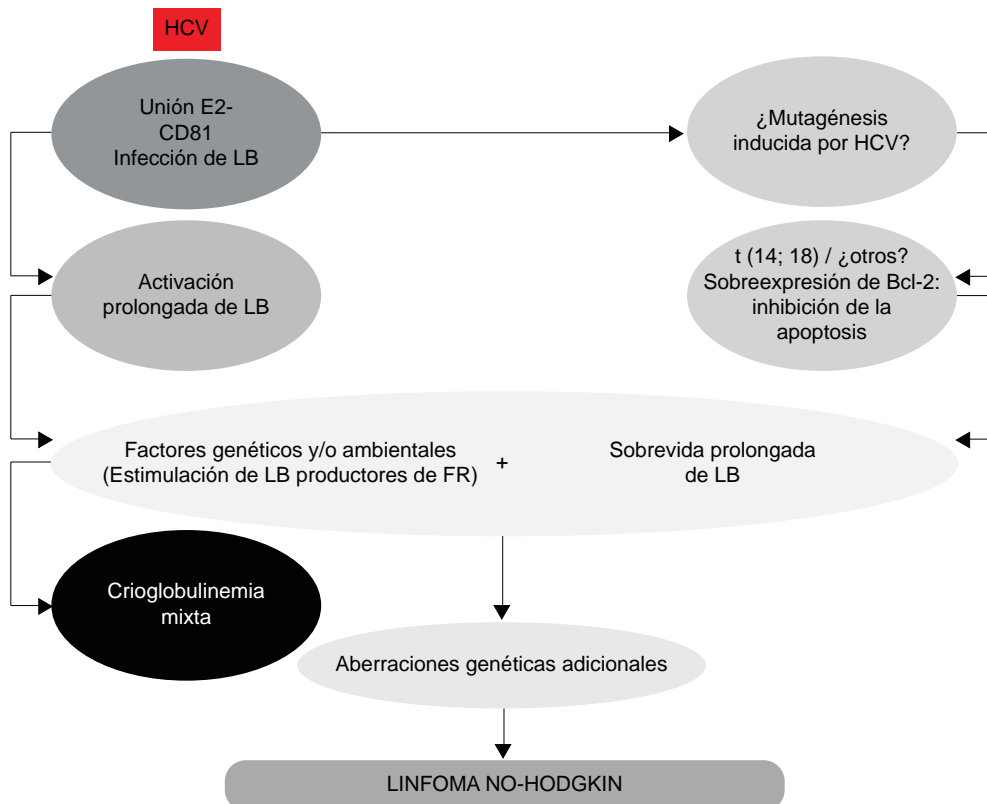


Figura 24.5.14. Patogénesis molecular del linfoma *No-Hodgkin* asociado a la infección por virus hepatitis C (HCV).

A. Asociación definida sobre la base de la alta prevalencia y estudios de patogénesis molecular	- Crioglobulinemia mixta (con síndrome completo o incompleto)
B. Asociación definida sobre la base de una mayor prevalencia que en controles	- Liquen plano - Porfiria cutánea tarda
C. Asociaciones a ser confirmadas / caracterizadas	- Alveolitis / fibrosis pulmonar - Aterosclerosis aórtica - Cáncer tiroideo - Diabetes mellitus - Nefropatías no crioglobulinémicas - Síndrome <i>sicca</i> - Tiroiditis autoinmune

Tabla 24.5.5. Asociación de enfermedades extra-hepáticas con la infección por HCV.

en pacientes infectados con HCV que exhiben crioglobulinemia mixta tipo II y linfomas. Este rearrreglo genómico promueve la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y el consiguiente incremento de la tasa Bcl-2 / Bax. Ello conduce a un aumento de la sobrevivencia de los linfocitos B. Es posible también que eventos mutagénicos más directamente vinculados al virus sean operativos, aunque aún no han sido definidos. Probablemente, factores genéticos del hospedador (por ejemplo, un umbral disminuido para la activación de linfocitos B productores de FR) y/o factores ambientales pueden contribuir a la transición en la producción de IgM policlonal (crioglobulinemia mixta tipo III) a IgM mono-u oligoclonal (crioglobulinemia tipo II). Este cambio epifenoménico puede evolucionar a la malignización celular (Figura 24.5.14).

Otras enfermedades como el **liquen plano** y la **porfiria cutánea tarda** se han observado con mayor prevalencia en individuos infectados con HCV que en controles no infectados (Tabla 24.5.5).

Si bien se ha demostrado la **replicación del HCV en el SNC**, los mecanismos moleculares subyacentes que promueven los cuadros de **depresión y ciertos trastornos cognitivos** aún se desconocen.

7. DIAGNÓSTICO

Existen dos tipos de ensayos de laboratorio para el diagnóstico virológico y monitoreo de la infección por HCV: los ensayos serológicos, que detectan anticuerpos circulantes (método indirecto) y los que detectan, cuantifican, o caracterizan componentes de las partículas del HCV, como el RNA viral y el antígeno *core* (método directo) (Tabla 24.5.6).

7.1. MÉTODOS INDIRECTOS: DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

La primera determinación que debe realizarse es la detección de anticuerpos anti-HCV (prueba de tamizaje). Desde 1989 hasta el presente se han producido sucesivos equipos comerciales para detectar anticuerpos mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA). Los equipos de primera generación poseían limitada sensibilidad y especificidad, ya que evidenciaban muy tardíamente la seroconversión de los pacientes (en algunos casos hasta 16 semanas luego de la exposición), a la vez que se producían falsos resultados positivos. Los anticuerpos detectados exhibían especificidad para un antígeno correspondiente a un fragmento de la proteína no estructural 4 (NS4). Sin embargo, éste fue el primer recurso diagnóstico con que contó la humanidad para determinar la presencia de individuos infectados. Desde entonces, los equipos han ido mejorando tanto la sensibilidad como la especificidad de las determinaciones. Para ello se modificaron los diseños de ELISA mediante el agregado de diferentes proteínas recombinantes del HCV (*core* y otras proteínas no estructurales). En función de su configuración antigénica, los equipos de detección de anticuerpos han sido categorizados como de primera, segunda o tercera generación, siendo los dos últimos los utilizados en la actualidad. Éstos poseen una elevada sensibilidad (97-99%) y especificidad (99%). Los **anticuerpos específicos**

anti-HCV pueden ser detectados **a partir de las 7-8 semanas luego de la primoinfección** (véase más adelante la figura 24.5.15). Estos anticuerpos **usualmente persisten durante toda la vida**, aunque se han descrito eventos de serorreversión aun en pacientes inmunocompetentes. Las pruebas de ELISA pueden resultar negativas en pacientes infectados con HCV inmunocomprometidos o hemodializados. Por otra parte, pueden detectarse reacciones falsopositivas en pacientes con enfermedades autoinmunes y con autoanticuerpos circulantes.

La detección de **IgM** para el diagnóstico de infección aguda **para HCV no se realiza** debido a que dicha Ig se detecta también en la fase crónica, por lo que resultaría fútil su determinación.

Una serología positiva por ELISA puede ser confirmada mediante tests suplementarios que poseen mayor especificidad, como el RIBA (**R**ecombinant **I**mmuno **B**lotting **A**ssay) o el LIA (**L**inear **I**mmune **A**ssay), que determinan la presencia de anticuerpos específicos para cada antígeno viral individualmente. Sin embargo, dada la significativa especificidad de las pruebas de tamizaje de 3ra. generación, para algunos autores, la confirmación mediante *immunoblots*, ya no resulta imprescindible. Los criterios de positividad del RIBA y LIA se indican en la Tabla 24.5.7 A y B. Dado que ambas pruebas determinan anticuerpos contra antígenos diferentes, los resultados no siempre son coincidentes. En la actualidad las técnicas de detección del genoma viral complementan a estos ensayos para documentar la infección por HCV. Sin embargo, el lector debe recordar que los métodos directos no son confirmatorios de la pesquisa de anticuerpos, ya que se pueden obtener resultados negativos por ausencia de viremia en pacientes genuinamente infectados (con serología positiva), o bien puede detectarse el genoma o el antígeno *core* del HCV en ausencia de anticuerpos (período previo a la seroconversión o en individuos inmunosuprimidos).

Es posible también determinar la presencia de anticuerpos genotipo-específicos (**tipificación serológica del genotipo**). Ello resulta de especial importancia, cuando no es posible detectar el genoma viral para su caracterización genotípica (casos de viremia recurrente, en las fases donde la misma puede ser indetectable). Sin embargo, debe recordarse que pueden existir casos de infección anterior por un genotipo determinado –y contra el que es esperable que exista una respuesta inmune específica–, seguida de una infección presente por un genotipo diferente, contra el cual puede no detectarse anticuerpos específicos.

7.2. MÉTODOS DIRECTOS: DETECCIÓN DEL GENOMA VIRAL Y DEL ANTÍGENO DEL CORE.

Detección del genoma viral

Existen diferentes metodologías para detectar y cuantificar el genoma del HCV. Los ensayos de detección cualitativos están basados en la amplificación de la secuencia blanco mediante RT-PCR (transcripción inversa-PCR; utilizando equipos comerciales o no comerciales) o TMA (amplificación mediada por transcripción, utilizando equipos comerciales; véase el Capítulo 8 "Diagnóstico vi-



Método	Detección	Técnica	
Directo	Antígeno Core	ELISA	
	RNA viral	Ensayos cualitativos: <ul style="list-style-type: none"> • RT-PCR • TMA Ensayos cuantitativos: <ul style="list-style-type: none"> • RT-PCR cuantitativa • RT-PCR en tiempo real 	Con amplificación de la secuencia blanco Con amplificación de la señal de detección
		Genotipificación: <ul style="list-style-type: none"> • RT-PCR + secuenciación nucleotídica • RT-PCR + Hibridación inversa (INNO-LiPA) • RT-PCR + endonucleasas (RFLP) 	
Indirecto	Anticuerpos anti-HCV	<ul style="list-style-type: none"> • ELISA • RIBA • LIA • Tipificación serológica de genotipos 	

Tabla 24.5.6. Diagnóstico de hepatitis C. RT-PCR (*Reverse transcription-PCR*): transcripción inversa acoplada a PCR. En desarrollos no comerciales, esta técnica frecuentemente se realiza en doble ronda (RT-PCR anidada o *Nested PCR*) con cebadores internos a los extremos 5' y 3' de los productos de cDNA de la primera amplificación. TMA (*Transcription Mediated Amplification*): Amplificación mediada por Transcripción. b-DNA (*Branched DNA*): DNA ramificado. RIBA (*Recombinant Immunoblotting Assay*): ensayo de *immunoblotting* recombinante. LIA (*Linear Immune Assay*): ensayo immune lineal.



rológico"). Si bien la cuantificación genómica no es necesaria para el diagnóstico, dicha medición puede utilizarse en el monitoreo de la respuesta del paciente a la terapéutica antiviral instituida (véase la figura 24.5.20 al final del capítulo). El genoma viral puede ser cuantificado también mediante técnicas de amplificación de la secuencia blanco como RT-PCR cuantitativa o a través de la RT-PCR en tiempo real, o bien mediante técnicas de amplificación de la señal como el *branched-DNA* (DNA ramificado; véase el capítulo 9).

Inicialmente, las diferentes técnicas de cuantificación expresaban la carga viral en diferentes unidades, dificultando la comparación directa. Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido un estándar internacional expresado en UI/ml (Unidades Internacionales por mililitro) para poder interconvertir los resultados obtenidos mediante diferentes equipos comerciales. Sin embargo, se recomienda utilizar el mismo tipo de ensayo cuantitativo en un mismo paciente durante el tratamiento, ya que existe variabilidad entre las diferentes técnicas. Están disponibles diferentes equipos comerciales basados en diversas metodologías y con distintas sensibilidades para la detección y cuantificación del genoma viral (Tabla 24.5.8). La especificidad de los ensayos cualitativos y cuantitativos oscila entre un 98 y un 99%.

La detección genómica del HCV utilizando equipos no comerciales puede ser cualitativa o cuantitativa. En el primer caso, es habitual la utilización de una RT-doble (*Nested*) PCR. La determinación cuantitativa se puede realizar mediante co-amplificación competitiva de cantidades crecientes de moléculas de RNA del HCV conocidas (y modificadas en su secuencia o tamaño) junto con las moléculas de RNA viral de la muestra problema. Los productos co-amplificados son luego analizados, estableciéndose la

cuantía de la carga viral de la muestra problema al determinarse comparativamente la intensidad de las bandas de amplificación de los productos correspondientes a dicha muestra, en función de los obtenidos a partir de la amplificación de los templados artificiales de concentración conocida. Esta determinación posee una sensibilidad comparable a la de los equipos comerciales.

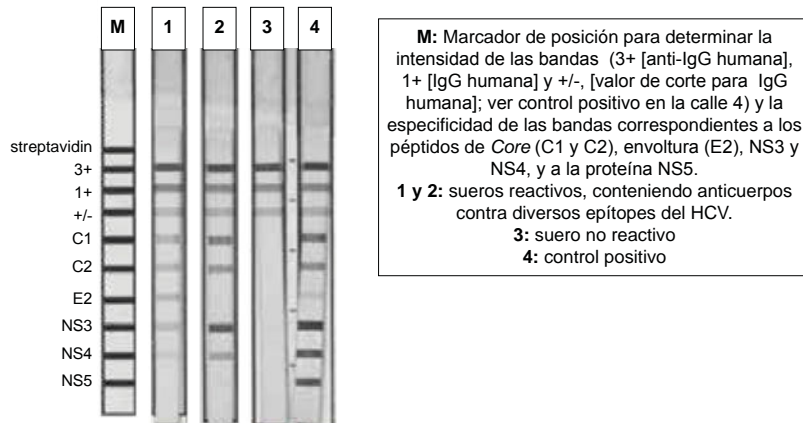
La detección del **genoma del HCV es el marcador definitivo de infección activa** (Tabla 24.5.9).

La documentación de la viremia es importante para: a) establecer la actividad de la infección en pacientes con serología positiva; b) diagnosticar hepatitis C aguda durante el período de ventana (el RNA viral puede ser detectado 1 a 3 semanas post-infección, aproximadamente un mes antes de la detección de anticuerpos); c) detectar la infección en pacientes inmunodeficientes, inmunosuprimidos o hemodializados, en quienes las pruebas serológicas pueden ser negativas; d) diagnosticar la infección en bebés nacidos de madres infectadas; e) monitorear la respuesta del paciente a la terapéutica antiviral; f) genotipificar la población actual circulante del HCV en el paciente.

Es importante recordar que se han comprobado **tres patrones diferentes de viremia: a) aguda fugaz; b) crónica persistente; c) crónica intermitente o –también denominada– recurrente** (Figura 24.5.15 A, B y C). Esta última es de particular importancia en el monitoreo de pacientes, para no interpretar resultados negativos por RT-PCR, como sinónimo de eliminación definitiva viral.

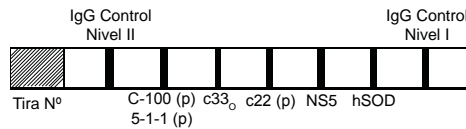
Se ha demostrado que las células mononucleares de sangre periférica (linfocitos y monocitos) pueden albergar variantes del HCV, actuando como reservorio de las mismas. Dichas células contribuyen a la carga viral plasmática aunque en mucho menor

A. INNO-LIA HCV Ab III para detección de anticuerpos anti-virus hepatitis C



Nota: Un ensayo se considera reactivo para anticuerpos anti-HCV cuando se cumple una de las siguientes condiciones:
 * Por lo menos una banda perteneciente a antígenos del HCV muestra un score correspondiente a una intensidad $\geq 2+$
 Por lo menos dos bandas pertenecientes a antígenos del HCV muestran un score correspondiente a una intensidad $\geq 1+$
 (Cortesía del Dr. Jorge Rey, Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Transfusional, Htal. de Clínicas "José de San Martín", UBA).

B. RIBA-3 para hepatitis C



Intensidad de la banda	Puntuación
• Ausente	-
• Menor que la intensidad de la banda de control IgG de Nivel I	+/-
• Igual a la intensidad de la banda de control IgG de Nivel I	1+
• Mayor que la intensidad de la banda de control IgG de Nivel I y menor que la intensidad de la banda de control IgG Nivel II	2+
• Igual a la intensidad de la banda de control IgG de Nivel II	3+
• Mayor que la intensidad de la banda de control IgG de Nivel II	4+

La interpretación negativa, indeterminada o positiva se basa en el patrón de reacción presente en la tira.
 Para interpretar las series como válidas deben utilizarse los siguientes criterios:

Patrón de la banda de antígeno	Intepretación
• Ninguna banda tiene reactividad + o mayor • Sólo la banda hSOD tiene reactividad 1+ o mayor	Negativo
• Una <i>única</i> banda de HCV con reactividad 1+ o mayor • La banda hSOD y una o más bandas de HCV con reactividad 1+ o mayor	Indeterminado
• Al menos <i>dos</i> bandas de HCV con reactividad 1+ o mayor	Positivo

Tabla 24.5.7. Pruebas serológicas de confirmación para detectar anticuerpos anti-HCV.

Equipos comerciales	Procedimiento	Técnica	Umbral de detección
<i>Ensayos cualitativos</i>			
Amplicor HCV v2.0 (Roche)	Manual	RT-PCR	50 UI / ml
Cobas Amplicor HCV v2.0 (Roche)	Semiautomatizado	RT-PCR	50 UI / ml
Versant HCV RNA Qualitative Assay (Bayer)	Manual	TMA	10 UI / ml
<i>Ensayos cuantitativos</i>			
Amplicor HCV Monitor v2.0 (Roche)	Manual	RT-PCR	600 UI / ml
Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0 (Roche)	Semiautomatizado	RT-PCR	600 UI / ml
Versant HCV RNA 3.0 Assay (Bayer)	Semiautomatizado	<i>branched</i> -DNA	615 UI / ml
LCx HCV RNA 3.0 Assay (Abbott)	Semiautomatizado	RT-PCR	25 UI / ml
SuperQuant (<i>National Genetics Institute</i> *)	Semiautomatizado	RT-PCR	30 UI / ml
Cobas Taq-Man HCV Test (Roche)	Automatizado	RT-PCR en tiempo real	10 UI / ml
Abbot RealTime HCV assay (Abbott)	Automatizado	RT-PCR en tiempo real	10 UI / ml

Tabla 24.5.8. Características de los equipos comerciales disponibles para detectar y cuantificar el genoma del HCV.
*El *National Genetics Institute* es un laboratorio de referencia independiente. En general los ensayos cualitativos de detección del genoma de HCV son más sensibles que la mayoría de los ensayos cuantitativos, a excepción de la PCR en tiempo real.

grado respecto a la producción viral en el hígado. Los linfocitos y monocitos pueden exhibir infecciones persistentes aún después de haberse tornado indetectable la carga viral plasmática luego del tratamiento antiviral, constituyéndose en potenciales fuentes de "fracaso terapéutico" meses a años después de repetidos resultados negativos en la pesquisa de RNA viral plasmático en pacientes tratados "exitosamente". Este evento ha sido observado mediante RT-*Nested* PCR seguida de *Southern blot* para detectar RNA viral en células mononucleares aun al cabo de 5 años de la administración del tratamiento anti-HCV que había sido considerado exitoso al erradicar el RNA viral del plasma. Estas células pueden –por ende– asociarse a eventos de reactivación de la infección espontáneamente o al finalizar el tratamiento antiviral.

Genotipificación (Figura 24.5.16). Su determinación sólo es útil en pacientes que van a ser sometidos a tratamiento, por lo cual solamente debe ser solicitado en esta circunstancia. La identificación del genotipo del HCV es muy útil en el manejo clínico de los pacientes infectados ya que define la dosis y duración de la terapia antiviral, así como la probabilidad de respuesta al tratamiento.

La técnica de referencia para la determinación del genotipo del HCV es la secuenciación nucleotídica directa de las regiones NS5B y/o E1 del genoma del HCV amplificadas por RT-PCR, seguida del alineamiento con secuencias de referencia y posterior análisis filogenético. Esta técnica es utilizada en estudios epidemiológicos donde es necesaria la exacta subtipificación.

Para facilitar la genotipificación rutinaria del HCV en la práctica clínica, están disponibles dos equipos comerciales basados en la amplificación mediante RT-PCR de la **región 5' UTR**. Uno está basado en la **secuenciación directa de los amplicones** (*TrueGene HCV 5'NC genotyping kit, Visible Genetics*), mientras que el segundo se sustenta en la **hibridación inversa** de los amplicones obtenidos a sondas de oligonucleótidos genotipo-específicas inmovilizadas en una tira de nitrocelulosa (*INNO-LiPA HCV II, Innogenetics*). Ambos ensayos pueden identificar los 6 genotipos del HCV y varios subtipos, aunque pueden ocurrir errores en la determinación de estos últimos en el 10-25% de los casos, debido al alto grado de conservación de la región estudiada (5' UTR) que no permite una discriminación adecuada. Este potencial defecto de las técnicas basadas en el análisis de la región 5' UTR no tiene consecuencias clínicas, ya que la decisión terapéutica vinculada al tiempo de administración solamente está basada en el genotipo y no en el subtipo (los genotipos 1 y 4 requieren un año de tratamiento con Interferón

pegilado (PEG-IFN) y ribavirina, comparado con los seis meses indicados para los restantes genotipos).

Una estrategia no comercial para la genotipificación es la técnica de **RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*; polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción), en la cual los **amplicones de la región 5' UTR**, obtenidos por RT-PCR, son posteriormente tratados con endonucleasas seleccionadas, originándose fragmentos de DNA de diferente tamaño, que –en conjunto– generan patrones de restricción característicos de cada genotipo.

En las infecciones mixtas, la RFLP es capaz de detectar el genotipo del HCV minoritario aun cuando está presente hasta en (apenas) un 5-30% de la población viral; mientras que el ensayo de hibridación inversa comercial INNO-LiPA, que es más sensible, permite detectar el genotipo minoritario aun estando presente en un 1-2% de la población viral.

Todas las técnicas de tipificación basados en el análisis de una región parcial del genoma –a partir del cual se infiere la secuencia de todo el RNA– son aplicables mientras que no se demuestren recombinaciones intergenotípicas como evento habitual. Si esto ocurriera –hasta el presente son aún escasos los estudios que demostraron su ocurrencia en el mundo– esas metodologías carecerían de validez.

Como se indicó en un ítem anterior, la determinación del genotipo del HCV también puede realizarse detectando anticuerpos específicos para cada uno (tipificación serológica de genotipos) mediante un ELISA competitivo comercial (*Murex HCV Serotyping 1-6 Assay, Murex Diagnostics*). Este ensayo puede identificar los 6 genotipos del HCV en el 90% de los pacientes inmunocompetentes, pero no puede discriminar los subtipos, siendo esto último clínicamente irrelevante para el médico clínico como se mencionó anteriormente. El grado de concordancia con los ensayos de biología molecular es de aproximadamente 90-95% pero la sensibilidad es menor, especialmente en pacientes inmunocomprometidos o hemodializados. Este ensayo no puede diferenciar una verdadera infección mixta de una reactividad cruzada. Finalmente, la tipificación serológica de genotipos tiene la ventaja de que no depende de la presencia actual del genoma viral para la identificación. Sin embargo, existe la posibilidad de que la respuesta inmune hubiera sido montada contra una infección pretérita y que actualmente sea otra la población genotípica predominante en el paciente.

Dado que se ha observado compartimentación de variantes del HCV en el hígado (por ejemplo, tejido tumoral *versus* no tumoral),

Situación clínica	Procedimiento a utilizar	Interpretación y comentarios
Sospecha de infección aguda	RT-PCR cualitativa o RT-PCR en tiempo real	Determinar el RNA HCV a las 4-6 semanas post-exposición. Determinar el RNA HCV a las 6-12 semanas; si es positivo, considerar tratamiento. Determinar RNA HCV y anticuerpos anti-HCV 4-6 meses post-exposición
Sospecha de infección crónica Con anticuerpos anti-HCV	RT-PCR cualitativa, RT-PCR en tiempo real, o TMA	RNA HCV positivo: paciente con infección crónica RNA HCV negativo: paciente muy probablemente no infectado, aunque una muy baja carga viral o viremia intermitente son posibles; repetir en 6 -12 meses
Sin anticuerpos anti-HCV, pero paciente con hepatopatía de causa desconocida o inmuno-comprometido	RT-PCR cualitativa, RT-PCR en tiempo real, o TMA	RNA HCV positivo: paciente con infección crónica RNA HCV negativo: paciente muy probablemente no infectado, aunque una muy baja carga viral o viremia intermitente son posibles; repetir en 6 -12 meses
HCV RNA y anticuerpos anti-HCV positivos, paciente elegible para tratamiento	Pruebas cuantitativas: RT-PCR cuantitativa, RT-PCR en tiempo real, o bDNA,	> 800 000 UI / ml es alta carga viral (más difícil de tratar); utilizar la misma prueba cuantitativa antes del tratamiento y evaluar la respuesta a los 4 y 12 semanas
Bebé nacido de madre infectada con HCV y con serología positiva a los 18 meses	RT-PCR cualitativa o RT-PCR en tiempo real	HCV RNA positivo: paciente con infección crónica HCV RNA negativo: paciente muy probablemente no infectado, aunque una muy baja carga viral o viremia intermitente son posibles; repetir en 6 -12 meses

Tabla 24.5.9. Guía para la detección de RNA del virus hepatitis C (RNA HCV). bDNA: *branched DNA* (DNA ramificado). TMA: *transcription mediated amplification* (amplificación mediada por transcripción). RT-PCR: transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa.

así como también respecto a las células mononucleares, es posible en algunos casos detectar genotipos diferentes del HCV al analizar la población plasmática de RNA viral, al compararse con la hepática y/o de los linfocitos / monocitos de sangre periférica. Estos eventos de compartimentación genotípica se observan con mayor frecuencia en pacientes trasplantados, y en expuestos a múltiples eventos de transmisión del HCV (usuarios de drogas, transfusiones múltiples, etc.). Un reporte reciente documentó una discordancia del 9% en la asignación genotípica del HCV plasmático *versus* la correspondiente a linfo-mononucleares de sangre periférica. Este dato tiene obvias implicancias en la conducta terapéutica, habitualmente sustentada en la genotipificación del RNA viral plasmático.

Detección del antígeno del core del HCV. En los últimos años se han desarrollado diferentes ensayos que complementan a las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Éstos están basados en la detección de antígenos virales, principalmente, en la detección de la proteína estructural *core* del HCV, cuya secuencia aminoacídica es la más conservada entre todas las proteínas virales de los diferentes genotipos. Existe un equipo de ELISA comercial para la detección y cuantificación del antígeno *core* del HCV en sangre periférica de

pacientes infectados (*Total HCV core Ag assay, Ortho Clinical Diagnostics*), el cual además de poseer una buena sensibilidad, permite la cuantificación de la antigenemia. La determinación del antígeno *core* ha sido propuesta como un marcador indirecto de la replicación viral activa y de la carga viral. Existe una correlación entre el título de antígeno *core* (en pg / ml) y los niveles de RNA viral (1 pg / ml de antígeno *core* es equivalente a aproximadamente 8 000 UI / ml de RNA del HCV). Por esta razón la cuantificación de este antígeno puede ser usada para el monitoreo de la eficacia de la terapia antiviral. Sin embargo, este ensayo no detecta al antígeno *core* cuando los niveles de RNA viral están por debajo de 20 000 UI / ml, restringiendo su uso clínico.

8. EPIDEMIOLOGÍA

8.1. RESERVORIO

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor del 3% de la población mundial ha sido infectada con dicho virus y que más de 170 millones de personas son portadores crónicos con riesgo

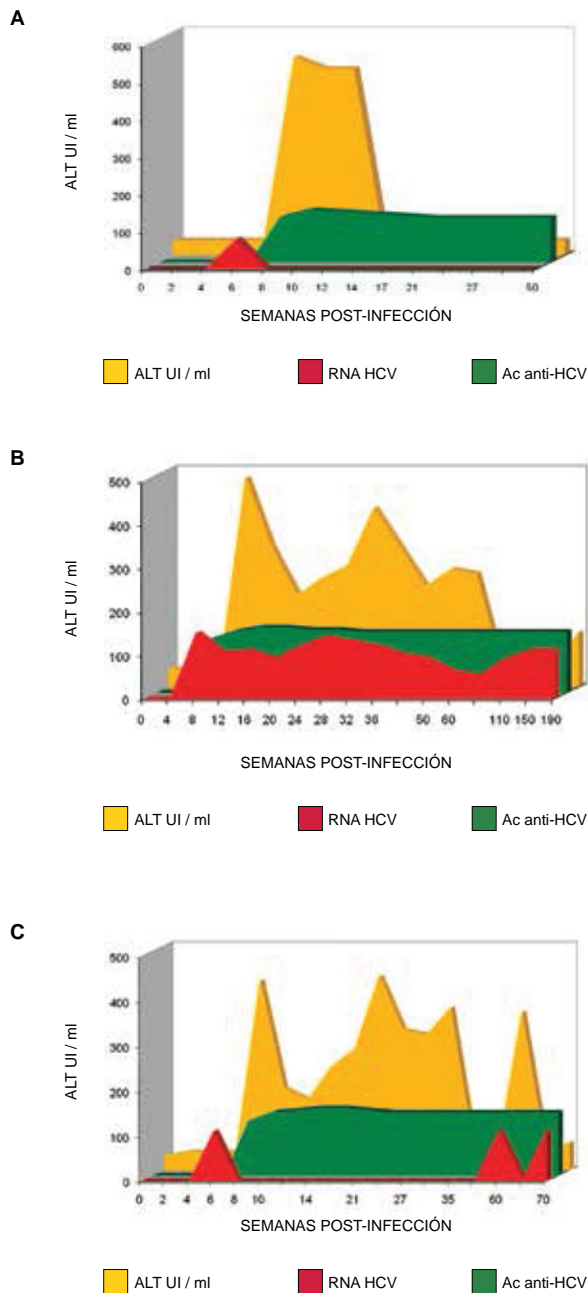


Figura 24.5.15. Perfiles de viremia asociados a la infección por virus hepatitis C. A. Viremia fugaz. B. Viremia persistente. C. Viremia recurrente.

de desarrollar cirrosis y HCC. Estos **individuos crónicamente infectados** representan un reservorio suficientemente grande para asegurar la persistencia del virus.

8.2. FUENTE DE INFECCIÓN

El HCV habitualmente se propaga por **vía parenteral** a partir de sangre infectada, siendo la drogadicción intravenosa y la transfusión de sangre las principales fuentes de contaminación, aunque la última ha disminuido muy significativamente desde la implementación de las pruebas de tamizaje en bancos de sangre.

La transmisión por vías no parenterales es menos eficiente que la mencionada anteriormente (ocurre aproximadamente en el 5% de los casos). En contraste con la eficiente tasa de transmisión vertical

/ perinatal del HBV, la del HCV es rara y ocurre sólo en mujeres con elevada viremia (más de 10^6 copias genómicas / ml), riesgo que se incrementa de manera significativa (cuatro a cinco veces más) cuando la madre está coinfectada con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) debido a un incremento en la carga viral del HCV, frecuentemente como consecuencia de la inmunosupresión. La transmisión sexual es también de baja eficiencia, aunque podría variar la misma en portadores coinfectados con HIV, teniendo en cuenta la amplia difusión de la actividad sexual y la frecuente asociación del HCV a infecciones crónicas.

Aunque existe un porcentaje sustancial de casos (30-40%) en el que la vía de la infección no puede ser confirmada, se han determinado los siguientes grupos de riesgo: a) los receptores de sangre, productos sanguíneos y órganos con anterioridad a 1992; b) los pacientes de centros de hemodiálisis donde el HCV se considera una infección nosocomial; c) los pacientes hemofílicos; d) los drogadictos que utilizan y comparten material contaminado; e) las personas expuestas a material médico o dental contaminado y sin esterilizar; f) las personas que por su ocupación están expuestas a sangre; g) los trabajadores sanitarios y h) los recién nacidos de madres infectadas.

8.3. PREVALENCIA E INCIDENCIA

La seroprevalencia en hemodonantes es del 6% en África y del 5% en ciertos países asiáticos como Filipinas, mientras que en EE UU, Japón y Europa occidental es igual o menor al 1%, lo mismo que en la Argentina.

Aunque los genotipos 1, 2 y 3 tienen una elevada distribución mundial (75%, 6% y 10%, respectivamente; Figura 24.5.17), su prevalencia relativa varía según el área geográfica. Los subtipos 1a y 1b son los más comunes en América y Europa, mientras que en Japón el genotipo 1b es el responsable de hasta el 80% de los casos de infección por HCV. Aunque los subtipos 2a y 2b son relativamente comunes en América, Europa y Japón; el 2c es encontrado comúnmente en Italia y en menor proporción en Francia, Túnez, Vietnam y Argentina. El genotipo 3a es particularmente frecuente en usuarios de drogas intravenosas ilícitas de Europa, EE.UU. y Argentina. La mayor prevalencia del genotipo 4 ocurre en África, principalmente en Egipto, aunque también se lo detecta en el sur de España. El genotipo 5 es predominante en Sudáfrica y recientemente fue reportado en Europa, mayoritariamente en Francia. Por último, el genotipo 6 ha sido encontrado principalmente en el sur de China, Hong Kong, Taiwan y el sudeste asiático, incluyendo Singapur, Malasia, Vietnam y Tailandia.

En Argentina los datos iniciales de distribución genotípica del HCV fueron obtenidos en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Una investigación colaborativa posterior entre el citado Departamento y el Centro para el control de las enfermedades (*Centers for Disease Control*, EE.UU.) demostró que los genotipos más frecuentes en la ciudad de Buenos Aires y alrededores ($n=243$) corresponden a los siguientes: el 1 (53.5%), el 2 (23%) y el 3 (8,6%), habiéndose registrado una inesperada elevada presencia de infecciones mixtas (14%; Figura 24.5.18). Interesantemente, dentro del genotipo 2, se observó mediante secuenciamiento nucleotídico de la región NS5B una significativa contribución del subgenotipo 2c. La circulación del genotipo 4 es excepcional en Buenos Aires. En contraposición, en la ciudad de Córdoba se ha documentado que el 50% de las cepas inicialmente estudiadas en la región genómica del *core* ($n=36$) corresponden al subtipo 2c, al que siguen los subtipos 1b (33%), 1a (11%), 3a (3%) y 4a (3%; Figura 24.5.18). Los valores porcentuales de los genotipos / subtipos correspondientes al total del país se exhiben en la figura 24.5.19. A medida que se realicen más estudios de epidemiología molecular en el resto del país, es posible que dichos valores de prevalencia genotípica sean modificados.

La incidencia del HCV ha disminuido desde que se redujo la transmisión de la infección a partir de sangre y hemoderivados y se intensificaron las precauciones en la práctica médica. Sin embargo, es-



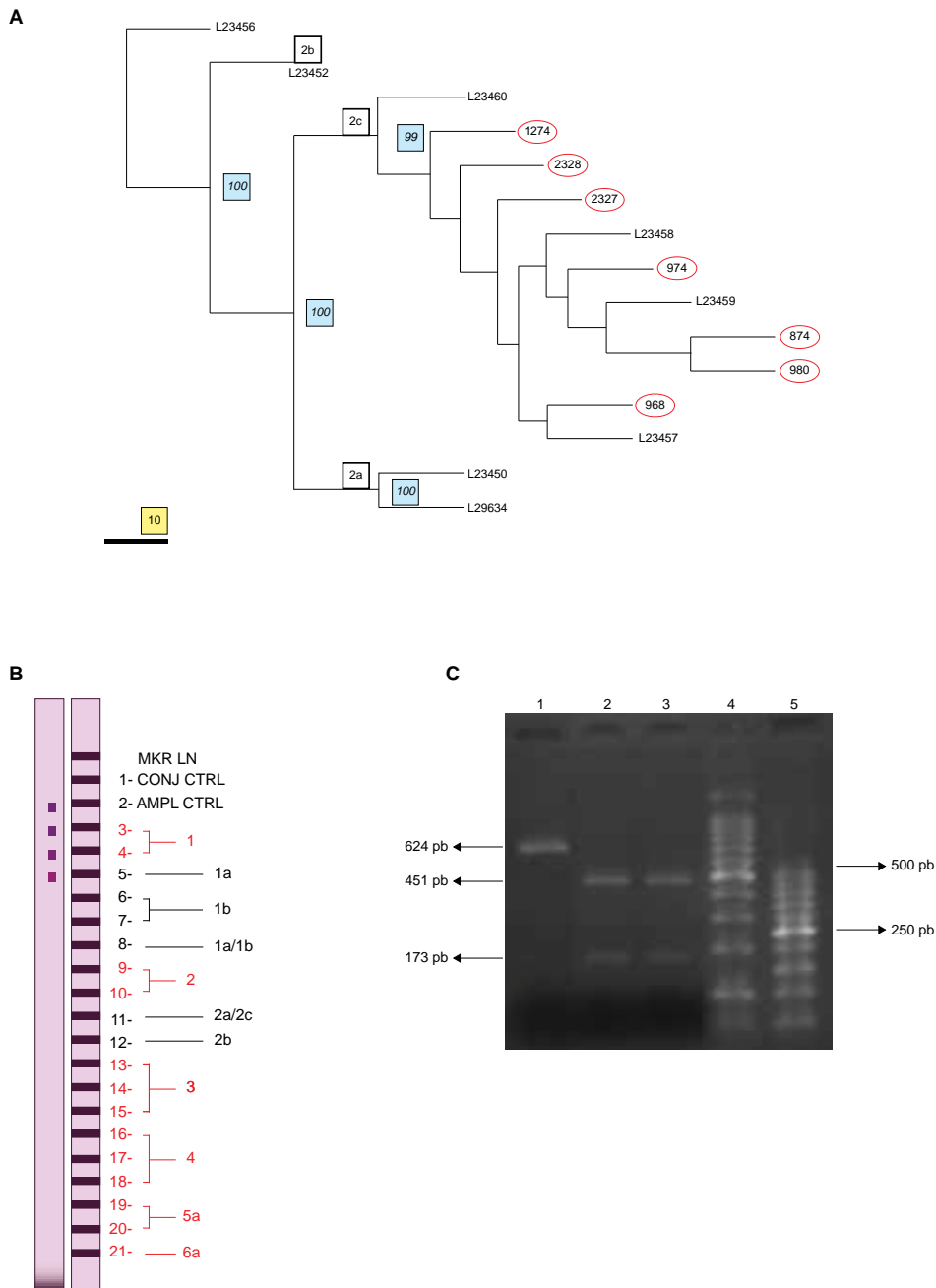


Figura 24.5.16. Determinación de genotipos del virus hepatitis C (HCV) mediante diferentes técnicas. **A.** Análisis de la región NS5B mostrando un árbol filogenético (construido mediante un procedimiento denominado *Neighbor Joining*) que exhibe la relación de la secuencia nucleotídica de productos de amplificación por RT-PCR del RNA del HCV correspondiente a pacientes de Argentina (incógnitas indicadas con un oval), respecto a la de cepas de referencia de los subtipos 2a, 2b y 2c. Los valores indicados con cursiva en recuadros sombreados indican los valores de remuestreo (*bootstrap*) para 100 réplicas; valores mayores a 70 (para un máximo de 100) revelan una mayor robustez del análisis. La pequeña barra horizontal inferior (a la izquierda) indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. **B.** INNO-LiPA II. El perfil de bandas obtenido mediante hibridación inversa del cDNA de la región 5' UTR (amplificado por RT-PCR y marcado con biotina) frente a oligonucleótidos tipo- y subtipo- específicos indica que el paciente está infectado por una población viral correspondiente al genotipo 1, predominando la subpoblación del subtipo 1a sobre la del 1b. (*Cortesía del Dr. Jorge Rey, Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Transfusional, Htal. de Clínicas "José de San Martín", UBA*). **C.** RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*): los amplicones de 624 pb obtenidos por RT-PCR anidada de la región 5' UTR-*core* fueron sometidos al clivaje con la endonucleasa *Bst*NI, para discriminar entre los subtipos 2a y 2c. La presencia de fragmentos de 451 y 173 pb indica la detección del subtpo 2c. Calle1: amplicón control 2c sin digestión. Calle 2: clivaje del amplicón control 2c con *Bst*NI. Calle 3: muestra de un paciente infectado con subtipo 2c. Calles 4 y 5: marcadores de tamaño molecular "en escalera" de 100 pb y 50 pb, respectivamente.

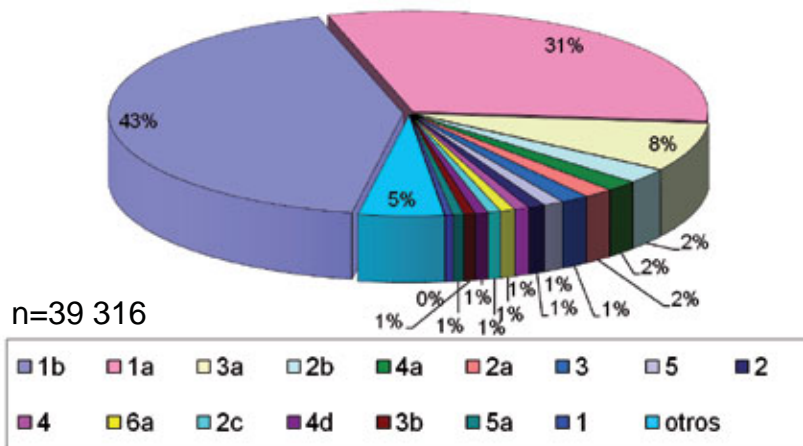


Figura 24.5.17. Prevalencia de genotipos del virus hepatitis C en el mundo. Datos obtenidos del sitio de Internet: http://hcv.lanl.gov/components/sequence/HCV/new_geography/geography.comp?region=world&form=all&organism=HCV.

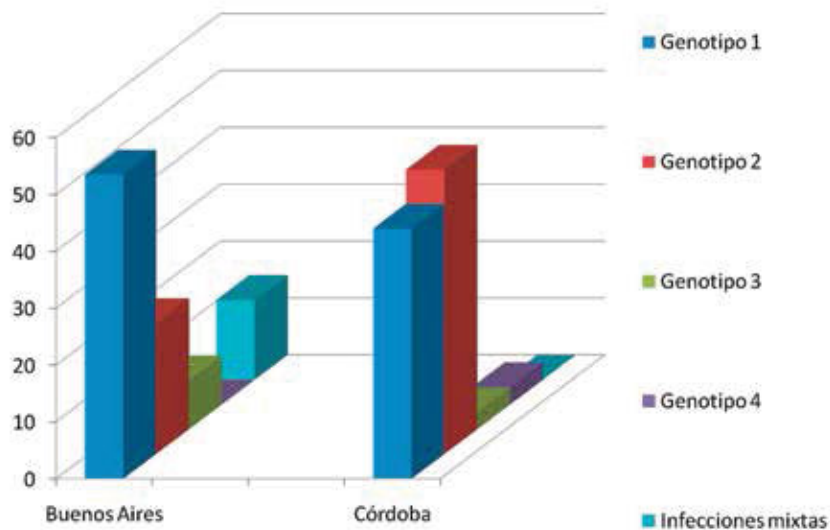


Figura 24.5.18. Prevalencia de genotipos del virus hepatitis C en la ciudad de Buenos Aires y en la ciudad de Córdoba, Argentina. Gráfico basado en las publicaciones de Quarleri *et al* (J Clin Microbiol 38:4560-8, 2000) y de Re *et al* (Mem Inst Oswaldo Cruz 102:995-8, 2007).

tudios recientes han documentado –aunque no en forma unánime– un incremento de la incidencia de la infección por HCV en hombres con serología positiva para HIV que tienen relaciones sexuales anales sin protección con otros hombres. Esta vía de transmisión estaría asociada a la presencia de pequeñas hemorragias que ocurren en relaciones sexuales traumáticas por vía anal y a la influencia de lesiones de la mucosa local causadas por otras infecciones de transmisión sexual.

9. PREVENCIÓN

Dado que no existe aún una vacuna eficaz y segura, la prevención consiste en evitar la exposición al virus.

Entre las medidas más eficaces se cuentan: 1) autoexclusión de hemodonantes con riesgo; 2) tamizaje serológico para HCV y determinación de los niveles de ALT en los bancos de sangre; 3) tratamiento virucida de hemoderivados; 4) campañas de educación que

limiten el inicio a la droga-dependencia; 5) evitar compartir agujas y jeringas entre usuarios de drogas por vía endovenosa; 6) evitar compartir artículos de cuidado personal que puedan contener sangre (navajas, cepillos de dientes); 7) en el caso de los trabajadores de la salud o empleados de seguridad pública, adoptar los recaudos correspondientes a las precauciones habituales de barrera, como el manejo cuidadoso de las agujas y otros objetos punzo-cortantes.

Por tratarse de un virus envuelto, los detergentes y los solventes lipídicos (como –por ejemplo–, el cloroformo) así como la beta-propiolactona, el psoraleno y la radiación ultravioleta son útiles para lograr su inactivación e impedir su transmisión por sangre. Algunos de estos métodos se emplean también para la inactivación del HIV y del HBV. Dado que la respuesta inmune observada en quienes logran erradicar la infección durante la etapa aguda confiere protección cruzada frente a otras cepas del HCV, la perspectiva de una vacuna específica profiláctica es posible.

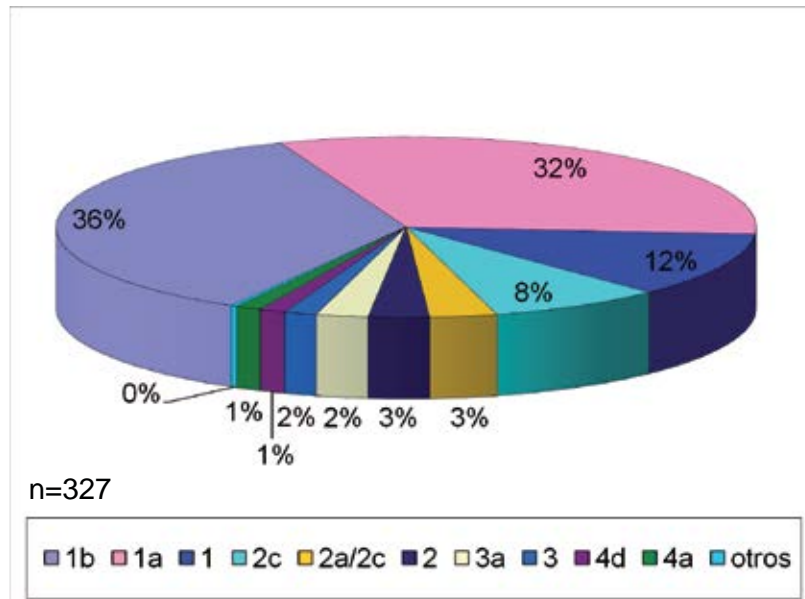


Figura 24.5.19. Prevalencia de genotipos y subtipos del virus hepatitis C en Argentina. Datos obtenidos del sitio de Internet: http://hcv.lanl.gov/components/sequence/HCV/new_geography/geography.comp?region=world&form=all&organism=HCV

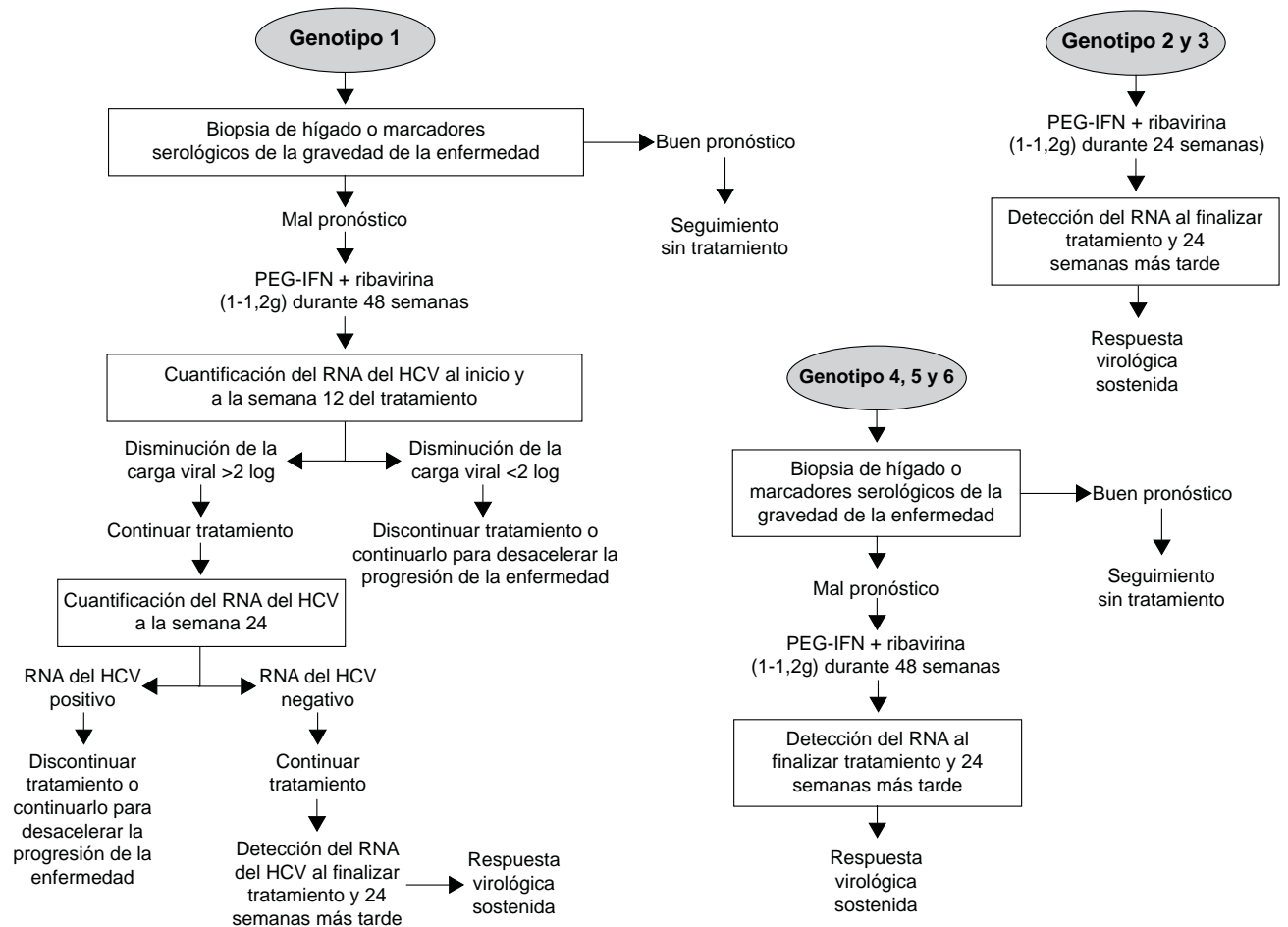


Figura 24.5.20. Guía para el monitoreo de pacientes infectados con diferentes genotipos del virus hepatitis C. (De Chevaliez S & Pawlotsky JM. *World J Gastroenterol* 13: 2461-6, 2007).

Se postula que dicha vacuna podría evitar las formas persistentes de infección, principal causa de la patogénesis. Se encuentran en diferentes fases de desarrollo inmunógenos vacunales obtenidos mediante 4 estrategias: a) vacunas a proteínas recombinantes; b) vacunas a péptidos sintéticos; c) vacunas a DNA; y d) vacunas basadas en vectores virales.

10. TRATAMIENTO

Entre los factores que influyen en la respuesta al tratamiento se cuentan: 1) genotipo implicado; 2) nivel de viremia y 3) diversidad de cuasiespecies. Como se indicó anteriormente, existen evidencias que asocian a los genotipos 1 y 4 con una peor respuesta al tratamiento, comparada con otros genotipos (por ejemplo, 2 y 3).

La terapéutica en **pacientes con hepatitis C aguda** infectados con el genotipo 1, es especialmente importante ya que ésta es de menor duración que la necesaria durante la fase crónica, siendo además más eficaz. En los últimos años, mediante ensayos moleculares se determinó que: el inicio del tratamiento con PEG-IFN- α debe realizarse entre la semana 8 y 12 luego de la infección, y administrarse durante 24 semanas. El IFN- α se encuentra unido a polietilenglicol (PEG) que permite una adsorción lenta y sostenida, una distribución tisular restringida y un tiempo de eliminación prolongado. Aparentemente, durante la infección aguda no sería necesaria la adición de ribavirina para lograr un tratamiento más eficaz, lo cual reduce los potenciales efectos adversos de dicha droga (anemia).

Para el tratamiento de los pacientes **con hepatitis crónica** es recomendable la terapia combinada de PEG-IFN- α con ribavirina. De tal manera, con una inyección semanal se puede alcanzar niveles terapéuticos constantes en sangre.

Un importante parámetro para el monitoreo durante el tratamiento, es el grado de respuesta virológica. Se define como **respuesta virológica sostenida** a la ausencia de RNA del HCV detectable después de 24 semanas de la finalización de la terapéutica, lo cual se correlaciona –en la mayoría de los casos– con la erradicación del virus. Una **rápida respuesta virológica** corresponde a los pacientes con RNA del HCV indetectable luego de 4 semanas de tratamiento, mientras que los pacientes cuyos *tests* para RNA del HCV son negativos luego de 12 semanas de instituido el tratamiento se considera que tienen una **respuesta virológica temprana**.

Como se mencionó anteriormente, los genotipos son importantes para determinar el tipo, dosis y lapso que deberá prolongarse la administración del tratamiento. Se recomiendan 48 semanas de tratamiento con PEG-IFN- α y 1000-1200 mg de ribavirina para pacientes infectados con los genotipos 1 ó 4, mientras que para pacientes infectados con los genotipos 2 ó 3 el tratamiento recomendado consiste en administrar durante 24 semanas PEG-IFN- α y 800 mg de ribavirina.

En pacientes infectados con los genotipos 5 y 6 (excepcionales en Argentina) se recomienda seguir el mismo procedimiento que para los infectados con el genotipo 1 y 4 aunque todavía es necesaria la realización de más estudios. Se recomienda suspender el tratamiento si la carga viral no decrece al menos $\geq 2 \log_{10}$ UI/ml al cabo de 12 semanas de iniciada su administración o si el RNA viral persiste detectable al cabo de 24 semanas (Figura 24.5.20).

Hasta la 1ra. década del siglo XXI, las chances de un éxito terapéutico frente a la infección por genotipo 1 eran del 50%, mientras que alcanzaban el 80% en pacientes infectados con los genotipos 2 ó 3.

Se ha observado una mejor respuesta al tratamiento con interferón en pacientes que presentaban escasa diversidad de cuasiespecies. Por el contrario, la coexistencia de múltiples cuasiespecies se asocia a la selección de aquellas que son resistentes a la terapéutica.

Todavía existen varios aspectos relacionados con la terapéutica anti-HCV que deberán establecerse en futuras reuniones de Consenso Internacional, tales como el tratamiento en pacientes con transaminasas normales, en mayores de 65 años, y en no respondedores a un tratamiento previo.

Se están realizando estudios con nuevas formulaciones de Interferón, como el Albinterferón α 2b, un compuesto molecular que une dicho Interferón a albúmina, lo que aumenta su vida media y permite su administración bisemanal. Los resultados iniciales del tratamiento con Albinterferón α -2b más ribavirina son análogos a los obtenidos con PEG-IFN- α , aunque se ha reportado una mejor calidad de vida.

También se han iniciado estudios con telaprevir (VX-950), un inhibidor de la serin-proteasa NS3 (y su cofactor 4A) que posee efecto sinérgico con el PEG-IFN. El triple tratamiento con PEG-IFN- α 2a asociado a ribavirina y telaprevir, durante 12-24 semanas logró una respuesta sostenida en 68% de los pacientes infectados con genotipo 1 *naïve* de tratamiento.

Diversas drogas que incluyen moduladores de la respuesta inmune, agonistas de receptores Toll similar (TLR), siRNAs (*Small Interfering RNAs*), otros inhibidores de la serin-proteasa NS3/4A (boceprevir [SCH 503034], ciluprevir [BILN-2061], ITMN-191), inhibidores de la helicasa NS3, o inhibidores de la polimerasa NSSB [HCV-796], anticuerpos monoclonales y policlonales se encuentran en fase I, II, III o IV de ensayos de investigación clínica. Se estima que algunos miembros de la nueva generación de drogas STAT-C (*Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV*) probablemente alcancen la correspondiente licencia de aprobación en un futuro inmediato. Entre 2009 y 2010, cuatro estudios independientes de asociación del genoma completo relacionaron sistemáticamente varios polimorfismos de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphism* o SNP) presentes en regiones regulatorias del gen *IL-28B* (codificante del IFN- λ 3) con la respuesta a la terapia frente a la hepatitis C crónica en pacientes infectados con los genotipos 1, 2, 3 ó 4 del HCV. En uno de dichos estudios, el SNP más correlacionado con la respuesta virológica sostenida fue el rs12979860; los individuos que presentaban el genotipo CC para este SNP mostraron un 80% de probabilidades de alcanzar dicha respuesta. Los otros tres estudios documentaron dicha asociación con el SNP rs8099917, también próximo a la región del gen *IL-28B*. Por lo expuesto, estos SNPs constituyen actualmente el factor basal más significativamente asociado a la respuesta virológica sostenida.

En cuanto a la posible evolución al HCC se debe tratar de hacer una detección precoz. Para ello se aconseja hacer una ecografía y una determinación de alfa fetoproteína cada seis meses. Una detección precoz permite instituir un tratamiento más eficaz, ya sea con resección del tumor, alcoholización o crioblación. En casos especiales, el trasplante hepático puede ser un excelente tratamiento.

Un capítulo aparte lo constituye la frecuente asociación entre el HCV y el HIV. Los pacientes inmunocomprometidos que adquieren la infección por HCV desarrollan una hepatitis grave que puede llevar al óbito al enfermo antes que la enfermedad original. Por ello es perentorio el tratamiento precoz con PEG-IFN- α / ribavirina, que inclusive puede superponerse a la terapia anti-retroviral de alta eficacia (HAART).

ADENDUM

Durante la etapa de Prueba de Galera de *Virología Médica* se publicaron importantes evidencias acerca del rol adicional del gen *IL-28B* en la erradicación de la infección viral durante la etapa aguda, la que acontece sólo en un 10-30% de los individuos.

Asimismo, se ha demostrado que en la infección crónica por HCV la producción de galectina 9 por las células de Küpffer se correlaciona con el aflujo hepático de linfocitos Treg (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) que promueven la apoptosis de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos.

También se ha documentado que el HCV utiliza la molécula CD5 para ingresar en los linfocitos T, y se ha reportado la existencia del genotipo 7 viral.

Agradecimientos: al Ing. Osvaldo Martínez y a la Diseñadora gráfica María Mercedes Martínez por la creación y producción fotográfica de la figura 24.5.6.

Bibliografía

- Alfonso V, Flichman DM, Sookoian S, Mbayed VA, Campos RH. "Evolutionary study of HVR1 of E2 in chronic hepatitis C virus infection". *J Gen Virol*. 2004; 85: 39-46.
- Appel N, Schaller T, Penin F, Bartenschlager R. "From structure to function: New insights into Hepatitis C virus RNA replication". *J Biol Chem*. 2006; 281:9833-36.
- "Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado". Consenso Argentino Hepatitis C 2004.
- "Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado". Consenso Argentino Hepatitis C 2007.
- Baré P, Massud I, Parodi C, *et al*. "Continuous release of hepatitis C virus (HCV) by peripheral blood mononuclear cells and B-lymphoblastoid cell-line cultures derived from HCV-infected patients". *J Gen Virol*. 2005; 86:1717-27.
- Binder M, Kochs G, Bartenschlager R, Lohmann V. "Hepatitis C virus escape from the interferon regulatory factor 3 pathway by a passive and active evasion strategy". *Hepatology*. 2007; 46:1365-74.
- Bowen DG, Walker CM. "Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection". *Nature*. 2005; 436: 946-52.
- Chevaliez S, Pawlitsky JM. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy". *World J Gastroenterol*. 2007; 13:2461-6.
- Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome". *Science*. 1989; 244:359-62.
- El-Zayadi AR. "Hepatic steatosis: a benign disease or a silent killer". *World J Gastroenterol*. 2008; 14:4120-6.
- Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, *et al*. "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry". *Nature*, 446: 801-5, 2007. Erratum en: *Nature*. 2007; 446:1 p following 805.
- Feinstone SM, Hu DJ, Major ME. "Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against hepatitis C virus". *Clin Infect Dis*. 2012; 55 Suppl 1:S25-32.
- Gale M Jr, Foy EM. "Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus". *Nature*. 2005; 436:939-45. Erratum en *Nature* 437:290.
- Halliday J, Klennerman P, Barnes E. "Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target". *Expert Rev Vaccines*. 2011; 10:659-72.
- Hofmann WP, Zeuzem S, Sarrazin C. "Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon β -based antiviral therapy". *J Clin Virol*. 2005; 32:86-91.
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, *et al*. "An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis". *Science*. 1989; 244:362-4.
- Levrero M. "Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C". *Oncogene*. 2006; 25:3834-47.
- Oubiña JR, Quarleri JF, Rudzinski M, Parks C, Badía I, González Cappa SM. "Genomic characterization of hepatitis C virus isolates from Argentina". *J Med Virol*. 1995; 47:97-104.
- Quarleri JF, Robertson BH, Mathet VL, *et al*. "Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from Argentine patients: a six-year retrospective study". *J Clin Microbiol*, 38:4560-8, 2000. Erratum en: *J Clin Microbiol*. 2001; 39:1208-10.
- Ré V, Contigiani M, Yoshida CF, Lampe E. "Identification of hepatitis C virus subtype 2c by sequencing analysis in patients from Córdoba, Argentina". *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102:995-8.
- Rehermann B, Nascimbeni M. "Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection". *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:215-29.
- Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M Jr. "Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA". *Nature*. 2008; 454: 523-7.
- Scott JD, Gretch DR. "Molecular Diagnostics of Hepatitis C Virus Infection". *JAMA*. 2007; 297:724-32.
- Simmonds P, Bukh, Combet C *et al*. "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes". *Hepatology*. 2005; 42: 962-73.
- Sugiyama M, Tanaka Y, Nakanishi M, Mizokami M. "Novel findings for the development of drug therapy for various liver diseases: genetic variation in *IL-28B* is associated with response to the therapy for chronic hepatitis C". *J Pharmacol Sci*. 2011; 115:263-9.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, *et al*. "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome". *Nat Med* 11:791-6, 2005. Erratum en: *Nat Med*. 2005; 11:905.
- Zein N. "Clinical significance of Hepatitis C Virus genotypes". *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13:223-35.

24.6

Hepatitis E

Julieta Trinks - José Raúl Oubiña

1. INTRODUCCIÓN

El virus hepatitis E (HEV), previamente conocido como agente causal de hepatitis no-A no-B de transmisión entérica, produce una enfermedad infecciosa con características clínicas compatibles con un cuadro de hepatitis aguda.

La enfermedad fue reconocida por primera vez como entidad clínica en la década de 1980, cuando muestras séricas obtenidas de individuos afectados durante una epidemia en 1955-56 en Nueva Delhi (India) y otra en Kashmir, carecían de marcadores serológicos que las vincularan a hepatitis agudas por HAV o HBV.

La primera evidencia de un nuevo agente viral transportado por el agua fue obtenida en 1983, cuando un voluntario inmune al HAV fue infectado con filtrados de materia fecal provenientes de pacientes que padecían la –hasta ese momento supuesta– hepatitis no-A no-B de transmisión entérica. Partículas con estructura símil-viral fueron detectadas mediante inmunoelectromicroscopía en la materia fecal de dicho voluntario. La enfermedad fue exitosamente transmitida a primates que también excretaron partículas con estructura símil-viral en su materia fecal.

Los casos de hepatitis aguda epidémica ocurridos en Nueva Delhi, en 1955-1956 habían sido inicialmente atribuidos al HAV. Sin embargo, el análisis retrospectivo de sueros mediante inmunoelectromicroscopía determinó que la verdadera etiología correspondía al HEV. Posteriormente, el estudio retrospectivo de otros brotes epidémicos ocurridos entre 1956 y los años ochenta en diferentes regiones geográficas (República de Kirguiz –perteneciente a la anteriormente denominada URSS–, República de Myanmar –anteriormente denominada Birmania–, Nepal, Argelia, Sudán, Somalia y México) confirmó que el HEV había sido el agente causal. En todos los casos la transmisión se asociaba a la contaminación fecal de las aguas.

El registro de la primera epidemia por HEV en 1955 y la baja prevalencia de la infección en países desarrollados sugiere que la hepatitis E es una enfermedad infecciosa nueva y emergente. Sin embargo, varias epidemias de hepatitis de transmisión entérica, con características epidemiológicas similares a aquellas producidas por HEV, ocurrieron en Europa y Estados Unidos en los siglos XVIII y XIX. Por lo tanto, puede postularse que la infección por HEV podría, en el pasado, haber sido prevalente en varias partes del mundo y que sólo recientemente se ha restringido a ciertas áreas geográficas, representadas principalmente por países subdesarrollados con condiciones sanitarias deficientes.

El genoma del HEV fue clonado en 1990 y secuenciado poco tiempo después.

2. MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS DEL HEV

El virus parecía estar vinculado al grupo de agentes relacionados con los calicivirus, pero actualmente es considerado el único miembro del género *Hepevirus* perteneciente a la familia *Hepeviridae*. Muchas de las partículas exhiben proyecciones e indentaciones, miden 27-34 nm de diámetro y consisten en una estructura esférica de simetría icosaédrica sin envoltura. (Figura 24.6.1)

Se trata de un virus lábil a la congelación/descongelación.

Genoma viral y proteínas. El genoma del HEV está constituido por una única cadena de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 7,3 kb.

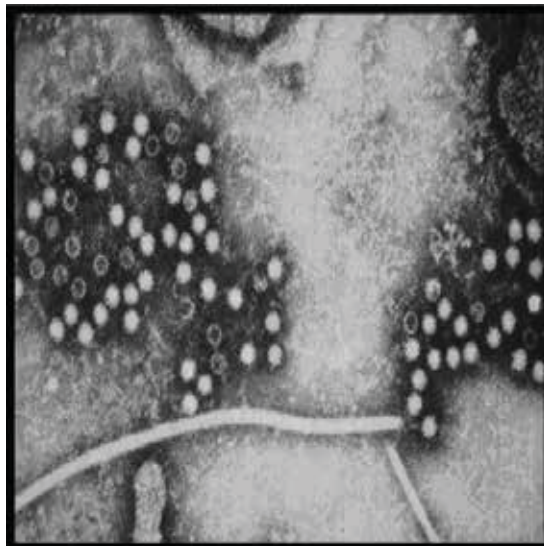


Figura 24.6.1. Microscopía electrónica del virus hepatitis E. Fuente: Sitio web del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, EE.UU.



La región codificante está flanqueada por un corto extremo 5' no codificante de 25 nucleótidos de longitud con una estructura de *cap* y un extremo 3' no codificante de 65 a 74 bases con una señal de poliadenilación (poli-A). Se observan tres marcos abiertos de lectura en la región codificante: ORF 1, ORF 2 y ORF 3. El ORF 1 –de aproximadamente 5 kb de longitud– está ubicado en el extremo 5' y codifica proteínas no estructurales involucradas en la síntesis del RNA, como la guanilil-transferasa, metil-transferasa, cisteín-proteasa símil-papaína, RNA helicasa y la RNA polimerasa-RNA dependiente. El ORF 2 (2 kb) ocupa el extremo 3' y da origen a la proteína de la cápside. Como gen solapado con estos dos, el ORF 3 (372 bases de longitud) está superpuesto un nucleótido con el ORF 1 y más de la mitad de la secuencia (331 nucleótidos) con el ORF 2. Sin embargo, la superposición nucleotídica entre ambos marcos de lectura no ocurre en fase, lo que hace que la secuencia aminoacídica traducida sea diferente. La fosfoproteína inmunogénica codificada por ORF 3 interactúa con la proteína de la cápside viral y proteínas celulares involucradas en la señalización celular. En el tejido hepático infectado pueden detectarse –mediante *Northern blot*– moléculas de RNA de distinta longitud: 7,3 y 2,2 kb. Se supone que el ORF 1 es traducido desde el RNA genómico (7,3 kb) inmediatamente después de la entrada del HEV a la célula para producir las enzimas responsables de la síntesis del RNA viral. En cambio, se requiere de la RNA polimerasa viral funcional para la síntesis de la molécula de RNA subgenómico (2,2 kb) que codifica a las proteínas de los ORF 2 y ORF 3.

Un estudio reciente concluyó que la molécula de RNA subgenómico se extiende desde la posición 5122 del RNA genómico y está flanqueada por la estructura de *cap* (extremo 5') y por una señal de poliadenilación (extremo 3'). Más aún, demostró que dicha molécula es bicistrónica y utiliza, en distintos marcos de lectura,

los codones AUG en las posiciones 5131 y 5145 para dar inicio a la traducción de los ORF 3 y ORF 2, respectivamente. (Figura 24.6.2)

3. PATOGENIA

El período de incubación se extiende durante 4 a 5 semanas, pero la ruta y el mecanismo por los que el virus alcanza el hígado desde el tracto intestinal son aún desconocidos.

La virucopria se presenta desde una semana previa al inicio de los síntomas hasta dos semanas después. En algunos casos, se ha reportado que se ha extendido hasta 52 días.

El RNA viral ha sido detectado en suero, mediante RT-PCR, desde dos semanas antes del inicio de los síntomas, persistiendo por 4 a 16 semanas.

Los estudios experimentales han logrado transmitir la enfermedad a primates no humanos mediante administración intravenosa u oral de filtrados de materia fecal de pacientes que cursan la enfermedad aguda. Los animales desarrollaron daño bioquímico e histológico, luego de un período de 4 a 6 semanas de incubación. Se observó la presencia del RNA viral en suero, bilis y heces unos pocos días antes del aumento de las transaminasas, así como la excreción de partículas de 27-34 nm durante la fase aguda de la enfermedad.

La expresión del antígeno del HEV, indicativo de replicación viral, ha sido detectada simultáneamente en hepatocitos, bilis y heces a partir de los 7 días post-infección. La misma alcanza un pico y comienza a declinar después del aumento de las aminotransferasas. Esto sugiere que el HEV es secretado desde el hepatocito hacia los canalículos biliares durante la fase inicial altamente replicativa de la infección y antes de la aparición de cambios histopatológicos en el hígado. Por lo tanto, la presencia de estos cambios y el incremento de las transaminasas se corresponden con la aparición de anticuerpos anti-HEV en suero y con niveles decrecientes del antígeno viral en hígado. De esta manera, la injuria hepática respondería a un mecanismo mediado por la respuesta inmune.

Un hallazgo similar fue descrito en 1993, cuando A. Chauhan ingirió voluntariamente una suspensión de HEV. Luego de un período de incubación de un mes, padeció una hepatitis icterica que se prolongó por 90 días. Este cuadro clínico se asoció a virucopria, viremia, elevación de transaminasas y conversión serológica para HEV (Figura 24.6.3). La detección de viremia aun previamente a la fase clínica sugiere también la posibilidad de transmisión parenteral.

La fosfoproteína codificada por ORF 3 promueve la sobrevivencia celular mediante al menos 3 mecanismos: a) la activación de la cas-

cada de las MAP quinasas; b) el retraso en la progresión de la vía de señalización de endomembranas (al inhibir el movimiento del receptor del factor de crecimiento epidérmico activado hacia los endosomas tardíos, prolongando así la señalización mediada por dicho factor); y c) la atenuación de la vía intrínseca de la apoptosis. Más aún, reduciría la expresión de las proteínas inflamatorias de fase aguda (reduciendo la traslocación nuclear del factor de transcripción STAT-3) y aumentaría la secreción de la proteína inmunosupresora α 1-microglobulina, generando un ambiente favorable para la replicación viral.

Los mecanismos patogénicos responsables del daño hepático grave (hepatitis fulminante) que afecta con mayor frecuencia a las mujeres embarazadas infectadas con HEV durante el tercero o –en ciertos casos– el segundo trimestre de la gestación no han sido totalmente establecidos. Sin embargo, se cree que la disminución de la respuesta inmune celular propia de la gestación para evitar el rechazo del producto de la concepción podría influir posiblemente favoreciendo la replicación y la expresión del genoma viral. Durante las primeras 20 semanas del embarazo se produce un desvío de la respuesta inmune celular desde un perfil Th1 hacia uno Th2, con disminución de la mayoría de las citoquinas y presencia de linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ (linfocitos T regulatorios) y células NK regulatorias. Asimismo, tanto las citoquinas TGF- β , IL-4 e IL-10 secretadas por la placenta y el trofoblasto, como los niveles elevados de progesterona, estrógenos y gonadotropina coriónica humana contribuyen a un efecto supresor de la inmunidad celular. Más aún, dichas hormonas pueden inhibir la regeneración hepática y promover la replicación viral.

En embarazadas con hepatitis E fulminante se han observado niveles disminuidos de LT CD4⁺ y elevados de LT CD8⁺, así como niveles de estrógenos, progesterona y gonadotropina coriónica humana aún mayores a los detectados en embarazadas no infectadas. También se ha documentado en dichas hepatitis E fulminantes la disminución del componente p65 del factor de transcripción NFkB, lo cual impide la correcta regeneración de los hepatocitos.

4. EPIDEMIOLOGÍA

4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

La infección por HEV es endémica en India, sudeste y centro de Asia, donde son comunes los casos esporádicos de hepatitis por vi-

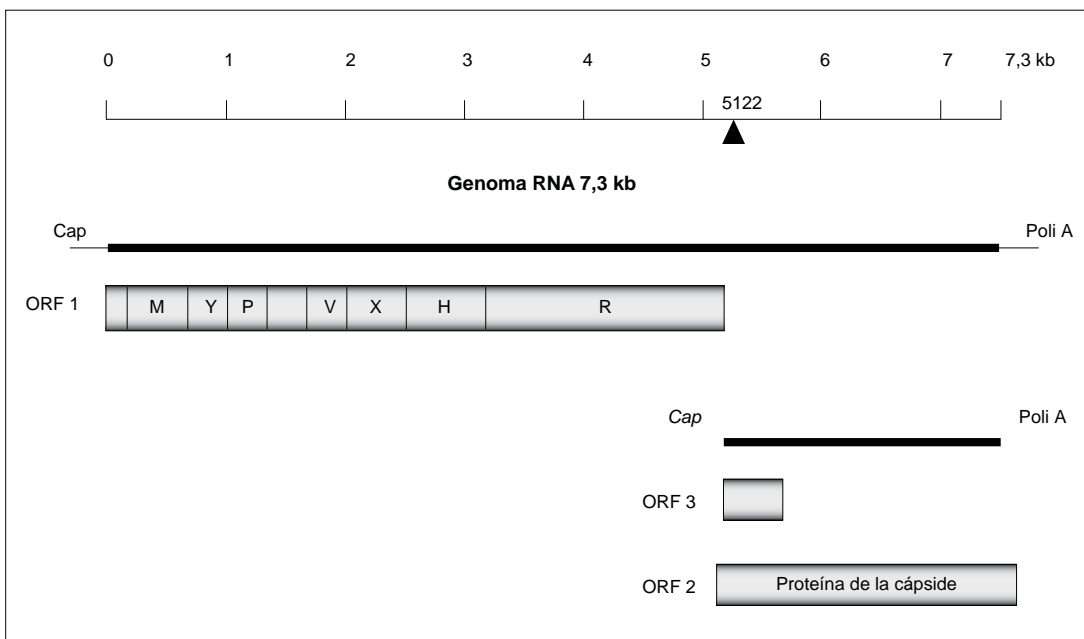


Figura 24.6.2. Organización del RNA genómico y subgenómico del HEV. Obsérvese la localización de la posición nucleotídica 5122, a partir de la que se inicia el RNA subgenómico.

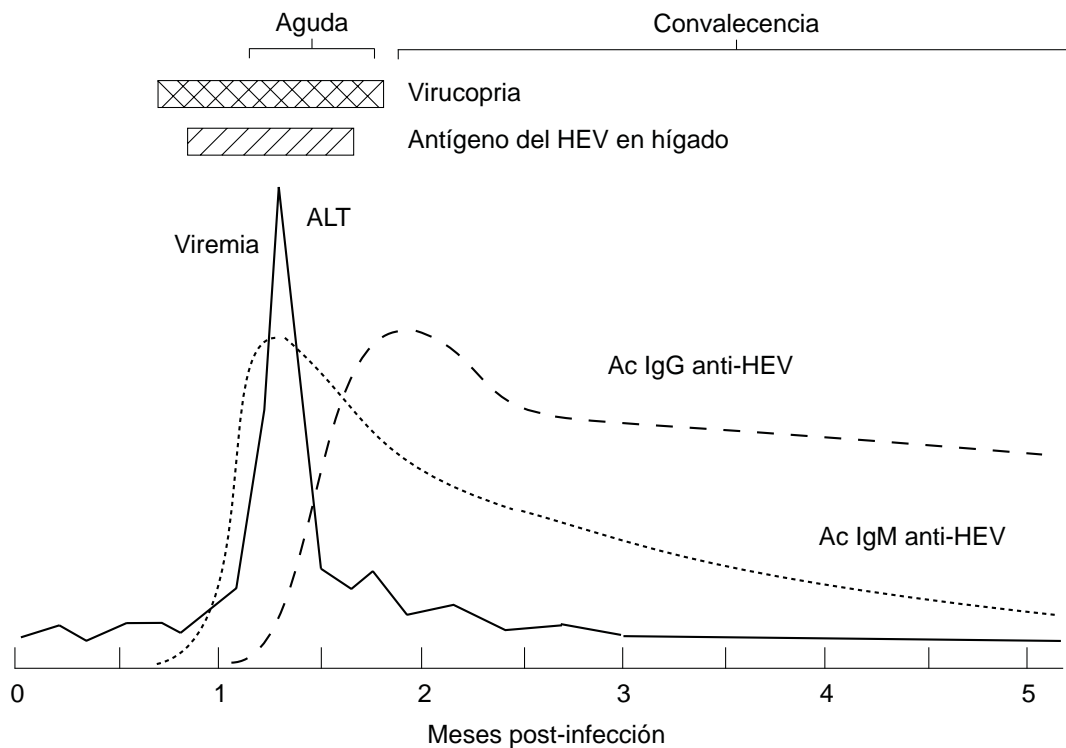


Figura 24.6.3. Curso de la infección por HEV. Modificado de Aggarwal *et al.*, *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:9-20.

rus E (50-70% de las hepatitis virales esporádicas documentadas en India). En esta región, las epidemias también son frecuentes y varían entre brotes de corta duración o epidemias prolongadas que pueden perdurar por más de un año.

Un gran número de epidemias ha sido reportado en el Medio Oriente, región noroccidental de África y México. Se caracterizaron por presentar una tasa de ataque global entre el 1 y el 15%, siendo más alta en adultos del sexo masculino (3-30%) que en niños (0,2-10%). Esto sugiere una mayor frecuencia de formas clínicas anictéricas o subclínicas en este grupo etario.

Un denominador común a las epidemias por HEV es la elevada mortalidad (10-25%) de las mujeres que se infectan durante el tercer trimestre del embarazo, que contrasta con la observada en la población general infectada por HEV, donde alcanza el 0,5-3%. Esta mortalidad no puede ser atribuida a los efectos ocasionados por el HEV, ya que otros virus hepatotropos sólo inducen una mortalidad mínima cuando afectan embarazadas.

En áreas no endémicas, los casos reportados de hepatitis esporádica por HEV son infrecuentes y corresponden, por lo general, a individuos de países desarrollados que viajan a zonas endémicas. Sin embargo, recientemente se han registrado casos en dichos países, sin que mediara el antecedente de viaje a dichas zonas. A esta forma de presentación se la conoce como hepatitis E autóctona de los países desarrollados, habiéndose registrado un aumento de su incidencia, siendo reconocida actualmente como una enfermedad emergente.

4.2 RESERVORIOS DEL VIRUS

A partir de muestras obtenidas de aguas cloacales, se ha detectado la presencia de partículas del HEV capaces de producir la infección experimental en primates. En el sudeste asiático, la eliminación de excretas humanas a los ríos y la utilización de dichas aguas para uso doméstico ha sido significativamente asociada a la alta prevalencia de la infección por HEV. El empleo continuo del agua de río a lo largo de los años puede desencadenar epidemias recurrentes.

Diversas líneas de investigación indican que en la naturaleza, ciertos animales –que presentan elevadas tasas de seroprevalencia–

actúan como reservorios del HEV y que la infección por los genotipos 3 y 4 correspondería en esos casos a una verdadera **antropozoonosis**. Entre estos animales se incluyen principalmente los porcinos, pero también gatos, perros, roedores, cabras, ciervos, y primates. La positividad de la serología para anticuerpos anti-HEV también observada en ensayos de ELISA analizando el suero de búfalos, ovejas y pollos, requiere aún la confirmación de ensayos de inhibición.

Un reservorio potencial del HEV durante los períodos interepidémicos en áreas endémicas estaría constituido por la transmisión viral entre individuos susceptibles, que pudiera generar infecciones esporádicas o subclínicas.

4.3 VÍAS DE TRANSMISIÓN

La principal, en las áreas endémicas, es la fecal-oral. La mayoría de las epidemias reportadas han sido relacionadas al **consumo de aguas contaminadas** con materia fecal.

La transmisión de persona a persona es infrecuente aún durante brotes epidémicos. Un aspecto llamativo de la epidemiología de la infección por este virus lo constituye la baja tasa de ataque secundario en convivientes. Sólo el 2,4% de los contactos hogareños del brote de 1981-1982 ocurrido en Nepal padeció enfermedad clínica. Ello contrasta abiertamente con lo que se observa con HAV, donde esa tasa en la misma región alcanza al 10-20%. Más aún, la ocurrencia de múltiples casos en el seno de una misma familia se asocia a la exposición a una fuente común de agua contaminada y no al contacto interpersonal.

Hasta el momento se desconocen las razones que logren explicar las diferentes vías de transmisión de HAV y HEV. Entre las hipótesis se encuentran: diferencias en el título viral presente en la materia fecal del individuo infectado, inóculo necesario para producir infección y/o la viabilidad de ambos virus en el medio ambiente.

Numerosos **casos esporádicos** de hepatitis aguda por HEV han sido atribuidos a la **ingesta de carne cruda o mal cocida de animales** –tanto salvajes o domésticos– que actúan como **reservorios** del virus.

Otras rutas de transmisión descritas son la vía vertical y la nosocomial (mediante transfusión de sangre o productos sanguíneos). No existe evidencia que asocie al HEV con la transmisión sexual.

4.4 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

A pesar de que se reconoció un único serotipo antigénico, ha sido observada una amplia diversidad genética entre los aislamientos de HEV analizados hasta el momento. El HEV ha sido clasificado en 4 genotipos. El genotipo 1, aislado de epidemias en países tropicales y subtropicales de Asia y África, es el más conservado y se divide en 5 subtipos (1a - 1e). En cambio, aislamientos provenientes de brotes epidémicos en México, Chad, Nigeria y Namibia fueron adscritos al genotipo 2, que incluye 2 subtipos (2a y 2b). Finalmente, los genotipos 3 y 4 son extremadamente diversos y pueden subdividirse en 10 y 7 subgenotipos, respectivamente. Mientras que el genotipo 3 está distribuido en casi en todo el mundo, con excepción de África, el 4 se circunscribe al continente asiático.

Una característica particular de la epidemiología molecular del HEV la constituye el hecho de que los aislamientos obtenidos de **brotes epidémicos** producto del **consumo de aguas contaminadas**, se adscriben a los **genotipos 1 y 2**, mientras que los casos esporádicos vinculados a la ingesta de carne de animales infectados se asocian a los genotipos 3 y 4 (origen zoonótico). Más aún, el análisis filogenético de secuencias genómicas del HEV, adscriptas a los genotipos 3 y 4 y provenientes de seres humanos como de animales infectados, demostró que éstas presentaban elevada identidad entre sí, sugiriendo un origen común o la posibilidad de infecciones entre especies.

Los datos concernientes a la epidemiología molecular de este agente viral en **Argentina** son escasos. Todas las secuencias analizadas (n=10), provenientes de pacientes y cerdos infectados, se adscribieron al **genotipo 3**.

5. CUADRO CLÍNICO

En base a los estudios experimentales mencionados, hoy se considera que el período de incubación de la enfermedad en el ser humano varía entre 2 a 10 semanas. Las manifestaciones clínicas de la infección por HEV son similares a aquellas producidas por otros virus de hepatitis. La hepatitis aguda ictericia posee un comienzo insidioso con una fase prodrómica de varios días de duración en la que el paciente puede presentar fiebre, escalofríos, dolor abdominal, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, artralgia, astenia y exantema macular transitorio. Estos signos y síntomas son seguidos por ictericia, ictericia y ictericia. La aparición de esta última coincide con la desaparición de los síntomas prodrómicos.

El examen físico revela una ligera hepatomegalia y, en algunos casos, esplenomegalia. Los análisis de laboratorio arrojan bilirrubinuria, grados variables de bilirrubinemia, aumento en suero de las transaminasas y la fosfatasa alcalina. La magnitud de la transaminemia no se correlaciona con la gravedad del daño hepático. La enfermedad es autolimitada y dura de 1 a 4 semanas, mientras que los valores de aminotransferasas y bilirrubina en suero retornan a la normalidad en 6 semanas.

La **mayoría de los individuos**, y sobre todo los niños, presentan **formas clínicas anictéricas o subclínicas**. La enfermedad se asocia, en pocos casos, a cuadros colestásicos, con buen pronóstico pero curso clínico prolongado e ictericia que se resuelve después de 2 a 6 meses. Pueden observarse casos de hepatitis crónica en inmunodeficientes.

Sin embargo, una **pequeña proporción** de los afectados desarrolla formas graves de **hepatitis fulminante**. La hepatitis clínica es 6 a 8 veces más probable en embarazadas en el segundo y tercer trimestre (19,4 y 18,6%, respectivamente), que en mujeres no embarazadas (2,1%) u hombres (2,8%). Más aún, la falla hepática fulminante es también **más frecuente durante el embarazo** (22,2%) con una **mortalidad de hasta el 25%**, en comparación a hombres (2,8%) y mujeres no embarazadas (0%). Además, los reportes de abortos, mortinatos o muertes neonatales se ven acrecentados entre las embarazadas infectadas con HEV.

5.1 SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS GENOTIPOS VIRALES

Aunque la gravedad de la infección por HEV dependa de ciertos factores del hospedador –como embarazo, la edad o enfermedades sub-

yacentes– que incrementan significativamente la tasa de mortalidad, factores virales –como los genotipos infectantes– desempeñarían también un papel esencial en la patogénesis de la infección asociada a un curso evolutivo fulminante. Un estudio reciente asocia al genotipo 4 con un curso más grave (mayor tasa de hepatitis severa y fulminante), picos más elevados de aminotransferasas y una actividad de protrombina disminuida en comparación con el genotipo 3. Asimismo, se ha asociado en forma significativa la hepatitis fulminante y un curso evolutivo más grave de la infección por HEV a la presencia de las sustituciones nucleotídicas U y C en las posiciones 3148 y 5907, respectivamente. Hasta el momento, no se ha atribuido caso alguno de hepatitis fulminante al genotipo 2 y la tasa de mortalidad del genotipo 1 en países desarrollados oscila alrededor del 1%.

Sin embargo, es menester contar con un número mayor de estudios para arribar a conclusiones válidas.

6. DIAGNÓSTICO

Los procedimientos de laboratorio utilizados en el diagnóstico de la infección por HEV incluyen:

a) Técnicas de biología molecular e inmunoelectromicroscopia para la detección del virus en suero y heces;

b) Estudios serológicos (ELISA y *Western blot*) efectuados para identificar anticuerpos anti-HEV de clase IgM y/o IgG.

Las pruebas de transcripción inversa acoplada a PCR (RT-PCR) permiten, a partir de muestras séricas o de materia fecal, la obtención de amplímeros específicos del RNA viral que son revelados mediante tinción de bromuro de etidio y transiluminación con luz UV o bien detectados mediante una sonda específica luego de la hibridación.

Mediante inmunoelectromicroscopia se han detectado partículas del HEV en materia fecal. Además, esta técnica permitió observar la agregación de dichas partículas con suero de convalecientes de esta infección. Estos estudios demostraron la reactividad cruzada de sueros provenientes de diferentes brotes epidémicos frente a partículas de distinto origen geográfico. En la actualidad, esta técnica se encuentra en desuso en laboratorios de diagnóstico clínico.

El diagnóstico serológico se realiza actualmente mediante ensayos inmunoenzimáticos para detectar anticuerpos (ELISA y *Western blot*).

Se utilizan proteínas recombinantes de fusión con *trpE* expresadas como proteína insoluble en *E. coli* (*trpE-C2*), la que contiene los dos tercios del extremo carboxilo del ORF 2 (cápside).

Otra configuración del *Western blot* que emplea proteínas de fusión derivadas del ORF 2 y ORF 3 con beta-galactosidasa permite detectar epítopes comunes y específicos de los tipos Birmania y México del HEV. Más recientemente, se ha logrado la expresión de proteínas recombinantes derivadas de los ORF 2 y 3 en el Baculovirus (un virus de insectos que es utilizado como vector de expresión de proteínas de interés).

El diagnóstico de infección aguda por HEV se sustenta habitualmente en la detección de IgG específica en una única muestra (Figura 24.6.3). La respuesta a IgM detectable por la mayoría de los equipos comerciales es variable, y no se detecta en muchos casos a pesar de la elevación en el título de IgG que se asocia a la exposición frente al HEV. Se ha observado que el título detectable de anticuerpos anti-HEV es llamativamente transitorio.

El 1-5% de los donantes de sangre de países occidentales presenta reactividad frente a antígenos de HEV, lo que puede complicar en algunos casos el diagnóstico de enfermos basado en la detección de IgG específica. En cambio, en áreas endémicas, los anticuerpos anti-HEV han sido detectados en el 5% de los menores de 10 años, cifra que se incrementa al 10-40% en adultos mayores de 25. Esto sugiere que, a diferencia de otros agentes infecciosos de transmisión entérica, el HEV es infrecuente en niños de países en vías de desarrollo.

7. PROFILAXIS

En la actualidad, la única medida apropiada es evitar el contacto con el virus. La prevención en áreas endémicas depende principalmente de la disponibilidad del servicio de agua potable, higie-

ne adecuada y control estricto de los desechos cloacales. El hervir agua antes del consumo reduce el riesgo de la infección. No es necesario el aislamiento de los individuos infectados, ya que la transmisión de persona a persona es infrecuente.

La inmunización pasiva con inmunoglobulina no es efectiva. Los reportes de numerosas epidemias atribuidas al HEV entre adultos de áreas endémicas sugiere que los anticuerpos anti-HEV no serían protectores en su totalidad o que los títulos de los mismos declinarían con el devenir del tiempo alcanzando gradualmente niveles no protectores. Un ensayo experimental demostró que la administración intramuscular de suero obtenido de un voluntario humano 4 años después de haber padecido una infección aguda por HEV no confirió protección alguna a primates desafiados con el virus. Más aún, estudios de profilaxis pre- y post-exposición realizados con preparados de inmunoglobulinas entre individuos de áreas endémicas no redujeron la prevalencia de la enfermedad.

Los resultados promisorios obtenidos con proteínas recombinantes, empleadas como inmunógenos para proteger a primates frente a la infección experimental con el virus de la hepatitis E salvaje, pudieron ser reproducidos en humanos. En la actualidad, una vacuna de proteína de cápside recombinante del HEV (GlaxoSmithKline®) ha superado la fase 2 de ensayos clínicos, luego de lograr una eficacia del 95,5% al ser administrada en 3 dosis (0, 1 y 6 meses) a voluntarios sanos

del Ejército nepalés, una población altamente susceptible a la infección por HEV.

Otra candidata vacunal conteniendo partículas símil-virus no infectante o VLP (designada HEV 239) fue recientemente desarrollada en China, habiendo superado la fase 3 de ensayos clínicos. Se desconoce si alguna de estas dos candidatas vacunales puede prevenir la hepatitis E fulminante.

ADENDUM

Durante la etapa de Prueba de Galera de *Virología Médica* se documentó que el 60% de los individuos inmunosuprimidos (incluyendo los trasplantados con órganos sólidos y los pacientes con SIDA) infectados con el genotipo 3 del HEV no elimina la infección, evolucionando a la hepatitis crónica con rápida progresión a la fibrosis, y 10% de dichos pacientes, a la cirrosis. La combinación de interferón- α y ribavirina constituye un tratamiento eficaz para la hepatitis E crónica en inmunosuprimidos.

A su vez, se ha establecido que el HEV puede producir manifestaciones neurológicas (síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalitis, neuritis braquial, y ataxia y miopatía proximal) y asociarse a glomerulonefritis membranosa o membranoproliferativa.

Bibliografía

- Aggarwal R, Jameel S. "Hepatitis E". *Hepatology* 2011; 54:2218-26.
- Aggarwal R, Krawczynski K. "Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research". *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:9-20.
- Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. "Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus". *J Biosci.* 2008; 33:451-64.
- Inoue J, Takahashi M, Mizuo H, *et al.* "Nucleotide substitutions of hepatitis E virus genomes associated with fulminant hepatitis and disease severity". *Tohoku J Exp Med.* 2009; 218:279-84.
- Jilani N, Das BC, Husain SA, *et al.* "Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy". *Hepatology* 2007;22:676-82.
- Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, *et al.* "Hepatitis E". *Lancet* 2012; 379:2477-88. Erratum en: *Lancet* 2012; 380:730.
- Lu L, Hagedorn CH. "Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis". *Rev Med Virol* 2006;16:5-36.
- Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT. "Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis". *Liver Int.* 2008; 28:1190-9.
- Okamoto, H. "Genetic variability and evolution of hepatitis E virus". *Virus Res* 2007;127:216-28.
- Shrestha MP, McNair Scott R, Joshi DM, *et al.* "Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine". *N Engl J Med* 2007;356:895-903.
- Teo, CG. "The two clinico-epidemiological forms of hepatitis E". *J Viral Hepat* 2007;14:295-7.



Otros virus que fueron postulados inicialmente como potenciales agentes etiológicos de hepatitis

Julietta Trinks - José Raúl Oubiña

Se han reunido evidencias epidemiológicas que sugieren la existencia de virus de hepatitis de transmisión entérica no A – no E, así como de otros virus causantes de hepatitis parenterales no B – no C – no D.

1. VIRUS DE LA HEPATITIS FRANCESA (HFV)

En diciembre de 1994, E. A. Flagan y el equipo de A. Zuckerman publicaron evidencias de la transmisión entérica de un nuevo agente responsable de casos de hepatitis esporádica no-A no-E en primates. Partículas simil-virales, de 27 a 37 nm de diámetro, fueron detectadas en la materia fecal de pacientes franceses y en el hígado y heces de animales inoculados. Los autores lo denominaron provisoriamente **virus de la hepatitis francesa** (por su origen) o **HFV**, lo que a su vez coincidía con la designación correspondiente al orden alfabético de un nuevo agente (ya caracterizados los virus causantes de hepatitis A-E). El análisis del genoma viral indicó que consistía en DNA bicatenario de 20 kb de longitud, lo cual era incongruente considerando el tamaño del virión. Lamentablemente, no se han dado a conocer reportes que confirmen el hallazgo del HFV y, por lo tanto, su condición como virus de hepatitis humana fue puesto en duda y subsiguientemente, demostrada la inconsistencia de los datos iniciales.

2. VIRUS GB TIPO C (GBV-C) / VIRUS HEPATITIS G (HGV)

En 1995 el equipo liderado por I. Mushahwar caracterizó dos virus provenientes del suero de tamarines (primates del Nuevo Mundo del tamaño de las ardillas) inoculados con el suero (conservado) de un individuo que había padecido una hepatitis en los años sesenta. Descrito en 1967 por Deinhardt y colaboradores al estudiar el suero de un cirujano enfermo, se propuso la denominación GB teniendo en cuenta las iniciales de éste. Los dos agentes descubiertos por Mushahwar fueron denominados GBV-A y GBV-B. A mediados de los 90, dicho grupo y otro multinacional liderado por el de H. Margolis del CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, EE.UU.) y H. Alter del NIH (*National Institutes of Health*, EE.UU.) identificaron casi simultáneamente dos nuevos virus a partir del suero de pacientes, algunos de ellos con enfermedad hepática, a los cuales denominaron **virus GB tipo C (GBV-C)** y **virus hepatitis G (HGV)**, respectivamente. La caracterización genómica de estos dos agentes demostró que se trataba de dos aislamientos del mismo virus. Los tres virus GB pertenecen a la familia *Flaviviridae*. GBV-A, GBV-C y un 4to. virus relacionado (GBV-D) fueron propuestos como miembros del género *Pegivirus* y GBV-B dentro del género *Hepacivirus*.

Se han expresado antígenos recombinantes del GBV-C / HGV empleados en ensayos inmunoenzimáticos para detección de anticuerpos. También se puede detectar el RNA viral mediante RT-PCR. En EE.UU. las primeras 200 muestras analizadas en hemodonantes demostraron una seroprevalencia del 4%. También se ha observado elevada prevalencia en pacientes politransfundidos y en usuarios de drogas ilícitas por vía endovenosa, asociándolo a la transmisión parenteral. Las vías sexual y vertical también fueron descriptas.

Hasta el momento se conocen 7 genotipos. En Argentina, los estudios de epidemiología molecular establecieron una prevalencia

del 5,5% de RNA viral en sangre periférica de hemodonantes de la ciudad de Buenos Aires, y del 30% en usuarios de drogas ilícitas por vía endovenosa coinfectados con HIV. En estos grupos poblacionales del país predomina la circulación del genotipo 2, siendo significativamente menor la contribución de los genotipos 1 y 3.

La asociación GBV-C / HGV y hepatitis agudas y crónicas en el humano fue inicialmente sugerida, aunque **no hay evidencias concluyentes que demuestren que el virus sea un agente patógeno hepatotrópico primario en humanos**; no obstante, en el primate *Macaca mulatta* se documentó en años recientes una asociación causal con hepatitis. Desde 1998 a la fecha se han publicado evidencias que demuestran el **linfotropismo** de este agente en humanos, aunque las observaciones no son uniformes. Las células que son blanco de la infección por GBV-C / HGV no han sido definitivamente individualizadas, habiéndose postulado a las precursoras hematopoyéticas, linfocitos B, plasmocitos, y fagocitos mononucleares, aunque simultáneamente se documentaba que transcritos completos de GBV-C / HGV son infecciosos *in vitro* en linfocitos humanos T CD4⁺. Estudios iniciales en curso sugieren que también los linfocitos T CD8⁺ pueden ser blanco de la infección.

En relación con el linfotropismo antes mencionado, dos aspectos merecen subrayarse: a) una posible asociación entre GBV-C / HGV y algunas enfermedades onco-hematológicas; y b) la interacción con el curso evolutivo de la infección por HIV. Al respecto, se investiga la naturaleza de la asociación entre GBV-C / HGV y ciertos linfomas. Asimismo, se ha documentado en varios estudios que analizaron la coinfección GBV-C / HIV, un menor nivel de la carga viral de éste último, y un significativo mantenimiento en los niveles de linfocitos T CD4⁺, lo que estuvo también asociado a una mayor sobrevida de los pacientes. Además, ha sido sugerido que la regulación negativa de la expresión de correceptores para quimioquinas (CCR5 y CXCR4) es mediada por la proteína E2 de GBV-C / HGV, dificultando la entrada de HIV a la célula. Más aún, la infección por GBV-C / HGV se asocia a un aumento en la producción de MIP-1 α , MIP-1 β , SDF-1 y RANTES. Esta última quimioquina al unirse a su receptor específico (CCR5), también bloquea el ingreso de HIV a la célula CD4⁺. Asimismo, se ha reportado una inhibición en la replicación del HIV-1 *in vitro* en cultivos celulares de estirpe linfoidea infectados con este virus y que experimentalmente se los indujo a expresar sólo un dominio peptídico de la proteína no estructural 5A (NS5A) del GBV-C / HGV. Este efecto inhibitorio podría deberse a la disminución en la expresión en superficie del receptor CXCR4 y al aumento en la secreción de su ligando SDF-1. En Argentina se han desarrollado y validado metodologías que permiten la cuantificación genómica del GBV-C / HGV en laboratorios de mediana complejidad, lo cual facilitará la realización de estudios clínicos de patogénesis.

Por lo expuesto, hasta el presente **GBV-C / HGV no puede considerarse un patógeno humano, pero merece la atención científica por su efecto inhibitorio sobre la coinfección con HIV** y consiguientemente, sobre algunos de los efectos habitualmente asociados a su exclusiva presencia en el hospedero.

3. VIRUS TT (TTV)

En 1997, T. Nishizawa y colaboradores reportaron el aislamiento de un nuevo virus a DNA, denominado **virus TT (TTV)**: Torque

teno virus), del suero de un paciente japonés (cuyas iniciales eran T.T.) afectado por una hepatitis post-transfusional de etiología desconocida. El tamaño del virión, que carece de envoltura, se estima entre 30 a 50 nm. Posee un genoma circular constituido por una molécula de DNA simple cadena de polaridad negativa y una extensión de 3 800 nucleótidos de longitud aproximadamente, con una gran diversidad que permite agrupar a los aislamientos en 5 grandes grupos y múltiples genotipos. El análisis de la secuencia nucleotídica y de las propiedades fisicoquímicas del TTV ha dificultado la clasificación taxonómica del mismo. En la actualidad se lo considera miembro de la familia *Anelloviridae*. En dicha familia coexisten al menos tres grupos de agentes: el mencionado TTV (3,8 – 3,9 kb), virus con genoma de 3,2 kb denominados TTMDV (Torque teno midi virus) y otros de 2,8-2,9 kb designados TTMV (Torque teno mini virus). Estos virus producen infecciones en humanos asociados a viremia persistente, y gran variabilidad y diversidad genómica.

La infección por TTV parece ser ubicua en todo el mundo, con altas tasas de prevalencia en humanos y animales. Las evidencias apuntan a la vía de transmisión parenteral, aunque también ha sido postulada la posible existencia de las vías sexual, vertical y entérica.

Aunque estudios iniciales concluyeron que el TTV era un agente hepatotrópico, datos recientes demostraron la replicación del mismo en un amplio rango de tejidos (médula ósea, pulmón, bazo, etc.). Este agente ha sido también asociado putativamente a enfermedades respiratorias, autoinmunes y oncológicas (me-

dante un mecanismo indirecto mediado por una modulación de la respuesta T). Sin embargo, existen numerosas evidencias que indican una ausencia de asociación entre TTV y los virus relacionados con la afección hepática. **Tampoco existen datos concluyentes que asocien a estos virus con enfermedad humana alguna hasta el presente.**

4. Virus SEN (SENV)

Finalmente, en el año 2000, científicos italianos reportaron el descubrimiento de un agente que sería la causa de gran parte de las hepatitis infecciosas de origen incierto. El virus fue inicialmente aislado de un usuario de drogas ilícitas con serología positiva para HIV y denominado provisoriamente a partir de sus iniciales: **virus SEN (SENV)**. Se trata de un agente desnudo, perteneciente a la misma familia que los TTV (*Anelloviridae*), que posee un genoma a DNA circular simple cadena de 3 900 bases de longitud. Se lo supone asociado a la vía parenteral de transmisión especialmente la mediada por transfusiones, aunque la vía no parenteral y vertical han sido también reportadas.

Hasta el momento, se han identificado 8 genotipos (A – H) de este virus; si bien inicialmente los genotipos D y H fueron asociados a algunos casos de hepatitis post-transfusional, **no existen actualmente evidencias firmes que avalen un rol etiológico de SENV en la inflamación hepática**, desconociéndose hasta el momento de la edición de este capítulo la verdadera patogenicidad de este agente.

Bibliografía

- Akiba J, Umemura T, Alter HJ, Kojiro M, Tabor E. "SEN virus: epidemiology and characteristics of a transfusion-transmitted virus". *Transfusion* 2005; 45:1084-8.
- Bhattarai N, Stapleton JT. "GB virus C: the good boy virus?". *Trends Microbiol* 2012; 20:124-130.
- Irshad, M, Joshi YK, Sharma Y, Dhar I. "Transfusion transmitted virus: A review on its molecular characteristics and role in medicine". *World J Gastroenterol* 2006; 12:5122-5134.
- Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, *et al.* "Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent". *Science* 1996; 271:505-8.
- Narayanan Menon KV. "Non-A to E hepatitis". *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15:529-34.
- Okamoto H. "History of discoveries and pathogenicity of TT viruses". *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 331:1-20.
- Oubiña JR, Mathet V, Feld M, Della Latta MP, Ferrario D, Verdun R, *et al.* "Genetic diversity of GBV-C/HGV strains among HIV infected-IVDU and blood donors from Buenos Aires, Argentina". *Virus Res* 1999; 65:121-9.
- Primi D, Fiordalisi G, Mantero JL *et al.* "Identification of SENV genotypes". International publication number: WO0028039 2000. International application published under the patent cooperation treaty, 2000.
- Reshetnyak VI, Karlovich TI, Ilchenko LU. "Hepatitis G virus". *World J Gastroenterol* 2008; 14:4725-34.
- Ruiz V, Giordano M, Rivero CW, Minassian ML, Cuestas ML, Trinks J. *et al.* "GV virus C quasispecies detected in plasma and lymphocyte subsets in a natural human infection". *J Gen Virol* 2010; 91: 1687-92.
- Ruiz V, Espínola L, Mathet VL, Perandones CE, Oubiña JR. "Design, development and evaluation of a competitive RT-PCR for quantitation of GBV-C RNA". *J Virol Methods* 2006; 136:58-64.
- Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, *et al.* Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995; 1:564-9.



25

FIEBRES HEMORRÁGICAS DE ORIGEN VIRAL

Guadalupe Carballal - José Raúl Oubiña

Familia *Arenaviridae*

Guadalupe Carballal - José Raúl Oubiña

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los virus integrantes de esta familia se caracterizan por producir infecciones persistentes en roedores, los que actúan como reservorios naturales y transmiten la infección al ser humano. La familia *Arenaviridae* incluye múltiples virus, de los cuales sólo unos pocos son patógenos para el hombre al que pueden causar desde infecciones inaparentes o enfermedades leves hasta cuadros letales. Estas infecciones se observan generalmente en áreas localizadas del planeta, restringidas al hábitat de los roedores reservorios, en las que por diversas razones (tareas agrícolas, recreacionales, etc.) se facilita el contacto reservorio-hombre.

La transmisión ocurre desde los roedores persistentemente infectados al hombre, pero en la infección por el virus Lassa, también puede existir el contagio interhumano, una vía inicialmente reportada también para el virus Machupo.

El número de casos clínicos de enfermedad por arnavirus es bajo, como máximo en el orden de varios centenares por año en las zonas endémicas para los arnavirus patógenos para el hombre en América y de aproximadamente 300 000 casos anuales de fiebre de Lassa en África, con una mortalidad que alcanza varios miles al año.

A pesar de su limitada importancia epidemiológica, estos virus han despertado el interés de virólogos, inmunólogos y ecólogos debido a su capacidad de inducir infecciones persistentes en reservorios animales y graves mecanismos inmunopatológicos de lesión en modelos experimentales, ya sea mediados por mecanismos T-dependientes o por complejos inmunes. Dado que estas dos condiciones son de gran interés en patología humana, los arnavirus han sido exhaustivamente estudiados a nivel experimental.

El primer arnavirus descrito fue el virus de la coriomeningitis linfocitaria (*Lymphocytic choriomeningitis virus* o virus LCM), considerado el prototipo de la familia. Por microscopía electrónica se lo observó con la forma de partículas ovoides o pleomórficas de 50-200 nm con envoltura. La característica más llamativa era la presencia en el interior de las partículas virales de gránulos electrón-densos, los que se identificaron como ribosomas de origen celular. Posteriormente, se aislaron muchos otros virus de estructura similar y en 1980, el Comité Internacional de Taxonomía Viral estableció la asignación de estos virus a la familia *Arenaviridae*. El nombre proviene de latín *arenosus* debido a las imágenes de los gránulos densos en el interior de las partículas virales, que asemejan gránulos de arena al microscopio electrónico (Figura 25.1.1).

Todos los arnavirus son esféricos u ovoides, de simetría helicoidal y poseen una envoltura lipoproteica, que adquieren al salir de la célula por brotación. En la envoltura se encuentran glicoproteínas importantes para la inducción de anticuerpos neutralizantes en el hospedador infectado. El genoma consiste en dos fragmentos de RNA de cadena simple (segmento L *-large-* y S *-small-*) y, además, presentan RNA ribosomal y de transferencia, de origen celular.

La familia *Arenaviridae* comprende dos grandes grupos (Tabla 1).

a) **Los arnavirus del Viejo Mundo.** Este grupo incluye el virus LCM –de distribución en Eurasia y América, y el Complejo Lassa (Virus Lassa y otros, aislados en África Occidental).

b) **Los arnavirus del Nuevo Mundo o Complejo Tacaribe.** Este grupo está constituido por múltiples virus, todos aislados en América.

De acuerdo con su capacidad para infectar al hombre, los arnavirus se clasifican en patógenos y no patógenos. Los patógenos conocidos hasta el momento son los siguientes: el virus LCM (que produce un cuadro similar a la gripe y a veces meningitis, es teratogénico y se ha asociado a cuadros fatales en receptores de órganos sólidos infectados), el virus Junín (agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina), el virus Machupo (fiebre hemorrágica boliviana), el virus Guanarito (fiebre hemorrágica venezolana), el virus Sabiá (fiebre hemorrágica de Brasil) y el virus Lassa (fiebre hemorrágica africana).

A pesar del conocimiento y la manipulación experimental del virus Tacaribe desde hace varias décadas, existe un único caso publicado de enfermedad febril asociada al mismo, con compromiso leve del SNC. También se ha documentado seroconversión sin enfermedad alguna en individuos infectados con Pichinde.

Recientemente (2008) se ha reportado la circulación de un segundo arnavirus en Bolivia, también asociado a un caso fatal de fiebre hemorrágica, cuyo nombre propuesto es Chapare. Es motivo de actual estudio la real patogenicidad para el hombre del virus Whitewater Arroyo, inicialmente asociado a la enfermedad de tres pacientes hospitalizados en California, EE.UU. que padecieron un curso fatal. También en 2008 se ha descrito una variante de LCM –distinta de las cepas conocidas de éste– en tres pacientes australianas que fallecieron al cabo de 4 a 6 semanas, luego de recibir el trasplante de hígado o riñón a partir de un único donante.

De lo expuesto se infiere que con cierta frecuencia se descubren nuevos arnavirus, algunos de los cuales están asociados a enfermedad humana. El médico debe conocer estos agentes, a pesar de su muy restringida o nula incidencia en áreas no endémicas, debido a la posibilidad de enfrentarse con casos provenientes de dichas áreas de un determinado país o de otros países o aún de otro continente (como son los casos observados de Fiebre de Lassa en Europa y EE.UU.).

La clasificación inicial de los arnavirus se sustentó en las características antigénicas de los mismos. Actualmente, se utiliza la clasificación genotípica de estos agentes, lo que mediante análisis filogenéticos asistidos por programas adecuados de computación, establece el agrupamiento de estos virus en los dos grandes grupos antes mencionados (Viejo Mundo y Nuevo Mundo); a su vez, dentro de este último grupo, se observa cómo los diversos virus exhiben relaciones genómicas que permiten su agrupamiento en tres clados (ramas): A, B y C, así como probablemente la recientemente postulada existencia de virus con genoma recombinante A/C: Whitewater Arroyo y Tamiani). La existencia de estos clados tiene importancia médica, ya que se observa que aún dentro de un grupo antigénicamente relacionado (por ejemplo, el complejo Tacaribe) existen diferencias tales que agrupan a los diversos virus según su patogenicidad para el hombre. Entre los arnavirus del Nuevo Mundo sólo un subgrupo del Clado B es patógeno para el humano (*Junín*, *Machupo*, *Sabiá*, *Guanarito* y –el recientemente propuesto– *virus Chapare*; figura 25.1.2).

Según el Instituto de Alergia y Enfermedades Infecciosas de EE.UU. (NCIAD) los virus Junín, Machupo y Guanarito corresponden a la categoría A de patógenos potencialmente utilizables



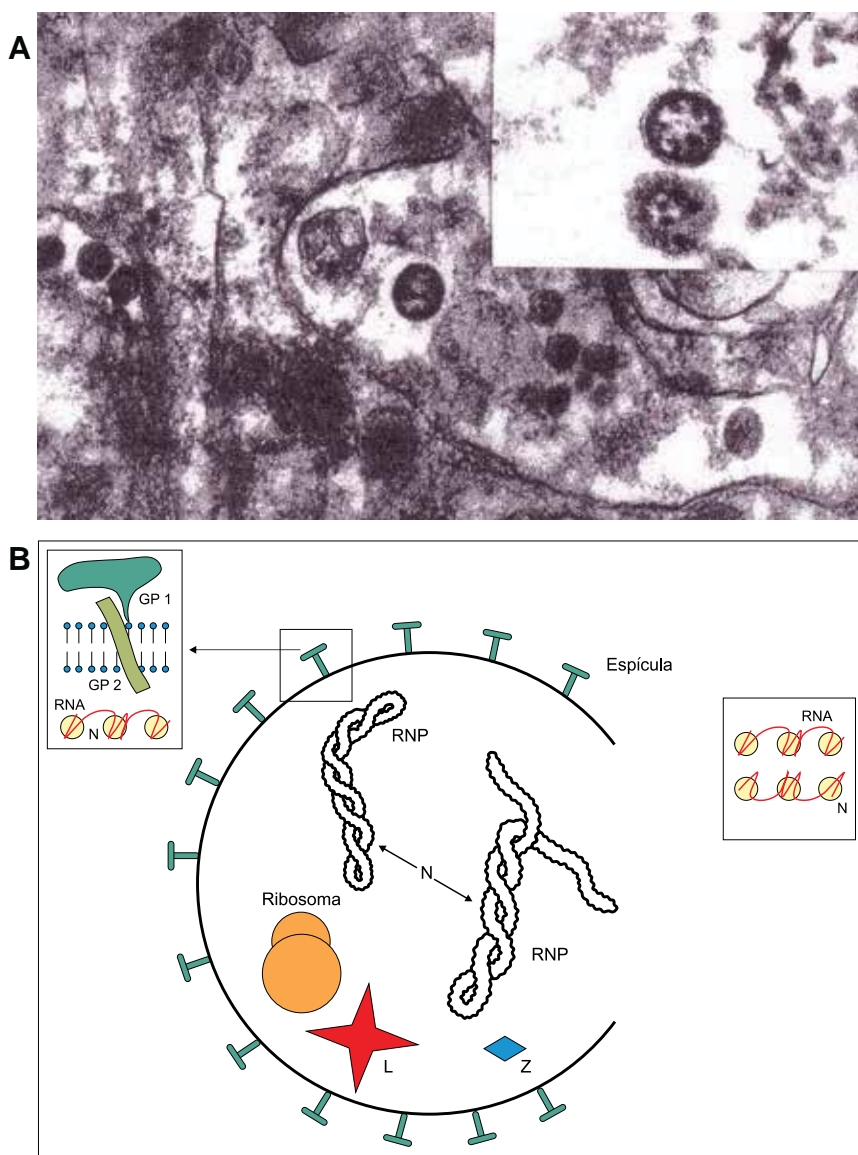


Figura 25.1.1. A. Partículas de virus Junín (cepa prototipo XJ) en médula ósea de cobayo. Microscopía electrónica (x 75 000). En el recuadro se observan a mayor aumento los gránulos de aspecto ribosomal y la envoltura viral. (Cortesía del Dr. C. Vásquez, Centro de Virología Animal [CEVAN], Buenos Aires). B. Representación esquemática de un arenavirus.

como armas biológicas por el bioterrorismo, debiendo ser manipulados en condiciones de bioseguridad máxima (nivel 4) –entre otras razones– por la alta mortalidad asociada a sus respectivas infecciones.

1.1 ARENAVIRUS Y SUS RESERVORIOS

Una de las características más interesantes de estos virus es su capacidad de infectar en forma persistente a roedores y así diseminarse en la naturaleza (Tabla 25.1.1). La distribución de los arenavirus en el mundo es dependiente de la de sus reservorios animales.

En 1984, Mims definió a la infección persistente como aquella en la que el virus se mantiene en un organismo durante períodos prolongados, muchas veces de por vida, pudiendo ser detectados por algún ensayo ya sea como partícula infecciosa, como antígeno intracelular o como genoma.

Los arenavirus se mantienen en la naturaleza al infectar persistentemente roedores. La única excepción es la del virus Tacaribe, que se aisló inicialmente de murciélagos herbívoros –*Artibeus*

sp., en la isla Trinidad en el mar del Caribe, aunque aún se investiga cuál es su verdadero reservorio.

Se ha observado que los arenavirus del Viejo Mundo infectan roedores de la familia *Muridae* (subfamilia *Murinae*) mientras que los del Nuevo Mundo lo hacen con roedores de la subfamilia *Sigmodontinae* (familia *Cricetidae*).

El principal mecanismo para el mantenimiento de la infección en roedores en la naturaleza es la transmisión horizontal, dado que se aislaron virus de fauces y/u orina. Para el virus LCM, además de dicha vía, se comprobó transmisión vertical (de madre a crías) a través de las células sexuales. Para los virus Machupo y Junín, además de la transmisión horizontal –que es la más importante– también se demostró transmisión vertical post-natal.

1.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y REPLICACIÓN

1.2.1 Genoma

El genoma de los arenavirus consta de RNA monocatenario y bisegmentado. De los cinco segmentos genómicos aislados de virus purificados, tres son de origen celular (28, 18, y 4 - 6 S, asociados a RNA

Arenavirus	Reservorio	Hábitat	Localización
Del viejo mundo			
Coriomeningitis linfocitaria* (LCM)	<i>Mus musculus</i>	Peridomiciliario	Mundial
Lassa*	<i>Mastomys natalensis</i>	Sabana y peridomiciliario	Oeste de África
Mopeia	<i>Mastomys natalensis</i>	Sabana	Sur de África
Mobala	<i>Praomys jacksoni</i>	Sabana	África Central
Ippy	<i>Praomys sp</i>	Sabana	
Del nuevo mundo			
Junín*	<i>Calomys musculinus</i> <i>Calomys laucha</i> <i>Akodon azarae</i> <i>Bolomys obscurus</i>	Bordes de ruta, terraplenes, área de cosecha de maíz	Argentina: pampa húmeda
Machupo*	<i>Calomys callosus</i>	Pasturas y peridomiciliario	Bolivia
Chapare*	?	?	Bolivia
Sabiá*	?	?	Brasil
Guanarito*	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Pastizales, zonas de cultivos mecanizados y peridomiciliario	Venezuela
Whitewater Arroyo** (incierto patogenicidad)	<i>Neotoma albigula</i> <i>Neotoma micropus</i> , <i>Neotoma cinérea</i>	Zonas rocosas, sabana, desierto	EE.UU.: Oklahoma, Utah, Nuevo México
Tacaribe	Aislado en <i>Atribeus sp</i> (murciélago)***	Bosque	Trinidad
Amapari	<i>Oryzomys capito</i>	Bosque tropical	Brasil
Flexal	<i>Oryzomys sp</i>	Bosque tropical	Brasil
Pichinde	<i>Oryzomys albigularis</i>	Bosque tropical	Colombia
Latino	<i>Calomys callosus</i>	Pasturas y peridomiciliario	Bolivia
Paraná	<i>Oryzomys buccinatus</i>	Bosque tropical	Paraguay
Tamiani	<i>Sigmodon hispidus</i>	Bosque tropical	EE.UU.: Florida
Allpahuayo	<i>Oecomys bicolor</i> <i>Oecomys paricola</i>	Bosques inundables, tierra firme, arrozales	Perú
Bear Canyon	<i>Peromyscus californicus</i>	Zona montañosa y peridomiciliario	EE.UU.: California
Catarina	<i>Neotoma micropus</i>	Zonas rocosas	E.E.UU.: Texas
Pirital	<i>Sigmodon alstoni</i>	Pastizales, zonas de cultivos mecanizados y peridomiciliario	Venezuela
Cupixi	<i>Oryzomys capito</i>	Bosque tropical	Brasil
Oliveros	<i>Necromys benefactus</i> y otros	Pastizales	Argentina: región pampeana central
Río Carcarañá	<i>Bolomys sp</i>	Maizales de la pampa húmeda	Argentina: Pcia. de Santa Fe (cerca de la ciudad de Río Carcarañá)

Tabla 25.1.1. Arenavirus y sus reservorios naturales. * Patógenos para el humano. ** Asociado en 1993 a tres casos de enfermedad fatal en humanos, actualmente se investiga si es un genuino patógeno humano. *** Aunque el virus se aisló originalmente en murciélagos, el verdadero reservorio es aún investigado.

Virus	Enfermedad	Mortalidad	Área endémica	Reservorio	Hábitat del roedor reservorio	Transmisión
Junín	Fiebre hemorrágica argentina o mal de los rastrojos o mal de O'Higgins	10-20%	Pampa húmeda	<i>Calomys musculinus</i> , <i>Akodon azarae</i> y otros	Rural	Roedor-roedor Roedor-humano
Machupo	Fiebre hemorrágica boliviana	30%		<i>Calomys callosus</i>	Peridomiciliario	Roedor-roedor Roedor-humano Interhumano
Guanarito	Fiebre hemorrágica venezolana	Alta	Llanos en Venezuela occidental	<i>Zygodontomys brevicauda</i> y <i>Sigmodon alstoni</i>	Rural y peridomiciliario	Roedor-roedor Roedor-humano
Sabiá	Fiebre hemorrágica de Brasil	Tasa desconocida	Un único caso en San Pablo	Desconocido	Desconocido	Desconocido
Lassa	Fiebre hemorrágica africana de Lassa	20%	África occidental	<i>Mastomys natalensis</i>	Rural y peridomiciliario	Roedor-roedor Roedor-humano Interhumano
LCM	Meningitis, cuadro gripal; teratogénico; compromiso renal, hepático y neurológico en trasplantados con órganos sólidos	0% (en inmunocompetentes); pacientes trasplantados con órganos sólidos infectados: curso fatal	Eurasia y América	<i>Mus musculus</i>	Domésticos	Roedor-roedor Roedor-humano Interhumano (en receptores de trasplante)
LCM*	Enfermedad febril, encefalopatía	Tres pacientes trasplantadas con órganos sólidos infectados: curso fatal	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Se sospecha contacto del donante con roedores Interhumano (en receptores de trasplante)
Chapare	Enfermedad febril hemorrágica, con compromiso hepático	Un caso fatal	Un único caso en Chapare, Dpto. de Cochabamba, Bolivia	Desconocido	Desconocido	Desconocido

Tabla 25.1.2. Epidemiología de los arenavirus patógenos para el ser humano. * Sería una nueva variante de LCM.

ribosómico y RNA de transferencia) mientras que los restantes –de origen viral– se conocen como S (*small*= 22 - 25 S) y L (*large*= 31 - 33 S) que poseen una extensión de 7 - 7,3 y 3,5 kb aproximadamente. La característica saliente del genoma de los arenavirus es la polaridad bisentido (o en inglés *ambisense*; es decir una parte de cada uno de estos dos fragmentos de RNA exhibe polaridad de mensajero [+] y la otra de anti-mensajero [-]). Ello tiene crucial importancia en la patogénesis de la infección, pues requiere de un delicado balance en la regulación de la expresión génica.

El significado del RNA ribosómico en el interior de las partículas virales se desconoce, aunque no es necesaria su presencia para la infectividad viral.

Los estudios de biología molecular efectuados inicialmente con Pichinde, permitieron establecer en 1984 una novedosa estrategia de codificación genómica en el segmento S. Este segmento codifica para la nucleoproteína N y para la glicoproteína precursora GPC. La nucleoproteína está codificada en el extremo 3' del RNA, mientras que la glicoproteína precursora está codificada en el 5'. Sin embargo, el sentido de la codificación de ambas es opuesto: la secuencia del gen N (con polaridad negativa) es complementaria a la del RNAm de la nucleoproteína, mientras que la del gen GPC (con polaridad positiva) es del mismo sentido que el RNAm de la GPC (Figura 25.1.3A). A esta forma de codificación genómica del RNA se la designó –como se indicó precedentemente– con el nombre de bisentido o *ambisense*. Estudios posteriores con LCM, Tacaribe, Lassa y Junín confirmaron esta organización genómica del segmento S. En 1989, se demostró que el segmento L de LCM y Tacaribe también codifica dos genes con polaridad opuesta: en el extremo 3', el gen L (con polaridad negativa) codifica para la RNA polimerasa viral L (o RNA polimerasa RNA-dependiente [RdRP]) en la secuencia complementaria, mientras que en el extremo 5' del fragmento L de RNA, los arenavirus codifican (en el mismo sentido del genoma viral) una pequeña proteína con un dominio con capacidad potencial de unión a metales (*RING finger protein* que une $Zinc^{++}$), la que fue inicialmente denominada p¹¹ para el virus Tacaribe y Z para LCM (actualmente la letra Z es utilizada para los diversos arenavirus) y que actúa como proteína de matriz.

El análisis de secuencias nucleotídicas del S RNA de Pichinde, Lassa, Junín, Tacaribe y LCM ha detectado la presencia de 19 bases en común en el extremo 3' de todos ellos. Esta secuencia es, a su vez, complementaria a la existente en el extremo 5' del segmento S. El extremo 3' del L RNA es casi idéntico al extremo 3' del S RNA de LCM, Pichinde y Tacaribe. Asimismo, existen unas 20 bases complementarias entre los extremos 3' y 5' del fragmento L de Tacaribe y LCM. La complementariedad de bases entre los extremos 3' y 5' del segmento S RNA y 3' y 5' del L RNA no es idéntica, ya que las pocas bases no complementarias en dichos extremos difieren en número y posición en ambos segmentos. Se ha sugerido que ello podría tener implicancias en la transcripción y replicación del RNA. La complementariedad de bases entre los extremos 3' y 5' del S y L RNA podrían explicar la presencia de formas genómicas circulares cerradas o en asa observadas al microscopio electrónico en condiciones desnaturalizantes con los virus LCM, Tacaribe y Pichinde. Estas imágenes podrían ser explicadas por la formación de una estructura secundaria de RNA parcialmente bicatenaria (Figura 25.1.3B). Asimismo, estas formas circulantes podrían formarse también a través del apareamiento de bases entre las secuencias repetidas invertidas en el extremo 3' de las cadenas L y S: la circularización no estaría restringida únicamente a interacciones entre los extremos de una única cadena.

Como se ha señalado, todos los arenavirus estudiados hasta la fecha exhiben una estrategia de codificación antiparalela en los segmentos S y L. Los genes N y GPC están separados por una región de secuencias complementarias invertidas que forman una estructura secundaria con aspecto de doble rulo (doble U invertida) la cual funciona como una señal terminadora de la transcripción. Se ha demostrado que la nucleoproteína de Junín tiene actividad de anti-terminador transcripcional, permitiendo a la polimerasa viral

la síntesis del intermediario replicativo, secuencia complementaria al fragmento S de RNA.

Se ha descrito una región intergénica entre los genes L y p¹¹ o Z (para Tacaribe y LCM, respectivamente) para la cual se postuló también la función de señal terminadora de la transcripción de los respectivos RNAm.

La asociación del RNA viral con la nucleoproteína forma el complejo ribonucleoproteína (RNP). Se han descrito dos tipos de RNP de acuerdo a su tamaño y composición: un primer tipo es de pequeño tamaño (600 nm) y contiene sólo S RNA, mientras que un segundo tipo de mayor tamaño (1300 nm) contiene S y L RNA, aunque este último en menor proporción.

1.2.2. Proteínas virales

El genoma de los arenavirus codifica en total 4 proteínas: 2 en el fragmento S y 2 en el L. Derivan del primero la glicoproteína precursora GPC hacia el extremo 5' y la nucleoproteína viral N (codificada hacia el extremo 3', también denominada NP por algunos autores). El segmento L codifica en el lado 5' una pequeña proteína que actúa como proteína de matriz, denominada Z inicialmente, y en el extremo 3' la RNA polimerasa viral. Las tres primeras son proteínas estructurales y fijan Zn^{++} . Una pequeña región genómica que precede en el extremo 5' a la que codifica la GPC corresponde a la zona codificante para un péptido-sígnal. Éste deriva del clivaje de la GPC por una señal-peptidasa celular. Una vez miristilado, forma parte del complejo glicoproteico de la envoltura viral en forma estable (SSP: *Stable Signal Peptide*), uniéndose a la proteína de membrana GP2.

El procesamiento de la glicoproteína precursora GPC por la proteasa celular S1P (*Site 1 Protease*, también conocida como subtilisina-quexina-isozima 1) da origen a las dos glicoproteínas maduras denominadas GP1 y GP2. GP1 corresponde a la mitad amino-terminal de la glicoproteína precursora GPC, y GP2 a la mitad carboxilo-terminal. Las glicoproteínas mencionadas están presentes en la superficie del virión, constituyendo las espículas del mismo. La glicoproteína GP1 (también denominada por algunos autores G1) está más expuesta que GP2 (G2). GP1 interactúa con los diversos receptores celulares y es blanco de acción de los anticuerpos neutralizantes. GP2 posee dominios de membrana que interactúan con la nucleoproteína subyacente y –como se indicó en el párrafo precedente– con SSP.

La organización espacial de la nucleoproteína N fue inicialmente dilucidada con el virus Pichinde. Se dispone en una formación lineal de unidades globulares de 4 a 5 nm. Estas múltiples unidades están organizadas en su forma más estable como fibras enrolladas de 12-15 nm. Este filamento se pliega sobre sí mismo constituyendo una estructura helicoidal, con ocasionales imágenes globulosas.

Se ha demostrado que la proteína L (RNA polimerasa viral) está asociada al virión y a complejos de ribonucleoproteínas (RNP) provenientes de células infectadas. La proteína Z también forma parte de la estructura viral.

Estudios realizados con virus Tacaribe documentaron la interacción de N con L, formando un complejo funcional que permite la actividad de RNA polimerasa. La interacción de Z con L inhibe los procesos de transcripción y replicación viral en un modo dependiente de la concentración de Z. Esta última proteína (que al ser miristilada en la célula le permite la interacción con la membrana, cambiando su lipofilidad) es imprescindible para la brotación viral.

1.2.3. Propiedades antigénicas

Los **determinantes antigénicos de tipo residen en las glicoproteínas de envoltura**. Los **antígenos de grupo residen en la nucleoproteína**, pudiéndose detectar en reacciones de fijación de complemento.

Estudios de protección realizados con el virus LCM demostraron **neutralización tipo-específica, fundamentalmente con anticuerpos monoclonales anti-GP1**. Asimismo, se logró inducir protección contra una cepa patógena de virus Lassa en cobayos y

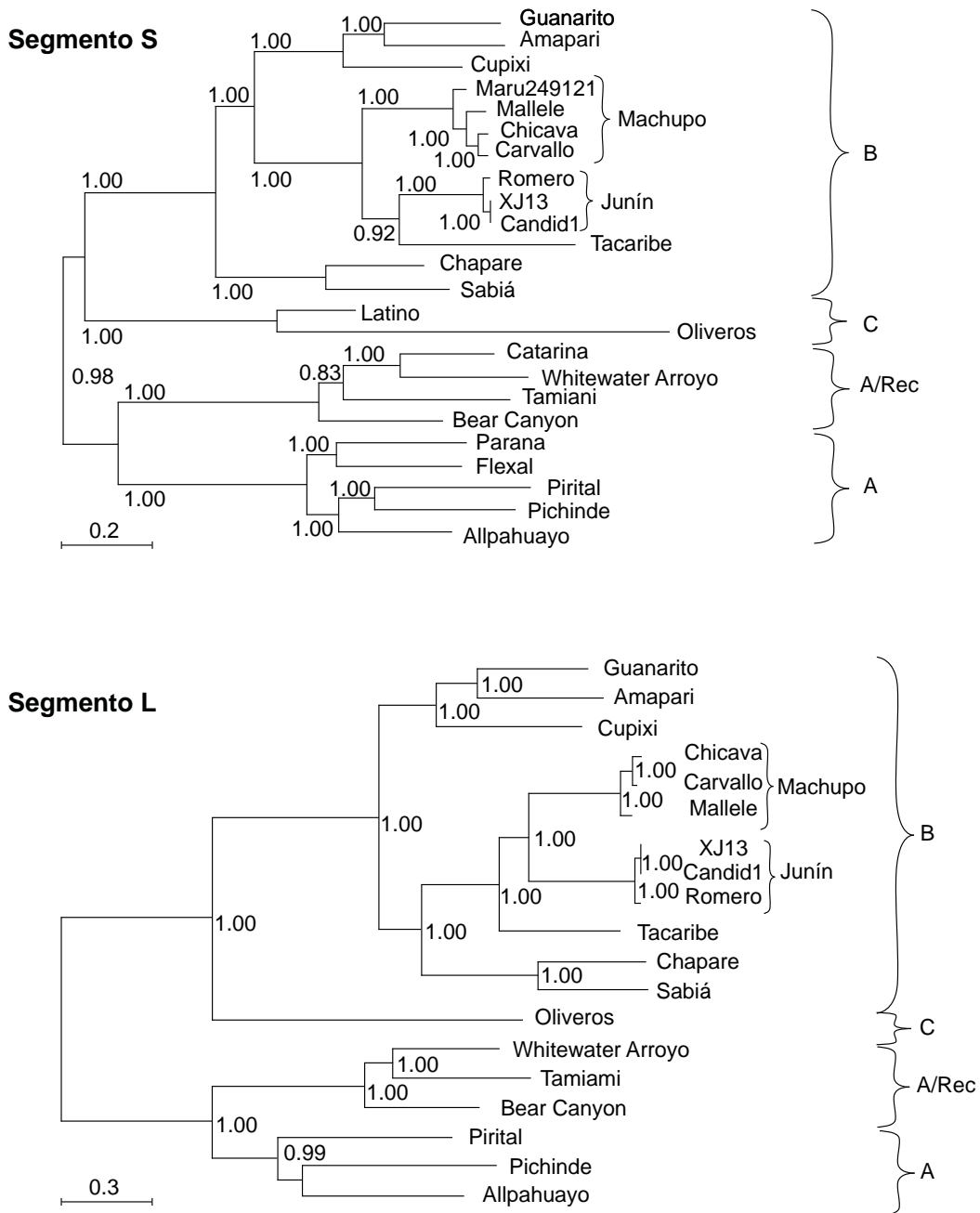


Figura 25.1.2. Análisis filogenético del genoma de los arenavirus del Nuevo Mundo. Se observan las relaciones genéticas entre los arenavirus luego del análisis de la secuencia completa de los fragmentos S y L. Las llaves agrupan a los clados (ramas) A, B, C y A/Rec (A/recombinante). Los virus patógenos para el ser humano Junín, Machupo, Guanarito, Sabiá y Chapare, están ubicados en el clado B. De: Delgado S y cols. *PLoS Pathog.* 2008 Apr 18;4(4):e1000047. (Edición electrónica en línea de acceso libre).

primates vacunados con virus vaccinia recombinante que expresaba el gen de la nucleoproteína o de la glicoproteína precursora del virus Lassa.

Análogamente, la inoculación experimental de ratones con virus vaccinia recombinante conteniendo genes para nucleoproteína o glicoproteína precursora de LCM induce protección mediada por linfocitos citotóxicos frente al desafío con virus LCM. En ambos experimentos con este virus, se comprobó que los linfocitos T CD8⁺ reconocen antígenos virales procesados y expresados en la membrana citoplasmática en el contexto de antígenos del CMH-I (aun los que están localizados originalmente en el interior del virus, como los correspondientes a la nucleoproteína).

Estudios pioneros alrededor de los años 1980 y 1990, documentaron que la infección de cobayos y primates con virus Tacaribe protegía frente al desafío con la cepa XJ (patógena) de virus Junín, por lo que se había postulado que dicha protección podría originarse en una respuesta inmune cruzada entre ambos virus (véase el ítem 3.1.3).

1.2.4. Replicación viral.

Estos virus producen ciclos no líticos al replicarse exclusivamente en el citoplasma de las células.

Ingreso viral. Recientes evidencias indican que el mecanismo de ingreso de los arenavirus es disímil.

Los arenavirus del viejo Mundo (como **Lassa, ciertas cepas de LCM y los virus del clado C del Nuevo Mundo**) utilizan como receptor el α distroglicano (un receptor de proteínas de la matriz extracelular que interconecta la misma con la actina del citoesqueleto) y que está presente en las superficies de aquellas células que residen adyacentes a una membrana basal. En contraposición, los **cinco arenavirus patógenos del Nuevo Mundo ubicados en el clado B (Junín, Machupo, Guanarito, Sabiá y Chapare)**, emplean el receptor 1 de transferrina (TfR1), cuya expresión está inversamente regulada por el Fe⁺⁺ citosólico. Otros virus del clado B (aunque no patógenos para humanos) como Tacaribe y Amparí, no utilizan TfR1 para ingresar a las células. Curiosamente, el virus Whitewater Arroyo (al que algunos autores le asignan un origen recombinante entre los clados A y B) parece utilizar para su ingreso a la célula una vía independiente de α distroglicano y de TfR. La actividad celular de O-manosilación y la de glicosil transferasa mediada por una proteína denominada LARGE, son críticas para la funcionalidad del receptor α distroglicano. Es posible que esta dependencia viral para el ingreso celular haya seleccionado alelos defectuosos del gen LARGE en la población de África en países como Nigeria, donde el virus Lassa es endémico. La expresión de glicoproteínas virales por virus que ingresan a través del α distroglicano, regula subsiguientemente su funcionalidad, al alterar su modificación post-traducciona, lo que perturba su interacción con las proteínas de matriz.

El receptor TfR1 es una proteína de clase II de membrana que se expresa en células inmunes activadas, y en células endoteliales vasculares, estirpes celulares críticamente involucradas en la patogénesis de la infección por los arenavirus patógenos para el hombre.

Los eventos subsiguientes de la infección son dependientes de la interacción con los dos receptores antes mencionados.

Los virus que utilizan α distroglicano ingresan a la célula mediante un mecanismo de endocitosis colesterol-dependiente pero clatrina-caveolina y (GTPasa) dinamina-dependiente que libera ribonucleoproteínas virales al endosoma. En contraposición, el virus Junín, penetra a la célula mediante un mecanismo de endocitosis clatrina- y dinamina-dependiente, formando vesículas que luego de una etapa de desnudamiento permiten el ingreso de ribonucleoproteínas virales a endosoma tempranos (véase la Figura 3 del capítulo 5 "Patogenia de las infecciones virales"). En contraposición al ciclo normal de reciclado de TfR1 hacia la superficie celular, la infección por Junín requiere un redireccionamiento de dicho receptor oligomerizado hacia un compartimiento de mayor acidez (pH 5,5) propio de los endosomas tardíos. Estudios *in vitro* documentaron que la adición de hierro al medio de cultivo inhibe la infectividad de Junín, mientras que su depleción la incrementa. Ello sugiere la posibilidad que pacientes que habitan áreas endémicas de fiebre hemorrágica argentina y que padecen anemias ferropénicas, podrían presentar mayor vulnerabilidad a la infección por virus Junín. Estudios *in vitro* realizados en cultivos primarios de células diferenciadas polarizadas del epitelio respiratorio humano indican que diversas cepas de LCM, así como la cepa atenuada Candid # 1, ingresan por el polo basolateral de las mismas.

En síntesis, una vez unido al receptor, los arenavirus ingresan a las células mediante un mecanismo de endocitosis que dirige las partículas virales a un ambiente de bajo pH, lo que dispara una etapa de fusión de membrana dependiente del pH, liberando las ribonucleoproteínas (RNP) virales al citosol, donde ocurre el desempaquetado del RNA viral. La fusión entre la envoltura viral y la membrana de la vesícula es promovida al descender el pH (5,3 es el valor óptimo para Junín y LCM), lo que produce un cambio conformacional irreversible que disocia a G1 del complejo glicoproteico. Ello expone al péptido de fusión presente en G2 que mediante un cambio conformacional promueve la fusión entre la membrana viral y la de la vesícula endosómica.

Replicación genómica. El segmento S ha sido el más estudiado (Figura 25.1.3A). Producida la penetración y el desnudamiento genómico en el interior celular, se inicia la transcripción del lado 3' del segmento S, el cual corresponde al gen N (de polaridad negativa). Como consecuencia, se sintetiza un RNAm subgenómico con *cap* y sin poliadenilación, cuya secuencia es complementaria a la del gen N. Sólo después de su traducción, es decir, luego de la síntesis de la nucleoproteína viral, el ciclo de replicación genómica puede continuar. Dicha nucleoproteína (o alguna proteína codificada por el L RNA) sería la que permitiría a la polimerasa viral la lectura a través de las secuencias terminadoras de la región intergénica.

El ciclo de replicación continúa con la síntesis de un intermediario replicativo cuya secuencia es complementaria (RNA anti-genómico) a la del segmento S (sin *cap*) y cuya longitud, por ende, es similar.

Este RNA anti-genómico es el intermediario obligado para la replicación de más S RNA genómico y sirve, a su vez, como template para la transcripción del RNAm subgenómico de la glicoproteína precursora. Las concentraciones relativamente bajas de este RNA intermediario comparado con el S RNA genómico en células infectadas sugieren que aquél sería utilizado repetidamente como template en la síntesis del segmento S del genoma viral.

Según este modelo, ocurriría una estrategia similar con la síntesis del segmento L RNA: el gen L (de polaridad negativa) que codifica para la polimerasa viral debería ser primeramente transcripto. El RNAm de la proteína L (polimerasa) posee la secuencia complementaria al gen L. En analogía con el segmento S, se ha detectado un intermediario replicativo (RNA complementario, anti-genómico) que serviría a la vez de template para la síntesis de L RNA genómico (replicación) y de molde para la transcripción de RNAm de la proteína Z. Se ha postulado un segundo modelo, según el cual existirían dos complejos conteniendo la polimerasa L, uno dedicado a la transcripción y otro a la replicación sin competir entre sí, utilizando un cebador con *cap* para la transcripción y un proceso de cebado y reordenamiento para la replicación del genoma viral. Ambos modelos no son mutuamente excluyentes.

Ha sido demostrada la actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA en la fracción RNP de extractos celulares infectados con virus LCM y Pichinde. Mediante *Western Blot* se demostró que la actividad de polimerasa de ambos virus estaba asociada a la presencia de la nucleoproteína N en extractos celulares pero no a altas concentraciones de la proteína L (polimerasa). Ambos estudios sugieren que la actividad enzimática disminuirá a medida que aumenta la concentración de la polimerasa en el curso de la infección. Este hecho paradójico, podría deberse a que en etapas tardías de la infección de cultivos celulares (24-48 h.), la acumulación de la proteína L alteraría la asociación con el complejo RNP y podría por ende disminuir la eficiencia del proceso de replicación-transcripción.

La síntesis *in vitro* de RNA viral promovida por la RNA polimerasa del virus LCM es 3 a 5 veces mayor para S que para el L RNA en extractos obtenidos durante las primeras 48 h., produciéndose paralelamente niveles algo menores de RNAm. La abrupta caída en la síntesis de los fragmentos genómicos S y L al cabo de las primeras 20 h. post-infección, comparada con la disminución mucho más lenta de la síntesis de los RNAm, sugeriría un desacople de los procesos de replicación y transcripción y podría reflejar cambios en la polimerasa, ya sea como consecuencia de su acumulación y/o por interacción con otra proteína viral o algún factor celular. Se ha postulado que la polimerasa viral participaría en la replicación de los RNA virales, en la síntesis de los RNAm y en la actividad de proteinquinasa, teniendo en este caso a la nucleoproteína como sustrato primario de dicha actividad.

Morfogénesis viral. Las proteínas N y L se asocian respectivamente a los fragmentos S y L de RNA viral, conformando estructuras de ribonucleoproteínas. La proteína Z interactuaría con L, promoviendo un cambio conformacional en ella que alteraría su capacidad de iniciar la replicación.

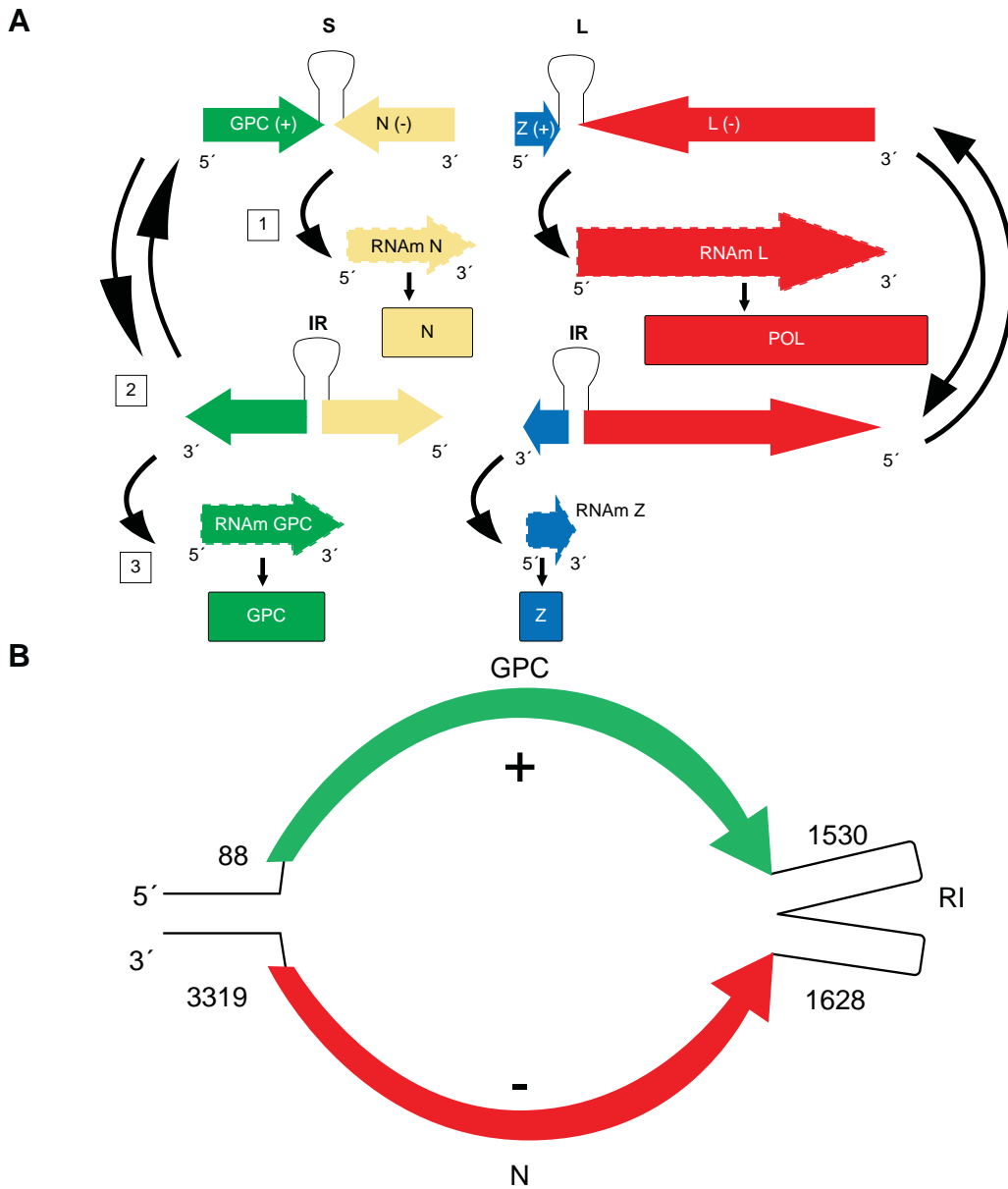


Figura 25.1.3. A. Modelo de replicación genómica de los arenavirus. GPC (+): gen codificante para la glicoproteína precursora (polaridad en el sentido del RNAm de GPC); RI: región intergénica; N (-): gen codificante para la nucleoproteína (polaridad negativa, complementaria al RNAm de N); Z (+): gen codificante para una proteína de matriz con un P.M. de 11 000 Da (también denominada p¹¹); L (-): gen codificante para la proteína L (RNA polimerasa). Replicación del segmento S: para que ocurra su síntesis es necesaria la transcripción del gen N (formación del RNAm de N) y la traducción de dicho mensajero (síntesis de la proteína N). Sólo entonces se sintetiza el RNA intermediario replicativo, que sirve de templado para la síntesis de RNAm de GPC y nuevas copias de RNA S. La codificación genómica anti-paralela se conoce como bisentido o *ambisense*. Este modelo podría ser también aplicado a la replicación y transcripción del segmento L. **B. Organización molecular del RNA S del virus Junín.** El RNA S forma un círculo cerrado mediante una estructura en asa, merced a la complementariedad de bases de los extremos 5' y 3'. Se indican con flechas las regiones codificadoras de la nucleoproteína (N) y de la glicoproteína precursora (GPC) de este RNA bisentido. La región intergénica (doble rulo) y los extremos 5' y 3' del RNA no están dibujados en escala. La numeración de nucleótidos comienza en el extremo 5' del RNA S en el sentido del genoma viral. Cortesía del Prof. Dr. Víctor Romanowski, Universidad Nacional de La Plata. Adaptado de la publicación: "The Arenaviridae" (Salvato M. Ed.). Serie "The Viruses" (Wagner R. y Fronkel Cornat, Eds.) Plenum Press, New York, 1993, cap. "Genetic organization of Junin virus, the etiologic agent of Argentine hemorrhagic fever".

La GPC es transportada hacia la superficie celular, donde ocurre la brotación celular. Las glicoproteínas maduras GP1 and GP2 se producen luego del clivaje de la GPC por la proteasa celular S1P/SK1 en el compartimiento de Golgi temprano. El ensamblado de las partículas virales ocurre en la membrana plasmática en el momento de brotar. Este evento es promovido por la proteína

de matriz Z, que interactúa con la región intergénica, reclutando al genoma y a los diversos componentes proteicos. Las proteínas celulares TSG101 (*Tumor Suppressor Gene 101*) y Nedd 4 que forman parte del sistema de direccionamiento vacuolar de proteínas (*Vacuolar Protein Sorting*) interactúan con Z reclutándola al sitio de ensamblado de los componentes virales, lo que

es requerido para la brotación de la progenie viral. Este proceso implicaría una compleja interacción entre las proteínas virales y diversas VPS, como TSG101, VPS4A y VPS4B. La brotación de los arenavirus desde dicha membrana no produce lisis celular. Estudios *in vitro* en cultivos primarios de células epiteliales diferenciadas polarizadas infectadas con diversas cepas de LCM indican que este virus egresa por el polo baso-lateral del epitelio respiratorio, coincidente con el polo de ingreso a dichas células. De ser este modelo válido, esta vía de egreso podría explicar la diseminación linfo-hemática observada con diversos arenavirus patógenos humanos.

2. BASES GENÉTICAS Y MOLECULARES DE LA PERSISTENCIA VIRAL

Diversos factores intervienen en la instalación y mantención de la infección persistente de los arenavirus en roedores. Ellos pueden ser agrupados teniendo en cuenta su origen (del hospedador o viral) y su efecto (interferir con el potencial replicativo del virus o evadir la respuesta inmune del hospedador). En los últimos años, se ha descubierto la fascinante trama de la génesis de la infección persistente por virus LCM, la que será abordada al final de este ítem.

Entre aquellos factores dependientes del hospedero merece especial atención la respuesta inmune frente al virus. Experimentalmente, se ha demostrado que la infección intrauterina o neonatal de ratones con virus LCM produce una infección persistente. Lo que en su momento fue considerado el ejemplo clásico de tolerancia inmunológica hacia un antígeno extraño que era reconocido como *propio*, ha sido conceptualmente modificado gracias al hallazgo de anticuerpos anti-antígenos de superficie de LCM, formando inmunocomplejos que se depositan en los glomérulos renales y que generan glomerulonefritis, y a la observación de que la supresión específica de la actividad de los linfocitos T citotóxicos es un fenómeno reversible y potencialmente modificable, mediante inmunización adoptiva con linfocitos T singéneos sensibilizados con el mismo antígeno. Ello implica que la falla habitual en la detección de anticuerpos libres o de linfocitos T citotóxicos obedecería a un fenómeno de enmascaramiento o agotamiento por el virus y no a una verdadera tolerancia.

También se ha observado la instalación de una infección persistente en ratones inoculados antes de las 24 hrs. de vida con virus Junín, la cual está asociada a infección de las células tímicas. El papel crucial de los linfocitos T en el curso de la infección ha quedado firmemente establecido cuando se estudiaron ratones congénitamente atímicos (*nude*) inoculados con virus Junín. En ellos se observó la persistencia del virus en encéfalo, en ausencia de lesiones hasta por lo menos 6 meses luego de la infección (Figura 25.1.4).

Estos ratones son principalmente deficientes en la población de linfocitos T CD4⁺. Ello permitió postular que un defecto cuali- o cuantitativo de dicha subpoblación podría participar en la instalación y/o mantención de la infección persistente en su reservorio natural.

De hecho, los ratones *nude* -infectados previamente con Junín- que reciben inmunización adoptiva con linfocitos T singéneos reproducen el cuadro neurológico mortal (Véase también la figura 25.1.12) que promueve el virus en los ratones lactantes inmunocompetentes infectados experimentalmente.

Con relación al virus deben tenerse en cuenta distintos factores: 1) producción de partículas interferentes defectivas; 2) expresión disminuida de glicoproteínas sobre la superficie celular; 3) síntesis de nuevos (diferentes) RNA virales durante la infección persistente 4) replicación viral disminuida; 5) cambios en la actividad de la RNA polimerasa.

En general, la producción de partículas defectivas tiende a disminuir el potencial lítico de los virus, ya que interfieren específicamente con la multiplicación de virus homólogos. Aunque los arenavirus no son citolíticos *per se*, estas partículas estarían posi-

blemente involucradas en la infección persistente de ratones con virus LCM. Las mismas han sido documentadas, pero su caracterización molecular es todavía incompleta.

El modelo de replicación viral propuesto para los arenavirus lleva implícito una regulación independiente de la síntesis de la nucleoproteína N y de la glicoproteína precursora GPC. Teniendo en cuenta que se ha observado una menor expresión de las glicoproteínas virales en la superficie de la membrana citoplasmática de células de ratones persistentemente infectados con virus LCM, se ha postulado que su expresión disminuida constituiría un mecanismo de escape a la vigilancia inmunológica del hospedador, ya que así no podría reconocer las células infectadas. Sin embargo, el descubrimiento de RNAm para la glicoproteína precursora en dichas células indica también un potencial mecanismo de regulación post-transcripcional en la infección persistente de dicho modelo experimental. De hecho, el examen inmunohistoquímico de neuronas de ratones persistentemente infectados con LCM sólo revela antígenos virales asociados a los ribosomas, pero no en la superficie de la membrana celular.

Recientemente, se ha detectado que ratones experimentalmente infectados al nacer con LCM y que desarrollan una infección persistente exhiben una compleja población de RNAs de tamaño heterogéneo en múltiples tejidos, además de los segmentos S y L, y de los RNAm para N y GPC. Se desconoce si estos noveles RNAs presentes en la infección persistente pero no en la aguda, son causa o consecuencia de dicha persistencia. Actualmente, se investiga si la producción de estos noveles RNAs así como la replicación viral disminuida observada en las etapas tardías de la infección con virus LCM está regulada o no por cambios en la actividad de la RNA polimerasa viral.

La infección experimental de ratones lactantes con el virus LCM ha permitido descubrir el fascinante modo en que el mismo promueve la infección persistente en dicho hospedador. Ahmed y colaboradores documentaron que poco después de transcurrida la etapa aguda de la infección en el ratón lactante (que evoluciona a la persistencia), existen en el cerebro y en el bazo de los ratones dos poblaciones de virus diferentes que fueron subsiguientemente clonadas: en la primera, las variantes detectadas inducen una adecuada respuesta de LT CD8⁺, que limita la infección a la etapa aguda en dicho órgano (sin persistencia). A esta población se la denominó CD8⁺P⁻. Como contrapartida, a la población viral detectada en la pulpa blanca del bazo, que no promueve una respuesta de LT CD8⁺, y que evoluciona a la persistencia se la designó CD8⁺P⁺. Secuenciados ambos clones virales, se documentó que existía un único aa de diferencia en el gen de la envoltura viral (GPC). Ello permitió descubrir mediante experimentos de inmunoprecipitación que la GPC de los clones CD8⁺P⁺ interactúan con la proteína α distroglicano, presente en alta concentración en las células dendríticas. Estas variantes se unen a dicho receptor con una afinidad 4 o 5 veces superior a la del ligando específico, la laminina, y unas 2 a 2,5 veces la de las variantes CD8⁺P⁻. Ello permite al virus CD8⁺P⁺ (pero no al CD8⁺P⁻) desplazar a la laminina del receptor α distroglicano. La infección de las células dendríticas, promueve una alteración funcional de las mismas, las que crean un microambiente con elevado contenido de IL-10, que facilita la persistencia y coadyuva a la inactividad funcional de los LT CD8⁺. Más aún, se ha observado que la interacción entre la célula dendrítica y los CD8⁺ culmina con el agotamiento de éstos, a través de la interacción entre la proteína de muerte expresada en la superficie de los LT y su ligando específico expresado en las células dendríticas (PD-1 y PD-L1, respectivamente). En otros términos, un cambio sutil en la envoltura viral, es responsable de la promoción de la infección persistente en este modelo experimental. Dado que la administración de anticuerpos monoclonales anti-receptor para IL-10 limita la infección persistente, (así como lo haría un inhibidor de la interacción PD-1 / PD-L1), esta nueva vía regulatoria de las infecciones virales, emerge como una potencial y poderosísima herramienta a ser utilizada con fines terapéuticos en otras infecciones persistentes, tales como las producidas por HIV, HBV o HCV, entre otras.

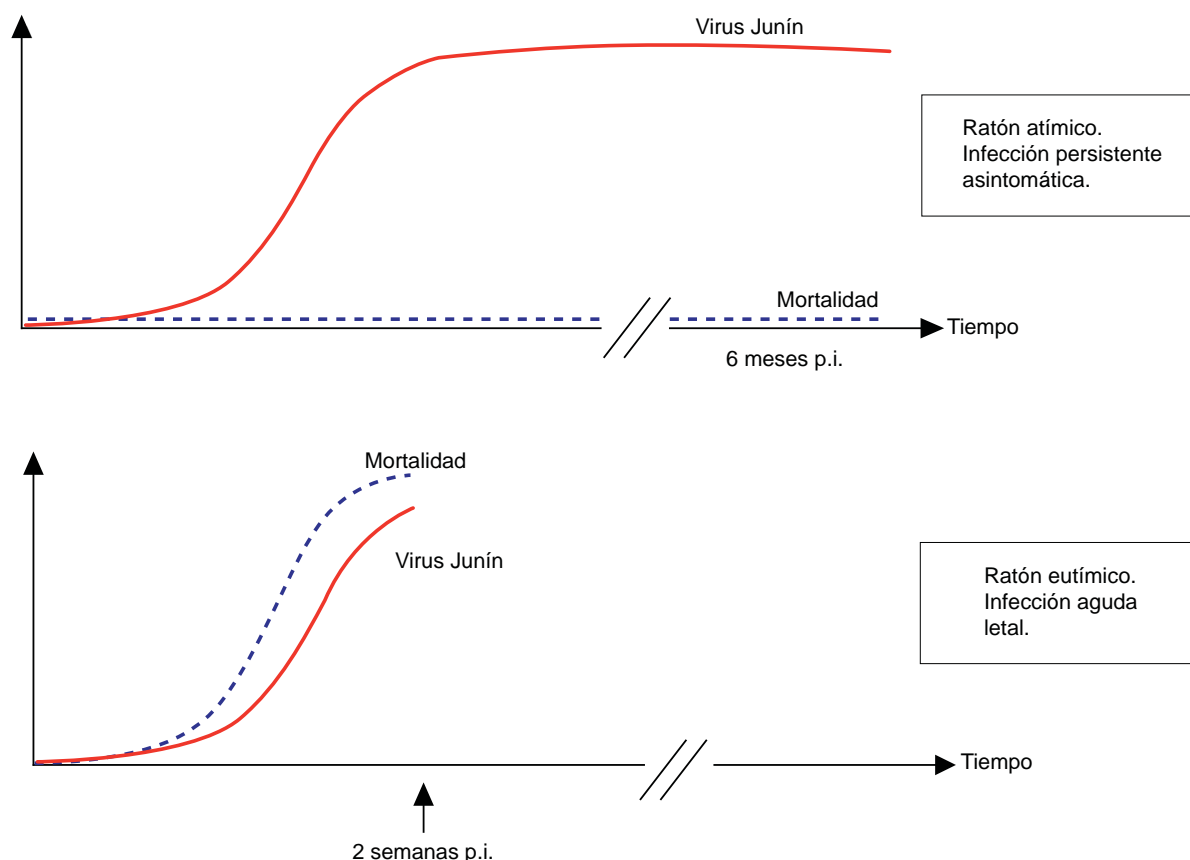


Figura 25.1.4. Evolución de la infección con virus Junín en ratones lactantes atímicos (*nude*) y en eutímicos. La respuesta inmune celular es responsable de la muerte de los animales inmunocompetentes, mientras que su ausencia posibilita la instalación de la infección persistente en los atímicos.

3. ARENAVIRUS DEL NUEVO MUNDO O COMPLEJO TACARIBE

Todos los arenavirus del complejo Tacaribe han sido aislados de roedores de América. Estos virus producen infecciones persistentes en roedores silvestres, siendo una excepción el virus Tacaribe, que fue aislado de murciélagos, aunque aún se desconoce si existe también un reservorio roedor. Se considerará con mayor detalle a la infección producida por el virus Junín, agente de la fiebre hemorrágica argentina, haciéndose una breve referencia a las infecciones producidas por los virus Machupo, agente de la fiebre hemorrágica boliviana, Guanarito, agente de la fiebre hemorrágica venezolana, Sabiá, agente de la fiebre hemorrágica de Brasil, y algunos de los datos más salientes de la infección por otros arenavirus patógenos para el hombre descubiertos muy recientemente.

3.1 VIRUS JUNÍN: FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA (FHA)

3.1.1 Introducción

La FHA es una enfermedad endemo-epidémica que afecta principalmente a trabajadores rurales de una de las zonas agrícola-ganaderas más importantes de Argentina: la pampa húmeda.

Reseña histórica. Los primeros registros de la enfermedad (por entonces desconocida como entidad nosológica definida) se remontan probablemente a 1943, donde en el Htal. "Julio de Vedia" de la localidad de 9 de Julio (Noroeste de la provincia de Buenos Aires), se observó una inusual epidemia de "gripe" con elevados registros térmicos, asociada a un 60% de mortalidad. A esta enfermedad se la conoció por esos años simplemente como "la fiebre". Fue recién mediante la descripción del médico de Bragado Rodolfo Arribáizaga, que se conoció en 1955 una descripción clínica completa de la enfermedad. Fue considerada un problema de Salud

Pública por las autoridades nacionales y provinciales en 1958, a raíz de una grave epidemia que ocurrió ese año en la localidad de O'Higgins (partido de Chacabuco, Pcia. de Buenos Aires), enfermado principalmente a trabajadores rurales, afectados a la cosecha del maíz. De allí que a esta enfermedad también se la conoció como mal de O'Higgins, "gripón", fiebre hemorrágica argentina o mal de los rastrojos (conjunto de restos de tallos y hojas que quedan en el terreno tras cortar el cultivo).

El virus Junín, agente etiológico de esta enfermedad, fue aislado en Buenos Aires en 1958 por dos grupos de investigadores argentinos dirigidos por los Dres. Armando S. Parodi (Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires) y (subsiguientemente) Ignacio Pirotsky (Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán"). Los primeros aislamientos se realizaron a partir de sangre y órganos de pacientes fallecidos en la localidad de Junín, Pcia. de Buenos Aires, de donde proviene el nombre asignado a este virus.

Inicialmente, el área endémica abarcaba las localidades de Junín, Gral. Viamonte, Chacabuco, Alberti, Bragado, Nueve de Julio y Rojas, alcanzando una superficie de 16.274 km² y una población potencialmente expuesta de 268.049 habitantes

En 1961 se reconoció a la fiebre hemorrágica argentina como una enfermedad profesional de los trabajadores agropecuarios (decreto 4894 del 21 de junio de 1961).

En los años siguientes, el virus pudo ser aislado de roedores silvestres persistentemente infectados (géneros *Calomys* y *Akodon*) capturados en áreas endémicas de la pampa húmeda. Posteriormente, se realizaron numerosos estudios que permitieron conocer las características de la enfermedad, su patogenia en animales de experimentación y en el hombre, etc. Estos estudios culminaron entre 1970 y 1990, con el desarrollo del tratamiento específico y,

posteriormente, de una vacuna para prevenir la enfermedad, la que actualmente se produce en el país.

Características generales. Habitualmente, la infección del ser humano con cepas salvajes produce enfermedad clínica (formas leves, moderadas o graves y aún mortales). La mortalidad sin tratamiento específico es alta: 15-20 %. Sin embargo, también existen infecciones inaparentes o subclínicas, las que se han detectado en áreas endémicas (2-4% de los pobladores) o en accidentes de laboratorio (20% de los casos). Estas infecciones subclínicas se documentan mediante la detección de anticuerpos específicos en ausencia de enfermedad. Se desconoce si las infecciones subclínicas en áreas endémicas se deben a cepas de menor virulencia o a otros factores.

El virus Junín puede producir infecciones persistentes en roedores silvestres y animales de experimentación (ratones, cobayos, ratas, ratones congénitamente atímicos, etc.) así como también en cultivos celulares, pero no se las ha observado en el ser humano.

3.1.2 Puerta de entrada

El virus Junín penetra al organismo humano por vía cutáneo-mucosa a través de escoriaciones en la piel (frecuentes en trabajadores rurales) o por mucosa conjuntival, oral o nasal por inhalación de aerosoles contaminados con virus, producidos durante la cosecha manual o mecánica.

La principal fuente de contagio son las secreciones (orina y saliva) de roedores persistentemente infectados (*Calomys musculus*, *Akodon azarae* y otros) que contaminan pastos y rastrojos en las áreas endémicas. La transmisión interhumana es de mínima importancia aunque se han registrado escasos casos excepcionales entre parejas.

En el laboratorio es posible contraer la infección accidentalmente por vía cutánea o mucosa, como consecuencia de accidentes al manipular animales infectados sin la adecuada protección, aspirar con la boca suspensiones de virus contenidas en pipetas (práctica que no debe realizarse al existir propipetas) o inhalar aerosoles infectados. Muchas de estas infecciones fueron graves y se registraron casos mortales antes de que se adoptaran rigurosas medidas de bioseguridad en el trabajo del laboratorio y se conociera el tratamiento específico para la enfermedad. En la clasificación actual de agentes patógenos, el virus Junín está ubicado entre los que se clasifican en la categoría IV (los más peligrosos) y por ello solamente debe ser manipulado bajo normas de máxima bioseguridad (nivel 4; véase el Capítulo 57 *Bioseguridad*)

3.1.3 Características del virus Junín

El virus Junín comparte las principales características de la familia *Arenaviridae*. Los viriones son ovales o pleomórficos de 50 - 200 nm y contienen un número variable de gránulos de aspecto ribosomal (Figura 25.1.1A). Posee una envoltura lipoproteica que adquiere al brotar de la célula. En la envoltura se encuentran importantes glicoproteínas antigénicas.

Genoma. El genoma consiste en dos especies de RNA monocatenario de 33 S (segmento L) y de 25 S (segmento S). Sus pesos moleculares son de $2,4 \times 10^6$ y $1,3 \times 10^6$, respectivamente. Al igual que otros arenavirus contiene proporciones variables de RNA de 28, 18 y 2 - 6 S de origen celular (ribosomas y RNA de transferencia).

El S RNA (de la cepa MC-2 de virus Junín) consta de 3 400 nucleótidos. Al igual que en otros arenavirus se han detectado dos marcos abiertos de lectura que codifican para la nucleoproteína y la glicoproteína precursora en sentido antiparalelo (estrategia bisentido o *ambisense*).

El gen N (de polaridad negativa) consta de 1 692 nucleótidos y codifica en la secuencia viral complementaria una proteína de 564 aminoácidos. Existe significativa similitud en dicha secuencia aminoacídica entre Junín y Tacaribe.

El gen GPC codifica para la glicoproteína precursora en el sentido del genoma viral (polaridad positiva). El peso molecular esti-

mado de la GPC es de 55 123 Da, el cual es menor que los 72kDa determinados mediante su análisis electroforético. Esa diferencia es atribuida a la glicosilación cotraduccional de dicho polipéptido precursor.

Se ha observado elevado grado de homología entre los extremos carboxi-terminales (correspondientes a la GP2) de la GPC de los diferentes arenavirus hasta ahora estudiados, mientras que existe divergencia en el extremo amino-terminal correspondiente a la GP1. Sin embargo, la comparación del extremo amino-terminal de los virus Tacaribe y Junín, muestra una región de alta homología que se extiende durante los primeros 40 aminoácidos con sólo 5 sustituciones.

Al igual que en otros arenavirus, se ha detectado que los extremos 3' y 5' de S RNA de Junín son complementarios, por lo que producen una estructura secundaria parcialmente bicatenaria.

Asimismo, la región que separa los genes N y GPC adopta una configuración en doble rulo (doble U invertida) muy estable, separados por una bisagra de 3 nucleótidos.

Asimismo, se ha documentado al igual que en otros arenavirus que el fragmento L de RNA codifica en sentido opuesto las proteínas Z y L (polaridad de mensajero para Z en el extremo 5' y anti-mensajero para L en el extremo 3').

El análisis nucleotídico del fragmento L de la cepa Candid # 1 vacunal y de la cepa patógena XJ 13, reveló la presencia de 12 mutaciones en el gen L, pero ninguna en Z. Seis de las mutaciones nucleotídicas determinaron cambios aminoacídicos en la polimerasa viral. Estos cambios aminoacídicos, junto a otros 6 documentados en la región codificante de la GPC en el fragmento S (4 en G1 y 2 en G2), son actualmente considerados como los potenciales responsables de la atenuación de la cepa vacunal. Respecto a dicha atenuación, se desconoce la significación de la variabilidad nucleotídica observada en la región 5' no codificante del fragmento S de la cepa vacunal Candid # 1 respecto a la secuencia de las cepas patógenas.

Proteínas. El genoma del virus Junín codifica las 4 proteínas observadas en otros arenavirus: la nucleoproteína N, la glicoproteína precursora GPC de envoltura (de la que derivan G1 y G2 por clivaje proteolítico post-traducciona), la proteína Z y la polimerasa L. La denominación de G1 en el caso de virus Junín no corresponde —como la GP1 de otros arenavirus— a un mayor peso molecular, sino a sus propiedades biológicas y funcionales. G1 es la responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes. Junto con la glicoproteína G2 y el péptido señal estable de 58 aa (SSP) forman un complejo trimérico unido en forma no covalente en la envoltura viral. Este complejo forma las espículas del virus, protruyendo unos 5-10 nm desde la superficie. El dominio transmembrana de G2 mantiene al complejo trimérico anclado a la envoltura. A su vez, SSP es importante para la funcionalidad de G2, dado que su remoción impide la fusión célula-célula pH dependiente. Este péptido señal también influiría el direccionamiento (tráfico) del complejo trimérico a los *rafts* lipídicos de colesterol y esfingolípidos apropiados de la membrana celular (dominios especializados de la membrana ricos en dichos lípidos y proteínas) que funcionan como plataformas para la interacción proteína-proteína y para el ensamblado macromolecular.

Las proteínas L y Z funcionan como RNA polimerasa-RNA dependiente y como proteína de matriz, respectivamente.

Relaciones antigénicas. El virus Junín cruza serológicamente con otros integrantes del complejo Tacaribe en las reacciones de fijación de complemento y de inmunofluorescencia. La relación es más estrecha con el virus Tacaribe, con el cual comparte al menos un epítopo de la glicoproteína de envoltura. Tacaribe parecería no ser patógeno para el hombre (hay un solo caso registrado con discreto compromiso neurológico) ni para cobayos o marmosets. Por el contrario, la infección inaparente de estos animales induce protección completa y duradera contra el desafío con Junín. Por estas razones el virus Tacaribe fue propuesto como posible vacuna heteróloga para la fiebre hemorrágica argentina.

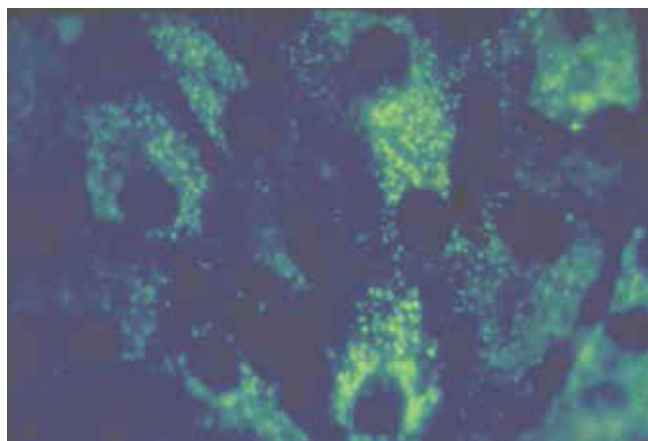


Figura 25.1.5. Diagnóstico serológico de fiebre hemorrágica argentina mediante inmunofluorescencia indirecta. Células BHK-21 persistentemente infectadas con virus Junín expresan antígenos virales en forma de gránulos intracitoplasmáticos. El revelado de la reacción inicial entre antígenos de Junín y el suero del paciente en el que se investiga la presencia de anticuerpos anti-Junín se realiza mediante la subsiguiente incubación con suero anti-Igs totales marcado con fluoresceína (x 400).

Un estudio colaborativo entre los grupos dirigidos por las Dras. Elsa B. Damonte y María T. Franze Fernández, documentó que al inocular experimentalmente a cobayos con dos dosis de virus vaccinia recombinante conteniendo la glicoproteína precursora de Tacaribe (pero no con su nucleoproteína), se genera protección cruzada anti-Junín en el 50% de los animales desafiados subsiguientemente con este virus, aun en presencia de bajos o nulos títulos de anticuerpos neutralizantes anti-Junín. Cuando se administraron dos dosis de la glicoproteína precursora de Junín expresada en el contexto del virus vaccinia recombinante, dicha protección ascendió al 72%, aun cuando los títulos de anticuerpos anti-Junín también fueron de escasa cuantía o estuvieron ausentes. Estos resultados sugieren que una respuesta protectora mediada por células citotóxicas CD8⁺ o por una respuesta B de memoria, que aceleraría la generación de anticuerpos anti-glicoproteína de Junín ante el desafío con la cepa salvaje de éste, serían responsables de la protección conferida por el virus Vaccinia recombinante que expresa la GPC homóloga (de Junín) o heteróloga (de Tacaribe) frente al desafío posterior de los cobayos con una cepa patógena de virus Junín, evitando la muerte en un porcentaje significativo de éstos.

Por el contrario, las reacciones cruzadas entre Junín y los arnavirus del viejo mundo son muy débiles. Sin embargo, a pesar de la distancia antigénica, Junín y LCM pueden interactuar y experimentalmente se han obtenido recombinantes *in vitro*.

Aislamiento. El virus Junín replica en animales de experimentación (cobayos, ratones lactantes, ratas, *marmosets* y primates) y en varios cultivos celulares. En ratones lactantes produce una encefalomiелitis mortal a los 7 - 14 días post-inoculación y en cobayos (dependiendo de la cepa viral) induce una enfermedad hemorrágica letal, similar a la del ser humano, aunque habitualmente sin compromiso del SNC. Estos dos hospederos se utilizaban habitualmente para el diagnóstico de certeza por aislamiento viral, a partir de sangre de pacientes ó de roedores infectados en la naturaleza (actualmente se tiende a reemplazar este procedimiento por técnicas que detectan el genoma viral con adecuada sensibilidad como la RT-PCR).

Si bien el virus Junín replica en diversas líneas celulares sólo produce ACP en células Vero y en MRC-5, donde también es posible detectarlo por técnicas de plaqueo bajo agarosa. La ACP es de aparición lenta y progresiva y consiste en focos de células redondeadas

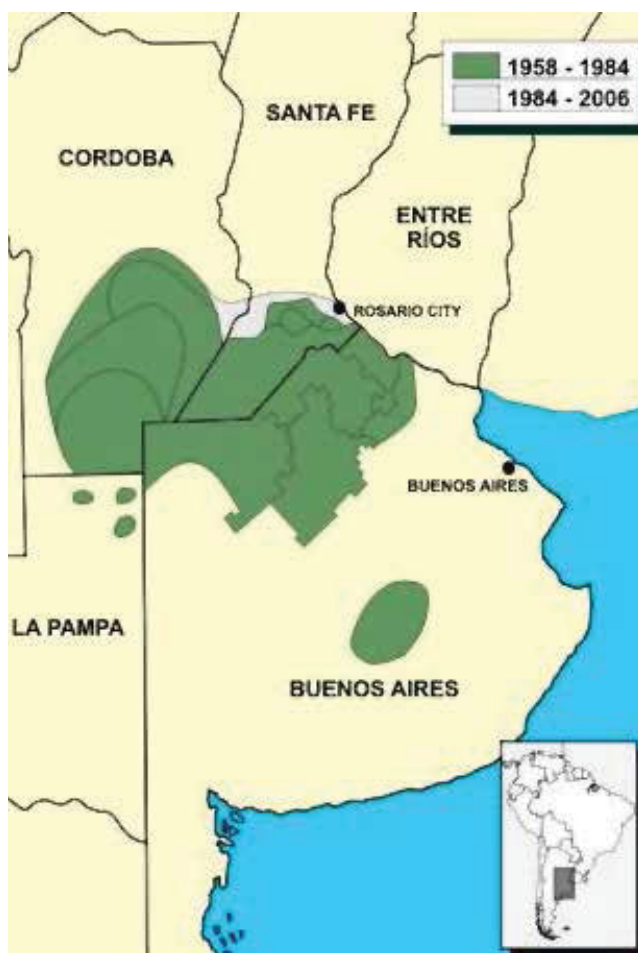


Figura 25.1.6. Área endémica de la fiebre hemorrágica argentina. Reproducido con autorización. (Enría DA *et al*; *Antivir Res* 78:132-9, 2008).

que se desprenden de la monocapa. En las infecciones en cultivos pueden producirse dos tipos de partículas: las completas, que inducen ACP en otros cultivos y son sensibles a la luz ultravioleta y otras que son resistentes y se denominan partículas defectivas. La síntesis de estas últimas se favorece con altas multiplicidades de infección. La función de las partículas defectivas parece ser la de modular la aparición de ACP y se ha sugerido que intervienen en el mantenimiento de las infecciones persistentes *in vitro*.

El virus Junín puede producir *in vitro* infecciones persistentes en líneas celulares. Por ejemplo, una sublínea de células BHK-21, persistentemente infectada se ha empleado para el diagnóstico serológico de fiebre hemorrágica argentina mediante inmunofluorescencia indirecta. (Figura 25.1.5)

3.1.4 Área endémica y Epidemiología

Como se mencionó anteriormente (ítem 3.1.1), en la década de 1950 el área afectada superaba los 16 000 km² y la población potencialmente expuesta alcanzaba los 268 049 habitantes del noroeste de la Pcia. de Buenos Aires. Desde entonces, esta superficie se expandió a las Pcias. de Córdoba, Santa Fe y La Pampa, incrementándose la misma (desde 1963 hasta 1975) 5 veces. Actualmente, abarca una superficie de 150 000 km², con una población a riesgo estimada en 5 000 000 de habitantes (Figura 25.1.6).

Se han registrado brotes epidémicos cada año, sin interrupción desde 1958, notificándose entre 300 y 3 000 casos anuales (Figura 25.1.7).

La FHA presenta una incidencia estacional, con un pico en otoño (abril, mayo, junio) que coincide con las cosechas de maíz y

sorgo; dicha incidencia está a su vez relacionada con el aumento en la densidad de roedores, lo que favorece el contacto del trabajador rural con los reservorios infectados. La mayor incidencia en trabajadores rurales, varones de 20 - 40 años, es debida a una mayor exposición al virus por la índole de las tareas agrícolas.

Dentro de las áreas endémicas, existen variaciones en la incidencia de la enfermedad de año a año, de acuerdo a las zonas. También se han observado variaciones en la incidencia global de esta enfermedad que fue mayor durante los primeros 15 años desde su aparición, registrándose una significativa disminución en las subsiguientes décadas, pero más pronunciadamente desde la institución de la vacunación con Candid # 1.

En áreas endémicas las especies de roedores que se han capturado persistentemente infectadas son: *Calomys musculinus* (28%) –principal reservorio–, *Calomys laucha* (20 %) y en menor proporción *Akodon azarae* y *Mus musculus* (Figura 25.1.8).

Sin embargo, en zonas alejadas del área conocida como endémica, también se han capturado roedores infectados. En 1983 en Pila, Pcia. de Buenos Aires, se capturaron *Akodon* infectados y se demostraron infecciones subclínicas en pobladores que no habían abandonado esa zona en ocasión alguna. Otras encuestas serológicas demostraron que las infecciones inaparentes o subclínicas ocurren en el 4% de los residentes de las áreas endémicas, mientras que el 96 % restante de la población continúa susceptible. Las causas de estas infecciones inaparentes se desconocen, aunque debe tenerse en cuenta que las oportunidades para la transmisión del virus pueden cambiar. Por ejemplo, en las epidemias iniciales, la enfermedad afectaba a trabajadores en la cosecha de maíz. Coincidentemente, los campos de maíz presentaban mayor densidad de roedores reservorios que los campos de soja u otros cereales.

De allí que se postulara la necesidad de favorecer el cultivo rotativo de soja y girasol para contribuir a un control ecológico de la fiebre hemorrágica.

Sin embargo, son muchos los factores que deben tenerse en cuenta. Por ejemplo, además del principal reservorio (*Calomys musculinus*), existen otros que, o bien están infectados en la naturaleza (*Akodon azarae*), o bien pueden serlo potencialmente ya que se ha demostrado infección experimental en ellos (*Akodon molinae*, *Calomys callidus*, etc.). Esto significa que hipotéticamente, el área endémica actual podría extenderse a otras áreas cuando ocurran cambios en los cultivos u otros factores climatológicos que favorezcan el aumento de roedores reservorios y se facilite la exposición del hombre a los mismos. Los roedores se reproducen desde los meses de primavera hasta principios de otoño. La mayor densidad de los mismos se registra a fines de verano y otoño (época de cosechas), decayendo en invierno debido a las heladas y a la falta de cobertura vegetal.

La actividad agrícola puede modificar la cantidad de roedores. En zonas endémicas donde se habían realizado cultivos intensivos de maíz se demostró un aumento de la densidad de *Calomys* y disminución de los sistemas ecológicos de control de los mismos, tales como especies predatoras (aves, mamíferos silvestres) y otros roedores competidores. Debido a esto, se ha sugerido la rotación de los cultivos y el pastoreo intensivo de los campos antes del cultivo, como un método para disminuir la cantidad de *Calomys musculinus*.

3.1.5 La enfermedad humana

La FHA es una enfermedad endemo-epidémica que ataca preferentemente a varones en la edad media de la vida. Presenta una amplia variación en cuanto a su gravedad, ya que pueden observarse desde infecciones inaparentes hasta formas leves, moderadas, graves y aún mortales.

La infección con virus Junín conduce generalmente –luego de un período incubación de 6 - 14 días– a una enfermedad clínica caracterizada por un síndrome febril, diátesis hemorrágica, leuco-plaquetopenia y compromiso variable del SNC. **La mayoría de los pacientes se cura, pero un 15 - 20% de los casos no tratados son fatales**, siendo habitual en estos pacientes un notorio compromiso del SNC.

La enfermedad exhibe tres fases: prodrómica, neurológica-hemorrágica y de convalecencia.

La fase prodrómica es insidiosa, y se extiende una semana luego de iniciados los síntomas. Incluye fiebre (38-39°C), cefalea, malestar, escalofríos, dolor retroorbitario, fotofobia, congestión de la conjuntiva ocular y edema periorbitario, rubicundez de facies, cuello y tórax superior, mialgias, dolor epigástrico, con mareos, náuseas o vómitos, constipación o leve diarrea. En el paladar blando, es habitual la presencia de enantema petequeal y con pequeñas vesículas. Las encías están congestionadas y pueden sangrar a la presión leve. Es característica la presencia de petequias cutáneas en el tórax superior, las regiones axilares y los brazos. Los pacientes exhiben adenomegalias cervicales. Hacia el final del período se observa un fino temblor de manos y lengua; pudiendo observarse a los enfermos en estado de irritabilidad o letargia. Raramente, se documenta hepatoesplenomegalia y/o ictericia.

La fase hemorrágica-neurológica se observa en un 20 - 30% de los pacientes al cabo de 8 - 12 días de comenzados los síntomas. Las hemorragias y la afectación del SNC son severas. Se observa hematemesis, melena, epistaxis, hemoptisis, hematuria y metrorragia. El compromiso neurológico comienza con un estado confusional, ataxia, irritabilidad y temblores, seguido de delirio, convulsiones y coma. La insuficiencia renal aguda se observa sólo en los casos terminales, luego de un período prolongado de shock que conduce a la necrosis tubular aguda. La inmunodepresión transitoria favorece la sobreinfección bacteriana, que puede causar neumonías o sepsis.

La fase de convalecencia se prolonga por 1 - 3 meses. Los pacientes exhiben irritabilidad, astenia muy ostensible, trastornos mnésicos, y caída del cabello. Luego de un período asintomático, aproximadamente un 10% de los pacientes a quienes se les administra plasma inmune de convaleciente desarrolla un síndrome neurológico tardío, caracterizado por fiebre, signos cerebelosos (ataxia) y parálisis de diversos pares craneales.

Las formas clínicas pueden ser: abortivas (2 %), leves (20 %), comunes (70 %), graves (5 %) o mixtas (3 %). Las formas abortivas presentan escasas manifestaciones clínicas; las leves presentan cuadros atenuados; las formas comunes, que son la mayoría, pueden calificarse como *tíficas comunes*, *tíficas vasculares* o *tíficas nerviosas*. Las formas graves pueden ser hemorrágicas, neurológicas o mixtas.

En la forma clínica común las características habituales son: período de incubación de una a dos semanas; período de invasión con fiebre, cefaleas, decaimiento y dolor retro-ocular; período de estado en el que se añaden a lo ya mencionado, petequias en piel, enantema bucofaringeo y conjuntival, hemorragias gingivales e inestabilidad de la marcha y facies de ebrio. Existe importante leuco-plaquetopenia y células redondas en orina (células de Milani). Posteriormente, se agregan manifestaciones hemorrágicas o neurológicas de diversa intensidad.

De acuerdo a su evolución, las formas clínicas pueden clasificarse en: a) aguda con recuperación a las 2 - 3 semanas; b) aguda que conduce a la muerte en 2 - 3 semanas; c) aguda con recuperación y reaparición de un síndrome neurológico tardío a las 4-6 semanas (forma a *doble onda*) que habitualmente no es letal, aunque puede ser grave.

3.1.6 Diagnóstico

La sospecha de fiebre hemorrágica se sustenta en un trípede epidemiológico, clínico y de laboratorio. El diagnóstico presuntivo debe plantearse ante un paciente con antecedentes epidemiológicos (trabajador rural o concurrente al área endémica en época de brotes epidémicos) que presenta fiebre, cefaleas, dolor retro-ocular, astenia y presenta leuco-plaquetopenia y células redondas en orina.

El diagnóstico de certeza se obtiene mediante el aislamiento del virus o detección de su genoma a partir de la sangre en período agudo, ó la detección de IgM específica o bien a través de la conversión serológica en muestras pareadas de suero. En órganos obte-

nidos en autopsia también pueden emplearse los métodos directos (Tabla 25.1.3, Figura 25.1.9).

Métodos Directos:

Aislamiento e identificación. El aislamiento puede realizarse en células Vero donde el virus producirá ACP al cabo de 1 - 2 semanas o bien en animales sensibles a la infección, como los ratones lactantes que desarrollarán cuadros neurológicos o los cobayos que desarrollarán cuadros hemorrágicos similares a la enfermedad humana.

El aislamiento puede demorar hasta 2 semanas. En todos los casos es indispensable identificar el virus aislado, lo cual puede realizarse mediante neutralización —que demorará 1-2 semanas más—, o por técnicas rápidas como la inmunofluorescencia sobre células o cortes de tejidos infectados, lo que puede insumir varias horas.

Dado el bajo título de virus Junín en la etapa precoz de la infección (cuando debe instituirse el tratamiento específico con plasma inmune), la sensibilidad del aislamiento oscila alrededor del 60%. Dicho valor, puede incrementarse significativamente hasta un 90% mediante el cocultivo de linfo-mononucleares de sangre periférica del paciente con células Vero. Sin embargo, dada la laboriosidad requerida para su implementación, esta técnica no es utilizada rutinariamente.

La detección de antígenos de virus Junín circulantes en sangre periférica mediante ELISA no tiene suficiente sensibilidad, por lo que no se utiliza esta técnica.

Detección del RNA del virus Junín. Se ha desarrollado una RT-PCR para lograr un diagnóstico rápido de la infección. La muestra clínica de elección es la sangre. Mediante un procedimiento desarrollado por Víctor Romanowski y colaboradores, se ha observado una sensibilidad del 98% asociada a una alta especificidad. Esta técnica permite detectar 0,01 UFP/200µl de muestra de sangre entera, o la presencia de una única célula infectada entre 10⁴ no infectadas.

La muestra a remitir al laboratorio consiste en 2,5 ml de sangre entera anti-coagulada mezclada con igual volumen de una solución de disrupción 8M de isotiocianato de guanidinio (GTC: un agente caotrópico que permite la rápida inactivación de ribonucleasas, aumentando la sensibilidad).

El procedimiento consiste en la obtención del RNA a partir de la muestra de sangre entera-GTC mediante extracción con fenol ácido - cloroformo, seguido de *n*-butanol, posterior precipitación con etanol y resuspensión en agua estéril libre de ribonucleasas.

La utilización de GTC inactiva la infectividad viral, por lo que es posible el transporte de la muestra (aun a distancia) conteniendo dicho agente para minimizar los riesgos de accidente.

Una vez obtenido el RNA, la RT-PCR amplifica la región específica hacia la que están dirigidos los cebadores (fragmento S) obteniéndose las bandas correspondientes al tamaño esperado, que son visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio y transiluminadas con luz UV. Este procedimiento requiere pocas horas para obtener el resultado.

Métodos Indirectos: La detección de IgM específica puede investigarse por IFI en sueros de período agudo. La conversión serológica requiere dos muestras pareadas de suero, una obtenida en el período agudo y otra en el de convalecencia (14 - 21 días después). Los anticuerpos pueden detectarse mediante neutralización (Nt), inmunofluorescencia indirecta (IFI) o ELISA (Figura 25.1.9).

3.1.7 Patogenia

Se asume que la mayoría de los casos de FHA resultan de la inhalación de virus Junín contenido en material de roedores infectados. También es posible el ingreso del virus mediante accidentes percutáneos con rastrosos contaminados con fluidos infectados de los roedores. El virus puede replicar inicialmente en pulmones, con posterior diseminación sistémica a otros tejidos / órganos. El virus Junín replica en endotelio vascular, bazo, médula ósea y otros órganos linfohematopoyéticos e hígado. La viremia es prolongada

superponiéndose al período febril. En los casos mortales se pueden observar en la autopsia hemorragias generalizadas, hipoplasia de médula ósea, hiperplasia reticular en ganglios, necrosis hepática con cuerpos acidófilos, necrosis papilar y tubular con hemorragias en riñón, y miocarditis. Salvo los cuerpos acidófilos, estas lesiones no son específicas de infección viral.

En la mitad de los casos, aproximadamente, los pulmones exhiben sobreinfección bacteriana secundaria, dando origen a neumonías lobares o abscesos. El tejido hematopoyético está intensamente afectado; allí coexisten altos títulos de virus, necrosis linfoidea e inhibición aguda transitoria de la hematopoyesis, la cual afecta principalmente a las plaquetas y granulocitos. En los pacientes que evolucionan a la curación hay recuperación de la función medular.

La hemorragia es el resultado de la trombocitopenia (defecto cuantitativo), y de un anormal funcionamiento de las plaquetas (defecto cualitativo inducido por un factor plasmático). Existen alteraciones de la hemostasia tales como la prolongación del tiempo parcial de tromboplastina activada (KPTT), y bajos niveles de los factores VIII, IX y plasminógeno. Los niveles elevados del factor von Willebrand son consecuencia de la afectación de las células endoteliales.

Con la excepción de las lesiones del tejido hematopoyético, las alteraciones descritas parecerían ser secundarias a las lesiones capilares generalizadas, a las hemorragias, las sobreinfecciones bacterianas y/o al consiguiente estado de choque.

Los estudios de microscopia electrónica e IF demostraron alteraciones del retículo endoplásmico rugoso, en coincidencia con la expresión de antígenos virales en órganos hematopoyéticos, hígado y riñón. Teniendo en cuenta estos hallazgos, sumados a la ausencia de depósitos de Ig o de C, se postuló que el virus Junín ejerce un efecto citopático directo sobre los tejidos. Pudo, además demostrarse activación de los factores de coagulación y del C sérico, aunque dichas alteraciones no se asocian directamente con la gravedad de la enfermedad. Los elevados niveles de interferón alfa (IFN- α) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) detectados podrían participar en la gravedad de la forma clínica. Los niveles muy elevados de IFN- α observados en la fase virémica, declinan con la administración del plasma inmune específico.

La respuesta inmune humoral anti-virus Junín, se detecta tardíamente (por FC o NT) aunque por IF pueden demostrarse anticuerpos ya a la segunda semana, en los casos que evolucionarán favorablemente.

Durante la fase aguda, las poblaciones de linfocitos T y B están disminuidas, y se observa una disminución de los LT CD4⁺, lo que implica una inmunodeficiencia transitoria, la que desaparece durante la convalecencia. Se ha documentado infectividad en linfomononucleares circulantes en sangre en la etapa aguda.

La patogenia del compromiso neurológico, presente en diverso grado en la mayoría de los casos, no ha sido aún dilucidada, habiéndose descrito ausencia de lesiones histológicas, coexistencia de antígeno viral y de Igs formando complejos en el endotelio capilar y resultados negativos al intentar la detección de virus infectivo.

3.1.8 Tratamiento

El tratamiento específico consiste en la administración de anticuerpos específicos anti-virus Junín, que se obtienen de plasma inmune, proveniente de individuos convalecientes de fiebre hemorrágica argentina. El tratamiento debe instituirse en forma precoz para ser efectivo.

Su administración antes del 8^{vo}. día de enfermedad clínica permite reducir la mortalidad del 15-20% (casos no tratados) a menos de un 3%. Un estudio doble ciego realizado entre 1974 y 1978 con 188 casos confirmados de FHA que recibieron 500 ml plasma inmune de convalecientes de FHA o de plasma normal (sin anticuerpos anti-Junín) documentó que la mortalidad era del 1,1% en el primer caso y del 16,5% en el segundo, lo que estableció inequívocamente el valor crucial de los anticuerpos específicos en el curso de la enfermedad.

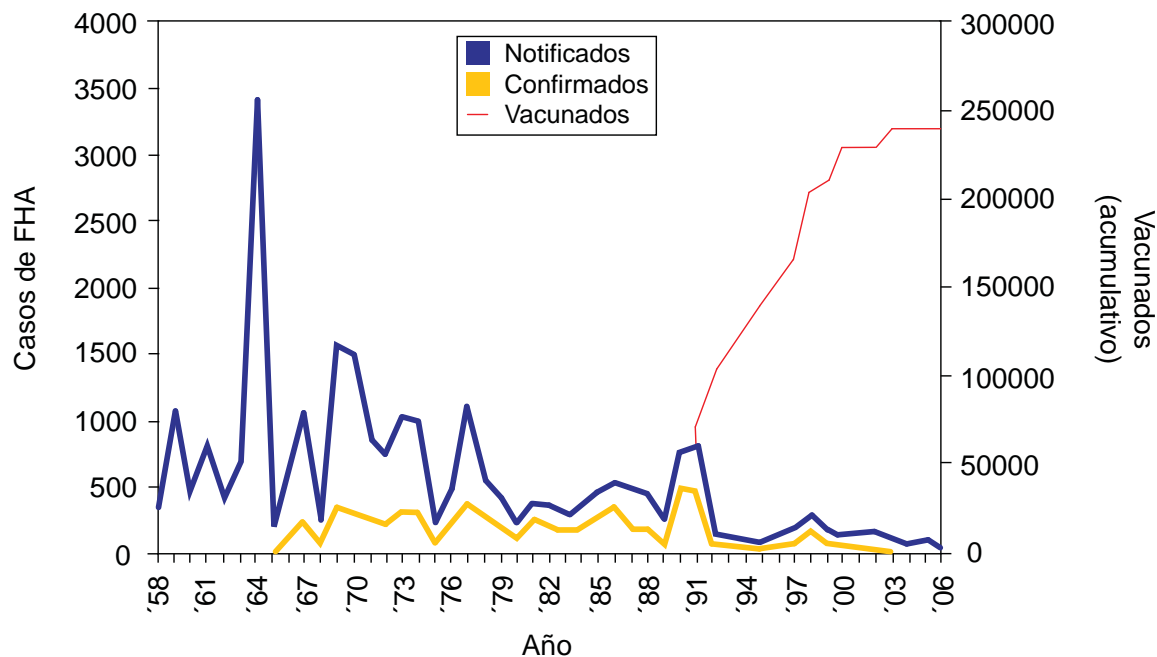


Figura 25.1.7. Casos notificados y confirmados de Fiebre hemorrágica argentina (1958-2006). Reproducido con autorización. (Enría DA et al; *Antivir Res* 78:132-9, 2008).



Figura 25.1.8. *Calomys musculinus*, principal reservorio del virus Junín. (Cortesía de la Dra. S. Merani; Facultad de Medicina, UBA).

Teniendo en cuenta las variaciones en los títulos de anticuerpos neutralizantes de los plasmas inmunes de diferentes individuos, actualmente se modificó el esquema primitivo de volumen fijo (500 ml) por otro que tiene en cuenta el título de anticuerpos neutralizantes, el volumen a transfundir y el peso corporal del paciente, con lo cual se definen unidades terapéuticas (UT). El cálculo se basa en la ecuación:

$$UT = \sum (\text{peso} \times \text{título de cada unidad}) / \text{peso corporal}$$

Se recomienda la administración de 3 500 UT / kg. de peso.

Esta inmunización pasiva se asocia en un 10 % de los casos a la aparición de un síndrome neurológico tardío, cuya patogenia se desconoce, aunque se ha sugerido un mecanismo inmunológico con persistencia de antígenos virales en el SNC.

En el Instituto Nacional de Virosis Hemorrágicas "Dr. Julio Maiztegui", Pergamino, Pcia. de Buenos Aires –denominado así en honor al médico que dedicó su vida al estudio de esta enfermedad–, se cuenta con *pooles* de plasma inmunes provenientes de

convalecientes de FHA. Dado que estos plasmas se administran a los pacientes, es necesario realizarles los mismos controles que se emplean en los bancos de sangre para descartar la posibilidad de transmisión de otras enfermedades. Por ello, en dichos productos biológicos se descarta la presencia de infecciones por HIV, HBV, HCV y por los agentes etiológicos de la sífilis, la brucelosis y la enfermedad de Chagas.

Si bien el tratamiento precoz (antes del 8vo. día) con plasma inmune conteniendo anticuerpos anti-Junín logra reducir la mortalidad significativamente, en los últimos años se ha observado un incremento de la incidencia de casos fatales de FHA. Ello se ha atribuido al efecto beneficioso de la vacunación específica que implicó una merma de la morbilidad en las áreas endémicas, y consiguientemente, a un reconocimiento no tan precoz por el personal de salud de los signos clínicos tempranos de la enfermedad.

Otros tratamientos en fase experimental.

Estudios experimentales en el marmoset *Callithrix jacchus* realizados por el grupo de Mercedes Weissenbacher habían demostrado que la ribavirina reduce la mortalidad inducida por la infección con cepas patógenas de virus Junín. Teniendo en cuenta que esta droga se había utilizado en pacientes infectados con virus Lassa, que el plasma inmune es ineficaz luego del 8vo. día de enfermedad, y que en el 10% de los que lo reciben se produce un síndrome neurológico tardío, se procedió a realizar estudios abiertos y luego –doble ciego– en humanos que acudieron a la consulta luego del 8vo. día de enfermedad. Si bien los resultados indicaron que la ribavirina no reduce significativamente la mortalidad (alcanzó el 28,6%), su administración se asoció a una caída de la viremia y del IFN- α endógeno, prolongando el tiempo requerido por el virus Junín para llevar al óbito a los pacientes. Sin embargo, se observó como efecto adverso la presencia de anemia. En uno de 10 casos sobrevivientes tratados con ribavirina, se documentó durante la convalecencia temprana un síndrome febril, con alteraciones del LCR y anomalías en las respuestas evocadas semejantes a las observadas en el síndrome neurológico tardío al administrarse plasma inmune. La falla inicial del tratamiento con ribavirina podría estar asociada a su administración tardía.

Otras drogas que podrían ensayarse en un futuro comprenden el IFN-alfacon-1, (útil en el tratamiento de hamsters infectados con Pichinde, y con efecto sinérgico al administrarse con la ribavirina), el compuesto ST-294 (una pequeña molécula con efecto protector en la infección de ratones con virus Tacaribe), el compuesto T-205 (una perazincarcboxamida eficaz como tratamiento de hamsters infectados con Pichinde), XBY-52 (un oligonucleótido tioaptámero que protege cobayos infectados con Pichinde modulando la expresión de genes que regulan la respuesta inmune) y NSC20625 (un compuesto disulfúrico aromático que tiene propiedades virucidas sobre Junín, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la proteína Z).

3.1.9 Infección con virus Junín en modelos experimentales

En animales de laboratorio el virus Junín induce diferentes respuestas dependiendo del hospedador, de su edad, vía de inoculación y de la virulencia en la cepa empleada.

Los estudios en animales son de fundamental importancia para lograr la reproducción de la enfermedad humana, y así poder conocer su patogénesis y ensayar medidas terapéuticas o profilácticas. Es importante destacar que la mayoría de estos estudios se realizaron en la Argentina y permitieron demostrar la eficacia de la inmunización pasiva y de las vacunas.

La reproducción de la enfermedad humana se ha logrado en cobayos, en el marmoset *Callithrix jacchus* y en monos rhesus. Los cobayos y marmosets presentan fiebre, pérdida de peso, petequias en piel y órganos, hemorragias diseminadas y mueren en el 100% de los casos. Hay pronunciada leucopenia y plaquetopenia, elevada viremia y altos títulos virales en órganos.

Modelo cobayo: El cobayo fue el hospedador más estudiado. La infección con virus Junín produce en el cobayo intensa necrosis del tejido linfo-hematopoyético, con la consecuente inmunodepresión (disminución de linfocitos T, de la reactividad tuberculínica y de la respuesta a antígenos timo-dependientes) (Figura 25.1.10). La coexistencia de altos títulos de virus, antígenos y ACP en los mismos tejidos, así como la ausencia de fenómenos inmunopatológicos o inflamatorios, demuestran un efecto directo del virus sobre los órganos permisivos para su replicación (fundamentalmente tejido linfo-hematopoyético y pulmonar). También se han detectado altos niveles de IFN-α que podría ser responsable de algunos síntomas. Del cerebro de cobayos no se recupera virus habitualmente, a menos que se usen cepas con neurotropismo aumentado.

Los cobayos se emplean como marcadores de virulencia de las cepas de Junín ya que la mayoría de las cepas aisladas de pacientes

producen una enfermedad letal. Sin embargo, existen cepas de patogenicidad moderada para el cobayo (MC2) o atenuada (XJ-Clon 3, Candid-1). Estas dos últimas cepas tienen importancia dado que ha sido o -en el último caso- es empleada como vacuna.

Los estudios de patogénesis así como los de inmunización pasiva en el modelo cobayo permitieron fundamentar el uso del plasma de convaleciente como tratamiento eficaz para esta enfermedad. Los cobayos que reciben inmunización pasiva sobreviven a la infección con cepas patógenas. Algunos de los animales sobrevivientes desarrollan un síndrome neurológico tardío con parálisis de miembros posteriores.

El tratamiento con ribavirina o tributiribavirina a cobayos infectados con Junín no reduce la mortalidad, aunque la replicación viral está demorada, y el tiempo de sobrevida aumentado.

Modelo ratón. La respuesta de numerosas cepas de ratones a la infección con virus Junín depende de la edad y de la cepa. Los animales lactantes (infectados por diversas vías) con cepas patógenas o atenuadas de virus Junín mueren en el 100 % de los casos a las dos semanas post-infección. Todas desarrollan signos neurológicos y meningoencefalomielitis, presentando gran cantidad de antígenos virales en neuronas corticales, meninges y plexos coroideos (Figura 25.1.11). No desarrollan anticuerpos circulantes.

El daño al SNC es producido por la respuesta T del hospedador al reaccionar con los antígenos presentes en las células, y no por la replicación del virus. Esto se ha determinado fehacientemente en experimentos de inmunosupresión y mediante la inoculación de ratones congénitamente atímicos (*nude*), los que sobreviven a la infección y desarrollan una infección persistente asintomática con elevados títulos de virus en encéfalo, en ausencia de lesiones. Cuando estos ratones *nude* persistentemente infectados son reconstituidos con linfocitos T (provenientes de donantes singéneos inmunes) desarrollan lesiones en el SNC y mueren (Figuras 25.1.4 y 25.1.12).

Los ratones adultos son poco sensibles, la mortalidad es mínima, el virus replica escasamente en cerebro y se detecta una rápida respuesta inmune humoral. Se ha sugerido que las células T supresoras contribuirían a esta evolución.

Roedores silvestres: En roedores silvestres, criados en el laboratorio, se ha podido demostrar la transmisión horizontal del virus Junín en *Calomys musculus* y la transmisión post-natal vertical (a través de leche y secreciones). Hasta el momento, no se detectó transmisión prenatal en roedores infectados con Junín, como sucede con LCM.

Sin embargo, las causas de la persistencia viral no ha sido aún dilucidada. Se ha postulado que un defecto selectivo en subpobla-

1) Antecedente epidemiológico:	Residencia en área endémica. Actividad rural Concurrencia ocasional para actividad deportiva (caza, pesca, <i>camping</i>)
2) Cuadro clínico:	Compatible
3) Diagnóstico presuntivo:	Leucopenia (disminución de linfocitos T CD 4 ⁺)* plaquetopenia Células redondas (de Milani) en orina
4) Diagnóstico de certeza: Métodos directos	Aislamiento del virus a partir de sangre del período agudo ú órganos (autopsia) en: - cultivos celulares (ACP) - ratones lactantes (encefalomielitis) - cobayos (hemorragias) Identificación del virus aislado (IF, Nt) Detección del genoma (RT-PCR)
Métodos indirectos	IgM específica (IFI o ELISA) Conversión serológica en muestras pareadas (IFI, ELISA o Nt)

Tabla 25.1.3. Diagnóstico de fiebre hemorrágica argentina. IF: inmunofluorescencia; Nt: neutralización / *No utilizado en el diagnóstico de rutina / ELISA: enzimoimmunoensayo.

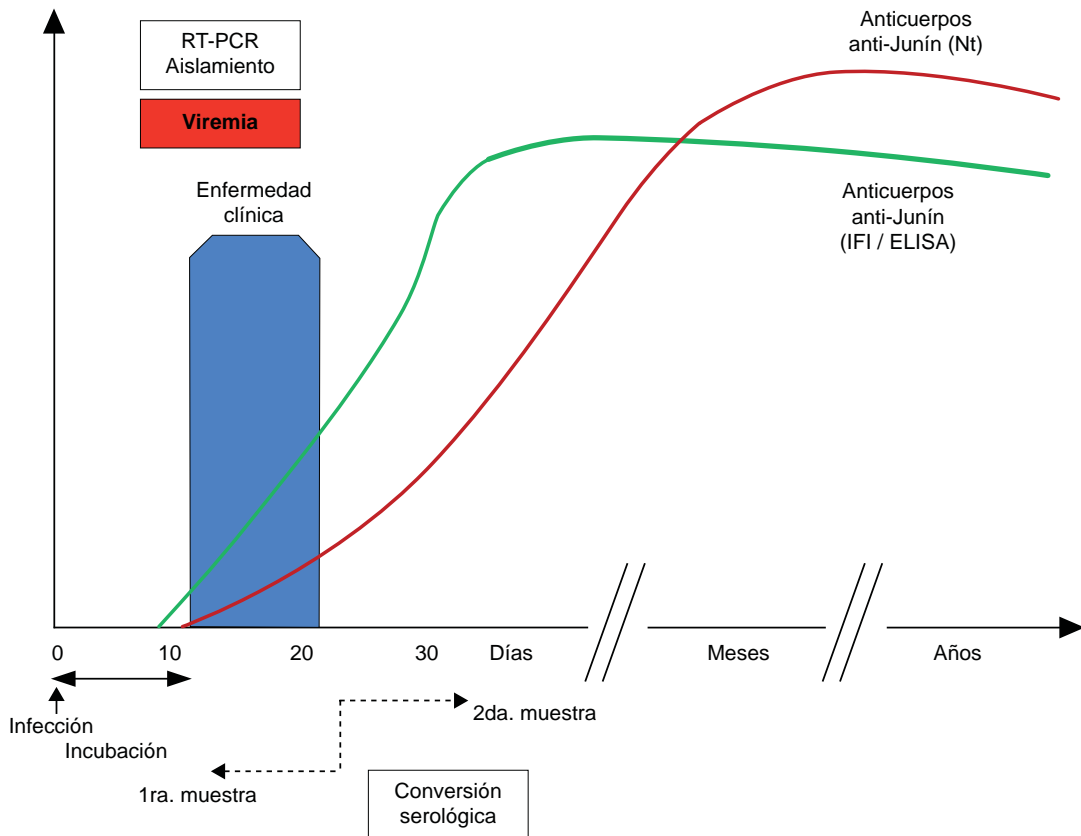


Figura 25.1.9. Diagnóstico de fiebre hemorrágica argentina. Obtención de muestras. Nt: Neutralización; IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

ciones de LT CD4⁺ podría ser una de las razones que contribuirían para el establecimiento de la persistencia. Otros factores de origen viral ya se han mencionado anteriormente.

La infección experimental de otros roedores relacionados desde el punto de vista filogenético y ecológico con el principal reservorio (*Calomys musculinus*) permitió demostrar que, en condiciones experimentales, también son sensibles a la infección *Akodon molinae*, *Akodon dolores* y *Calomys callidus*. Este último es capaz de desarrollar infecciones persistentes con eliminación prolongada de virus por fauces. Si bien esto no significa que esos roedores sean reservorios naturales, presentan un riesgo potencial que deberá ser explorado.

Infección de primates. Se realizaron infecciones experimentales con monos y marmosets. Las especies más estudiadas fueron *Macaca rhesus*, *Callithrix jacchus* y *Cebus apella*. La infección de monos rhesus y del marmoset *C. jacchus* reproducen las lesiones observadas en pacientes con fiebre hemorrágica argentina. En los rhesus, se observa habitualmente hemorragia, necrosis de médula ósea y hepatocelular, polioencefalomielitis y glanglioneuritis autonómica. En *C. jacchus* infectados con Junín se observan alteraciones hematológicas, tales como anemia, leuco-plaquetopenia y manifestaciones hemorrágicas y neurológicas que producen la muerte de los animales en 17 - 24 días, en ausencia de anticuerpos neutralizantes detectables. La administración de suero inmune reduce la mortalidad del 100 % al 25%. Entre los sobrevivientes que reciben dicho tratamiento, se documenta -al igual que en el cobayo y en el humano- un síndrome neurológico tardío. Los resultados del tratamiento con ribavirina demostraron un aumento de la sobrevida y un retardo del tiempo promedio de muerte, comparado con los controles infectados sin tratar. Cuando dicha droga se administró a monos rhesus en forma profiláctica o terapéutica, se observó una modificación de la sintomatología inicial, aunque los animales

desarrollaron un síndrome neurológico de aparición tardía, que se asoció a mortalidad en la mayoría de los animales.

El mono *Cebus apella* es sensible a la infección con la cepa patógena XJ de virus Junín. Sin embargo, las manifestaciones hematológicas son leves y transitorias. Este primate fue utilizado para determinar la potencial neurovirulencia de la cepa atenuada XJ Clon 3, utilizada -previamente al desarrollo de Candid # 1- en voluntarios humanos. La infección de estos primates se asoció a graves cuadros neurológicos en 25% de los animales (que causaron la muerte), con expresión de antígenos virales y depósito de Igs en neuronas del SNC. Se documentó también que esta cepa puede persistir en SNC por períodos prolongados (Figura 25.1.13A y B).

3.1.10. Vacunas para fiebre hemorrágica argentina

Su desarrollo. El desarrollo de una vacuna efectiva e inocua para FHA ha sido difícil dadas las características del virus (persistencia, neurotropismo) y la carencia -en las etapas iniciales- de modelos experimentales que reprodujeran todas las manifestaciones clínicas de la enfermedad humana (hematológicas y neurológicas).

Los estudios sobre vacunas para fiebre hemorrágica han seguido distintas líneas de investigación: vacuna a virus inactivado; vacuna a virus homólogo atenuado; a virus heterólogo (Tacaribe) y a subunidades con glicoproteínas. La búsqueda de vacunas inactivadas (con formol u otros métodos) no resultó efectiva ya que si bien fue posible inducir anticuerpos neutralizantes en cobayos, no se logró protección. Se han estudiado tres cepas atenuadas para vacunas a virus *vivo* y atenuado homólogos: XJ-Clon 3, XJ-0 y Candid # 1, siendo esta última la que está en uso actual.

La cepa XJ-Clon 3 fue la primera cepa atenuada ensayada como vacuna para uso humano. Esta cepa fue clonada en células MA 111 y es atenuada para cobayos y marmosets, induciendo protección completa y duradera contra el desafío con cepas patógenas. En aquel hallazgo se basó un ensayo piloto de inmu-

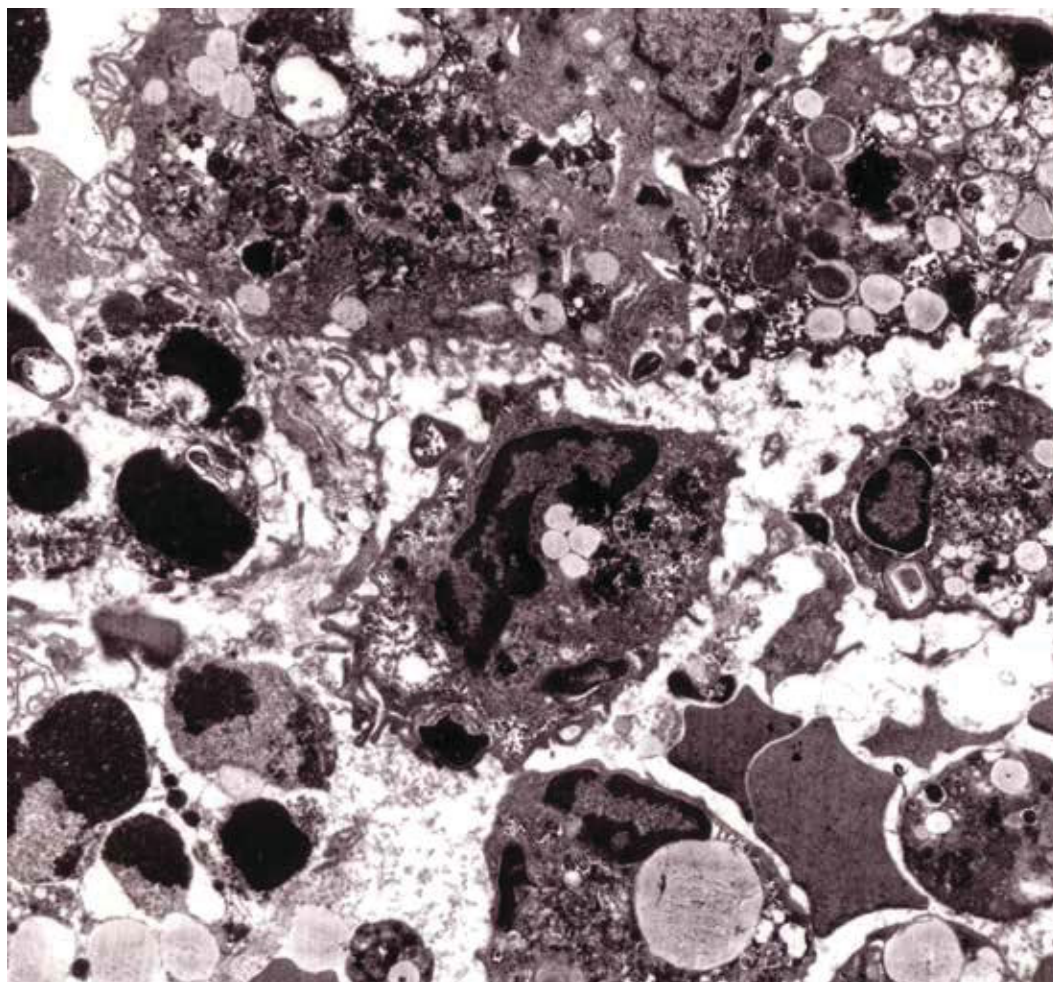


Figura 25.1.10. Efecto de la infección de la médula ósea de cobayo con la cepa patógena XJ de virus Junín. Se observan intensas lesiones celulares. Microscopía electrónica de un corte ultrafino (x 8 500). Cortesía del Dr. C. Vásquez, Centro de Virología Animal (CEVAN), Buenos Aires.

nización de 636 voluntarios humanos con XJ-Clon 3 (una cepa propagada en cerebro de ratón lactante) entre 1969-71. Se detectó un alto índice de seroconversión para anticuerpos anti-Junín (más del 90 % de los vacunados) y los títulos de anticuerpos neutralizantes se mantuvieron elevados durante años. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la cepa XJ-Clon 3 era capaz de atravesar la placenta e inducir persistencia en cobayos, e inducir lesiones inmunopatológicas en el SNC de roedores y monos *Cebus apella*. Teniendo en cuenta –entre otras razones– el sustrato en que estaba preparada la vacuna inicial y la carencia de una historia clara de los pasajes que había tenido la cepa, ésta fue abandonada y se focalizaron los esfuerzos para la búsqueda de otras cepas atenuadas.

La investigación de la cepa XJ-0 dio resultados promisorios pero no se continuaron los estudios.

También se exploró la posibilidad de una vacuna a virus heterólogo con el virus Tacaribe ya que no es habitualmente patógeno para el hombre. Se demostró que no produce lesiones por mecanismos directos o indirectos en cobayos ni primates y que los protege sólidamente contra la infección con Junín. Los estudios sobre XJ-Clon 3, XJ-0 y Tacaribe se realizaron en la –entonces– cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Estudios más recientes realizados en cobayos, demostraron una eficacia protectora parcial del virus vaccinia recombinante que expresa la glicoproteína de envoltura de Tacaribe o de Junín frente al desafío con una cepa patógena de éste.

La vacuna de uso actual

En 1979 se inició un proyecto conjunto entre el gobierno argentino, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Oficina Panamericana de la Salud, Instituto de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas del Servicio de Sanidad del Ejército de EE.UU.–USAMRIID– e Instituto Nacional de Estudios sobre Virosis Hemorrágicas del Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación-Pergamino. El objetivo era desarrollar una nueva semilla de vacuna a virus atenuado. Entre 1979 y 1985, el Dr. Julio Barrera Oro realizó (en los laboratorios del USAMRIID) investigaciones que permitieron obtener la cepa Candid # 1 de virus Junín.

La cepa se obtuvo por clonado en células FRL (pulmón fetal de mono Rhesus) y es la más atenuada de todas las cepas de Junín conocidas hasta el presente. La inocuidad, inmunogenicidad y eficacia protectora de esta vacuna experimental fueron demostradas en animales de laboratorio. En cobayos y primates induce una infección inaparente con viremia y los protege totalmente del desafío con cepas patógenas. Presenta menor neurovirulencia para Rhesus que las otras cepas atenuadas conocidas.

La cepa Candid # 1 cumplió con los requisitos de inocuidad requeridos por organismos internacionales y se pudo realizar el primer ensayo en un pequeño número de voluntarios humanos. No se observaron efectos adversos y se documentó el desarrollo de anticuerpos neutralizantes, aunque a títulos bajos. Entre 1985-88, se inocularon 300 nuevos voluntarios del área endémica y no se observaron efectos clínicos adversos. En más del 90 % de los vacunados se detectaron an-

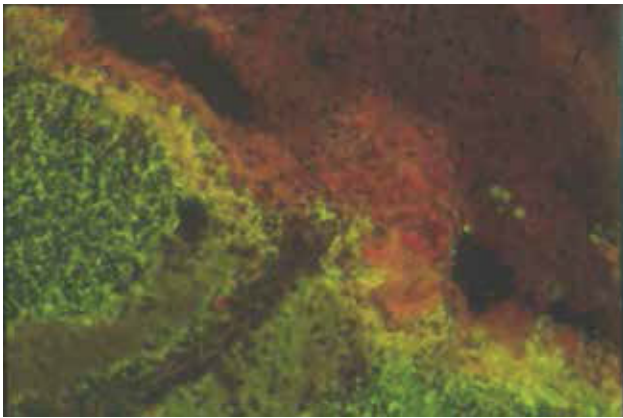


Figura 25.1.11. Expresión de antígenos del virus Junín en el encéfalo de un ratón eutímico al cabo de 10 días post-infección por vía intracerebral con la cepa XJ-Clon 3. Corte de tejido mediante crióstato. Inmunofluorescencia indirecta, utilizando coloración de contraste con azul de Evans (x 250).

ticuerpos neutralizantes a los 30-60 días de la inoculación. Se demostró así la inocuidad e inmunogenicidad de la cepa Candid # 1.

En junio de 1991, el Dr. Julio Maiztegui, por entonces Director del Centro Nacional de Virosis Hemorrágicas de Pergamino comunicó a la Academia Nacional de Medicina la eficacia de la cepa Candid # 1. Para demostrarla se habían inoculado 6 500 voluntarios de sexo masculino de 15 a 60 años de edad que trabajaban o residían en la zona rural de 41 localidades del sur de la Pcia. de Santa Fe, seleccionadas por la elevada incidencia de FHA durante el período 1984-87.

El estudio se había realizado en forma prospectiva, a doble ciego, inoculándose el 50% de los voluntarios con la vacuna Candid # 1 y el 50% restante con placebo. Cuando se procedió a develar el resultado de los datos –hasta ese momento codificados– se observaron los siguientes resultados:

Inoculación	Número de voluntarios	Tuvieron fiebre hemorrágica
Vacuna	3255	1
Placebo	3245	22
Eficacia de la vacuna	95,5%	$p=0,0000028$

Posteriormente, los estudios serológicos permitieron comprobar la persistencia de los anticuerpos específicos por más de dos años en la mayoría de los vacunados.

Aún no se disponía de la cantidad suficiente de vacuna para proteger a toda la población expuesta al riesgo de contraer FHA.

Sin embargo, el Ministerio de Salud obtuvo del Gobierno de EE. UU. 200 000 dosis de Candid # 1 para vacunar durante 1991-92 a los 69 000 trabajadores rurales más expuestos en las zonas de mayor riesgo del área endémica.

Luego, el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" bajo la dirección de la Dra. Delia A. Enría comenzó la producción local de la vacuna Candid # 1, asegurando la provisión de las dosis necesarias para la población rural en riesgo.

Un trabajo colaborativo entre la Dra. Ambrosio (del mismo Instituto) y la Dra. Sabatini documentó en voluntarios que la vacuna Candid # 1 induce una respuesta humoral específica de anticuerpos neutralizantes significativamente menor que la que produce la infección subclínica por otras cepas atenuadas (salvajes) del virus Junín, o la observada en quienes sobreviven a la enfermedad. La inmunización de voluntarios que habían tenido una infección subclínica con Junín, incrementa los títulos de anticuerpos específicos a niveles intermedios, aunque sin alcanzar la de quienes se habían enfermado y curado. La infección previa por LCM no modifica la respuesta a la vacuna Candid # 1.

Indicaciones de la vacuna Candid # 1: está indicada en trabajadores rurales de las áreas endémicas y personal de laboratorio que trabaja con virus Junín. Dado que es a virus *vivo* y atenuado está absolutamente contraindicada en embarazadas, ya que se observan malformaciones congénitas en algunos casos de mujeres que se embarazaron en fechas cercanas a la vacunación, desconociéndose si existió una relación de causalidad entre la vacuna administrada y el desenlace observado. Teniendo en cuenta el riesgo / beneficio, un estudio de Feuillide y Enría propuso en 2005 implementar en un futuro la inmunización expandida a niños menores de 15 años que habitan en el área endémica. Desde 2007 forma parte del calendario oficial de vacunación para las personas de 15 - 65 años que habitan en el área endémica. Hasta ese año diversos programas de inmunización selectiva habían administrado la vacuna a más de 300 000 pobladores rurales.

Bases moleculares de la atenuación de la cepa Candid # 1. El grupo de investigadores dirigido por el Dr. Víctor Romanowski, secuenció inicialmente el fragmento S del RNA de la cepa atenuada vacunal, la comparó con la de una cepa salvaje MC-2 y detectó 39 nucleótidos de diferencia entre ambas. Luego, los Dres. Romanowski, Ghiringhelli y Lozano, lograron secuenciar el fragmento L del RNA de Candid # 1, documentando la existencia de 6 aminoácidos diferentes en la polimerasa de la cepa vacunal, respecto a otras cepas no atenuadas. Estudios futuros determinarán cuál(es)



Figura 25.1.12. Infección experimental de ratones con la cepa XJ de virus Junín. A. Ratones Balb lactantes eutímicos (inmunocompetentes) infectados con virus Junín. Parálisis de miembros por encefalomiелitis T-dependiente. **B.** Ratones Balb atímicos adultos infectados con virus Junín. A la derecha, animal asintomático sólo infectado con el virus. A la izquierda, otro atímico infectado con virus Junín que recibió 7 días antes una inmunización adoptiva con linfocitos T de un ratón (eutímico) singéico sensibilizado con dicho virus. **C.** El mismo ratón infectado que recibió linfocitos T, exhibe parálisis de miembro posterior, semejante a lo observado en ratones lactantes eutímicos infectados con virus Junín. Tanto en los ratones atímicos adultos como en los eutímicos infectados en la vida perinatal, el virus Junín replica en el SNC alcanzando títulos superiores a 10^6 DL₅₀/ml.

de estas modificaciones es/son responsable(s) de la atenuación o virulencia del virus Junín.

3.1.11 Otros métodos de control

Dado que los roedores persistentemente infectados desempeñan un rol fundamental en la diseminación del virus Junín, se han propuesto diversos métodos de control como ser: reducción del número mediante captura, rodenticidas, aumento de los predadores, sustitución de los cultivos, pastoreo intensivo de los campos, rotación de cultivos, etc.

En 1964, se aplicó en Bolivia un programa para control de la fiebre hemorrágica boliviana mediante disminución de la cantidad de *Calomys callosus*. Este método tuvo éxito debido a los hábitos peridomésticos de este roedor. Para el caso de virus Junín, este procedimiento no puede ser aplicado teniendo en cuenta los hábitos rurales de los reservorios y la diversidad de los mismos.

Por ello, se proponen las siguientes estrategias: a) disminuir la exposición del hombre al contagio mediante el uso de ropa y calzado adecuados; b) evitar la exposición innecesaria en las épocas de brotes epidémicos; c) inmunización de la población susceptible (trabajadores rurales en áreas endémicas y personal de laboratorio).

3.2 VIRUS MACHUPO: FIEBRE HEMORRÁGICA BOLIVIANA

El virus Machupo tiene como reservorio al *Calomys callosus*, roedor de hábitos peridomésticos, lo que facilita el contacto con el hombre.

La fiebre hemorrágica boliviana es similar a la argentina pero de mayor gravedad y más elevada tasa de mortalidad. La enfermedad era endémica en la meseta de Beni (San Joaquín), Bolivia desde 1958.

El número de casos de esta enfermedad se redujo a partir de 1964, asociado al control del roedor reservorio. En 2004 se notificaron dos casos fatales de fiebre hemorrágica boliviana, confirmando mediante estudios serológicos la infección por virus Machupo en uno de ellos.

3.3 VIRUS GUANARITO: FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA (FHV)

Los primeros casos fueron observados en 1989 en el estado de Guanare, aunque no se identificó inicialmente el agente. Ante la coincidencia temporal de la primera epidemia de dengue hemo-

rrágico por virus dengue, la etiología inicialmente sospechada correspondió este virus. Superada la epidemia de dengue hemorrágico en marzo de 1990, y ante la persistencia de casos que afectaban a la población rural de Guanare de 15 - 49 años, se iniciaron nuevos estudios, que culminaron con el descubrimiento en la Universidad de Yale (EE. UU.), de un nuevo virus, denominado Guanarito, agente de una zoonosis emergente. Desde 1989 se registraron 3 grandes epidemias en Venezuela, observándose un aumento del área correspondiente a la región endémica. Las manifestaciones clínicas son muy semejantes a las descritas para la fiebre hemorrágica argentina. La mortalidad de la enfermedad oscila alrededor del 30%, a pesar de cuidados intensivos de soporte.

El diagnóstico etiológico específico de FHV puede realizarse mediante métodos directos o indirectos. Entre los métodos directos se realiza el aislamiento e identificación del virus en cultivos celulares o la amplificación parcial del RNA viral mediante RT-PCR. El virus puede aislarse a partir de muestras clínicas tales como suero, sangre y órganos (en caso de autopsia).

El método directo más utilizado es el aislamiento viral en cultivo de células Vero-E6, identificándose la etiología al detectarse antígenos del virus Guanarito por inmunofluorescencia indirecta (IFI). El diagnóstico indirecto (serológico) se realiza por la determinación de anticuerpos IgG e IgM específicos para el virus Guanarito mediante IFI o ELISA.

No hay un tratamiento específico ni vacunas anti-Guanarito. Se encuentra en evaluación la potencial utilidad *in vivo* de la administración de ribavirina (eficaz *in vitro*).

3.4. VIRUS SABIÁ

Sólo se ha registrado un caso fatal en San Pablo, Brasil. El caso fue inicialmente atribuido a fiebre amarilla por el significativo compromiso hepático observado.

3.5. VIRUS CHAPARE

Se ha documentado un caso fatal en las cercanías del río homónimo, en Bolivia. Este caso de fiebre hemorrágica fue uno de los que hacia fines de 2003 fueron reportados en las proximidades de Cochabamba, al pie de los Andes. El paciente fallecido experimentó un grave compromiso hepático, por lo que fue inicialmente sos-

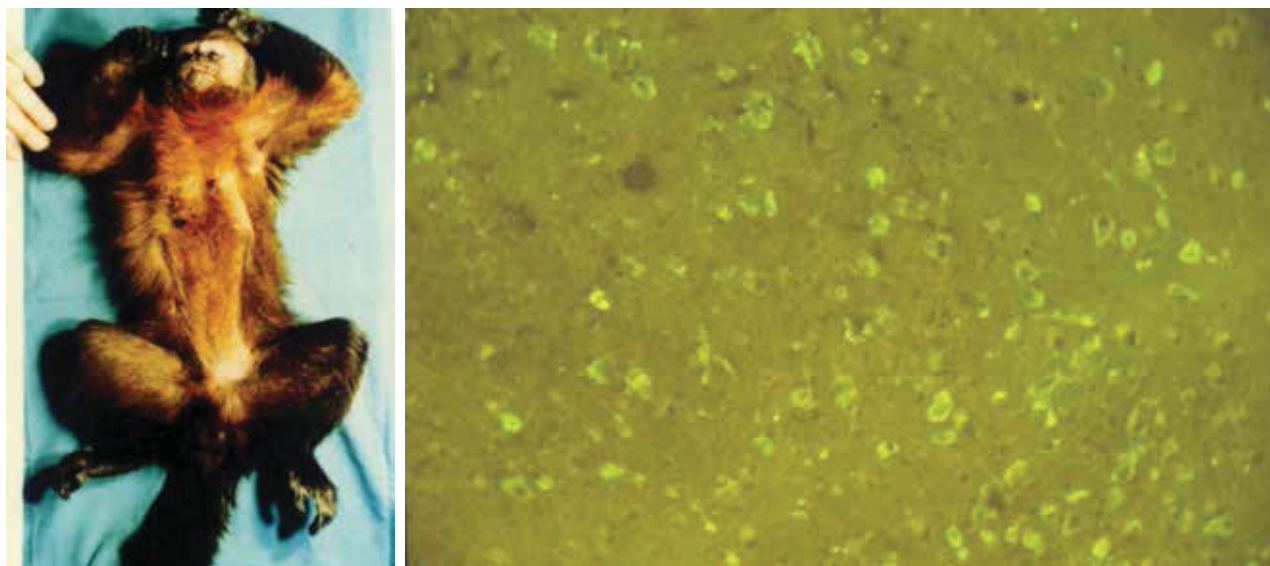


Figura 25.1.13. A. Mono *Cebus apella* infectado con la cepa XJ-Clon 3 del virus Junín. B. Expresión de antígenos de virus Junín en el encéfalo de un mono *Cebus apella* al cabo de 155 días post-infección con la cepa XJ Clon 3. Inmunofluorescencia indirecta (x 250).

pechado un cuadro de fiebre amarilla o de fiebre hemorrágica por dengue. El cuadro clínico incluía cefaleas, artro-mialgias, vómitos y profusas hemorragias. La detección del genoma y posteriores análisis filogenéticos documentaron que el agente etiológico está relacionado con el virus Sabiá, aunque es claramente distinto de él.

4. ARENAVIRUS DEL VIEJO MUNDO

Los arenavirus del viejo mundo patógenos para el hombre son: el virus LCM y el Lassa.

4.1 VIRUS LCM

El reservorio del virus LCM es el ratón doméstico (*Mus musculus*), lo que explica la vasta distribución de este virus. En Argentina, se ha documentado que LCM infecta *Mus domesticus*. Los hámsters también son sensibles y pueden transmitir la infección al hombre (en caso de tener hámsters infectados como mascotas, o bien en criaderos de roedores, etc.).

El virus LCM ha sido el arenavirus más estudiado desde el punto de vista experimental, dado que constituye un modelo sumamente interesante para dilucidar mecanismos de persistencia e inmunopatología. Fue en 1974 que Rolf M. Zinkernagel y Peter C. Doherty establecieron mediante la infección de cultivos celulares con LCM, las bases de la restricción genética de la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T mediante sencillos y brillantes experimentos de citotoxicidad. Por dichos hallazgos ambos investigadores recibieron el Premio Nobel Fisiología o Medicina en 1996.

El virus LCM produce habitualmente en el hombre una infección inaparente o enfermedad leve que puede confundirse con gripe; ocasionalmente puede producir meningitis aséptica o meningoencefalitis.

La infección o enfermedad afecta a personal de laboratorio en contacto con roedores o con cultivos primarios de los mismos. El diagnóstico se realiza por aislamiento del virus y por RT-PCR a partir de secreciones o del LCR o bien por conversión serológica.

Más recientemente, se ha observado que este virus es capaz de producir enfermedad grave y generalmente mortal en individuos receptores de trasplante de órganos sólidos. Se han documentado dos brotes en los que los pacientes padecieron alteraciones mentales, trombocitopenia, elevación de las transaminasas hepáticas, coagulopatía y disfunción del trasplante, observándose también fiebre o leucocitosis dentro de las tres semanas de recibido el órgano trasplantado. Otras manifestaciones tales como diarrea, exantema alrededor de la incisión, fallo renal y ataques de apoplejía ocurrieron con frecuencia variable. La muerte de los receptores de órganos aconteció entre los 9 y 76 días de recibido el trasplante, con la excepción de uno de ellos a quien se le disminuyó la dosis inmunosupresora y se trató con el antiviral ribavirina.

Estudios sero-epidemiológicos realizados en Alemania y EE. UU. demostraron que un 3 - 5 % de la población poseía anticuerpos contra este virus. En Argentina este virus también se ha detectado —aunque con muy baja frecuencia— en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, tanto en áreas geográficas endémicas de fiebre hemorrágica argentina, como fuera de ella, tal como se observó en la localidad de Río Cuarto, Pcia. de Córdoba. La infección previa con LCM de residentes en el área endémica de fiebre hemorrágica argentina no modifica los títulos de anticuerpos anti-Junín alcanzados luego de administrada la vacuna Candid # 1, comparada con la de aquellos que no exhibían serología previa para LCM y fueron también vacunados.

No se dispone de vacuna anti-LCM.

Estudios experimentales. Los ratones adultos inoculados con LCM desarrollan una infección aguda que, dependiendo de la dosis, vía de inoculación, características de la cepa viral (neuro o viscerotropa) y de la cepa de ratón, puede producir la muerte por mecanismos inmunopatológicos de lesión o bien conducir a la

curación. La infección *in utero* o neonatal en ratones produce una infección persistente en la cual se detecta el virus durante toda la vida del animal. Inicialmente, se postuló que la presencia del virus se debía a una falta de respuesta inmune y se lo consideró el prototipo de la tolerancia inmunológica. Sin embargo, posteriormente se demostró que los ratones persistentemente infectados presentaban, en edad adulta, una glomerulonefritis mediada por el depósito de inmunocomplejos, lo que indicaba la existencia de respuesta humoral. Aunque se producen anticuerpos, la respuesta de linfocitos T citotóxicos está disminuida en los animales persistentemente infectados y este defecto selectivo se postula como una de las causas de la persistencia viral. La observación de la acumulación de genomas virales en órganos de estos ratones, sugiere que las partículas defectivas o incompletas también tendrían un papel en la inducción de persistencia. (Véase el ítem 2, *Bases moleculares de la persistencia*).

4.2 VIRUS LASSA: FIEBRE HEMORRÁGICA AFRICANA

El virus Lassa fue aislado en 1969 a partir de muestras clínicas de dos médicos misioneros que contrajeron la enfermedad en Lassa, Nigeria, por contacto con personas enfermas. Posteriormente, se describió la enfermedad en distintos lugares del oeste de África y se aislaron otros virus relacionados. En 1972 se aisló el virus Lassa de *Mastomys natalensis* (familia *Muridae*), que es considerado el principal reservorio y tiene una amplia distribución en el continente africano.

Semejante al complejo Tacaribe, existe un complejo de arenavirus africanos relacionados antigénicamente entre sí y asociados a distintos reservorios, además de *Mastomys*, pero con diferente patogenicidad para el hombre, siendo hasta el presente el virus Lassa el único patógeno demostrado para el ser humano entre los virus de dicho complejo de virus.

Los hábitos peridomésticos de los roedores reservorios y los elevados títulos de virus presentes en orina favorecen la transmisión al hombre. Asimismo, es frecuente la transmisión de hombre a hombre, especialmente como fuente de infección intra-hospitalaria (de paciente a enfermeras, médicos, laboratoristas, etc.).

La fiebre de Lassa es una enfermedad grave con 15 - 20% de mortalidad; cursa con diátesis hemorrágica, neumonitis, miocarditis, hepatitis y encefalopatía. El diagnóstico etiológico se lleva a cabo por aislamiento del virus a partir de sangre, en cultivos celulares, por técnicas moleculares, por detección de IgM específica o por seroconversión. Por razones de bioseguridad, el aislamiento puede realizarse solamente en laboratorios de máxima bioseguridad (nivel 4).

La administración de suero o plasma inmune no tiene un efecto beneficioso en un alto porcentaje de casos. La ribavirina reduce la mortalidad si es administrada en los primeros 7 días de la enfermedad. La infección experimental de *Mastomys natalensis* puede producir tanto en lactantes como adultos una infección persistente asintomática con eliminación de virus por secreciones y elevados títulos en órganos. Estudios citogenéticos de este roedor han determinado que existen 3 especies con diferente número de cromosomas que ocuparían distintos nichos ecológicos y que se asocian a los diversos virus del complejo Lassa. En el oeste de África ocurren 300 000 nuevos casos de fiebre de Lassa por año, de los cuales 5 000 son fatales. Entre las medidas instrumentadas para el control se ha instituido la colocación de trampas, así como la introducción de predadores con el objeto de reducir el número de roedores.

No se dispone aún de una vacuna autorizada mediante licencia para prevenir la infección humana por virus Lassa. Sin embargo, ya se ha obtenido una cepa atenuada mediante la selección de un clon (número 29) viral que posee el fragmento S del virus patógeno Lassa y el fragmento L del virus Mopeia (apatógeno para el humano). Este virus con genoma reasociado (ML29) es apatógeno para primates, cobayos y ratones, y confiere protección ante la infección experimental con virus Lassa.

5. PERSPECTIVAS

Los arenavirus han sido el sustrato a través del cual se lograron descubrimientos notables, entre los que el de la restricción genética de la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T ocupa un sitio de privilegio. Recientemente, fue también posible comenzar a comprender a nivel molecular las razones virológicas e inmunológicas que se asocian a las infecciones virales persistentes utilizando a los arenavirus como modelo de estudio. Es posible que nuevos arenavirus sean aún descubiertos en animales o que emerjan como causales de enfermedad humana, como fuera recientemente documentado con una nueva variante de LCM. A pesar del acceso a una vacuna eficaz para prevenir la fiebre hemorrágica argentina, persiste el desafío de lograr también adecuadas vacunas profilácticas para los restantes arenavirus patógenos para el hombre. El conoci-

miento de la patogénesis molecular de las infecciones persistentes podrá ser extrapolado para diseñar e instituir en un tiempo futuro pero próximo un mejor tratamiento para otras virosis humanas.

ADENDUM

Durante la etapa de Prueba de Galera de Virología Médica se demostró que un anticuerpo (ch128.1) dirigido contra un epítipo del receptor TfR1 -que no compite con la transferrina- inhibe el ingreso y la replicación del virus Junín. Dicho anticuerpo fue construido mediante la fusión de las porciones variables del anticuerpo monoclonal murino ch128.1 anti-hTfR1 a las porciones constantes de IgG3. Éste y otros agentes terapéuticos dirigidos contra dicho epítipo del receptor TfR1 podrían ser efectivos en el tratamiento de las fiebres hemorrágicas por arenavirus del Nuevo Mundo.

Bibliografía

- Ambrosio AM, Riera AM, Saavedra M del C, Sabattini M.S. "Immune response to vaccination against Argentine hemorrhagic fever in an area where different arenaviruses coexist". *Viral Immunol* 2006; 19:196-201.
- Carballal G, Oubiña JR, Molinas F, Nagle C, de la Vega MT, Videla C. *et al.* "Intracerebral infection of *Cebus apella* with the XJ-Clone 3 strain of Junin virus". *J Med Virol* 1987; 21:257-68.
- Carballal G, Videla CM, Merani MS. "Epidemiology of Argentine hemorrhagic fever". *Eur J Epidemiol* 1988; 4: 2, 259-74.
- Enria DA, Briggiler AM, Sánchez Z. "Treatment of Argentine hemorrhagic fever". *Antiviral Res* 2008; 78:132-9.
- Feuillade MR, Enria DA. "Análisis de la utilidad de la vacuna Candid 1 en la prevención de la fiebre hemorrágica argentina en niños". *Rev Panam Salud Pública* 2005; 18, 100-6.
- Goñi SE, Iserte JA, Ambrosio AM, Romanowski V, Ghiringhelli P.D, Lozano M.E. "Genomic features of attenuated Junín virus vaccine strain candidate". *Virus Genes* 2006; 32:37-41.
- Maiztegui J, Fernandez N, Damilano AF. "Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine hemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome". *Lancet* VIII: 1979; 1216-17.
- Instituto Nacional de Estudios sobre Virosis Hemorrágicas, Pergamino, Ministerio de Salud y Acción Social. Información para profesionales sobre la vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina, 1992.
- Oubiña JR, Carballal G, Videla C, Cossio P. "The guinea pig model for Argentine hemorrhagic fever". *Am J Trop Med Hyg* 1993; 33: 1251-7.
- Palacios G, Druce J, Du L, Tran T, Birch C, Briese T *et al.* "A New Arenavirus in a Cluster of Fatal Transplant-Associated Diseases". *N Eng J Med* 2008; 358:991-8, y corrección en 358:1204.
- Radoshitzky S.R, Abraham J, Spiropoulou CF, Kuhn JH, Nguyen D, Li W. *et al.* "Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses". *Nature* 2007; 446: 92-6.
- Riera LM, Feuillade MR, Saavedra MC, Ambrosio AM. "Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of Argentine haemorrhagic fever". *Acta Virol*, 1997; 41:305-10.
- Romanowski V. "Genetic organization of Junín virus, the etiologic agent of Argentine hemorrhagic fever". En: *The Arenaviridae*. Salvato M (ed.) Serie *The Viruses*, Wagner R y Frankel Conrat (eds). Plenum Press, N York, 1993; p 51-83.
- Rojek JM, Kunz S. "Cell entry by human pathogenic arenaviruses". *Cell Microbiol* 2008; 10: 828-35.
- Weissenbacher MC, Laguens RP, Coto C. "Argentine hemorrhagic fever". *Current Topics in Microbiol Immunol* 1987; 134: 104-8.

Otras fiebres hemorrágicas de origen viral

Guadalupe Carballal

1. INTRODUCCIÓN

Existen muchas fiebres hemorrágicas de origen viral, además de las producidas por arnavirus (Capítulo 25.1), que pueden presentar síndromes clínicos similares, aunque se diferencian en su gravedad y mortalidad. Son producidas por virus que pertenecen a diversas familias y géneros y varían en sus modos de transmisión al hombre y en su ocurrencia urbana o rural en áreas geográficas restringidas del planeta (Tabla 25.2.1).

La complejidad y especificidad de los ciclos de transmisión entre los diferentes reservorios explica la distribución geográfica local de estas enfermedades.

En la actualidad, dada la frecuencia de viajes por vía aérea que pueden transportar a individuos en período de incubación o prodromico, los médicos y los laboratorios debieran estar preparados para diagnosticar enfermedades exóticas que pudieron haberse adquirido en países lejanos.

Algunos de estos agentes como los filovirus y arnavirus son altamente patógenos, por lo que sólo se deben manipular en laboratorios con las máximas condiciones de Bioseguridad (BSL 4-*Biosafety Level 4*).

Algunas fiebres hemorrágicas (fiebre amarilla) son conocidas desde hace siglos, pero la mayoría se ha identificado durante el siglo XX, como por ejemplo el dengue epidémico (1956), la fiebre del Rift Valley (1977) o las producidas por los filovirus Marburg o Ébola descritas en 1967 y 1976, respectivamente.

El síndrome clínico común para todas las fiebres hemorrágicas tiene un período de incubación de 3-8 días, un período prodromico de 3 días, a veces similar a una gripe, y luego un empeoramiento del estado general con la aparición de hemorragias de distinta gravedad. En las formas graves el compromiso cardiovascular puede llevar al *shock*, a veces irreversible. Son frecuentes las complicaciones como deshidratación, uremia, coma hepático, acidosis, compromiso del SNC, así como las sobreinfecciones bacterianas.

El cuadro clínico de cada una de las fiebres hemorrágicas virales depende del agente etiológico específico, de la respuesta del hospedador y de la particular virulencia de la cepa causal. La mortalidad puede llegar hasta un 20-80% para fiebre amarilla y a más del 80% para el virus Ébola.

La transmisión al hombre puede ocurrir por artrópodos (dengue, fiebre amarilla), por roedores (fiebres hemorrágicas producidas por arnavirus, fiebres hemorrágicas con compromiso renal producidas por virus Hantaan y otros) o también por contacto interhumano directo (virus Marburg, Ébola y Lassa).

Las enfermedades transmitidas por artrópodos se analizan en los capítulos de Arbovirus y de Dengue (Capítulos 27 y 33); las fiebres hemorrágicas producidas por arnavirus se analizaron en el Capítulo 25.1 y los hantavirus del viejo mundo (productores de las Fiebres hemorrágicas con compromiso renal) así como los del nuevo mundo (causantes del Síndrome pulmonar por hantavirus) se tratan en detalle en el capítulo 35.

En este capítulo se consignan las enfermedades producidas por los filovirus Marburg y Ébola y comentaremos brevemente las enfermedades producidas por hantavirus.

Un resumen de estas enfermedades se puede observar en la Tabla 25.2.1.

2. FILOVIRUS: FIEBRES HEMORRÁGICAS POR VIRUS MARBURG Y ÉBOLA

En 1967, inesperadamente se registró por primera vez en Alemania una nueva enfermedad hemorrágica grave que produjo siete muertos entre el personal de laboratorio que manipulaba tejidos de monos verdes africanos (importados de Uganda) para producción de cultivos primarios de riñón con fines de diagnóstico virológico. El nuevo virus aislado se denominó virus Marburg, por la ciudad alemana donde se registraron estos primeros casos.

En la década del 70 se detectaron en Zaire y Sudán brotes epidémicos de una enfermedad hemorrágica similar a la observada en Marburg, con elevada mortalidad (cercana al 80%). Como agente causal se identificó a otro virus que fue denominado virus Ébola.

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA FILOVIRIDAE

Posteriormente, estos virus emergentes (Marburg y Ébola) se incluyeron en la familia *Filoviridae*, orden Mononegavirales. El nombre de la familia deriva del latín *filum*, que significa hilo, y se refiere a las características morfológicas de estos virus al microscopio electrónico que presentan largas formas filamentosas, tubulares y/o circulares. Su tamaño es, a veces, mayor que el de las bacterias. Presentan envoltura lipídica y nucleocápside de simetría helicoidal. Su genoma es RNA de cadena simple y polaridad negativa con una extensión nucleotídica de 19 kb. Los virus penetran por endocitosis y la replicación es citoplasmática.

2.2 TRANSMISIÓN Y CUADROS CLÍNICOS

En muchas de estas infecciones se ha detectado **transmisión interhumana**, por exposición del personal médico a sangre o secreciones respiratorias de los pacientes.

La transmisión es por contacto directo, aerosoles o contacto con fluidos tisulares de los enfermos. El personal de salud en contacto con estos pacientes presenta un alto riesgo de infección, en especial si las condiciones de bioseguridad no son las adecuadas.

Los síndromes clínicos producidos por ambos virus son similares. Luego de un período de incubación de 3-15 días, la enfermedad comienza bruscamente con fiebre alta, cefaleas intensas y dolor lumbar. Luego, aparecen vómitos, diarrea, conjuntivitis y faringitis. En la segunda semana se observa una erupción máculopapular no pruriginosa, petequias y comienzan las hemorragias pulmonares, nasales, gingivales, conjuntivales y del tracto gastrointestinal. Se detecta plaquetopenia y hemoconcentración.

El mecanismo patogénico no se conoce; estos virus son pantrópicos, es decir, se diseminan a numerosos órganos donde producen necrosis. Se postula un daño endotelial que conduce a un aumento de permeabilidad vascular, seguido de hemorragias y *shock*. La mortalidad puede alcanzar del 25 al 90%.

2.3 EPIDEMIOLOGÍA

Luego del dramático accidente registrado en el personal de laboratorio de la ciudad de Marburg donde se descubrió este virus, se han detectado escasos casos en África.



Vector	Enfermedad	Reservorio	Familia/virus
Desconocido	Fiebre hemorrágica de Marburg*	¿primates?	<i>Filoviridae</i> <i>Virus Marburg</i>
¿Roedor?	Fiebre hemorrágica de Ébola*	¿?	<i>Filoviridae</i> <i>Virus Ébola</i>
Mosquito	Dengue	primates inferiores y ser humano	<i>Flaviviridae</i>
"	Rift Valley	ganado	<i>Bunyaviridae</i>
"	Fiebre amarilla	primates no humanos	<i>Flaviviridae</i>
Garrapata	Fiebre hemorrágica de Crimea	ganado	<i>Bunyaviridae</i>
"	Fiebre hemorrágica Kyasanur	primates no humanos, aves, ganado	<i>Flaviviridae</i>
"	Fiebre hemorrágica de Omsk	roedores	<i>Flaviviridae</i>
Roedor	Fiebre hemorrágica argentina	<i>Calomys musculus</i>	<i>Arenaviridae</i> <i>Virus Junín</i>
"	Fiebre hemorrágica boliviana	<i>Calomys callosus</i>	<i>Arenaviridae</i> <i>Virus Machupo</i>
"	Fiebre hemorrágica venezolana	roedores	<i>Arenaviridae</i> <i>Virus Guanarito</i>
"	Fiebre hemorrágica brasileña	roedores	<i>Arenaviridae</i> <i>Virus S. Páulo</i>
"	Fiebre hemorrágica africana	roedores, género <i>Mastomys</i>	<i>Arenaviridae</i> <i>Virus Lassa</i>
Roedor	Fiebres hemorrágicas con síndrome renal	Familia <i>Muridae</i> : ratas y ratones	<i>Bunyaviridae</i> , género <i>Hantavirus</i> : <i>Virus Hantaan, Puumala, Seoul</i>
Roedor	Síndrome Pulmonar	Familia <i>Sigmodontinae</i>	<i>Virus Sin Nombre</i> y otros por hantavirus <i>Virus Andes*</i> y otros

Tabla 25.2.1. Transmisión y etiología de las fiebres hemorrágicas virales. * Se ha detectado transmisión interhumana.

Por el contrario, se han registrado numerosos brotes epidémicos de virus Ébola en Zaire y Sudán con elevada mortalidad. Los datos de estudios serológicos indican que este virus es endémico en esas áreas y que pueden existir infecciones subclínicas. Se ha sugerido la existencia de roedores reservorios pero aún no se los ha identificado. No se han detectado artrópodos vectores.

Los virus Ébola se clasifican en cuatro subtipos: Sudán, Zaire, Costa de Marfil y Reston. Este último virus se identificó en una colonia de primates en Reston, EE.UU. donde produjo mortalidad entre los monos, pero no hubo casos fatales en los laboratoristas que se infectaron. Esto indica que pueden existir cepas de menor patogenicidad para el ser humano.

2.4 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

El diagnóstico de estos virus debe sospecharse en pacientes que han visitado las áreas endémicas en las últimas tres semanas (importancia de la anamnesis), en aquellos que han tenido contacto con fluidos corporales de pacientes o primates con enfermedad hemorrágica y en los laboratoristas que trabajan con estos virus.

Los casos sospechosos deben ser reportados inmediatamente a las autoridades sanitarias de cada país.

El diagnóstico de estos virus debe realizarse solamente en laboratorios con el mayor nivel de seguridad biológica (BSL 4- *Bio-safety Level 4*-).

La microscopía electrónica permite un diagnóstico rápido mediante la identificación de las características morfológicas de la familia *Filoviridae* en muestras de suero, orina o tejidos. Los virus pueden aislarse a partir de sangre o tejidos, obtenidos en autopsia, en células Vero seguidos de identificación por microscopía electrónica o por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos. También pueden emplearse la detección directa de antígenos por inmunofluorescencia o la RT-PCR para detectar el genoma viral.

El diagnóstico serológico mediante la detección de conversión serológica también es un procedimiento útil, aunque muchos pacientes fallecen antes de la seroconversión.

Durante la realización de estudios habituales de hematología y química clínica en muestras de estos pacientes deben adoptarse precauciones especiales (no contaminar la superficie externa de los tubos, rotular adecuadamente; manejar las muestras en una cabina de seguridad biológica clase II con prácticas de nivel 3 de seguridad; descontaminar las superficies y equipos, etc.).

2.5 PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

Hasta el momento no existe tratamiento específico ni vacunas disponibles. Se ha empleado ribavirina con resultados dispares. Deben adoptarse estrictas medidas de control en bioterios y laboratorios que emplean tejidos de primates para la obtención de cultivos celulares, así como controles en la importación de primates del África.

El personal de salud que atiende a estos pacientes, así como el personal de laboratorio debe emplear estrictas medidas de bioseguridad para evitar la transmisión por aerosoles, contacto directo y contacto con fluidos corporales.

3. FIEBRES HEMORRÁGICAS CON COMPROMISO RENAL: HANTAVIRUS

3.1 CARACTERÍSTICAS Y NOCIONES DE EPIDEMIOLOGÍA

Durante la guerra de Corea (década de 1950) se registró una enfermedad febril con hemorragias y compromiso renal que presentaba una mortalidad del 5-15%. Se la designó como fiebre hemorrágica coreana. Enfermedades similares, de aparición endemo-epidémica, habían sido descritas con anterioridad en otras zonas de Asia y Europa.

Las fiebres hemorrágicas con compromiso renal se manifiestan en dos formas: una, grave en el este de Asia, y la otra, más leve en Escandinavia.

Aunque la etiología viral de estas enfermedades había sido sospechada durante mucho tiempo, recién en 1978 se aisló el agente etiológico de la fiebre hemorrágica coreana. Se lo denominó virus Hantaan, por el nombre de un río de la zona donde se pudo aislar el virus a partir de un roedor silvestre, *Apodemus agrarius*. Este roedor transmite la enfermedad al hombre por medio de su orina y materia fecal. No se ha detectado transmisión interhumana. Esta enfermedad es una zoonosis y es más frecuente en áreas rurales, especialmente entre trabajadores del campo, soldados, etc. que están expuestos al contacto con secreciones infectadas de roedores reservorios. En Corea y otras áreas de Asia se registran cientos de casos por año con una mortalidad del 5%.

Además de las infecciones en áreas rurales, también se han descrito epidemias en áreas urbanas de Corea, China y Japón en las que el principal reservorio es la rata *Rattus norvegicus*.

El virus Hantaan se clasificó en la familia *Bunyaviridae*. Mide 100 nm y posee RNA. El diagnóstico de certeza se realiza por aislamiento del virus en cultivos celulares o en ratones, por técnicas moleculares, o por conversión serológica (IF, neutralización o ELISA).

Estudios posteriores demostraron que este virus no está localizado exclusivamente en Asia, sino que está diseminado en diversas áreas del planeta.

Se han detectado infecciones inaparentes en diferentes poblaciones que trabajan en estrecho contacto con roedores, tales como trabajadores portuarios (ratas) o personal de bioterios o laboratorios (ratas, ratones y otros roedores).

Los hantavirus se mantienen en la naturaleza mediante la infección persistente en los diversos roedores que constituyen sus reservorios naturales. De allí su distribución geográfica.

En Argentina, se ha detectado infección con virus Hantaan en ratas del puerto de la ciudad de Buenos Aires, y también en roedores de laboratorio en un elevado porcentaje (22%). Además, en el personal que manipula roedores en laboratorios y o bioterios se detectaron infecciones inaparentes por medio de encuestas serológicas en el 16% de los casos.

En EE.UU., Brasil, Uruguay y Bolivia también se han detectado infecciones inaparentes con el virus Hantaan. Serán necesarios posteriores estudios para determinar la extensión de estas virosis.

3.2 SÍNDROME PULMONAR POR HANTAVIRUS

En 1993 se describió en zonas rurales de *Four Corners*, en el sudoeste de EE.UU. una nueva enfermedad producida un nuevo hantavirus que desencadena un cuadro respiratorio agudo de gravedad, con elevada mortalidad. Se la denominó "síndrome pulmonar por hantavirus", y el nombre propuesto para el nuevo patógeno fue Virus Sin Nombre.

El reservorio es el *deer mouse* (*Peromyscus maniculatus*) que transmite el virus al hombre a través de sus excretas.

La infección ocurre por vía respiratoria. La enfermedad se observa principalmente en trabajadores rurales expuestos a secreciones contaminadas eliminadas por los reservorios. No hay transmisión interhumana. Aún no existe tratamiento específico.

Dada la importancia de los hantavirus productores del síndrome pulmonar para Argentina, estos virus se analizan en detalle el capítulo 35.



Virus	Familia	Reservorio	Enfermedad	Lugar
Fiebres hemorrágicas con compromiso renal				
<i>Hantaan</i>	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Apodemus agrarius</i>	FH de Corea FH de Japón	Corea Japón
<i>Puumala</i>	"	<i>Clethrionomys glareous</i>	Neuropatía epidémica	Escandinavia
<i>Seoul</i>	"	<i>Rattus norvegicus</i>	FH con síndrome renal	Asia y resto del mundo
<i>Prospect Hill</i>	"	Roedores de América	Ninguna	América
Síndrome pulmonar por hantavirus				
<i>Sin Nombre</i>	"	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Síndrome pulmonar	EE.UU.: Arizona, Colorado, Nuevo México
Otros virus	"	Roedores		Otras áreas de EE.UU.
<i>Virus Andes</i> y otros*	"	Roedores	Síndrome pulmonar	Sudamérica

Tabla 25.2.2. Enfermedades producidas por hantavirus. FH: fiebre hemorrágica. * Los hantavirus detectados en Argentina se aborda en el capítulo 35.

Bibliografía

- Bremen JG, van der Groen G, Peters JC, Heyman LD. "International Colloquium on Ebola virus Research. Summary report". *J Infect Dis*. 1997;176:1058.
- Centers for Disease Control and Prevention: Update: Management of patients with suspected viral hemorrhagic fever –United States, *MMWR* 1995;44:475.
- Johnson, KM. "Hemorrhagic fevers: a comparative appraisal". En Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. Editores: *Clinical Virology*, New York: Churchill Livingstone, 1997.
- Ndayimirije N, MK Kindhauser. "Marburg hemorrhagic fever in Angola-fighting fear and a lethal pathogen". *N Engl J Med* 2005;352:2155.
- Storch, GA (ed.). *Essentials of Diagnostic Virology*. Chapter 16. New York: Churchill Livingstone, 1999.
- World Health Organization. "Ebola outbreak chronology" (cited 2007, Feb 20), http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs_103/en/index_1.html
- World Health Organization. "Outbreak of Ebola haemorrhagic fever. Uganda. August 2000-January 2001". *Wkly Epidemiol Rec* 2001;76,41.

Virus de la rabia

Daniel M. Cisterna

La rabia es una enfermedad infecto-contagiosa de evolución aguda, habitualmente mortal. Esta enfermedad se caracteriza por presentar lesiones SNC, y es causada por el virus de la rabia que se transmite entre los animales de sangre caliente y el hombre. Por tal motivo, se encuentra clasificada entre las zoonosis. La rabia es la décima causa de muerte entre las enfermedades infecciosas, produciendo 60 000 decesos anuales.

1. GENERALIDADES

1.1. CLASIFICACIÓN

El virus de la rabia pertenece a la familia *Rhabdoviridae* (del griego, *rhabdos*, bastón). Los miembros de esta familia se clasifican en tres géneros de virus animales: *Lyssavirus*, *Ephemerovirus* y *Vesiculovirus*. El género *Lyssavirus* contiene siete especies: el virus de la rabia, el virus del murciélago de Lagos, el virus Mokola, el virus Duvenhage, los lisavirus del murciélago europeo tipo 1 y tipo 2 y el lisavirus del murciélago australiano (Tabla 26.1). Recientemente, cuatro nuevas especies, aisladas de murciélagos insectívoros de Euroasia, han sido propuestas: virus Aravan, virus Khujand, virus Irkut y virus del murciélago blanco del Cáucaso.

1.2. ESTRUCTURA

El virus de la rabia posee una forma característica de bala, de 100-430 nm de longitud y 45-100 nm de diámetro. La superficie del virus consiste en una envoltura de doble capa lipídica que deriva principalmente de la célula hospedadora, donde se insertan espículas. La envoltura encierra una nucleocápside helicoidal infecciosa de 30 a 35 vueltas. El genoma del virus de la rabia está constituido por una única molécula de RNA no segmentado de polaridad negativa de aproximadamente de 12 000 nucleótidos. El RNA codifica cinco proteínas en el siguiente orden 3' N-P-M-G-L 5': la proteína N (componente principal de la nucleocápside), la fosfoproteína P, la proteína de la matriz M (ubicada por fuera de la nucleocápside y en la superficie interna de la envoltura), la glicoproteína G (constituye las espículas que se insertan en la envoltura) y la proteína L (polimerasa viral RNA dependiente). Las proteínas N, P y L constituyen la nucleocápside. (Figura 26.1). La asociación de ésta con el genoma viral forma la ribonucleoproteína del virus. Las proteínas L y P actúan conjuntamente para desarrollar la actividad de polimerasa.

1.3. REPLICACIÓN

Luego de la adsorción a un receptor celular el virus penetra mediante la invaginación de la membrana celular hacia vesículas donde se produce la remoción de la envoltura viral. La nucleocápside es entonces liberada hacia el citoplasma. La remoción de dicha envoltura activaría el complejo polimerasa para iniciar los procesos de transcripción y replicación.

Dado que el genoma viral es de sentido negativo, es decir, tiene una polaridad opuesta al RNA mensajero (RNAm), el primer paso es la transcripción del RNAm viral. Dicho proceso, comienza en el extremo 3' y sigue un orden predeterminado: síntesis de una secuencia corta de RNA líder, seguida de los RNAm de los 5 genes estructurales, en el mismo orden en el que se los detecta en el ge-

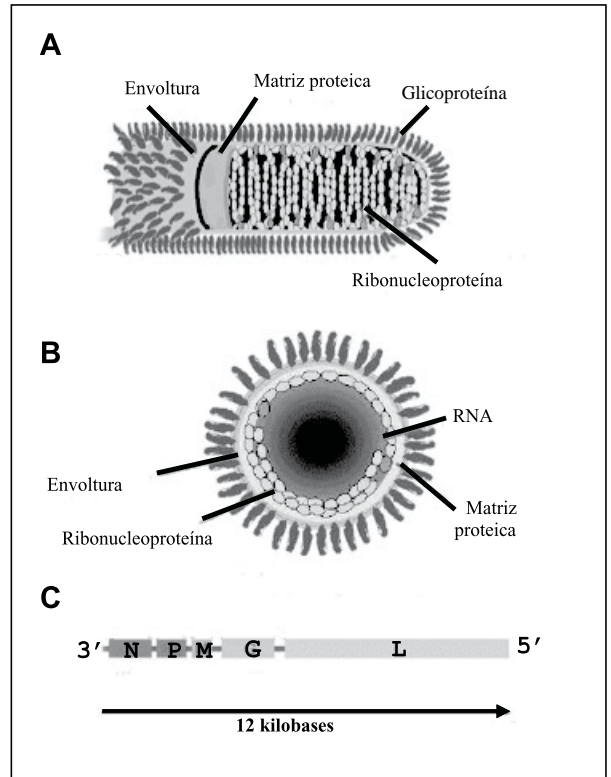


Figura 26.1. Estructura del virus de la rabia. (A) Corte longitudinal; (B) Corte transversal; (C) Genoma viral. Adaptado de <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies>

noma. La transcripción de los diferentes RNAm ocurre en una serie continua de eventos, con la particularidad de exhibir una frecuencia decreciente en un 30-40% en las sucesivas uniones genéticas, lo que produce un gradiente de producción de RNAm, de N>P>M>G>L. Este proceso transcripcional permite la posterior síntesis de las diferentes proteínas virales en proporciones diversas. El ensamblaje de las unidades que conforman la nucleocápside induciría al complejo polimerasa a ignorar las señales de terminación y procesamiento inherentes a la transcripción e iniciar la replicación viral.

El proceso de replicación consiste en el desarrollo secuencial de dos eventos: 1) síntesis de RNA de polaridad positiva, de idéntica longitud que el genoma viral cuya secuencia es complementaria a éste; y 2) síntesis de cadenas negativas utilizando como molde las cadenas positivas. Estas cadenas serán incorporadas a la progenie viral, que se ensambla en el citoplasma. La proteína G sintetizada es transportada, luego de su glicosilación, hacia la membrana celular donde queda anclada a través de su extremo carboxilo en la bicapa lipídica. Finalmente, las nucleocápsides migran hacia estas áreas modificadas, donde se distribuyen y a través de las cuales brotan. En este proceso de brotación la glicoproteína G y los lípidos de la membrana envuelven a la nucleocápside. La proteína M es incorporada al virión inmediatamente antes de la brotación del mismo.

Virus	Reservorio	Distribución geográfica
Virus de la rabia	Cánidos ¹ domésticos y salvajes, mustélidos ² , vivérridos ³ y murciélagos insectívoros y hematófagos	Mundial, excepto Australia y Antártida y algunas islas.
Virus del murciélago de Lagos	Murciélagos frugívoros	África
Virus Mokola	Probablemente murciélagos frugívoros o roedores	África
Virus Duvenhage	Probablemente murciélagos frugívoros	África
Lisavirus del murciélago europeo tipo 1	Murciélagos insectívoros	Europa
Lisavirus del murciélago europeo tipo 2	Murciélagos insectívoros	Europa
Lisavirus del murciélago australiano	Murciélagos frugívoros e insectívoros	Australia

Tabla 26.1. Miembros del género *Lyssavirus*. ¹Cánidos: principalmente perros, lobos, zorros, coyotes, y chacales, ²mustélidos: principalmente armiños, comadrejas, hurones, tejones y nutrias, ³vivérridos: principalmente mangostas.

1.4. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

El virus de la rabia puede infectar a todos los animales de sangre caliente bajo condiciones experimentales, pero sólo los mamíferos son hospedadores naturales importantes. Las especies que son reservorios incluyen a perros, zorros, chacales, lobos, armiños, comadrejas, hurones, tejones, mangostas y murciélagos. Muchas especies han sido infectadas experimentalmente con virus de la rabia, incluyendo aves. Los roedores, tales como ratones de laboratorio, se han utilizado ampliamente para el diagnóstico, ensayos de potencia de vacunas y estudios de patogenicidad.

Desde los estudios de Pasteur, las cepas de virus rábico se han clasificado por sus características biológicas en *virus calle* y *virus fijo*. Los *virus calle* son cepas aisladas de animales infectados naturalmente, de alta patogenicidad al inocularse por vía intramuscular, que producen enfermedad al cabo de períodos de incubación variable y que se eliminan por saliva. Los *virus fijos* son cepas que luego de sucesivos pasajes en animales de laboratorio producen la enfermedad tras un período de incubación más constante (*fijado*) en estos hospedadores; exhiben una patogenicidad reducida al ser inoculados por vía intramuscular, pero muy alta por vía intracerebral y no se eliminan por saliva. Los cultivos primarios de riñón de hámster, perro, cerdo y de otras especies se utilizan para el aislamiento y propagación de cepas de *virus fijo* y *calle* de la rabia. En particular, la línea celular continua BHK-21 es una de las más usadas, dado que es muy sensible a la infección y produce altos títulos virales. Aunque estas células se usan ampliamente para la propagación de *virus fijo*, el aislamiento de cepas calle de virus de la rabia no es consistentemente realizado en ellas y debe utilizarse cultivo de células primarias o líneas celulares de neuroblastomas de origen murino tales como las MNA.

Las células diploides humanas WI-38, MRC-5 y Vero son usadas en la producción comercial de la vacuna de rabia de uso humano.

1.5. INACTIVACIÓN POR AGENTES QUÍMICOS Y FÍSICOS

El virus de la rabia es inestable a pH menores de 3 ó mayores de 11. Es estable durante muchos años a -70°C o liofilizado a 4°C . Es rápidamente inactivado por desecación, rayos ultravioletas y rayos X, luz solar, tripsina, propiolactona, éter y detergentes.

2. CUADROS CLÍNICOS

El período de incubación de la enfermedad es usualmente de 1-2 meses, pero puede ser inferior a una semana o prolongarse por varios años. Un 95% de los casos tiene un período de incubación menor a un año. La duración del período de incubación depende del lugar de la mordedura y su proximidad al SNC, tipo y cantidad de virus introducida, edad del hospedador y estado inmune.

Los casos de rabia son mayormente asociados a la mordedura de un animal rabioso. Otras exposiciones que rara vez causan rabia

son la inhalación de aerosoles, lamidas o arañazos u otros eventos inusuales que llevan a la contaminación de una herida abierta o de una mucosa, tales como un trasplante de córnea de un donante infectado. Cuando no se inicia la vacunación específica post-exposición, la mortalidad más elevada ocurre en personas mordidas en la cabeza y la cara (40-80%), siendo la mortalidad intermedia en aquéllas mordidas en las manos o brazos (15-40%), y menor aún en aquéllas mordidas en el tronco o piernas (5-10%) o través de la ropa (<5%).

El desarrollo clínico de la rabia se puede dividir en tres fases: un período prodrómico, una fase neurológica aguda y un coma que precede a la muerte. Durante la fase prodrómica, que en general dura de 2 a 10 días, los síntomas iniciales son inespecíficos y consisten en malestar general, fatiga, cefaleas, anorexia, vómitos, fiebre, fofobia, diarrea y mialgias. Un 50% de los pacientes presenta dolor o parestesias en el sitio de mordedura y éste puede ser el primer síntoma específico de rabia. En la fase neurológica aguda, que suele superponerse a la fase prodrómica, el paciente desarrolla signos de compromiso del SNC. Los signos neurológicos iniciales pueden incluir hiperactividad, desorientación, alucinaciones, convulsiones, conducta grotesca, rigidez de nuca o parálisis. Los casos en los cuales predomina la hiperactividad, se denominan *rabia furiosa* y el 17-80% de estos pacientes muestran signos patognómicos de rabia tales como la hidrofobia. La rabia paralítica aparece en un 20% de los casos, en general, asociada a la exposición a murciélagos hematófagos con rabia. Esta situación se observa con alguna frecuencia en espeleólogos.

En la rabia furiosa, el período neurológico finaliza después de 2 a 7 días con coma o muerte súbita. En la rabia paralítica, el desarrollo de la enfermedad es menos progresivo y algunos pacientes pueden vivir hasta 30 días sin cuidado intensivo, con un estadio final de 3-7 días en coma seguido de muerte. Los pacientes que reciben cuidados intensivos pueden sobrevivir por varias semanas. Se han informado al menos 7 casos humanos de recuperación, ninguno de los cuales fue espontáneo, sino debido a que cada paciente había tenido profilaxis pre o post-exposición o bien recibido un tratamiento experimental con antivirales, asociado a la inducción farmacológica de coma terapéutico (actualmente controversial).

3. PATOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNE

El virus rábico penetra en el organismo mediante la inoculación de saliva infectada a través de mordeduras o heridas preexistentes, aunque también puede hacerlo a través de las mucosas. La interacción del virus rábico con el receptor celular es un evento importante para la patogénesis. Se ha demostrado la interacción de la proteína G viral con el receptor nicotínico de acetilcolina. Asimismo, se ha observado la participación de otras moléculas tales como gangliosidos, fosfolípidos, moléculas de adhesión neuronal, y el receptor del factor de crecimiento neural p75 como potenciales receptores del virus. De estas interacciones, surge que la proteína G influye

en el neurotropismo viral. Según el título de virus inoculado en la mordedura y la virulencia de la cepa infectante el virus puede ingresar directamente en las terminales nerviosas o replicarse en el tejido muscular donde permanece un tiempo determinado que es por lo general suficiente para permitir la acción de los anticuerpos generados por la vacunación. Cuando estos anticuerpos no eliminan la infección, el virus penetra en el sistema nervioso periférico por los husos neuromusculares, para llegar en forma centrípeta a todo el organismo, incluyendo el SNC y, especialmente las glándulas salivales, lo cual representa la fase final de la infección y es importante para la transmisión desde un animal a otro y al humano.

Los mecanismos moleculares de la patogénesis viral no están totalmente dilucidados. Varios estudios señalan que la glicoproteína G tiene un rol esencial en la patogenicidad. La neuroinvasividad viral está directamente (aunque no de modo excluyente) vinculada a dicha glicoproteína G de envoltura. Se ha observado que cepas que tienen una sustitución del aminoácido arginina en la posición 333 de la glicoproteína G tienen un comportamiento apatógeno o atenuado. Sin embargo, se desconoce el real valor de dicha mutación en el curso de infecciones naturales, ya que los estudios realizados con estas cepas mutadas fueron ejecutados con cepas significativamente atenuadas en cultivos celulares *in vitro*, con patogenicidad inferior a las cepas de *virus calle*, aunque inicialmente poseían Arg333 en la proteína G. Además, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado su importancia en la habilidad de infectar células de neuroblastoma, diseminarse de célula a célula *in vitro* y a través del cerebro. Estudios con virus rábico recombinantes que tienen incorporado el gen G de cepas neurotrópicas y neuroinvasivas en un contexto génico de cepas que no lo son, exhiben una significativa merma de la patogenicidad del virus recombinante comparado con los virus salvajes. Ello sugiere un carácter multigénico en la neuroinvasividad viral, habiéndose propuesto a la expresión del gen L como partícipe de la determinación de la neuroinvasividad. Asimismo, la diseminación trans-sináptica es otro factor clave en dicho proceso. La presencia de la proteína G es necesaria para transporte desde el sitio post-sináptico al pre-sináptico, mientras que la proteína P podría contribuir al transporte axonal retrógrado de partículas desnudas, al interactuar con la cadena liviana (LC8) de la dineína, aunque hasta el momento no se ha establecido que el proceso de desnudamiento viral ocurra en la terminal axonal o en el sitio presináptico. Un mecanismo alternativo de transporte retrógrado podría involucrar el tráfico de vesículas conteniendo partículas virales completas (luego que la proteína G del virus hubiera interactuado con el receptor del factor de crecimiento neural p75, que en forma de complejo sería internalizado por vesículas de clatrina en los endosomas tempranos, que a su vez podrían ser vehiculizadas por vía retrógrada).

Otros investigadores han señalado que los virus altamente patogénicos, en apariencia pueden usar diferentes receptores o rutas de entrada a aquellas utilizadas por cepas apatógenicas. También se ha sugerido que pueden afectar en forma diferencial la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad Clase II en el SNC.

En la autopsia, no es usual que se observen lesiones importantes en el cerebro, excepto una congestión vascular en pacientes que mueren después del uso prolongado de ventilación mecánica. Microscópicamente, la patología producida por el virus de la rabia en el SNC es descrita como una encefalitis que presenta cuerpos de Negri (masas eosinófilas formadas por nucleocápsides virales asociadas a TLR-3). En general, los cambios histopatológicos del SNC son limitados y no están relacionados con la sintomatología neurológica, observándose nula o mínima muerte neuronal. El deterioro de la función neurológica, más que los cambios anatómicos subyacentes, es responsable del desarrollo de los signos clínicos.

El mecanismo de daño neurológico en la rabia no ha sido establecido con precisión aún. Se postula que la disfunción neuronal está asociada a una drástica inhibición de la síntesis proteica y a una alteración de la neurotransmisión vinculada a la expresión de la proteína G en la superficie celular que afecta los canales iónicos.

La respuesta inmune humana a la infección rábica natural es insuficiente para prevenir la enfermedad. Los anticuerpos inducidos

por la vacunación, particularmente aquellos con actividad neutralizante, tienen un rol importante en la defensa inmune contra la infección. La proteína G representa el único antígeno que induce anticuerpos neutralizantes y es capaz de conferir inmunidad contra el desafío de una infección rábica letal.

En síntesis, el neurotropismo, la neuroinvasividad y el deterioro de la función neural son las tres principales características de la infección por virus rabia.

4. EPIDEMIOLOGÍA

La rabia se presenta en todos los continentes con excepción de la mayor parte de Oceanía. Varios países están libres de la infección entre ellos Barbados, Jamaica, Uruguay y varias islas del Caribe en el continente americano, el Japón en Asia, Bulgaria, España, Gran Bretaña, Irlanda, los Países Bajos, Portugal y varios países escandinavos en Europa.

La rabia es en principio una enfermedad de animales y, por lo tanto, la epidemiología de la rabia humana está directamente relacionada a la epizootiología de la rabia animal. Los conceptos de vector y reservorio son específicos para esta patología y no son los mismos que se emplean en otras enfermedades. El término *reservorio* define una especie de animal susceptible, la que por sí misma sostiene la infección o el ciclo epidemiológico en una área geográfica. Por otra parte, el término *vector* define a cualquier especie susceptible, reservorio o no, que constituye un efectivo transmisor de la infección a otra especie animal o humana. El vector y el reservorio son exclusivamente mamíferos y, cada cierto tiempo y en regiones específicas del mundo, determinadas especies animales pueden actuar simultáneamente como vectores excretando el virus y como reservorios conservando el virus infeccioso para por fin fallecer por la propia enfermedad. La conservación del virus por periodos largos de tiempo se explica por las fases de incubación prolongadas antes de desarrollar el cuadro clínico. El hombre y otros mamíferos de la región en donde existe circulación viral son víctimas de virus y, en este caso, hospedadores finales de la enfermedad al morir. Por esta razón, es muy importante identificar las especies consideradas vectores y reservorios antes de evaluar los riesgos que corre el hombre y otras especies de mamíferos. El reservorio y vector de rabia difieren de una región a otra, incluso en cada ecosistema pueden ser una o dos especies las que actúan como responsables del mantenimiento enzoótico de la rabia.

La identificación de las especies que actúan como reservorio ha avanzado considerablemente en la última década, gracias a la caracterización antigénica de las cepas de virus de la rabia aisladas en un amplio número de diversos animales. El empleo de una batería de anticuerpos monoclonales anti-proteína N ha permitido determinar la prevalencia relativa, la distribución y la transmisión de la rabia entre diferentes especies salvajes. Un panel de ocho anticuerpos monoclonales, desarrollado por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EE.UU., ha permitido identificar variantes antigénicas de virus rabia (numeradas de V1 a V8), que identifican una especie reservorio dada en diferentes países de América Latina.

En Argentina, se han identificado cinco variantes antigénicas mantenidas por perros (V1), perros y posiblemente zorros (V2), murciélagos hematófagos como *Desmodus rotundus* (V3) y murciélagos insectívoros tales como *Tadarida brasiliensis* (V4) y *Lasiurus cinereus* (V6).

Los análisis con anticuerpos monoclonales proporcionan una resolución de las diferencias entre antígenos víricos suficiente para identificar la distribución geográfica y por especies de muchas variantes de la rabia. Sin embargo, su empleo exclusivo no está exento de limitaciones y ha fallado en caracterizar el 5,7% de las cepas de este virus pertenecientes a un panel de cepas aisladas en Argentina entre 1995-2002. En general, la diversidad de las variantes presentes en los murciélagos no puede ser explicada fácilmente con los monoclonales existentes. El análisis genético proporciona una información más detallada sobre la relación evolutiva de los aisla-

mientos, los cambios temporales y espaciales que se producen y las similitudes entre los aislamientos.

4.1. CICLOS DE LA RABIA

Se distinguen dos ciclos de la rabia: urbano y selvático. La rabia urbana tiene como principal reservorio al cánido y la mayoría de los casos se atribuye a esta especie; la infección se mantiene en forma epizootica y ocasionalmente afecta a otros animales domésticos como por ejemplo felinos o porcinos. En la rabia silvestre intervienen varias especies animales según el nicho ecológico; el virus permanece en su ciclo enzootico y tiene dos formas: la aérea, mantenida por los quirópteros, y la terrestre, donde intervienen una gran variedad de mamíferos silvestres.

En áreas donde la rabia de animales domésticos no se ha controlado en forma adecuada, los perros son responsables de la mayoría de los casos humanos informados. En América Latina, entre 1982 y 2003, el número de casos humanos disminuyó de 355 a 35, lo que representa una reducción de 91%, cifra muy semejante a la tendencia observada de la rabia canina, que disminuyó de 15 686 a 1 131 casos, es decir 93% en el mismo período. El perro es responsable de 65% del total de casos con información sobre el animal agresor. La rabia humana transmitida por perros fue la que básicamente presentó esa reducción, disminuyendo de 152 a 27 casos anuales. En Argentina, en el mismo período, la incidencia de la rabia canina descendió de 57 casos en 1990 a 2 casos en 2001, con un máximo de 101 casos en 1993. Sin embargo, en 2002 y 2003 el número de casos se incrementó debido a la reemergencia de la rabia canina en algunas ciudades de las provincias de Salta y Jujuy en la frontera con Bolivia donde se informaron 157 casos en 2003, todos correspondientes a la variante V1. Continúan notificándose casos aislados de rabia en perros y zorros en las provincias de Formosa y Chaco, asociados a la variante V2. En 2008, se registró el último caso de rabia humana transmitida por perros, hecho acaecido en la provincia de Jujuy.

En los países en donde se ha controlado o erradicado la rabia canina, la rabia silvestre se ha tornado más importante. Analizando el período 1990-2003, se observó que la rabia humana transmitida por las diferentes especies se redujo de 251 casos a 35 (86%). El 75% de los casos de rabia humana causada por animales silvestres se debe a murciélagos.

La rabia en los murciélagos es un problema independiente de los ciclos infecciosos de otros mamíferos. Es necesario distinguir la infección en quirópteros hematófagos y no hematófagos. La rabia en los murciélagos no hematófagos se registra del norte al sur del continente americano y se ha comprobado en numerosas especies. En Argentina, se han notificado aislamientos de virus de la rabia en la mayoría de las provincias, incluso en las más australes como Río Negro, Chubut y Santa Cruz. *Tadarida brasiliensis* es la especie más frecuentemente identificada (53-78%), asociada a la variante V4. En menor medida, se ha detectado rabia en otras especies, tales como *Lasiurus spp*, *Molossus spp*, *Myotis spp* e *Histiotus spp*, entre otras.

La rabia en murciélagos hematófagos o vampiros es un problema limitado a América Latina, Trinidad y Tobago. La infección se ha comprobado en las tres especies de hematófagos: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngi*, pero sólo la primera tiene importancia epidemiológica. La distribución de los vampiros *D. rotundus* comprende un área que se extiende desde México hasta la parte central de Argentina. Afectan principalmente al ganado y producen la denominada *rabia parresiente*. Ataca principalmente a los bovinos, equinos, mulares y asnales. En la Argentina, el área endémica abarca las provincias de Misiones, Corrientes, Chaco, Formosa y parte de las de Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca, Santiago del Estero y Santa Fe. Existen registros de 5 casos de rabia humana causados por murciélagos hematófagos entre 1966 y 2001, todos ocurridos en provincias del norte del país.

5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico de la rabia puede ser realizado si se dispone de una historia de exposición y de signos y síntomas clínicos com-

patibles. Aunque la rabia humana es una enfermedad extremadamente rara en Argentina, la misma debería ser considerada como un diagnóstico posible en casos de encefalitis viral de etiología desconocida, especialmente en zonas endémicas de murciélagos hematófagos.

Todas las muestras que serán utilizadas para el diagnóstico de rabia deben ser consideradas potencialmente infecciosas y ser manipuladas con las condiciones de bioseguridad adecuadas. Las muestras deben ser enviadas congeladas con hielo seco. Si no son enviadas inmediatamente deben ser conservadas a temperaturas de -20° C o inferiores. La Tabla 26.2 indica las muestras adecuadas para la investigación del virus de la rabia en humanos.

La presencia de virus infeccioso, ácidos nucleicos o antígeno viral se puede detectar en muestras de saliva, nervios cutáneos, LCR u otros tejidos (Tabla 26.2).

Los ensayos más usados para detectar la infección rábica son la inoculación de ratones lactantes y la técnica directa de inmunofluorescencia directa. Los ratones se inoculan por vía intracerebral y se observan 21-30 días para detectar síntomas de encefalitis y, en los cerebros de los que mueren se realiza una inmunofluorescencia directa. La inoculación en ratones es la técnica de referencia para el diagnóstico pero resulta muy lenta y cara.

Para la técnica de inmunofluorescencia directa se realizan imprints con los tejidos sospechosos y se enfrentan con anticuerpos antirrábicos marcados con fluoresceína preparados contra el virus completo o ribonucleoproteínas purificadas, o bien con una mezcla de monoclonales reactivos contra la proteína N. Al microscopio de fluorescencia se observan granuleciones citoplasmáticas (correspondientes a los corpúsculos de Negri) teñidos de verde manzana y también el llamado *polvo antigénico* constituido por antígenos virales que no han llegado a formar los corpúsculos. Este ensayo de inmunofluorescencia directa es la técnica de elección ya que es rápida, muy sensible y específica. La eficacia de la prueba depende del entrenamiento en la lectura y de la calidad de los reactivos, en especial del conjugado.

El ensayo de PCR acoplada a transcripción inversa (RT-PCR) se utiliza para amplificar una porción del genoma viral presente en el cerebro, saliva u otros tejidos. En muestras de cerebro, donde la cantidad de virus presente es muy alta, es preferible utilizar la prueba de inmunofluorescencia ya que es más económica y eficiente. Cuando es necesario investigar la presencia de RNA viral en muestras de LCR o saliva es necesario utilizar una RT-PCR anidada para aumentar la sensibilidad de la técnica (RT-nPCR).

La detección de anticuerpos en el suero de un individuo sin vacunar también sugiere la infección rábica. Con excepción de ciertos casos de encefalo-mielitis post-vacunal, la presencia de anticuerpos en el LCR sólo se produce en individuos infectados con rabia y no en vacunados. La sensibilidad y especificidad de los diferentes ensayos para medir anticuerpos contra el virus de la rabia varían enormemente. La proteína G es la más importante para conferir inmunidad a la infección letal con este virus y, en consecuencia, los ensayos de inmunogenicidad de vacunas deben medir anticuerpos contra esta proteína. Estos anticuerpos se miden mediante pruebas de neutralización en ratones lactantes o a través del ensayo rápido de reducción focos fluorescentes. Las pruebas de neutralización requieren el mantenimiento de ratones y una demora de 2-3 semanas para obtener los resultados. El ensayo reducción de focos fluorescentes mide la capacidad del suero de neutralizar un inóculo desafío, indicado por la reducción en el número de focos fluorescentes de las células infectadas. El número de unidades internacionales (UI) de anticuerpos contra virus de la rabia en el suero analizado se determina por comparación con un suero estándar incluido en el ensayo. Una muestra de suero obtenida después de 2-4 semanas post-vacunación debería contener al menos 0,5 UI/ml (título protector). Se han desarrollado varios ensayos de ELISA que miden anticuerpos dirigidos hacia glicoproteína G purificada. Estos ensayos son más rápidos y muestran una excelente correlación con los resultados obtenidos por neutralización o reducción de focos fluorescentes.

El diagnóstico de la rabia no es difícil cuando existen antecedentes de que el paciente ha sido mordido por un animal poten-

cialmente rabioso y presenta signos clínicos de hiperactividad e hidrofobia. Sin embargo, sólo el 71-84% de los pacientes con rabia muestra antecedentes de posible exposición rábica. En ausencia de antecedentes de exposición o de hidrofobia, hay pocos signos y síntomas que permitan diferenciar inicialmente la rabia de otras encefalitis virales, como las causadas por virus herpes y arbovirus. En ocasiones, el tétanos puede ser confundido con rabia, aunque la rigidez muscular de aquél difiere en que las contracciones son más prolongadas y el LCR es normal. Es más difícil diferenciar la rabia parálitica de otras patologías neurológicas parálíticas, tales como poliomielitis, síndrome de Guillan-Barre y mielitis transversa.

Es particularmente difícil diferenciar la rabia clínica de una encefalo-mielitis post-vacunal. Cuando el período de incubación es corto y los síntomas de pródromo se superponen con la administración de las vacunas, o cuando los períodos de vacunación son prolongados y la vacunación se inicia de forma tardía, la aparición de síntomas compatibles con rabia aparece superpuesta a la aplicación de las vacunas. En general, la enfermedad es de iniciación brusca y tiene como antecedente la aplicación de la vacuna anti-rábica entre 10 a 20 días antes del inicio del cuadro. Los exámenes electroencefalográficos y electromiográficos, en conjunto con el análisis virológico del LCR, pueden colaborar en su diagnóstico. En particular, el nivel de anticuerpos anti-rábicos presentes en el LCR es siempre mayor en la encefalitis rábica que el que se puede alcanzar con la vacunación.

6. PROFILAXIS PRE-EXPOSICIÓN DE LA RABIA HUMANA

La vacunación anti-rábica es uno de los métodos empleados para prevenir la rabia en las personas mordidas por animales rabiosos. Las primeras vacunas para seres humanos, como las desarrolladas por Pasteur (homogenatos desecados de médulas de conejos infectados experimentalmente con virus rabia tipo *fijo*), Ferni (virus inoculado en tejido nervioso de conejo e inactivado en forma parcial por la acción del fenol al 1%) y Semple (virus inoculado en cerebro de carnero fenolizado al 1%) se obtenían usando animales adultos. Estas vacunas producían una alta tasa de reacciones neurológicas (aproximadamente 1/1 000 personas vacunadas) por lo que fue necesario la búsqueda de otros sustratos para propagar el virus y así

se desarrollaron las de tejido nervioso de animales recién nacidos, como la de cerebro de ratones lactantes que contiene menor cantidad de mielina. Ésta última se emplea en la Argentina y consiste en una suspensión al 1% de encéfalos de ratones lactantes infectados, centrifugada e inactivada mediante irradiación ultravioleta y tratada con timerosal al 0,01% y fenol al 0,25% como preservativos. Esta vacuna fue desarrollada por los investigadores chilenos Fuenzalida y Palacios. La tasa de reacciones vacunales se redujo a 1/20 000 personas vacunadas. Para eliminar las reacciones post-vacunales, se han desarrollado varias vacunas en cultivo celulares; las producidas en células diploides humanas, fibroblastos de pollos y en la línea celular Vero son las más empleadas en la actualidad. Estas vacunas son inactivadas con beta-propiolactona. Su producción es relativamente dificultosa y poco eficiente, lo que aumenta los costos de producción. Los avances biotecnológicos, tales como las técnicas de purificación, han permitido la producción de vacunas menos costosas, como la vacuna purificada en células Vero.

A la fecha, no existen evidencias que sugieran que el fracaso en la profilaxis pueda ser causado por la variación antigénica del virus de la rabia. Los casos humanos de rabia ocurridos a pesar de la vacunación han sido atribuidos a otros factores, tales como un cuidado inadecuado de la herida, omisión o falla en el uso de la inmunoglobulina, y demora o falla en seguir los procedimientos recomendados.

La profilaxis pre-exposición está indicada en veterinarios, personal de laboratorio de diagnóstico o investigación que trabaja con este virus.

7. PROFILAXIS POST-EXPOSICIÓN

Dado que no existe tratamiento alguno para salvar la vida de una persona con signos y síntomas de rabia, la profilaxis post-exposición es una urgencia médica (no una emergencia médica). Anualmente en la Argentina se atiende a un promedio de 17 000 personas agredidas por animales. Las recomendaciones para el tratamiento después de la exposición sugeridas por el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud sobre rabia se indican en la Tabla 26.3. El tratamiento con vacuna de cerebro de ratón lactante sugerido sigue el esquema clásico que se compone de una serie inicial



Tipo de muestras	Toma de muestra	Técnicas diagnósticas
Saliva	En tubo estéril. No agregar preservantes.	RT-nPCR Inoculación en ratón Cultivo celular
Biopsia de nuca	Extraer piel (5-6 mm de diámetro) en la parte posterior de la nuca debajo de la línea del cabello. Debe incluir al menos 10 folículos pilosos y ser profunda para incluir los nervios cutáneos de la base del folículo. En tubo con solución fisiológica estéril.	IFD RT-PCR Inoculación en ratón
LCR	Recolectar al menos 0,5 ml	<i>Detección de anticuerpos mediante:</i> ELISA Neutralización Reducción de focos fluorescentes RT-nPCR
Suero	Recolectar al menos 1 ml. No usar sangre entera.	<i>Detección de anticuerpos mediante:</i> ELISA Neutralización Reducción de focos fluorescentes
Biopsia de cerebro	En tubo estéril. No agregar preservantes.	IFD RT-PCR Inoculación en ratón
¹ Necropsia de cerebro	En tubo estéril. No agregar preservantes.	IFD RT-PCR Inoculación en ratón

Tabla 26.2. Diagnóstico de rabia en humanos. ¹Tomar porciones de médula, cerebelo e hipocampo. RT-nPCR: *nested* PCR previa transcripción inversa; IFD: inmunofluorescencia directa.

Naturaleza del contacto	Estado del animal sin considerar si está vacunado		
	En el momento del episodio sospechoso	Durante el período de observación de 10 días ^a	Acción recomendada
Contacto sin lesión; contacto indirecto; ningún contacto	Rabioso	Sano	Ninguna
Lamedura de la piel; arañazos o erosiones; mordedura leve en las partes cubiertas de los brazos, del tronco y de las piernas	a- Presuntos síntomas de rabia ^b	Sano	Iniciar la vacunación Interrumpir la misma si el animal sigue sano durante cinco días ^{a, c}
	b- Animal salvaje ^d o animal que no puede ser sometido a observación	Rabioso	Iniciar la vacunación. Si el diagnóstico es positivo, administrar suero y completar el esquema de vacunación.
Lamedura de las mucosas; mordedura grave compuesta de mordeduras múltiples o situadas en cara, cabeza, dedos y cuello	Animal doméstico o salvaje ^b sospechoso de rabia ^d o rabioso, o animal que no puede ser sometido a observación	Rabioso	Administrar suero y vacuna. Interrumpir la vacunación si el animal sigue sano durante cinco días. ^{a, c}

Tabla 26.3. Guía para instituir la profilaxis anti-rábica post-exposición de la persona.

^a El período de observación recomendado se aplica sólo a perros y a gatos.

^b En zonas endémicas, todos los casos de mordeduras sin provocación deben ser considerados sospechosos, con excepción de aquéllos en los que los resultados de la inmunofluorescencia directa en cerebro sea negativa.

^c O si la prueba de inmunofluorescencia directa es negativa.

^d En general, en el contacto con roedores y conejos no es necesario el tratamiento antirrábico específico.

de 14 dosis, aplicándose 1 cada 24 horas y 2 dosis de refuerzo a los 10 y 20 días después de finalizada la serie inicial. En el caso de las vacunas producidas en cultivos celulares se recomienda un esquema de aplicación de 5 dosis y un refuerzo a los 90 días.

El tratamiento específico de la rabia consiste en la administración de suero y vacunas anti-rábicas o sólo de las vacunas que se mencionaron en el párrafo anterior. La diferencia depende de la gravedad de la exposición y de la especie agresora. El tipo de tratamiento anti-rábico a prescribir depende de varios factores: a) el sitio de la mordedura; b) la magnitud de las heridas; c) la especie agresora; d) las circunstancias que rodearon la agresión; e) la situación epidemiológica del área donde ocurrió el accidente; y f) del informe inmediato del médico veterinario encargado de la observación (especialmente cuando el agresor ha sido un perro o un gato).

Los sueros anti-rábicos para uso humano se utilizan en el tratamiento de pacientes que sufrieron heridas graves o mordeduras por animales silvestres. Si el suero es de origen humano se denomina homólogo y se obtiene por la concentración y fraccionamiento del plasma de personas previamente inmunizadas. Si el suero es de origen animal se denomina heterólogo y se obtiene del plasma de mulas o caballos hiper-inmunizados.

El tratamiento debe iniciarse lo más precozmente posible después de la exposición, pero en ningún caso se debe rehusar la administración del mismo a una persona expuesta cualquiera sea el tiempo ya transcurrido. En las zonas donde se carezca de suero anti-rábico habrá que administrar el tratamiento vacunal completo.

7.1. ACCIONAR LOCAL EN LAS HERIDAS CON POSIBLE EXPOSICIÓN AL VIRUS DE LA RABIA: MEDIDAS RECOMENDADAS EN TODOS LOS CASOS

7.1.1. Primeros auxilios

Como el procedimiento más eficaz de protección es la eliminación del virus de la rabia en el punto de infección por métodos químicos o físicos, el lavado inmediato y a chorro con agua jabonosa, con un detergente o aun con agua sola (método recomendado en todas las mordeduras, inclusive en las que no haya posibilidad de contacto con virus rábico) es una medida indispensable. A continuación se aplica alcohol (400-700 ml/litro), tintura de yodo o soluciones yo-

dadas o compuestos de amonio cuaternario (1 ml/litro). En caso de que se haya empleado jabón para limpiar la herida, se eliminarán todas las partículas que queden antes de aplicar los compuestos de amonio cuaternario, pues el jabón neutraliza su actividad.



7.1.2. Accionar inmediato efectuado por el médico o realizado bajo su supervisión

Se deben efectuar las siguientes acciones: a) limpiar la herida según lo indicado en el párrafo anterior; b) aplicar el suero anti-rábico, instilándolo cuidadosamente en la herida e infiltrándolo alrededor; c) posponer la sutura de la herida, aunque si la realización de la misma es imperativa, se procederá a la aplicación tópica de suero anti-rábico en la forma indicada; d) aplicar –cuando estén indicadas– las medidas de prevención contra el tétanos y otras infecciones distintas de la rabia.

7.1.3. Accionar general específico

Es dependiente de la naturaleza del contacto y del animal en el momento de la exposición y durante el periodo de observación, si es que se hubiera logrado su captura.

8. MEDIDAS A EJECUTAR CON EL ANIMAL AGRESOR

En el caso que el agresor fuere un perro o un gato, dicho animal deberá ser capturado y puesto en observación por un período de 10 días (período máximo después del cual si el animal hubiera eliminado virus por saliva al momento de la agresión, debería exhibir signos de enfermedad). Transcurrido dicho período, si el animal permanece sin signo-sintomatología compatible con rabia, podrá asegurarse que no estaba rabioso al momento de la agresión. Todo animal mordedor del que se sospeche que está rabioso debe sacrificarse inmediatamente y realizar un estudio de sus tejidos por técnicas apropiadas de laboratorio.

9. CONTROL DE LA RABIA ANIMAL

La mejor manera de proteger al hombre contra la rabia –como contra otras zoonosis– es reducir el número de animales transmisores

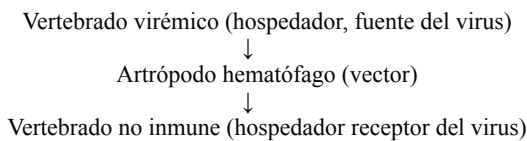
Virus transmitidos por artrópodos

Marta S. Sabattini

1. DEFINICIÓN

Los virus transmitidos por artrópodos, denominados arbovirus (del término en inglés *arthropod borne*), constituyen un agrupamiento de virus que comparten su principal mecanismo de transmisión, por el que son perpetuados en la naturaleza.

El ciclo de transmisión es:



2. CICLOS SILVESTRES

Los arbovirus replican (infectan), amplificándose, en el hospedador y en el vector. Se han detectado arbovirus en reptiles, aves y mamíferos. Producen una infección aguda, con desarrollo de viremia (virus en el plasma sanguíneo) y posterior aparición de anticuerpos, que se mantienen de por vida. La calidad de hospedador depende de la duración y nivel de la viremia y de la letalidad, que debe ser baja o nula, para que se mantenga el nivel de la población. El ciclo se limitaría en un lugar por acumulación de inmunes; esto debe ser compensado por nacimiento de susceptibles y si no lo es, el ciclo se traslada a sitios vecinos donde el hospedador no está inmune.

Los principales artrópodos implicados como vectores son los mosquitos, pero se han descubierto también arbovirus transmitidos por garrapatas, culicoides y flebotomos. Solamente la hembra de estos artrópodos puede ser vector de arbovirus porque necesita ingerir sangre de un vertebrado para oviponer. La competencia vectorial está dada por la capacidad de infectarse al ingerir sangre del hospedador virémico y la capacidad de transmitir el virus a otro hospedador susceptible. Para cada par de virus y vector existe un umbral de la cantidad de virus en sangre por debajo del cual el vector no se infecta. Superando ese umbral, el virus ingerido llega al intestino, en cuyas paredes se replica, pasa a la linfa y con ella llega a la glándula salival, donde se encuentra durante toda la vida del vector. Esta infección no es deletérea. Cuando el vector infectado pica a otro hospedador, inyecta saliva contaminada. El tiempo desde que el vector ingiere la sangre virémica hasta que el virus se detecta en la glándula salival y lo puede transmitir, se denomina período de incubación extrínseca. Este proceso es dependiente de la temperatura ambiente. La longevidad del vector es suficiente para proveer la oportunidad de picar a múltiples hospedadores susceptibles, transmitiendo el virus.

Cada lugar geográfico, y en él, cada hábitat, tiene su fauna y su flora particular, con especies de arbovirus específicas que han encontrado las especies de vectores y hospedadores que los perpetúan y que constituyen el nicho ecológico para cada especie viral. Las selvas ecuatoriales y tropicales de todo el mundo, con su gran diversidad de especies en la fauna, ofrecen el nicho adecuado a un incalculable número de arbovirus. Los conocidos al presente son una pequeña parte de los que existen.

El ciclo de transmisión que perpetúa un virus se denomina ciclo natural o ciclo silvestre, que según el hábitat puede ser selvático, rural, etc. El hombre y los animales domésticos no intervienen en este ciclo natural, pero al entrar en el nicho ecológico, si son susceptibles, se infectan por picadura del artrópodo, con infecciones inaparentes o

clínicas, dando lugar a casos aislados en forma endémica y a brotes epidémicos selváticos o rurales. Excepcionalmente, los arbovirus presentan otros mecanismos de transmisión en la naturaleza, con diversa importancia; en el vector, la transmisión transovárica; y en el hospedador, transmisión por contacto con virus excretado o eliminado por la sangre de heridas en el curso de peleas.

En los climas templados el vector no tiene actividad durante el invierno. En estos casos el virus desaparece y es reintroducido desde zonas tropicales, cuando se reinicia la actividad del vector, o el virus se mantiene en mosquitos adultos infectados que pasan el invierno en lugares protegidos de las bajas temperaturas.

3. CICLOS URBANOS

Ciertas especies de vectores y de hospedadores se han domesticado conviviendo con el hombre donde éste se concentra, en pueblos y ciudades. Entre los mosquitos, *Culex pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*; entre los hospedadores, aves como la paloma doméstica y el gorrión, roedores como las ratas y el ratón doméstico, son ejemplos de ello.

El ingreso a una localidad de un vector o hospedador infectados del ciclo silvestre, da oportunidad de transmitir el virus a estas otras especies domésticas y se produce un ciclo urbano de amplificación y transmisión viral. Esto es factible cuando los vectores y hospedadores de la localidad alcanzan una densidad de su población que permite la circulación viral. En la medida de la patogenicidad del virus para el hombre y de la intensidad de la transmisión, se produce un brote epidémico de importancia en Salud Pública.

Algunos virus, como fiebre amarilla (FA), dengue (DEN) 1, 2, 3 y 4 y Oropuche, que en el ciclo silvestre tienen como hospedadores a monos, producen en el hombre viremia suficiente para infectar al vector; de esta forma, los ciclos urbanos se desarrollan entre un vector y el hombre como hospedador vertebrado.

Los ciclos urbanos se autolimitan cuando crece la inmunidad del hospedador o por cesar estacionalmente la actividad del vector, y ofrecen la posibilidad de prevención y control.

4. CLASIFICACIÓN

4.1 SEROLÓGICA

De acuerdo al Catálogo Internacional de arbovirus se han reconocido más de 500 arbovirus o probables arbovirus en todos los Continentes excepto Antártida. En la década de 1920 fueron aislados los arbovirus de la FA en África, de la estomatitis vesicular indiana en Estados Unidos (EE.UU.) y de la enfermedad del *Looping* en Escocia. En la década de 1930 se aislaron por primera vez los virus de la fiebre del Valle de Rift en África, de la enfermedad africana de los caballos, y una serie de virus productores de encefalitis como la encefalitis japonesa, encefalitis rusa de primavera-verano, encefalitis equina del Este (EEE) o del Oeste (EEO) y encefalitis de San Luis (ESL) en EE.UU., la encefalitis equina venezolana (EEV) y del Nilo Occidental (*West Nile*). Se habían desarrollado técnicas de preservación de los virus en el laboratorio (liofilización, congelamiento), lo que permitió su caracterización.

Jordi Casals aplicó la prueba serológica de fijación del complemento (FC) para detectar reactividad cruzada entre los virus ESL, encefalitis japonesa y otros, iniciando así un agrupamiento de estos

agentes virales por determinantes antigénicos comunes, base de una clasificación serológica de los arbovirus.

Aprovechando la capacidad de hemaglutinar glóbulos de ganso, Albert Sabin produjo hemoaglutininas de FA y DEN y mostró que por inhibición de la hemaglutinación (IHA) había una relación entre los antisueros y los antígenos de estos dos virus. Desde entonces esta técnica se usó para mostrar similitud antigénica entre los arbovirus. Es así como se crean los grupos A, B y C con virus que cruzaban serológicamente. En el grupo A, estaban los virus EEE, EEO, EEV y otros, en el grupo B, FA, encefalitis japonesa, ESL y otros, y en el grupo C una serie de virus que se habían aislado en Brasil.

La publicación de Delphine Clarke y Jordi Casals en 1958 difundió la obtención de un antígeno para IHA semipurificado con sacarosa-acetona que aún hoy se utiliza para diagnóstico, vigilancia y clasificación serológica de los arbovirus. En la década de 1960, Robert Shope adaptó la IHA a microtécnica en pequeñas bandejas con 90 pozos en las que se pueden comparar gran número de virus con sus respectivos antisueros simultáneamente, y aceleran la prueba de gran cantidad de sueros de encuestas. Complementariamente se descubrió que los virus que cruzaban en IHA y/o FC, no lo hacían o lo hacían levemente en la prueba de neutralización (NT) de la capacidad infectiva. Por ello, con NT se identifica un virus (serotipo) cuando comparado con una cepa prototipo de un virus conocido, las reacciones cruzadas de sus antisueros presentan iguales títulos a los títulos homólogos o difieren como máximo 2 veces. Dos virus pertenecen a diferente serotipo cuando en NT los dos antisueros difieren 4 ó más veces en su título, en ambos sentidos.

Mientras tanto, se aislaban de la naturaleza cientos de virus que no reaccionaban en IHA con los virus de los Grupos A, B o C, conociéndose otros Grupos serológicos: Bunyamwera, Anopheles A, California, Gamboa, Simbu, Phlebotomus, etc. Esta clasificación se completó cuando aparecieron virus que en un sentido eran idénticos y en otro sentido no. Se definieron así subtipos y variantes serológicas. Por otro lado, dentro de un Grupo, los virus con cruce serológico marcado, constituyeron Complejos serológicos. De esta manera los niveles de la diferenciación serológica son Grupo-Complejo-Serotipo-Subtipo-Variante.

4.2 TAXONOMÍA

A partir de 1970 Frederick Murphy y otros demostraron que los arbovirus de un grupo serológico compartían la morfología y morfogénesis dando las bases actuales de la clasificación taxonómica. Los arbovirus del Grupo A forman el género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*. El Grupo B constituye el género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Este tipo de ordenamiento se extendió a todos los arbovirus que taxonómicamente pertenecen a distintas familias virales. Con el advenimiento de las técnicas moleculares aplicadas al genoma viral, un serotipo es hoy una especie viral. Según Jordi Casals: "Un virus o especie es un conjunto de individualidades agrupadas alrededor de, y parecidas a un prototipo o modelo, más que un número de cepas todas idénticas con el prototipo". En las especies virales se reconocen genotipos según sus diferencias genómicas.

Entre los arbovirus reconocidos al presente, más de 200 se han aislado en América del Sur, principalmente en la región Amazonia. Pertenecen a las siguientes familias y géneros:

Familia *Togaviridae*. De los dos Géneros que la componen, *Alphavirus* y *Rubivirus*, el primero está formado por arbovirus, constituyendo el Grupo A de la clasificación serológica. Hasta ahora se han reconocido 27 *Alphavirus* en todo el mundo, de los cuales 7 serotipos se han aislado en América del Sur y de ellos, 5 en Argentina (Tabla 27.1). El virus Aura se aisló de *Aedes serratus* en la zona de Amazonia. En Argentina se lo encontró en la misma especie de mosquitos cuando se estudiaba el brote de FA en 1966. Los virus EEE y EEO se han encontrado repetidamente en caballos enfermos o muertos durante brotes epizooticos; ambos

producen encefalitis en el hombre. El virus UNA, subtipo de la especie viral Mayaro, se aisló en Brasil de mosquitos *Psorophora ferox*; en Argentina, se aisló de un potrillo muerto y de un caballo febril que presentó conversión serológica. Del virus EEV se conocen los subtipos I a VI; en Argentina se aisló el subtipo VI, que es atenuado y enzoótico, de mosquitos *Culex (Melanoconion) delpontei* de la zona subtropical. Durante un período interepizootico, también en la zona subtropical de Argentina, se aislaron 3 cepas idénticas de un subtipo enzoótico y atenuado de virus EEO, a partir de *Culex (Melanoconion) ocosa*.

Familia *Flaviviridae*. La Familia *Flaviviridae* tiene 3 Géneros, *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*, de los cuales los *Flavivirus*, son arbovirus transmitidos por mosquitos o garrapatas. En América del Sur se han reconocido 9 especies (serotipos) de *Flavivirus*, de los cuales 6 se han aislado en Argentina (Tabla 27.2). El virus ESL se aisló de hombres con un síndrome febril, de roedores y de mosquitos. Las cepas de roedores son atenuadas y constituyen el genotipo VII, el más disímil de los genotipos conformados con base en las secuencias del gen de la proteína E de superficie. La cepa 78V-6507 de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* de la ciudad de Esperanza (Provincia de Santa Fe) es virulenta y se clasificó en el subtipo V junto con cepas de Brasil, Perú y Trinidad. La cepa 79V-2533 aislada de *Cx. (Cx.) spp.* cerca de la misma ciudad, constituyó el genotipo III.

Del virus FA se aislaron varias cepas de casos humanos durante un brote selvático en Corrientes y Misiones, durante el año 1966. El virus Ilhéus se aisló circunstancialmente al estudiar la etiología de casos con un síndrome febril, en la Provincia de Buenos Aires, en 1963. El DEN es una enfermedad producida por 4 especies virales (serotipos 1, 2, 3 y 4) de las cuales DEN 2 fue el primero en introducirse en Argentina en 1998, y le siguieron DEN 1 en el año 2000 y DEN 3 en el 2003. Se espera la introducción del DEN 4, activo en otros países de América del Sur. Otro *Flavivirus*, del Nilo Occidental (*West Nile*), que se introdujo y expandió rápidamente en América del Norte desde 1999, en su avance hacia el Sur, ha llegado a la Argentina.

Familia *Bunyaviridae*. Tiene 5 Géneros de los cuales *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus* son arbovirus. Los *Hantavirus* son transmitidos por roedores y los *Tospovirus* son virus de plantas. Los *Orthobunyavirus* y *Phlebovirus* son muy numerosos en América del Sur, donde se han detectado hasta ahora unos 70 serotipos; los *Orthobunyavirus* se agrupan en los Grupos serológicos Anopheles A, Bunyamwera, C, California, Capim, Gamboa, Guamá, Simbú y Turlock, mientras que el Género *Phlebovirus* está constituido por el Grupo serológico Phlebotomus. En la Argentina se han aislado hasta ahora *Orthobunyavirus* y otros 4 agentes de la familia a los que aún no se les asignó el Género (Tabla 27.3). Los virus Cache Valley, Kairi, Las Maloyas, Melao, San Juan y Turlock se han aislado de mosquitos o de un caballo febril durante los estudios de las encefalitis equinas, pero no se les ha reconocido importancia en la salud humana. El virus Oropuche se detectó en enfermos que se habían notificado como DEN pero habían resultado negativos en las pruebas de laboratorio; se han descrito tres genotipos (I, II y III) y el virus activo en la Argentina sería de un genotipo IV, porque la divergencia de las secuencias nucleotídicas de las cepas argentinas y las cepas de otros países varía entre 3,9 y 6,6%. Tres agentes virales denominados Resistencia, Barranqueras y Antequeras, forman un grupo serológico al que no se ha designado aún el Género, lo mismo que el virus Pará que no está ni agrupado serológicamente con otros virus, ni se le asignó el Género. Los virus del Grupo Resistencia tienen como vector a mosquitos subtropicales, y los anticuerpos en caballos indican que hay que tenerlos en cuenta en la patología equina. Los *Phlebovirus* de Brasil no se han buscado en Argentina.

Familia *Reoviridae*, Género *Orbivirus* con dos serogrupos en América del Sur, Changuinola y Corriparta, que incluyen más de 50 serotipos aislados en Brasil, principalmente de flebotomos; no se han encontrado en Argentina.

Tipo serológico	Subtipo o variedad	Fuente	Año	Zona o provincia
Aura	-	Mosquitos	1966	Misiones
EEE*	Sud América	Caballos	Desde 1933	Templada
Mayaro	UNA	Caballos	1964	Córdoba
EEV	VI	<i>Cx. (Mel.) delpontei</i>	1980	Chaco
		Otras spp. de mosquitos	1982	Santa Fe
EEO	Epizoótico	Caballos	Desde 1933	Templada
		<i>Och. albifasciatus</i>	1982-83	Santa Fe
	Enzoótico	<i>Cx. (Mel.) ocosa</i>	1980	Chaco Corrientes

Tabla 27.1. Familia *Togaviridae*, Género *Alphavirus*: arbovirus aislados en Argentina. *EEE, *Encefalitis equina del Este*; EEV, *Encefalitis equina Venezolana*; EEO, *Encefalitis equina del Oeste*; *Cx.*, *Culex*; *Mel.*, *Melanoconion*; *spp.*, *especies*; *Och.*, *Ochlerotatus*.

Familia *Rhabdoviridae*, Género *Vesiculovirus*. Para América del Sur se aislaron 6 agentes virales de los cuales dos se encontraron en Argentina. (Tabla 27.4) A otros virus de esta Familia aislados en Brasil, aún no se les atribuyó el Género. El Género *Lyssavirus* incluye al virus de la rabia que no es un arbovirus, y a otros virus relacionados con él.

5. NOMENCLATURA

Las especies (serotipos) virales se designaron primero por el tipo de enfermedad que producían o la especie de hospedador o de vector. Para diferenciar los distintos virus productores de encefalitis se los designó por su origen geográfico, en Japón virus de la Encefalitis Japonesa; en Venezuela, virus de la Encefalitis Equina Venezolana; en Estados Unidos se diferenciaron los virus de la Encefalitis de San Luis, por la ciudad donde se reconoció la primera vez, y los virus de las Encefalitis Equina del Este o del Oeste, por la zona del país donde se produjeron los primeros brotes. Luego, cada nuevo virus fue designado con el nombre del lugar donde se lo aisló por primera vez, sea un río, un valle, una localidad, etc. Los Grupos serológicos toman el nombre del primer virus aislado de ese grupo. Los subtipos o variantes se designan ya sea con números romanos, con letras por abecedario, con el nombre del lugar donde se aislaron o con la designación de la cepa tomada como prototipo.

6. ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES

Los arbovirus producen enfermedades en el hombre, en animales domésticos y excepcionalmente en animales silvestres. El espectro de las infecciones va desde inaparentes y formas leves, hasta formas graves y letales. Por lo general, son más las infecciones inaparentes que las formas clínicas. En adultos la tasa inaparente:aparente puede llegar a 1000:1, pero varía según el virus y según el brote.

En la Tabla 27.5 se resumen las enfermedades que producen los arbovirus en el hombre y se indican los virus que las producen en Argentina o que posiblemente estén produciendo estas patologías en la actualidad pero no se los estudia, o virus que pueden ingresar al país como el caso de DEN 4 y del Nilo Occidental.

Los virus del primer grupo son neuroinvasivos y producen una enfermedad sistémica febril o una neurovirosis. La fiebre se instala abruptamente y el paciente presenta escalofríos, artralgias y mialgias que pueden durar una o dos semanas con completa recuperación, o seguir con irritabilidad, somnolencia, cefalea, temblores, rigidez de nuca, fotofobia, vómitos, diarrea, cianosis, convulsiones

y coma. La EEE es la arbovirosis de más alta letalidad y casi todos los que se recuperan presentan secuelas físicas o mentales progresivas. La EEO es más grave en los niños, el 30% de los casos se produce en menores de 1 año y pueden desarrollar paresis espástica y retraso mental. La ESL es más grave en los adultos mayores por una mayor susceptibilidad a la infección neurológica; en ellos la tasa de casos fatales llega al 30%. En los niños y adultos jóvenes los síntomas son fiebre, cefalea y no más de una meningitis aséptica. En estas neurovirosis el LCR es claro, incoloro, presenta pleocitosis con preponderancia de polimorfonucleares en el comienzo o linfocitosis. El laboratorio hematológico da valores normales, salvo patologías previas o nosocomiales.

DEN y FA son considerados Fiebres Hemorrágicas. El DEN será tratado en otro capítulo.

La FA es una enfermedad bifásica. La primera fase se caracteriza por fiebre, cefalea, escalofríos, náuseas, vómitos, debilidad y mialgias generalizadas. Después de 3 ó 4 días los síntomas van desapareciendo o luego de una breve remisión se instala una forma grave por localización en hígado y riñón con manifestaciones hemorrágicas, ictericia, falla renal y una alta letalidad.

Las enfermedades febriles son producidas como formas leves por virus que producen encefalitis o fiebres hemorrágicas pero también por una serie de arbovirus que nunca u ocasionalmente se encuentran en una meningitis. Llegan a la consulta cuando se produce un brote urbano.

7. DIAGNÓSTICO Y ENSAYO VIRAL

El diagnóstico se basa en tres premisas, clínica, epidemiología y laboratorio virológico. La clínica se encuadra en uno de los síndromes descritos. La epidemiología es de particular importancia para orientación. Se debe considerar la distribución geográfica de la enfermedad, qué grupos etarios afecta, si es un caso aislado o un brote, si es rural o urbana.

Hoy existen herramientas en el laboratorio para llegar a la etiología de todas las Arbovirosis incluidas en la Tabla 27.5, siempre que se disponga de las muestras adecuadas del paciente.

7.1 DETECCIÓN DE VIRUS

La detección de virus en pacientes o en muestras de artrópodos o vertebrados del ciclo natural, se realiza por: a) aislamiento del virus infectivo inoculando las muestras en hospedadores de laboratorio; b) amplificación del RNA por PCR; c) detección de antígenos vi-

Tipo	Fuente	Año	Provincia
ESL*	Hombre	1963	Buenos Aires
	Roedor	1966	Córdoba
	Mosquitos	1978-79-82-84	Santa Fe
2005		Córdoba	
FA	Hombre	1966	Corrientes - Misiones
ILHÉUS	Hombre	1963	Buenos Aires
DEN 1	Hombre	2000	Jujuy - Formosa - Misiones
		2003	Salta
DEN 2	Hombre	1998	Salta
		2003	Salta - Jujuy
DEN 3	Hombre	2003	Salta
		2004	Salta-Jujuy-Formosa

Tabla 27.2. Familia *Flaviviridae*, Género *Flavivirus*: arbovirus aislados en Argentina. *ESL, Encefalitis de San Luis; FA, Fiebre amarilla; DEN, Dengue. (Datos inéditos del Instituto Nacional de Virosis Hemorrágicas, Pergamino).

rales por ELISA; d) detección de inclusiones intracelulares en secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina (por ejemplo, hígado en FA); e) detección de antígeno específico por inmunohistoquímica. Como la viremia en el hombre desaparece al iniciarse los síntomas o pocos días después (2° a 3° día en las neurovirosis; 5° día para DEN y FA), la detección se hará con una muestra de suero lo más temprana posible; adquiere la mayor importancia que el médico determine por interrogatorio la fecha de inicio de la enfermedad con precisión y comunique la fecha de la muestra, para interpretar los resultados. Lo mismo es válido para el LCR. En los casos fatales la viremia puede prolongarse por lo que en la autopsia se extrae sangre de los grandes vasos, más una porción del órgano blanco, hígado si se sospecha FA, cerebro en las neurovirosis.

El hospedador de laboratorio universal para aislamiento de los arbovirus es el ratón albino suizo recién nacido, excepto para los virus DEN que no son letales para este hospedador sino después de una adaptación. La alternativa de usar cultivos celulares, reemplaza al ratón por razones de bioseguridad pero son más costosos porque se usan insumos que no se producen en Latinoamérica. Se necesitan dos o más líneas celulares porque la susceptibilidad de cada una está limitada a ciertos arbovirus. Los cultivos más usados incluyen las líneas Vero y LLCMK2 (riñón de mono), BHK (riñón de hámster) y los cultivos primarios de embrión de pollo o pato. Para los virus DEN se prefiere una línea celular derivada de mosquitos, C 6/36, que también es muy sensible para el virus ESL.

Cada cepa de arbovirus debe ser conservada en el laboratorio como semilla maestra con un bajo nivel de pasaje; posibles variaciones puntuales en su genoma RNA o selección de subpoblaciones virales en los sucesivos pasajes, pueden modificar los determinantes antigénicos y/o la virulencia. La temperatura de conservación de las cepas debe ser -70°C bajo cero o menos, porque son termosensibles.

La identificación específica de las cepas aisladas puede hacerse por Inmunofluorescencia (IF) en las células inoculadas con el material viral, si se sospecha de qué virus se trata. En caso contrario se recurre a la IHA, FC o NT con antígenos virales producidos con el cerebro de ratones lactantes o cultivos celulares infectados. Para IHA y FC el antígeno se semipurifica por el método de sacarosa-acetona. Los antígenos se enfrentan con líquidos inmunes, por lo general líquidos ascíticos obtenidos de ratones inmunizados con cepas virales prototipo e inoculados vía intraperitoneal con células del Sarcoma 180. También se pueden utilizar sueros de conejos, cobayos o hámsteres inmunizados. La especificidad del suero para una especie viral depende del número de inyecciones de material viral y

del momento de extracción. Cuanto menos inyecciones y más temprana sea la extracción, el líquido inmune es más específico pero de bajo título. Por el contrario, los llamados líquidos hiperinmunes, con gran reactividad cruzada con otros agentes del mismo Grupo serológico, se obtienen al hacer varias inyecciones con un serotipo y una extracción tardía. Los líquidos inmunes de Grupo son los obtenidos por inmunización de los ratones con diferentes virus de un mismo Grupo serológico en sucesivas inyecciones; reaccionan con todos los serotipos del grupo. Para algunos serotipos (por ejemplo DEN 1, 2, 3 y 4) se dispone de anticuerpos monoclonales específicos para cada uno, que se usan en IF directa.

Cuando no hay datos orientadores para la identificación de los virus aislados se puede recurrir a la microscopía electrónica que, por las características morfológicas, ubica la familia viral del aislamiento. Si no se dispone de esta herramienta, se enfrenta el antígeno del virus desconocido con los líquidos de Grupo disponibles en IHA y luego, con los sueros más específicos de cada serotipo del Grupo que resultó positivo, en NT. Esta identificación se realiza, por lo general, en laboratorios de referencia donde cuentan con condiciones de bioseguridad para manejar virus exóticos.

Cuando se dispone de muestras tempranas del paciente o muestras de vertebrados o vectores de la naturaleza, se intenta detectar el virus simultáneamente por aislamiento y por detección del RNA por RT-PCR, con resultados dispares en cuanto a sensibilidad pero con ventaja para la RT-PCR por su rapidez. En la RT-PCR, el primer par de iniciadores es específico de un género viral o de un Grupo o Complejo serológico y, con un segundo par de iniciadores se amplifica el fragmento específico de la especie viral que se sospecha. El reconocimiento de genotipos con diferente distribución geográfica para una misma especie viral plantea la posibilidad de un resultado falso-negativo. Además, si al realizar la PCR se agota la muestra original y su RNA extraído, se imposibilitan estudios ulteriores. Por lo que ese ensayo no sustituye el aislamiento del virus infectivo con el que se prepara una semilla viral. Ambos ensayos, aislamiento y PCR se complementan cuando se aplica la PCR sobre la semilla viral.

Como ocasionalmente pueden ocurrir contaminaciones cruzadas durante el aislamiento y también en la PCR a partir del control positivo, es necesaria la validación de estos procesos en el caso de positividad, mediante el reaislamiento o detección por segunda vez del RNA viral, partiendo de la muestra original. Por otra parte, cada uno de estos ensayos valida al otro o se busca la validación por detección de antígeno viral en la muestra o por aparición de anticuerpos en el paciente o del vertebrado en estudio.

Grupo Serológico	Tipo	Subtipo o variedad	Fuente	Año	Provincia
Género <i>Orthobunyavirus</i>					
Bunyamwera	Cache Valley	Laguna Larga	Mosquitos	1964-65	Córdoba
		Maguari	Mosquitos	1982	Santa Fe
	Kairi	-	Mosquitos	1966	Córdoba
			Caballo	1973	Río Negro
Anopheles A	Las Maloyas*	-	Mosquitos	1980	Corrientes
California	Melao	AG-83-497	Mosquitos	1982	Santa Fe
Gamboa	San Juan	78V-2441	Mosquitos	1977	Santa Fe
				1978-80	Chaco
Turlock	Turlock	-	Mosquitos	1984	Santa Fe
Simbu	Oropuche**	-	Hombre	2005	Jujuy
Género no asignado					
Resistencia	Resistencia*	AG80-504	Mosquitos	1980	Chaco
		AG80-517	Mosquitos	1980	Chaco
	Barranqueras*	-	Mosquitos	1980	Chaco
	Antequeras*	-	Mosquitos	1980-82	Chaco-Santa Fe
Género no asignado					
No agrupado	Pará	-	Mosquitos	1980	Chaco

Tabla 27.3. Familia *Bunyaviridae*: arbovirus aislados en Argentina. * Nuevos para la Ciencia. / ** Detectado por PCR (*Datos inéditos del Instituto Nacional de Virosis Hemorrágicas, Pergamino*).

Para vigilancia de la infección de mosquitos por determinados virus se han desarrollado pruebas de ELISA de detección de antígeno viral, que permiten procesar muchas muestras simultáneamente, en corto tiempo.

7.2 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

Las infecciones por arbovirus en los hospedadores vertebrados pueden ser diagnosticadas por la demostración de anticuerpos específicos después del *clearance* de la viremia. En encuestas, se puede determinar la seroprevalencia de anticuerpos para un determinado agente y después de un brote, la tasa de infecciones inaparentes. En animales centinela (animales susceptibles que se exponen en la naturaleza) la aparición de anticuerpos indica actividad viral para ese lugar y tiempo.

El paciente u hospedador vertebrado, en general, puede presentar una infección primaria, cuando es la primera vez que se infecta con un virus de un Grupo serológico, reaccionando con anticuerpos a más alto título con el serotipo viral que los produjo. Si el paciente u hospedador se había infectado, previo a la infección actual, con otro serotipo del mismo Grupo, se presenta una reacción secundaria, que se caracteriza por la positividad a títulos altos y semejantes, frente a varios virus del mismo Grupo serológico, impidiendo decidir cuál de esos virus produjo la infección actual.

El diagnóstico rápido con base en los anticuerpos consiste en la detección de IgM específica en el suero agudo, o en el LCR de las neurovirosis, cuando se los enfrenta con antígenos virales. Los anticuerpos IgM preceden a los anticuerpos IgG, aparecen al 1° ó 2° día de enfermedad en las neurovirosis y al 5° día en DEN y FA, y representan una infección reciente por su pronta desaparición; sin

embargo, en la ESL se ha descrito la persistencia de IgM por un año, en algunos casos. Las IgM pueden reaccionar con antígenos de otros virus del mismo Grupo serológico del que produjo la infección. La presencia de IgM en el LCR tiene un importante valor diagnóstico de las neuroarbovirosis porque significa producción local de anticuerpos; sin embargo, es necesario descartar que la presencia de la IgM se deba al pasaje de la sangre por rotura de la barrera hematoencefálica.

La IgM específica se puede determinar por ELISA de captura o por IF indirecta, pero se prefiere la primera por dos razones: a) mayor sensibilidad; y b) lectura de los resultados objetiva. Con ambas técnicas se presentan problemas de especificidad (falsos positivos) en pacientes con factor reumatoideo.

Los anticuerpos IgG aparecen entre una semana y 20 días después de iniciados los síntomas, alcanzan su nivel máximo a los 30-60 días y luego de un tiempo variable declinan, sin desaparecer. Esta evolución permite un diagnóstico confirmatorio cuando con dos muestras, un suero agudo y otro de la convalecencia, se produce un aumento de título de anticuerpos de 4 veces (conversión serológica) o los anticuerpos declinan en título 4 veces (conversión serológica inversa), según el día post-comienzo de la enfermedad en que fueron extraídos los sueros.

Los anticuerpos IgG se pueden detectar por IHA, NT y FC, siendo los FC los que declinan más rápido hasta desaparecer y los NT los que se mantienen por años.

Siendo la IHA más sencilla, menos costosa y más rápida que la NT y en la que se enfrentan los sueros con muchos antígenos simultáneamente, pero menos específica, la secuencia de las pruebas serológicas a utilizar es, primero la IHA y luego, los sueros positivos se procesan por NT.

Tipo	Fuente	Año	Provincia
Calchaquí *	Mosquitos	1982	Santa Fe
Cocal	Caballo	1963	Buenos Aires

Tabla 27.4. Familia *Rhabdoviridae*, Género *Vesiculovirus*: arbovirus aislados en Argentina. * *Nuevo para la Ciencia*.

Tipo de enfermedad	Virus
Meningitis	EEE*, EEO, ESL
Meningoencefalitis	Rocío
Encefalitis	Nilo Occidental
Fiebres hemorrágicas	FA, DEN 1, 2, 3, 4
Enfermedad febril con exantema	DEN 1, 2, 3, 4 clásico Mayaro (subtipo UNA)
Enfermedad febril	Oropuche, Ilhéus, DEN 1, 2, 3, 4 EEV subtipo VI, EEE, EEO, ESL Bunya y Phlebovirus de Brasil

Tabla 27.5. Tipos de enfermedad de las arbovirosis y virus que los producen en Argentina. * EEE, *Encefalitis equina del Este*; EEO, *Encefalitis equina del Oeste*; ESL, *Encefalitis de San Luis*; FA, *Fiebre amarilla*; DEN, *Dengue*; EEV, *Encefalitis equina Venezolana*. Negrita, etiología potencial para Argentina.

7.3 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DIAGNÓSTICOS

Un paciente que presenta la clínica y la epidemiología de una arbovirosis se categoriza como caso sospechoso y se somete a las pruebas del laboratorio virológico. Según el resultado de las mismas el paciente se categoriza por el grado de certidumbre que se logra.

Caso probable

Es el caso sospechoso que presenta uno de las siguientes resultados:

- Anticuerpos IgM por ELISA o IF, o aislamiento viral, o RT-PCR, positivos en un suero agudo y carece de otras muestras.
- Anticuerpos FC o IHA o NT a alto título en el suero convaleciente y carece de suero agudo.
- Inmunohistoquímica positiva o presencia de inclusiones en sección histológica (FA) en órganos y carece de sueros.

Caso confirmado

Es el caso sospechoso que presenta uno de los siguientes resultados:

- Dos o más de las siguientes pruebas positivas en suero agudo: Anticuerpos IgM, aislamiento viral y RT-PCR y carece de otras muestras.
- Conversión serológica (aumento o disminución de 4 veces en el título de anticuerpos) entre suero agudo y suero de convaleciente.
- Dos pruebas positivas en órganos: Inmunohistoquímica, presencia de inclusiones (FA), aislamiento viral o RT-PCR.
- Anticuerpos IgM en LCR.
- Una prueba positiva en órganos más una de las siguientes pruebas en el suero agudo: Anticuerpos IgM, aislamiento viral o RT-PCR.

Caso indeterminado

- Anticuerpos IgM, aislamiento y/o PCR negativos en suero agudo y carece de suero convaleciente.
- Anticuerpos IHA y/o NT a títulos bajos en suero de convaleciente y carece de suero agudo.

Caso remoto (infección anterior a la enfermedad actual)

Anticuerpos IHA o NT positivos a bajos títulos, sin conversión serológica, en dos muestras de suero agudo y convaleciente suficientemente separadas en el tiempo.

Caso negativo

Anticuerpos negativos en el suero de convaleciente, y no reúne las condiciones para las categorías anteriores.

8. EPIDEMIOLOGÍA

Cada arbovirus tiene sus características propias, algunas derivadas de su particular ciclo de transmisión.

Los virus de distribución geográfica muy amplia varían en las especies de hospedadores y vectores y, en consecuencia, se presentan con diferencias epidemiológicas de un área a otra y hasta de un brote epidémico a otro. Las características más destacadas de la epidemiología de los arbovirus incluidos en Tabla 27.5 son las siguientes.

El virus EEE, en EE.UU., enferma y es letal para el ser humano, los equinos y los faisanes produciendo casos rurales. Su distribución comprende principalmente los Estados del Este del Río Mississippi. Es endémico y epidémico y circula entre los pájaros y especies de mosquitos. En ese país ésta es la neuroarbovirosis más grave, presenta más alta tasa de infecciones aparentes: inaparentes (1:23) aunque hay variación de un brote a otro. En Argentina se han presentado epizootias equinas, en pequeñas áreas geográficas, ya sea de la zona templada como de la subtropical. Los pájaros constituyen el hospedador y no se conoce el vector. No se han encontrado casos humanos, lo cual se atribuye a variables ecológicas o a la baja densidad humana en las zonas de las epizootias.

El virus EEO viene produciendo epizootias equinas y epidemias rurales en los agro-ecosistemas de los EE.UU. con más frecuencia al Oeste del Río Mississippi, siendo endémico en algunas zonas. La mitad de los casos se producen en niños menores de 10 años y la enfermedad es más severa por debajo de un 1 año de edad, debido a una mayor susceptibilidad a la infección neurológica. El sexo masculino y la ocupación de agricultor mostraron las más altas incidencias. En la Argentina se producen grandes epizootias equinas que abarcan toda el área templada, cada 10 ó más años, pero casos humanos se han encontrado solamente en la Provincia de Río Negro, en una zona con granjas que disponen de riego cerca de la ciudad de Viedma. Entre las epizootias, el virus desaparece y debe ser reintroducido; se desconoce si desde América del Norte o desde focos enzoóticos de la zona tropical de América del Sur. No se ha encontrado cuáles son los hospedadores vertebrados del ciclo, pero se comprobó por aislamiento viral y competencia vectorial que la



especie de mosquitos *Ochlerotatus albifasciatus* es el vector principal de estos ciclos expansivos.

Un subtipo atenuado y enzoótico de virus EEO (cepa prototipo AG 80-646) y el serotipo AURA del Complejo EEO, ambos aislados de mosquitos en la zona subtropical de la Argentina (Tabla 27.1), deben tenerse en cuenta en todas las investigaciones y diagnóstico por la similitud genómica y serológica con virus EEO epizoótico.

El virus ESL es endémico desde Canadá, al Norte, hasta donde se lo ha buscado, al Sur en Argentina, la Provincia de Río Negro. Infecta caballos, pero no los enferma y en el hombre sólo una pequeña parte muestra enfermedad, según se infiere de la alta proporción de casos inaparentes que revelan las encuestas serológicas. A pesar de que en Argentina se conoce desde 1955, recién en 1966 en la Provincia de Buenos Aires, se aislaron 2 cepas de casos humanos con un síndrome febril indiferenciado y en un estudio serológico retrospectivo 42 pacientes resultaron positivos, de los cuales 21 presentaron conversión por la prueba poco específica de IHA. Otros 5 casos febriles en Argentina, 2 de ellos en el 2002 y 2003 en la Ciudad de Córdoba, son todos los casos reconocidos en un período de casi 40 años.

Entre enero y mayo del año 2005 se produjo el primer brote urbano de esta enfermedad para la Argentina, con 183 notificaciones, 72 estudiados y de ellos 48 probables y 24 confirmados, con 8 muertes en la Ciudad de Córdoba y poblaciones vecinas. La gravedad y la tasa de casos fatales creció con la edad. Se aisló virus ESL de los mosquitos *Culex quinquefasciatus*, especie vectora que componía el 84% de los mosquitos capturados, y una alta transmisión viral ya que el 62% de las aves de corral tenían anticuerpos. Entre los pájaros, el hornero (*Furnarius rufus*) fue uno de los hospedadores expandidores. La paloma torcaza (*Zenaida auriculata*), que duerme y anida en los bosques xerófilos del Norte y Oeste de la Ciudad y vuela diariamente grandes distancias para alimentarse, es la candidata para transportar el virus del ciclo silvestre al ciclo urbano.

La Fiebre de Ilhéus es una enfermedad de países tropicales de América del Sur donde los casos confirmados se dieron en personas expuestas en la selva, donde ocurren los ciclos enzoóticos. La posible asociación de este virus con una enfermedad en equinos no está confirmada. En Argentina se han encontrado anticuerpos NT en pájaros y equinos y anticuerpos IHA en bovinos; en 1966 se aisló una cepa viral de un paciente febril y se encontraron conversiones serológicas en la Provincia de Buenos Aires por la prueba, poco específica, de IHA.

La FA presenta en América del Sur un ciclo urbano, entre mosquitos de una especie introducida –*Aedes aegypti*– y el hombre, y un ciclo silvestre en los bosques tropicales, entre especies de monos y mosquitos de los géneros *Haemagogus* y *Sabethes*, que viven en la copa de los árboles. Una campaña de erradicación de *Ae. aegypti*, completada en 1963 para Argentina, terminó con los brotes urbanos en América Latina. La reinfestación de las ciudades con esta especie de vector plantea la posibilidad actual de reurbanización de la FA. Mientras, los ciclos selváticos de la zona de Amazonia presentan ondas expansivas hacia el Sur; una de ellas llegó a la Argentina en 1966 y se produjo el primer brote selvático registrado en Misiones y Corrientes, con 15 casos estudiados, 5 confirmados, 8 presuntivos y 2 negativos. Desde entonces no se han notificado casos de FA en Argentina. Sin embargo, se han encontrado personas no vacunadas de la Provincia de Salta que presentaban anticuerpos.

Los virus de América del Sur que producen un síndrome febril indiferenciado, a veces con exantema, son muchos pero sólo algunos se han reconocido en Argentina. Desde el ingreso del DEN a la zona subtropical, se empezaron a tener en cuenta y es así como pacientes negativos para DEN y ESL se han confirmado para virus Oropuche por MAC-ELISA para anticuerpos IgM o por RT-PCR en muestras de sueros de pacientes con menos de 5 días de evolución. Éste es considerado como uno de los más importantes arbovirus de

América del Sur, habiéndose registrado numerosos brotes urbanos en los que se enferman cientos de miles de personas en las grandes ciudades, por lo que su importancia en Salud Pública estriba en la alta morbilidad. En esta enfermedad son más las infecciones clínicas que las inaparentes (2:1).

El virus EEV subtipo VI encontrado en la zona subtropical (Tabla 27.1) puede estar causando un síndrome febril en esa zona de Argentina pero no se lo ha investigado sistemáticamente.

Entre los Bunyavirus y Vesiculovirus de la Argentina (Tablas 27.3 y 27.4), el virus Cache Valley infecta los seres humanos y caballos, pero no se analizó su patología para esos hospedadores.

En general, desde hace 10 años la situación epidemiológica de los arbovirus en Argentina ha variado. La reinfestación con mosquitos *Ae. aegypti* y la posterior introducción de DEN 1, 2 y 3, la producción de brotes urbanos de ESL, el reconocimiento de la Fiebre de Oropuche y la posibilidad de la introducción de DEN 4 y del virus del Nilo Occidental indican la necesidad de tenerlos en cuenta. Desde que este capítulo fue escrito se ha incrementado la actividad de Flavivirus en Argentina. Se ha confirmado el ingreso del virus del Nilo Occidental al país por la detección de casos en equinos y a principio del año 2008 se ha producido después de 42 años un nuevo brote de Fiebre Amarilla selvática en la Provincia de Misiones, con la detección del virus en monos muertos y casos humanos en personas no vacunadas. Esto plantea la posibilidad de la urbanización del brote por hallarse el vector urbano presente en toda área subtropical de la Argentina y buena parte del área templada y plantea problemas de disponibilidad de vacunas y de programas de vacunación permanentes.

9. PREVENCIÓN Y CONTROL

La cepa de FA denominada 17D es la adaptación de una cepa aislada en África en 1927, por múltiples pasajes en tejidos de embrión de ratón y embrión de pollo. El premio Nobel Max Theiler mostró el bajo viscerotropismo y neurotropismo en monos y, desde 1937, se realizan en América inmunizaciones a gran escala con esta vacuna atenuada. En 1980, la elaboración fue reformulada con las buenas prácticas de manufactura.

Para las neurovirosis de América se dispone de vacunas inactivadas para equinos para los virus EEE y EEO, y EEV. Para los seres humanos existen dos vacunas inactivadas para EEE y EEO, de uso exclusivamente restringido a los laboratoristas, bajo firma de consentimiento informado.

El control de los vectores, basado en la reducción de los criaderos y fumigación con adulticidas y la reducción de aves silvestres y domésticas de las ciudades en momentos críticos, han dado resultado en EE.UU. Estas medidas deben ser la consecuencia de un sistema de vigilancia de la actividad viral. Lo que se busca es implantar un sistema de alarma temprana. Se han utilizado *animales centinela*, expuestos en jaulas apropiadas a las picaduras de artrópodos desde la primavera, y luego se realiza el seguimiento de la viremia y desarrollo de anticuerpos. Recientemente, se ha desarrollado un ELISA para detectar antígeno viral en pájaros o mosquitos y RT-PCR para detectar el RNA viral en mosquitos.

En cuanto a los virus EEE y EEO, los casos equinos que preceden a los casos humanos sirven de alerta. Para EEO en Argentina el comienzo de la epizootia equina indica la onda expansiva a toda la zona templada y la necesidad de la inmediata vacunación equina, la vigilancia en seres humanos y la educación para la prevención de las picaduras por el vector.

El aumento estacional de las neurovirosis o de síndromes febriles alertan sobre la posibilidad de brotes urbanos por arbovirus.

NOTA

Este capítulo fue finalizado en el año 2008.

Bibliografía

- Bergoglio R, Sabattini MS, Contigiani M, Chuit R, Arselán SD, Almirón W *et al.* "Brote inédito de encefalitis por *Flavivirus* en la ciudad de Córdoba". *Rev Arg Zoonosis* 2006;1: 1-35.
- Clarke DH, Casals J. "Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses". *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-573.
- Contigiani M. "I Togaviridae. II Flaviviridae". En: Basualdo, Coto y de Torres, eds. *Microbiología Biomédica*. Atlante, Buenos Aires, 1996;726-740.
- Karabatsos N, editor. *International Catalogue of Arboviruses*. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, USA, 1985;1147.
- Mettler NE, Parodi A, Casals J. "Survey for antibodies against arthropod-borne viruses in man in Argentina". *Am J Trop Med Hyg* 1963;12:653-656.
- Sabattini MS, Avilés G, Monath TP. "Historical, Epidemiological and Ecological Aspects of Arboviruses in Argentina: I Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. II Togaviridae *Alphavirus*". En: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos P y Travassos da Rosa JF, eds. *An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Evandro Chagas Institute, Belém, 1998;113-153.
- Sabattini MS, Shope RE, Vanella JM. "Serological survey for arboviruses in Córdoba Province, Argentina". *Am J Trop Med Hyg* 1965;14:1073-1078.

Familia *Poxviridae*

Guadalupe Carballal - Susana Mersich

1. LOS VIRUS *POX* QUE PUEDEN INFECTAR AL HOMBRE

La historia de la viruela y de la vacuna antivariólica representa uno de los mayores logros de la medicina en la lucha contra una grave enfermedad infecciosa. Son muchas las enseñanzas que pueden aprenderse de esta historia: la viruela fue la primera enfermedad en ser totalmente erradicada del planeta tierra en 1980; esto se pudo lograr con la vacuna antivariólica, que fue también la primera vacuna empleada en el ser humano (Figura 28.1). Asimismo, la viruela fue la primera enfermedad viral para la cual se desarrolló un tratamiento efectivo con quimioterapia.

En la actualidad, la viruela no es relevante en la práctica clínica, ya que ha sido erradicada. Sin embargo, el médico debe conocerla por las siguientes razones:

- 1) Como ejemplo de la erradicación a nivel mundial de una enfermedad mediante vacunación con un virus heterólogo.
- 2) Como posible agente de bioterrorismo, debido a su transmisión respiratoria, su gran resistencia en el medio externo y a la elevada mortalidad de la enfermedad (30%).
- 3) Como ejemplo del empleo del virus vacunal (*vaccinia*) para el desarrollo de vacunas recombinantes para otras patologías.

La familia *Poxviridae* incluye dos subfamilias, de acuerdo a los hospedadores que infectan: *Cordopoxvirinae* o virus *pox* de vertebrados y *Entomopoxvirinae* o virus *pox* de insectos (Tabla 28.1). En este capítulo describiremos solamente a los que pueden infectar al ser humano.

El nombre *Poxviridae* deriva de *pox* que significa pústula. La mayoría de los *poxvirus* producen lesiones en la piel que pueden ser localizadas (*cowpox*, molusco) o generalizadas (viruela).

Existen numerosos virus *pox* que pueden infectar al hombre: el virus viruela –actualmente erradicada–, el virus *vaccinia* (vacuna), el *Cowpox*, el pseudo *cowpox* (nódulo de los lecheros), el virus de Orf, el virus del *molusco contagioso*, el virus de la viruela de los monos, los *tanapoxvirus* y el virus de Yaba.

Con las excepciones de los virus viruela, *vaccinia* y *molusco contagioso*, el resto de los virus *pox* son productores de zoonosis. Sin embargo, es de destacar que la transmisión al hombre ocurre muy rara vez por contacto con animales infectados y el número de casos es muy bajo. Pero, dado el riesgo del empleo del virus viruela en posibles atentados bioterroristas se hace necesario su conocimiento, así como también contar con ensayos diagnósticos para poder diferenciarlo con rapidez.

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

La viruela (*smallpox*) fue una de las plagas más temidas debido a su elevada mortalidad (20-50%) y a las secuelas deformantes que se producían en la piel, en especial en la cara, de los sobrevivientes. La enfermedad fue conocida desde la más remota antigüedad en la India, China, norte de África y Europa y fue traída a América por los colonizadores donde diezmo a la población nativa.

El virus viruela (variola) es exclusivamente humano y se transmite por contacto directo en particular por vía respiratoria o por fomites.

La inmunización contra la viruela fue la primera en ser aplicada al ser humano. La práctica de la *variolización* era conocida en la antigua China y consistía en la introducción de costras desecadas (provenientes de enfermos de viruela) en las fosas nasales de los



Figura 28.1. Último caso registrado de viruela en una niña de Bangladesh. Tomado de: Salud Mundial, OMS, Mayo de 1980.

individuos susceptibles. El procedimiento era totalmente empírico y a veces, en lugar de la protección, se producía la enfermedad debido a una inactivación térmica insuficiente del virus contenido en las costras.

La variolización fue introducida en Europa en 1721 por la esposa del embajador inglés en China. Posteriormente, las observaciones del médico inglés Edward Jenner lograron establecer las bases del método experimental y de la vacunación. Jenner observó que los campesinos que presentaban en sus manos una lesión conocida como *nódulo de los ordeñadores*, que adquirían inadvertidamente por contacto con bovinos infectados con viruela bovina o *cow-pox*, nunca enfermaban de viruela cuando se registraban los brotes epidémicos que diezmaron a la población en la Europa de esa época. Jenner llegó a la conclusión de que "la infección con *cow-pox* protegía al ser humano de la viruela" en 1798, cuando el concepto de virus no existía y sólo se contaba con los primeros y primitivos microscopios de muy bajo aumento. Este investigador pudo demostrar experimentalmente su hipótesis cuando se atrevió a inocular con material extraído de un nódulo de ordeñador a un niño virgen de enfermedad. Meses después, al exponerlo al contagio con viruela, el niño no enfermó; había sido *inmunizado*.

Debieron transcurrir 182 años (1798-1980) desde los trabajos pioneros de Jenner hasta lograr la erradicación de la viruela del planeta Tierra. Esta hazaña se obtuvo mediante el empleo de una vacuna a virus vivo y atenuado, derivada del *cow-pox* o virus de viruela vacuna, que se denomina *virus vaccinia*. De allí proviene el nombre *vacuna* (del latín *vacca*), que se utiliza actualmente para todo antígeno capaz de inducir protección. Por estos estudios, Jenner es considerado el padre de la Vaccinología.

1.2 MORFOLOGÍA DE LOS VIRUS POX

Los *poxvirus* son los virus más grandes conocidos. Los *orthopoxvirus* tienen forma de ladrillo u ovoide y un tamaño de 170-260 por 300-400 nm. Poseen una estructura compleja con envoltura externa que contiene lípidos y estructuras proteicas tubulares o globulares, que incluyen uno o dos cuerpos laterales y un *core* que contiene al genoma. El genoma es DNA de cadena doble (Figura 28.2).

Los *parapoxvirus*, entre los que se incluye al virus de Orf, presentan una morfología diferente; su forma es bacilar y muestran una estructura entrecruzada típica. Contiene un núcleo interno y cuando está como virus maduro se encuentra rodeado de una envoltura.

Todos los virus de la familia *Poxviridae* comparten un antígeno común. Por serología presentan neutralización cruzada y también existe protección cruzada entre algunos miembros del género *orthopoxvirus* como, por ejemplo, entre el virus de vacuna (*vaccinia*) y el virus de viruela (variola).

Esta es la única familia de virus en la que las partículas infecciosas pueden contener una envoltura, en el caso del virión intracelular, así como dos envolturas, en el caso del virión extracelular, o bien tres envolturas en otros viriones extracelulares.

1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA

El ácido nucleico de los *poxvirus* consiste en una sola molécula de DNA bicatenario y tiene un peso molecular de 130-240 x 10⁶ daltons. El virión contiene más de 30 proteínas estructurales y numerosas enzimas relacionadas con la síntesis del ácido nucleico, tales como RNA polimerasa dependiente de DNA, DNA polimerasa dependiente de DNA y otras enzimas utilizadas durante la replicación como hidrolasa, DNA helicasa, DNA topoisomerasa, etc. El virión también contiene lípidos y carbohidratos.

1.4 REPLICACIÓN

Los virus *pox* son una excepción entre los virus a DNA ya que replican en el citoplasma.

Existen dos receptores conocidos para los virus *pox*: uno se denomina heparán sulfato (glicosaminoglicano) y el otro es el receptor de EGF (*epidermal growth factor*). La forma de entrada está en discusión, aunque se postula que las capas de envoltura se van desenvolviendo, como un paquete. Este proceso se realiza en el citoplasma, donde posteriormente aparecen los característicos cuerpos de inclusión, denominados corpúsculos de Guarnieri, que pueden observarse en las células infectadas con tinciones histológicas.

El virión contiene numerosas enzimas que le permiten independizarse del núcleo celular. El ciclo de replicación es relativamente breve; por ejemplo, la expresión de los RNA mensajeros de *vaccinia* en células infectadas presenta cantidades de RNA temprano, intermedio y tardío a la hora y media, 2 hs. y 4 hs., respectivamente.

Después de un primer desnudamiento (*uncoating*), se sintetizan factores de transcripción que se usarán en la etapa siguiente. Luego,

Subfamilia	Virus	Hospedador primario	Cuadro clínico en humanos
<i>Chordopoxvirinae</i>	Numerosos agentes	(Afectan a vertebrados)	Sí: algunos miembros de la subfamilia
Géneros			
<i>Orthopoxvirus</i>	Viruela (variola)	Hombre	Viruela (<i>smallpox</i>), erradicada
	<i>Vaccinia</i> * (vacuna)	Hombre	Lesiones vesiculares post-vacunación
	<i>Cowpox</i> (viruela bovina)	Ganado, gato, roedores	Lesiones en manos
	<i>Monkeypox</i> (viruela del mono)	Monos	Similar a la viruela
	Viruela del ratón (ectromelia)	Ratón	No
<i>Parapoxvirus</i>	Virus Orf (dermatitis pustular de ovinos)	Ovinos	Lesiones localizadas vesículo-granulomatosas
	<i>Pseudocowpox</i>	Ganado	Nódulo de los ordeñadores
<i>Yatapoxvirus</i>	Virus Yaba	Monos (tumores)	Lesiones localizadas
	<i>Tanapoxvirus</i>	Roedores	Lesiones nodulares
<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus del molusco contagioso	Hombre	Tumores benignos en piel
<i>Avipoxvirus</i>		Aves	¿?
<i>Capripoxvirus</i>		Ganado caprino	No
<i>Leporipoxvirus</i>		Conejos (mixomas)	No
<i>Suispoxvirus</i>		Cerdos	No
Subfamilia			
<i>Entomopoxvirinae</i>	Numerosos agentes	(Afectan a invertebrados)	No

Tabla 28.1. Familia *Poxviridae*. *Virus prototipo.

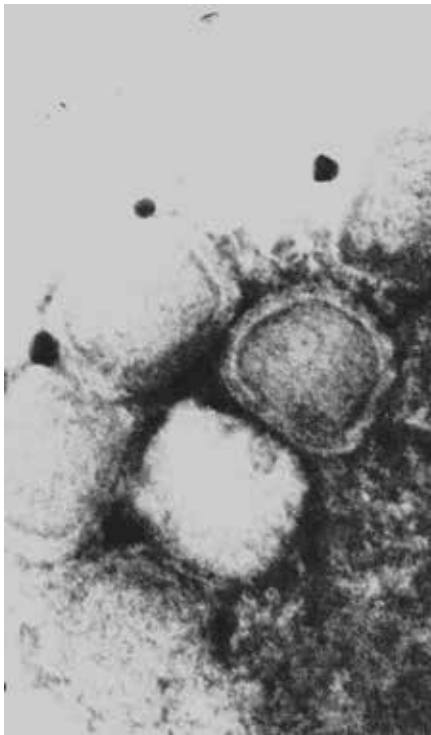


Figura 28.2. Virus viruela. Microscopía electrónica. Se observa la característica forma de ladrillo de las partículas virales. 120 000 x.

ocurre un segundo desnudamiento y se expresan genes de la etapa intermedia, que incluyen factores de transactivación, proteínas de unión al DNA y serpinas (*serine protease inhibitor*). Estas sustancias son muy importantes, pues se ha demostrado que los virus con mutación en el gen de serpina presentan menor virulencia en las infecciones del mixoma del conejo.

Las partículas maduran a través de microvellosidades y es llamativo que se haya propuesto que la envoltura lipídica no la adquieren por brotación, sino que se sintetiza *de novo*. Asimismo, estudios *in vitro* han demostrado que las proteínas de la membrana de los virus maduros se insertan cotraduccionalmente en el retículo endoplásmico de la célula infectada.

1.5 INTERACCIÓN CON LA CÉLULA HOSPEDADORA

Los *orthopoxvirus* pueden replicar en varias líneas celulares y presentan una replicación restringida en células CHO (*Chinese hamster ovary cells*). Estudios recientes han determinado ciertas características importantes durante la replicación en la célula hospedadora:

a) Producen una inhibición de la síntesis de macromoléculas con un efecto citopático importante, ya que inhiben la síntesis de RNA y DNA del hospedador. También inhiben el transporte así como la degradación de los mensajeros de actina y tubulina.

b) Estimulan el crecimiento celular. Muchos *poxvirus*, como por ejemplo el virus del *Molluscum contagiosum* dan una respuesta hiperplásica, debido a la secreción de un factor de crecimiento epidérmico (EFG), que provee un entorno óptimo para la replicación viral. La proliferación celular en las vecindades de un centro de infección es clave para el desarrollo de las características lesiones denominadas *pocks*.

c) Interfieren con la respuesta inmune del hospedador: La respuesta inmune puede frenar la multiplicación de los virus y por lo tanto eliminarlos, a través de efectos mediados por interferón, citoquinas, complemento y células NK. Estos virus codifican varias proteínas que interfieren con la inducción o actividad del complemento y con la de las principales citoquinas. Se unen y antagonizan al TNF (*Tumor necrosis factor*), al interferón y a quimioquinas. Las

proteínas inhibitorias son de carácter soluble, y pueden alterar receptores celulares o proteínas intracelulares que interfieren con el señalamiento.

2. VIRUELA

2.1 VÍA DE INFECCIÓN Y FORMAS CLÍNICAS

El agente etiológico pertenece a la subfamilia *Chordopoxvirinae* y se denomina virus viruela (en inglés, *variola*) y presenta una especificidad de especie marcada (humano). La transmisión es por vía respiratoria (aerosoles) o contacto directo o por fomites (materiales inertes contaminados), no existiendo vectores ni reservorios animales en la naturaleza.

Las formas clínicas de la viruela se diferencian por su tasa de mortalidad:

- Viruela mayor, mortalidad de 20-50%
- Viruela menor, también denominada *alastrín*, mortalidad menor al 1%

El período de incubación es de 10 días. Luego de replicar en el epitelio respiratorio, se disemina por medio de viremia. Se presenta fiebre elevada, cefalea, y vómitos que en tres días son seguidos por la aparición de un importante exantema eritematoso macular, que progresa de mácula a pápula, vesícula y finalmente a pústula. También existen enanemas en las mucosas del tracto digestivo. Existe grave compromiso visceral asociado y las formas hemorrágicas y fulminantes son generalmente mortales.

El exantema comienza en la cara, manos y brazos, luego se disemina a miembros inferiores y finalmente al tronco. Esta distribución se denomina centrífuga, lo que significa que se afectan más los miembros que el tronco, a diferencia de la varicela. Las lesiones de la viruela son sincrónicas, es decir, se observan todas en la misma fase de desarrollo (Figura 28.3).

La mortalidad suele ser del 30% en pacientes no-inmunes y, en caso de sobreinfecciones bacterianas (neumonía), puede ascender al 50%. La muerte ocurre habitualmente en la segunda semana de enfermedad, aunque en los casos fulminantes puede ocurrir en una semana. Por el contrario, en los pacientes vacunados la mortalidad disminuye al 3%.

Es muy importante distinguir clínicamente viruela de varicela. En la varicela las lesiones son más superficiales, aparecen en ondas y son asincrónicas, es decir, pueden observarse grupos de máculas, vesículas, y pústulas simultáneamente. Las lesiones de la varicela son más densas en el tronco y no aparecen en palmas o plantas. También debe realizarse un diagnóstico diferencial con la viruela de los monos (*monkey pox*) y con la exposición a ciertas drogas u otras lesiones cutáneas como eritema multiforme o dermatitis alérgicas.

2.2 PATOGENIA

El virus viruela circula libre en plasma o transportado por células linfoides (primera viremia). Así alcanza todos los tejidos y replica en distintos tipos celulares, incluyendo los endotelios vasculares. Luego se produce una segunda viremia. El virus replica y destruye células de los parénquimas pulmonares, renales, hepáticos, etc.

La invasión masiva, característica en individuos en edades extremas de la vida, no puede ser controlada por la respuesta inmune y culmina por lo general con lesiones hemorrágicas que conducen a la muerte. Por el contrario, un buen estado general y determinadas condiciones de la infección permiten eliminar las células infectadas y la recuperación, mediada por la respuesta inmune.

La inmunización con vacuna antivariólica previene la enfermedad y evita la diseminación masiva de la infección.

2.3 DIAGNÓSTICO

La viruela ha sido erradicada del planeta en 1980. Sin embargo, el riesgo del empleo de este virus como agente del bioterrorismo hace necesario que algunos laboratorios de referencia internacio-

nales mantengan disponibles los métodos de diagnóstico para la detección y confirmación inmediata de cualquier reaparición del virus. Estos laboratorios deben funcionar con las máximas condiciones de bioseguridad (BSL-4) ya que un escape del virus viruela a una población no inmune –como es la mayoría de la población actual– podría producir una catástrofe. Por ello, todo caso sospechoso debe ser notificado inmediatamente a las autoridades de Salud Pública y las muestras deberán ser enviadas a los laboratorios de referencia como el CDC de Atlanta, EE.UU., y en nuestro país, el ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", en Buenos Aires.

El envío de muestras debe realizarse en condiciones de bioseguridad para lo que existen contenedores especiales (*ver Capítulo de Bioseguridad*).

Las muestras para diagnóstico de viruela son: fluido vesicular, raspado de la base de las vesículas, biopsias o material de autopsia.

El diagnóstico se puede realizar por:

- 1) Microscopía electrónica por tinción negativa in muestras del líquido contenido en las vesículas. Éste es el ensayo de elección para un diagnóstico rápido, ya que en una hora es posible realizarlo debido a que la morfología característica de los *poxvirus* (forma de ladrillo) permite diferenciarlos de inmediato de los *herpes virus* (varicela). Sin embargo, esta técnica no permite diferenciar a los distintos *orthopoxvirus* ya que todos presentan morfología similar (Figura 28.2).
- 2) Citohistología. Identificación de inclusiones intracitoplasmáticas (cuerpos de Guarnieri) con tinciones histológicas en células de la base de las vesículas o de tejidos e identificación de los antígenos virales por inmunofluorescencia.
- 4) Aislamiento en cultivo celular o en huevos embrionados. Numerosas células son susceptibles a los *orthopoxvirus*, tales como cultivos primarios de fibroblastos de prepucio humano, pulmón fetal humano, riñón de mono, células VERO, LLC-MK2, etc. La ACP aparece rápidamente y posteriormente se debe identificar el virus aislado. También pueden cultivarse en membrana corioalantoidea de huevos embrionados de gallina donde producen las características lesiones focales denominadas *pocks*.
A diferencia de los *orthopox*, los *parapoxvirus* crecen en cultivo pero no en huevos. El virus del molusco contagioso no desarrolla ni en cultivo ni en huevos.
- 5) Técnicas moleculares. La PCR puede realizarse directamente en las muestras clínicas o sobre el cultivo para identificación de la ACP. Se amplifica un segmento del gen de la hemaglutinina y existen PCRs para diferenciar las diferentes especies de *orthopoxvirus*.
- 6) Diagnóstico serológico. Permite el diagnóstico de infección pasada. Existen ensayos de neutralización, inhibición de la

hemaglutinación, ELISA y *Western Blot*. Estos estudios se realizan solamente en laboratorios especializados como el CDC, de Atlanta, EE.UU.

2.4 TRATAMIENTO

El tratamiento puede intentarse con cidofovir, droga con cierta actividad contra *poxvirus*, aunque con eficacia no demostrada contra viruela. Otros antivirales son tisemicarbazona, adefovir y ribavirina. También se puede emplear gammaglobulina hiperinmune anti-*vaccinia*.

Todo individuo expuesto a viruela debe ser vacunado de inmediato con *vaccinia*. La vacunación es efectiva en prevenir la muerte si es administrada hasta los 5 días post-exposición y en prevenir la enfermedad si es administrada antes de las 72 h. Los individuos expuestos deben ser aislados en cuarentena por 17 días ya que podrían transmitir la enfermedad mediante secreciones respiratorias.

2.5 EPIDEMIOLOGÍA

Existen evidencias de la existencia de viruela en la más remota antigüedad. Así lo demuestra la momia del faraón Ramsés V, que data del 1100 antes de Cristo. Las epidemias de viruela asolaron Europa, la India y China durante muchos siglos.

La fuente de infección con viruela son las secreciones respiratorias de los pacientes infectados en las etapas tempranas de la enfermedad. Este virus también puede diseminarse por fomites tales como ropas en contacto con los pacientes.

La viruela fue prevalente en países occidentales, la India y Latinoamérica hasta la introducción de la vacunación masiva, lo que permitió su erradicación del planeta Tierra en 1980.

3. EL ÉXITO DEL PROGRAMA DE ERRADICACIÓN DE LA VIRUELA DEL PLANETA

Los estudios pioneros de E. Jenner iniciados en 1798 culminaron 182 años más tarde, con el programa de la OMS para erradicación de la viruela, con el último caso humano natural de viruela detectado en el mundo (1977) y con la declaración del planeta Tierra libre de viruela (1980). Esto constituye uno de los éxitos más importantes de la ciencia en la lucha contra una enfermedad infecciosa (Figura 28.4).

El éxito de este programa se basó en la aplicación masiva de la vacunación antivariólica y en la cooperación internacional para controlar su producción y aplicación en las acciones de bloqueo en las áreas con casos detectados de viruela.



Figura 28.3. Lesiones de viruela en el mismo estadio de evolución. Tomado de: CDC, *Department of Health and Human Services: Evaluating patients for smallpox*. Foto de Mack T y col. WHO.

Aguja bifurcada
↓

**¿CUÁNTO COSTÓ...
... enviar un hombre a la Luna?**

Desde 1961, año en que el Presidente John Kennedy dio instrucciones para que se enviara a un hombre a la Luna y se le devolviera a la Tierra, «antes que termine el presente decenio», hasta el alunizaje de dos hombres en la región lunar del Mar de la Tranquilidad, en julio de 1969, la agencia espacial estadounidense NASA gastó en este proyecto alrededor de

US \$ 24.000 millones.

... extirpar la viruela de la faz de la Tierra?

Desde 1967, año en que la OMS decidió poner en ejecución su programa intensivo de erradicación de la viruela, hasta 1980, año en que la 33.ª Asamblea Mundial de la Salud confirmó la desaparición definitiva de la enfermedad de toda la faz del planeta, los gastos de la erradicación han sumado en total

US \$ 300 millones.

¿CUÁNTO SE ECONOMIZARÁ?

El importe anual de las economías que se harán en el mundo entero cuando todos los países hayan suprimido la vacunación antivariólica se calcula en

US \$ 1.000 millones.

¿CUÁNTAS PERSONAS PADECIERON LA VIRUELA?

El año 1967 hubo, según las estadísticas oficiales, 131.697 casos de viruela, pero esa cifra sólo representó una pequeña fracción de la incidencia real de la enfermedad, que se elevó con seguridad ese año a

más de 10 millones de casos en el mundo entero.

¿CUÁNTAS MURIERON?

Según evaluaciones fidedignas, alrededor de

2 millones de personas murieron de viruela en 1967.

¿CUÁNTAS PERSONAS TRABAJARON PARA SALVAR AL MUNDO DE LA VIRUELA?

El total de personas que trabajaron en los servicios nacionales de más de 40 países para el Programa de erradicación de la viruela ascendió a

200.000.

Los efectivos de personal internacional que trabajaron para el Programa representaron unas

700 personas de más de 70 países.

¿CUÁNTAS VACUNACIONES SE PRACTICARON?

Se calcula que para la ejecución del Programa se utilizaron en el mundo entero

2.400 millones de dosis de vacuna.

La producción de vacuna de los países de endemicidad variólica ascendió a

2.000 millones de dosis.

Los suministros de vacuna distribuidos por la OMS ascendieron a

400 millones de dosis.

¿CUÁNTAS AGUJAS BIFURCADAS SE UTILIZARON?

De 1967 a 1976, la OMS facilitó para la ejecución del Programa más de 40 millones de agujas bifurcadas. La aguja bifurcada es básicamente una aguja de máquina de coser con el ojo de enhebrar el hilo limado para obtener la bifurcación. La introducción de la aguja bifurcada hizo posibles importantes economías en la cantidad de vacuna necesaria

Figura 28.4 a y b. Campaña de erradicación de la viruela del planeta. Tomado de: Salud Mundial, OMS, Mayo de 1980.

3.1 VACUNA ANTIVARIÓLICA

El virus *vaccinia*, utilizado para producir la vacuna antivariólica, es una incógnita evolutiva. Jenner creyó que se trataba del virus de la viruela del caballo que había producido enfermedad en vacas y que éste, inoculado directamente al humano, se comportaba como atenuado. Es decir, producía una lesión local, generando una inmunidad cruzada suficiente para disminuir o anular el riesgo de enfermedad ante la infección natural con viruela. Esto se denomina inmunización con un virus heterólogo.

Estudios genéticos recientes de cepas de *vaccinia* demostraron que difiere en su organización genética de la viruela bovina. Si bien el origen de esta cepa es oscuro, la hipótesis más aceptada en la actualidad es que las cepas de vacuna, derivadas de innumerables pasajes desde Jenner hasta el año 1980, es una recombinante de genes de viruela bovina (*cowpox*) y viruela humana y forma una especie distinta en el género *Orthopoxvirus*.

La vacuna antivariólica contiene virus vivo y atenuado (virus *vaccinia*). El virus *vaccinia* se puede propagar en altos títulos por inoculación en la piel de terneras u ovejas. El contenido de las vesículas con alto título viral se trata para reducir la contaminación bacteriana y se añade glicerol para preservar la infectividad. Luego es liofilizada, lo que permite su conservación por largos períodos refrigerada a 4 °C. A temperatura ambiente, una vez reconstituida es inestable.

Una de las claves del éxito de la campaña mundial de vacunación de la OMS fue precisamente el uso de esta vacuna liofilizada, desarrollada inicialmente en Inglaterra.

La vacuna debe aplicarse por multipuntura en la piel del brazo (músculo deltoides) con una aguja especial, denominada **aguja bifurcada (Figura 28.4 a)**. La inoculación produce una infección con una lesión localizada que evoluciona de pápula (3 días), a vesícula (6 días), pústula (9 días) y finalmente costra (12 días), que cae dejando una escara. Pueden existir síntomas sistémicos como fiebre, malestar general, mialgias, dolor en el lugar de la inoculación y adenopatías locales.

Esta vacuna desarrolla una intensa inmunidad cruzada con el virus viruela. Si estas típicas lesiones cutáneas no se desarrollan luego de la primovacunación esto significa que la vacunación no fue eficaz y que el paciente no estará inmune. En las re-vacunaciones la evolución de la lesión es mucho más rápida que en la primovacunación. En la actualidad, la vacuna se prepara en piel de terneras con el método clásico antes descrito (Wyeth, Aventis) o bien en cultivos celulares (Acambis/Baxter).

Inmunidad. La inmunidad conferida por la vacuna disminuye a los 5 años y prácticamente desaparece a los 20. La vacunación luego de la exposición a viruela protege contra la enfermedad y contra el desenlace fatal.

3.2 INDICACIONES DE LA VACUNACIÓN ANTIVARIÓLICA

A partir de 1980, fecha en que la OMS declaró libre de viruela al planeta, la vacunación antivariólica (que era obligatoria en países con casos de viruela) fue suspendida. En la actualidad, dado el peligro potencial del empleo del virus viruela como arma de bioterrorismo, se han reactualizado las normas de vacunación, como se observan en la Tabla 28.2. Sin embargo, dados los riesgos de esta vacuna no se recomienda su aplicación masiva a toda la población.

Si no hay brote epidémico:

Personal de laboratorio

Personal de salud y fuerzas armadas y de seguridad y todos aquellos que deban actuar o responder en caso de epidemia

En caso de brote epidémico:

Todos los pacientes con exposición directa

Todos los que presenten riesgo de exposición

Tabla 28.2: Indicaciones de la vacunación antivariólica para EE.UU. www.cdc.gov/ smallpox

3.3 CONTRAINDICACIONES

Esta vacuna contiene virus vivo y atenuado y posee muchos riesgos y contraindicaciones. Las contraindicaciones son: embarazo, inmunodeficiencias, lesiones extensas en piel, terapias inmunosupresoras, lesiones inflamatorias del ojo, dermatitis atópicas (eczemas), lactancia, edad menor a un año y alergia a alguno de los componentes de la vacuna.

Complicaciones

Encefalitis. La complicación más grave de la vacunación es la encefalitis post-vacunal que, aunque rara, puede ocurrir en 15 casos por millón de vacunados. Se desarrolla a los 14 días luego de la vacunación y puede ser grave.

Auto-inoculación accidental. Es una complicación frecuente producida por la auto-inoculación accidental del virus vacunal en las membranas oculares.

Eczema vaccinal. En pacientes con eczema (por ejemplo, dermatitis atópica) el virus vacunal puede implantarse en las lesiones y diseminarse en la piel (vacuna generalizada), que puede tener un desenlace fatal.

Vaccinia generalizada. Es poco frecuente y se produce por diseminación de la cepa vacunal por viremia. Se observa en pacientes con anomalías inmunológicas.

Eritema multiforme. Son lesiones exantemáticas benignas que pueden aparecer a 1-2 semanas luego de la vacunación por mecanismos de hipersensibilidad. La forma más grave es el síndrome de Stevens-Johnson.

Queratitis por vaccinia. El virus puede ser accidentalmente implantado en el tejido ocular, incluso en la córnea, lo que lleva a ulceración.

Vaccinia progresiva. Es una complicación muy rara que se observa en pacientes con deficiencias en la inmunidad T-dependiente (inmunodeficiencias congénitas, terapias inmunosupresoras, HIV/SIDA). El cuadro es grave y debe ser tratado con inmunoglobulina específica anti-*vaccinia*.

4. ELIMINACIÓN DEFINITIVA DE LA ESPECIE VIRUELA

Los dos últimos casos de viruela en el mundo ocurrieron en Inglaterra en 1978 cuando se produjo un trágico accidente de laboratorio con escape viral. En la Universidad de Birmingham se estaban realizando estudios de virología básica con virus viruela y, accidentalmente, un investigador enfermó y murió habiendo antes contagiado a su madre. Las acciones inmediatas de contención permitieron evitar la diseminación del virus en la comunidad.

Luego de la declaración de la erradicación del virus viruela del planeta en 1980, dado que este virus ha dejado de circular en la naturaleza y que no existen reservorios animales, la OMS solicitó *destruir todo resto de virus viruela* conservado en los laboratorios del mundo en el año 1999. Solamente se conservan cepas de viruela en laboratorios de máxima seguridad en Atlanta, EE.UU. y en Rusia.

Ésta fue la primera vez en la historia en que se destruye una especie por decisión del hombre. La destrucción deliberada de este virus es controversial ya que, aunque peligroso, cada especie viviente contiene información biológica única. Sin embargo, la secuencia nucleotídica completa de muchos virus de viruela ya se conoce.

5. CONCEPTOS SOBRE BIOTERRORISMO

La posibilidad de utilizar el virus viruela como un arma biológica en acciones terroristas ha reactivado el interés por este virus, en las medidas de prevención (vacunación) y acciones de bloqueo y en su diagnóstico rápido y tratamiento.

Es así como estudios recientes realizados en condiciones de máxima seguridad, permitieron conocer el genoma completo del virus de viruela, caracterizar los genes responsables de la virulen-

cia y preparar un medicamento oral a partir de cidofovir (www.cdc.gov).

Los agentes etiológicos que probablemente pudieran ser usados en un ataque bioterrorista son aquellos que sobreviven en forma seca en un aerosol y, por lo tanto, pueden transmitirse por inhalación. Los aerosoles en un laboratorio se producen en todo momento; por ejemplo, un proceso tan sencillo como depositar una solución en un portaobjetos puede producir un aerosol, de manera que el uso de procedimientos para seguridad tipo BSL-2 se considera una rutina segura para muchos virus. Por el contrario, deben emplearse procedimientos y condiciones de bioseguridad clase BSL-3 y BSL-4 si se sospecha un agente de transmisión bioterrorista, como por ejemplo virus viruela (véase el capítulo 57).

En el caso de los virus *pox*, la peligrosidad se basa en la vía de infección aerógena, con una transmisión a través de la inhalación de pequeñas gotas contaminadas con el virus que son liberadas al medio ambiente por las personas infectadas. Además, si bien las costras secas que recubren las pústulas contienen menor cantidad de virus, presentan una importante resistencia al calor y a la desecación, lo que asegura su posible diseminación en condiciones en las que otros virus envueltos hubieran perdido la viabilidad.

Dado que el virus *vaccinia* (vacuna antivariólica) protege contra la enfermedad, parece razonable preparar lotes de vacuna para su uso en una emergencia, teniendo en cuenta que si una acción terrorista liberara virus viruela al medio ambiente en forma intencional, la mayoría de la población mundial sería susceptible a esta enfermedad dado que la vacunación fue suspendida en 1980. De allí surgen las nuevas indicaciones de la vacunación (Tabla 28.2), que se están aplicando en EE.UU., donde se dispone de una cantidad importante de vacuna para la población, de surgir una guerra biológica, y también de personal de la salud entrenado para detectar y diagnosticar casos de viruela. En nuestro país también se cuenta con personal entrenado para el diagnóstico (Instituto ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán").

6. EL VIRUS VACCINIA COMO VECTOR

El desarrollo de las técnicas que permiten las construcciones de quimeras genéticas (**técnicas de DNA recombinante**) permitió utilizar al virus *vaccinia* como cepa inmunizante, incluyendo entre sus genes, uno o más que codificaran para la síntesis de proteínas de otros virus.

De esta forma, al vacunar a un individuo con el virus recombinante, la replicación viral originará las proteínas del virus vacuna y también aquellas de otros virus, cuyos genes han sido insertados en el DNA del virus *vaccinia*.

Un **vector viral** se define como un virus con material genómico modificado a través de la introducción de un ácido nucleico extraño. El vector debe poder multiplicar en la célula que infecta y, por lo tanto, debe poseer secuencias regulatorias, así como señales de replicación y de encapsidación.

El fragmento extraño que se incorpora puede ser un gen que se quiera expresar en cantidades importantes, por ejemplo, una glicoproteína viral que sea altamente inmunogénica.

Dado que el virus *vaccinia* tiene baja patogenicidad, los virus recombinantes que expresan proteínas extrañas son considerados buenos candidatos para la producción de vacunas animales y humanas.

El empleo de virus *vaccinia* como vector tiene varias ventajas: un amplio rango de hospedadores, un genoma que acepta fragmentos grandes y altos niveles de expresión de la proteína elegida.

El fragmento de DNA extraño es insertado en el DNA de *vaccinia* por recombinación homóloga entre un plásmido (que contenga un promotor del virus vacunal) y el virus *vaccinia* presente en las células transfectadas por el plásmido.

Así, se ha preparado un virus recombinante *vaccinia*-rabia para inmunizar animales silvestres mediante cebos conteniendo el virus. Al ser ingeridos los cebos, el virus *vaccinia* recombinante



Figura 28.5. Lesión de molusco contagioso en un paciente con SIDA. Cortesía del Prof. Abulafia. Tomado de: *Virología Médica*, Carballal G, Oubiña, JR, 3ª Edición. Editorial El Ateneo, 1978. Capítulo 18: Familia *Poxviridae*. R. A. de Torres y L. Belli.

infecta a estos animales y produce inmunidad contra *vaccinia* y contra rabia. Sin embargo, existen recaudos sobre la diseminación de este virus recombinante en la naturaleza.

Actualmente, se está ensayando el uso de los *avipoxvirus* como vectores en vacunas para humanos ya que estos virus no completan su ciclo de multiplicación en células de mamíferos, pero expresan transitoriamente los genes extraños y, por lo tanto, pueden inducir una adecuada respuesta inmune.

7. VIRUS DEL MOLUSCO CONTAGIOSO

Este virus produce una enfermedad de la piel humana, y es similar a otro que produce tumores en monos (virus de Jaba) (Tabla 28.1). Su morfología es similar a la de otros *poxvirus* y su genoma contiene genes para un factor de crecimiento que estimula la hiperplasia y la proliferación celular.

La enfermedad tiene una distribución mundial y se observa en consultorios dermatológicos y en clínicas de enfermedades de transmisión sexual, aunque su frecuencia es menor que la de la sífilis, gonococcia o herpes genital.

El contagio se produce por contacto íntimo de las superficies corporales. Las lesiones cutáneas son similares a un tumor papilomatoso; son redondeadas de 2-5 mm y pueden ser únicas o con crecimientos en los bordes. La característica de estas lesiones es la falta de queratinización de su superficie. El centro de la lesión se umbilica y luego se necrosa. Pueden desaparecer en meses o persistir durante años (Figura 28.5).

El contagio puede ser por vía directa o indirecta y puede transmitirse por vía sexual. La enfermedad puede observarse en niños, generalmente en la cara, tronco o extremidades y en adultos, en los que con frecuencia –pero no de forma excluyente– el contagio se debe a la actividad sexual y aparecen en la zona genital. La presencia de gran cantidad de lesiones de molusco contagioso en un adulto debe inducir a pensar en inmunodepresión.

El diagnóstico se realiza por biopsias de la lesión. No existen técnicas de aislamiento en cultivos ni serología. La histopatología muestra epidermis con degeneración globular, acantosis, hiperplasia y las células con grandes inclusiones acidófilas intracitoplasmáticas características (cuerpos de Henderson-Paterson). Estas inclusiones son frecuentes en células epiteliales superficiales por lo que el raspado de la lesión y el estudio citológico, con tinción de Giemsa o Lugol, permiten un diagnóstico rápido. También pueden emplearse microscopía electrónica y técnicas moleculares.

No existe tratamiento específico y se emplean tratamientos destructivos locales (criocirugía, láser, curetaje).

Bibliografía

- Collier L, J Oxford. *Human Virology*. 2nd Ed. Chapter 14. Oxford University Press, Oxford, 2000.
- Centers for Disease Control and Prevention National Immunization Program. U.S. Department of Health and human services. 2003. www.cdc.gov/smallpox
- Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. "Fields Virology", 3rd ed. Lippincott - Raven, New York, USA. 1996.
- Pogo, B. "Los virus *pox*". En: Basualdo JA, C Coto. *Microbiología Biomédica*, Capítulo 85. Ed. Atlanta, Buenos Aires, Argentina, 2006.
- Specter S, Hodinka RL, Young SA. *Clinical Virology Manual*, 3rd Ed. Chapter 34: "Poxviruses". ASM Press, Washington DC, USA, 2000.
- Strauss JH, Strauss EG. *Viruses and human disease*. Chapter 6. Academic Press, Elsevier, 2002; 223.
- Storch, GA. *Essentials of Diagnostic Virology*, Chapter 6, Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London Philadelphia, San Francisco, 2000.

Papilomavirus humanos

María Alejandra Picconi - Angélica Teysió

1. INTRODUCCIÓN

Los virus papiloma están ampliamente distribuidos en la naturaleza; infectan piel y mucosas en sus hospedadores naturales (hombres, otros mamíferos y aves) produciendo lesiones epiteliales proliferativas (verrugas) que por lo general regresan espontáneamente.

El gran impacto del *virus papiloma humano* (HPV) en el campo sanitario surgió con el conocimiento de su potencial oncogénico y su asociación con tumores humanos, en especial, con el cáncer de cérvix. Esta patología representa el segundo cáncer más común en mujeres en el mundo, después del cáncer de mama, aunque en países en vías de desarrollo constituye la principal causa de muerte por cáncer en población femenina. En América Latina y el Caribe se estima que más de 30.000 mujeres mueren anualmente por esta enfermedad. Su etiología infecciosa y transmisión sexual se sospechaba desde 1842, cuando el médico italiano Rigoni-Stern notó una mucho mayor incidencia de esta neoplasia en prostitutas que en monjas. A mediados de 1970, H. zur Hausen y colaboradores publicaron los primeros datos sugiriendo la asociación etiológica de las displasias y carcinomas cervicales con la infección por HPV.

El principal obstáculo para el diagnóstico de laboratorio de los papilomavirus, que dificultó inicialmente el estudio de su biología, es la incapacidad de propagarse en cultivos celulares convencionales. Los avances en su conocimiento se realizaron a través de técnicas de biología molecular, que permitieron clonar genomas virales aislados de distintas lesiones y utilizarlos como sondas para el análisis por hibridación molecular. De esta manera, a comienzos de la década de 1980 se aislaron los HPV tipos 6 y 11 a partir de verrugas genitales y papilomas laríngeos y los HPV 16 y 18, primeros tipos virales identificados de biopsias de cáncer de cérvix. En los últimos veinte años se han caracterizado alrededor de 100

tipos virales distintos, de los cuales cerca de 40 tipos son capaces de infectar el tracto anogenital femenino (vagina, vulva, cérvix, ano) y el masculino.

La Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, Lyon, Francia), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha establecido en 1995 que ciertos tipos de HPV (denominados de *alto riesgo*) son *carcinogénicos en humanos*. Esto marcó un hito, señalando a la infección por HPV como condición necesaria para la génesis del tumor. En términos de salud pública, este hallazgo es tan importante como el de la asociación entre el tabaquismo y el cáncer de pulmón o entre la infección crónica con virus de las hepatitis B o C con el riesgo de desarrollo de hepatocarcinoma. De esta manera se puso fin a una controversia, dando un estímulo a la aplicación de la detección viral en el campo clínico y abriendo nuevas posibilidades en el campo de la prevención a través del desarrollo de vacunas contra HPV, profilácticas y terapéuticas.

La infección por HPV, aun con tipos de alto riesgo, *per se* no es suficiente para el desarrollo neoplásico; se han descrito factores del hospedador y del medio ambiente que modulan el potencial oncogénico viral.

2. TAXONOMÍA

Los papilomavirus estaban incluidos inicialmente en la familia *Papoviridae*, pero en 1999 se revisó la clasificación, considerándose que por sus características biológicas, estos virus debían constituir una nueva familia: *Papillomaviridae*.

3. TROPISMO

Los virus papiloma infectan y replican en el núcleo de células epiteliales (piel y mucosas). No se propagan en sistemas de cultivos celulares convencionales debido a que su ciclo replicativo requiere células con cierto grado de diferenciación, rasgo que pierden las células propagadas *in vitro*. Son altamente específicos de especie y de tejidos.

4. ESTRUCTURA

Los virus papiloma no poseen envoltura (*virus desnudos*) y presentan un *cápside* proteica de simetría icosaédrica (poliedros regulares con 20 caras triangulares, 30 aristas y 12 vértices), compuesta por 72 subunidades denominadas *capsómeros*; esto brinda al *virión* una forma casi esférica al ser observado por microscopía electrónica (Figura 29.1).

Los análisis bioquímicos revelaron:

- La *cápside* formada por dos proteínas estructurales, la *proteína principal*, L1 (PM 54.000 daltons) y la *proteína menor*, L2 (PM 76.000 daltons). La primera, que constituye el 75% del contenido proteico total, muestra propiedades antigénicas específicas comunes a la familia, mientras que la segunda aparenta ser altamente específica. La cápside encierra al genoma viral y lo protege durante la transmisión de la infección.

- El *genoma* constituido por una molécula de DNA doble cadena circular, covalentemente cerrada, conocido como *episoma*. El DNA del HPV contiene alrededor de 8.000 pares de bases y su peso molecular es de alrededor de $5,2 \times 10^6$ daltons. En contraste

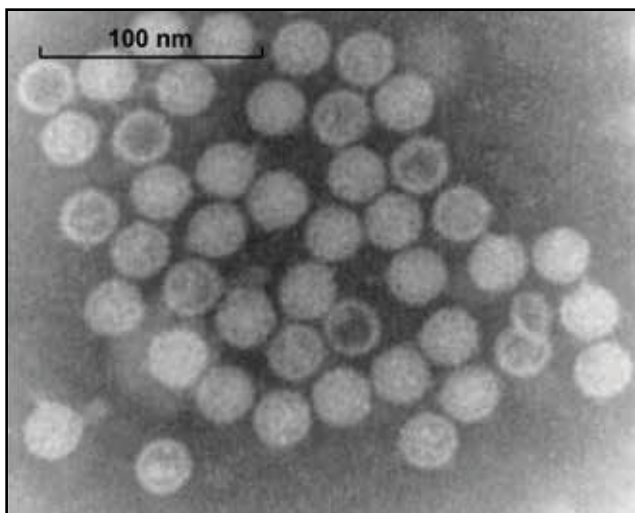


Figura 29.1. Partículas del virus papiloma humano al microscopio electrónico. La microfotografía muestra los viriones del virus papiloma; puede observarse la morfología esférica y los capsómeros (coloración negativa, aumento 160.000x)

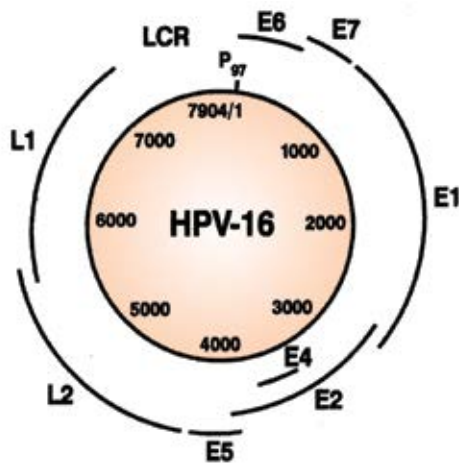


Figura 29.2. Representación esquemática del genoma del HPV16. Se indican los genes tempranos (E), tardíos (L) y la región reguladora (LCR). Adaptado de Howley (6), con modificaciones.

con los cromosomas de mamíferos, toda la información genética de estos virus está contenida en sólo una de las dos cadenas de DNA apareadas. El DNA viral está combinado con histonas (proteínas derivadas del hospedador), compactado en un cromosoma pequeño (minicromosoma).

Todos los DNA secuenciados de los distintos HPV evidencian una gran similitud en su organización genómica (Figura 29.2). Poseen diez marcos de lectura abiertos diferentes; cada uno de ellos representa un gen viral que codifica una proteína responsable de características biológicas tales como el rango de hospedador, el tropismo tisular y la patogenicidad de la infección. El genoma puede ser dividido en tres regiones: la *región larga de control* (LCR), la *región temprana* (E, por *early*) y la *región tardía* (L, por *late*); éstas dos últimas deben su nombre al momento en que se expresan durante el ciclo replicativo del virus.

- *LCR*, también conocida como *upstream regulatory region* (URR) o *región no codificadora*, representa el 15% del genoma viral. Es responsable de la regulación de la replicación viral y controla la transcripción de algunas secuencias de la región E. Los distintos tipos virales muestran marcadas diferencias en su secuencia nucleotídica. Ha sido correlacionada con cambios en la virulencia y el potencial oncogénico.
- La *región E* es un largo segmento que representa alrededor del 45% del genoma viral. Contiene al menos siete marcos de lectura abiertos nombrados de acuerdo a su tamaño relativo, por lo que el número asignado no guarda relación con su ubicación en el genoma. Codifica proteínas involucradas en la transcripción viral (E2), la replicación del DNA viral (E1 y E2), la proliferación celular (E5, E6 y E7), la transformación celular (E6, E7) y posiblemente, en su infectividad (E4).
- La *región L* comprende alrededor del 40% del genoma viral y contiene dos marcos de lectura abiertos, imprescindibles para formación de la cápside viral. L1 codifica la proteína principal de la cápside; es un gen altamente conservado en los papilomavirus de distintas especies. L2 codifica la proteína menor de la cápside y contrariamente a la anterior, muestra marcadas diferencias en la secuencia nucleotídica, inclusive entre los tipos que infectan a una misma especie.

5. CLASIFICACIÓN EN GENOTIPOS

Los virus papiloma se designan de acuerdo a la especie que infectan (Ej.: HPV: *human papilloma virus*; BPV: *bovine papilloma*

virus, etc.). Se clasifican en *genotipos* sobre la base del grado de homología de las secuencias nucleotídicas de su DNA con prototipos preestablecidos. El número asignado es correlativo al orden de descubrimiento (HPV tipo 1, HPV tipo 2, etc.).

En los humanos, se han identificado más de 100 tipos distintos de HPV.

5.1 ¿CUÁNDO SE HABLA DE UN NUEVO TIPO VIRAL?

El criterio adoptado para considerar a un aislamiento como un nuevo tipo viral ha ido modificándose a través del tiempo debido al perfeccionamiento de las técnicas moleculares que permitieron profundizar el análisis. Actualmente, de acuerdo a lo convenido en la Conferencia Anual Internacional sobre Papillomavirus (Quebec, 1995) se establece:

- Un nuevo *tipo viral* cuando éste difiere en más de un 10% de homología con la región L1 al ser comparado con los prototipos conocidos.
- Un *subtipo* si esta divergencia oscila entre 2 y 10%.
- Una *variante* intratípica cuando la divergencia es menor al 2%.

La existencia de *variantes* (secuencias de DNA estable que difieren en mutaciones puntuales), podría tener implicancias epidemiológicas y patogénicas.

5.2 TIPOS VIRALES DE ALTO Y DE BAJO RIESGO, ¿CUÁL ES LA DIFERENCIA?

Los HPV que infectan el tracto anogenital son alrededor de 40 tipos y han sido subdivididos en dos grupos sobre la base de su *potencial oncogénico*.

- HPV de *bajo riesgo* (principalmente HPV 6, 11, 42, 43 y 44), comúnmente presentes en las lesiones benignas (condilomas y neoplasias intraepiteliales de bajo grado), con mínimo riesgo de progresión maligna.
- HPV de *alto riesgo* (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82), que –bajo la forma de infección persistente– pueden conducir al cáncer.

6. CICLO DE REPLICACIÓN DEL HPV. DISTINTOS TIPOS DE INFECCIONES

El virus puede penetrar a través de microabrasiones y así acceder a las capas basales del epitelio (Figura 29.3). Éstas son las únicas células del epitelio capaces de dividirse, por lo que constituyen el blanco obligado del virus que intenta inducir lesiones en las que pueda persistir. Una vez ingresado y descapsidado, el genoma viral migra hacia el núcleo celular. Así se establece la infección, que puede ser *latente* o *productiva*.

6.1 INFECCIÓN LATENTE

Luego de la inoculación, se estima que existe un período extremadamente variable, que oscila entre 1 y 8 meses, conocido como *latencia*. El virus está presente en las células pero no manifiesta signo citopático. El genoma viral se replica sólo cuando la célula basal infectada se divide y lo hace en forma autónoma, siendo distribuido de forma homogénea en las células hijas y manteniendo un bajo número de copias.

6.2 INFECCIÓN PRODUCTIVA

El virus comienza a replicarse en forma independiente de la división celular y produce un alto número de copias mediante la expresión de los genes tempranos, en la *capa basal* del epitelio. A medida que el epitelio se va diferenciando, el virus inicia la expresión de los genes tardíos en las *capas intermedias y superficiales*, mediante la síntesis de las proteínas de la cápside viral. El ensamblado de los genomas y las cápsides da lugar a las partículas virales completas o *viriones*, por lo que esta forma de infección resulta altamente transmisible. El HPV

no mata a la célula que infecta. Por el contrario, convive con ella; mientras va ocurriendo la maduración natural del epitelio, el virus se va multiplicando. Finalmente, la descamación de estas células conteniendo viriones del HPV sirve como vector de transmisión de la infección. La infección productiva se manifiesta morfológicamente con la aparición de los signos citopáticos característicos del HPV (coilocitosis, hiperplasia, acantosis, disqueratosis, etc.) y clínicamente con el desarrollo de las lesiones proliferativas (Figuras 29.4 y 29.5).

7. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGENIA

7.1 LESIONES CUTÁNEAS

Las lesiones inducidas por el HPV en piel se caracterizan por hiperplasia de las papilas dérmicas; las verrugas son generalmente benignas y regresan espontáneamente por acción del sistema inmune del hospedador. Son raras en niños menores de 5 años; su frecuencia aumenta en niños mayores (con una prevalencia de hasta 10% en la edad escolar) y adultos jóvenes. Las formas más comunes de presentación son la verruga vulgar, verruga plana y verruga plantar, localizadas preferentemente en rostro, manos y pies.

Los virus que infectan los queratinocitos se encuentran en forma replicativa en las células de las capas superiores del epitelio; el contenido viral es muy variable en las diferentes lesiones y el antígeno de la cápside se detecta en el estrato superior del epitelio.

Existe una asociación preferencial entre un tipo clínico de verruga y un tipo particular de virus. Sin embargo, un tipo viral puede estar asociado a lesiones diferentes por sus caracteres morfológicos, histológicos o por su localización anatómica. Los HPV's relacionados a verrugas plantares, se han detectado también en verrugas vulgares de la mano.

Por otra parte, en verrugas planas de cara y manos se han caracterizado distintos tipos virales (HPV 2 y 3) en una misma lesión lo que indica que un tipo clínico puede relacionarse a varios tipos virales.

Los HPV asociados a lesiones cutáneas han sido exhaustivamente estudiados en la epidermodisplasia verruciforme (EV) (Tabla 1). Esta patología relacionada a un defecto genético se caracteriza por la presencia de lesiones múltiples verrugosas y maculares, diseminadas en rostro, tronco y extremidades. En ella se han caracterizado cerca de 20 tipos virales, siendo los tipos predominantes HPV 5, 8, 14, 17 y 20.

La EV ha sido el primer ejemplo de asociación de tipos específicos de HPV con una neoplasia en humanos, el cáncer de piel. Constituye, además, un excelente modelo para la comprensión de los cofactores que intervienen en la expresión del potencial oncogénico de estos virus; entre ellos la respuesta inmune y la constitución genética del hospedador y factores ambientales como la exposición a la luz solar de las lesiones, los cuales afectarían la transformación progresiva de lesiones benignas a carcinomas.

En el 30% de los casos, las lesiones (en especial las más expuestas a la luz solar) pueden evolucionar a cáncer de piel (carcinoma espinocelular) luego de un período medio de 20 años. Se han descrito patologías cutáneas precancerosas como la enfermedad de Bowen y la queratosis actínica.

El mecanismo de carcinogénesis en piel no ha sido aún esclarecido. A diferencia de lo que se observa en los carcinomas de la mucosa genital, en el cáncer de piel el DNA viral no se encuentra integrado al genoma del hospedador.

7.2 PAPILOMA LARÍNGEO

La papilomatosis laríngea representa una de las formas más comunes de tumores benignos del tracto aero-digestivo inducidos por la

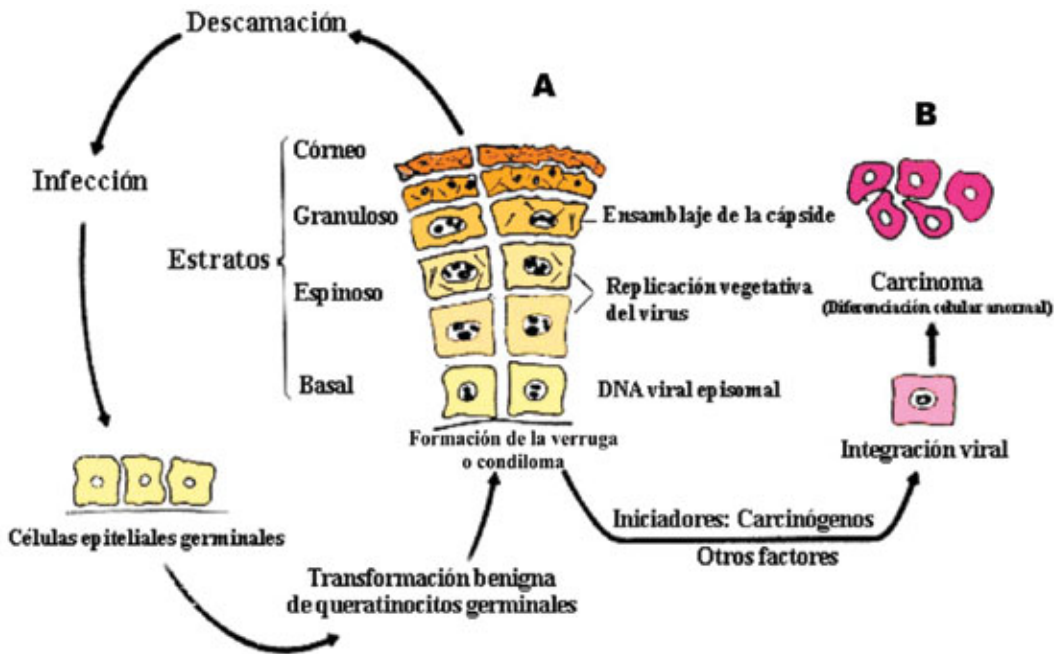


Figura 29.3. Ciclo de la infección por HPV en el epitelio. Potencial oncogénico viral. La representación esquemática muestra el ingreso del virus en el estrato basal donde se inicia la expresión de los genes tempranos. El genoma viral replica muy lentamente como un plásmido, al ritmo de la división celular, siendo distribuido homogéneamente en el núcleo de las células hijas y manteniendo un bajo número de copias. **A.** Lesión benigna. A medida que se va diferenciando el epitelio, se completa la expresión del genoma viral mediante la síntesis vegetativa del DNA en el estrato espinoso y la síntesis de las proteínas de la cápside en el estrato granuloso que finalmente son ensambladas con los genomas virales generando el virión. Esto se manifiesta clínicamente con la formación de la verruga o condiloma. **B.** Lesiones preneoplásicas y neoplásicas. En conjunción con cofactores propios del hospedador y del medio ambiente, ciertas infecciones producidas por los tipos del HPV de alto riesgo, pueden conducir a una desregulación del ciclo celular, induciendo una proliferación anárquica. Generalmente, en este proceso el DNA viral se integra al genoma de la célula infectada.

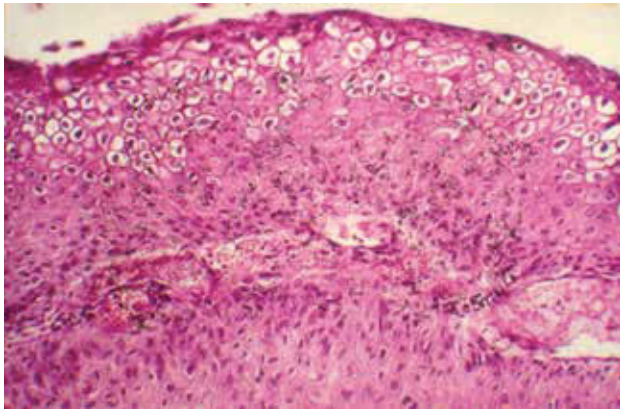


Figura 29.4. Corte histológico de un condiloma de cuello uterino. Puede observarse la morfología característica inducida por el HPV; se destacan los coilocitos (células con halo perinuclear) en las capas intermedias y superficiales del epitelio (aumento: 40 X).



Figura 29.5. Condiloma acuminado en el cuello uterino. Puede observarse la lesión verrugosa nacarada por encima y debajo del orificio endocervical (Colpofotografía; gentileza Dr. J. Mural, Hospital Nacional "Prof. A. Posadas").

Localización	Lesiones asociadas	Cánceres asociados	Tipos virales
Piel	Verruga		1, 2, 3, 4, 7, 10, 28, 41, 48, 60, 63, 65
	Epidermodisplasia verruciforme		3, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36-38, 46, 47, 49, 50
		Cáncer escamoso	5, 8, 14, 17, 20, 47
Tracto anogenital	Condiloma acuminado		6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 70, 72, 81
	• Bajo grado (LSIL)*		6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 70, 72, 81, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82
	• Alto grado (HSIL)**		16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82
		Carcinoma escamoso	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82
		Adenocarcinoma	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58
Conjuntiva			6, 11
Cavidad oral	Hiperplasia epitelial focal		13, 32
Amígdala		Carcinoma escamoso	16, 33
Laringe	Papiloma		6, 11, 16, 18

Tabla 29.1. Tipos de HPV presentes en diferentes lesiones. (*) LSIL: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. / (**) HSIL: Lesión intraepitelial escamosa de alto grado. / En negrita se destacan los tipos virales más frecuentes.

infección por HPV, que también incluyen a la cavidad oral, hipofaringe, esófago y sistema bronquial. Los tipos virales más frecuentemente detectados son HPV 6 y 11, aunque también se han aislado HPV 16, 18 y 31, entre otros (Tabla 29.1).

Se caracteriza por una histología proliferativa benigna; sin embargo, por su recurrencia y tendencia a la diseminación, se la considera de alta morbilidad, requiriéndose para su tratamiento, en la mayoría de los casos, resecciones quirúrgicas periódicas.

El comportamiento clínico es variable: las lesiones regresan con frecuencia, en ocasiones persisten y raramente progresan a cáncer (en general asociado al tabaquismo).

Se presenta en la infancia y adolescencia (papilomatosis laríngea juvenil) o en la adultez (papilomatosis laríngea del adulto). En el primer caso, la vía de transmisión se vincula con la vía de parto (madres con lesiones productivas genitales por HPV), mientras que en los adultos se relaciona con la práctica de sexo oral.

7.3 LESIONES ANOGENITALES

La mucosa del tracto anogenital (cérvix, vagina, vulva, pene, ano) puede ser infectada por numerosos tipos de HPV, dando lugar a lesiones que difieren en su clínica, histología y riesgo de progresión maligna. En base a estas características se dividen en tres grupos:

- Verrugas o condilomas anogenitales que afectan genitales externos y están asociadas preferentemente con los HPV 6 y HPV 11 que se hallan en forma episómica (no integrada) dentro del núcleo. En estas lesiones benignas, el contenido de DNA celular es diploide, muestran un alto grado de regresión y la infección es transmisible (Tabla 29.1, Figura 29.5). Se trata de lesiones productivas en las que el antígeno viral (proteína L1) se detecta en el 50-60% de los casos. La característica más saliente de estas lesiones es la aparición del efecto citopático viral expresado en las células infectadas como coilocitosis, que representa la respuesta cito-histológica a la infección (Figura 29.4).
- Lesiones preneoplásicas de distinto grado de gravedad (SIL): lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL); en ellas puede identificarse una gran variedad de tipos virales, tanto de alto como de bajo riesgo (Tabla 29.1).
- Carcinoma invasor (escamoso o glandular), lesión maligna con capacidad metastásica, en la que se detectan los tipos virales de alto riesgo (Tabla 29.1).

En las lesiones precancerosas o cancerosas hay baja replicación viral por lo cual la detección del antígeno de cápside es menor. Estas lesiones se caracterizan histológicamente por la desorganización de la arquitectura tisular con una atipia nuclear que crece con el grado de gravedad de la lesión; en estos casos el efecto citopático viral (en particular la coilocitosis) es menos evidente.

La *zona de transformación* del cuello uterino, donde se reúnen los epitelios del ectocérvix (plano estratificado, no queratinizado) y el del endocérvix (cilíndrico simple y mucilágo) muestra una mayor susceptibilidad a este virus. Esto se debe, en parte, a la marcada influencia hormonal y la activa división celular que la convierten en el blanco preferido del HPV y el sitio donde se establecen más frecuentemente las lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cuello uterino.

7.3.1 Desarrollo de lesiones intraepiteliales escamosas (SIL). Infecciones transitorias vs. persistentes

La infección por HPV, aun con tipos de *alto riesgo*, es muy frecuente en la población joven sexualmente activa. En ellas se estima hasta un 50% de positividad para DNA del HPV detectada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mientras que sólo un 5% presenta alteraciones citológicas. En la mayoría de los casos se trata de infecciones *transitorias*, autolimitadas y sin consecuencias oncopatogénicas.

Por otro lado, en mujeres mayores de 30 años, los HPV de *alto riesgo* pueden permanecer a través del tiempo generando infecciones *persistentes*. Estudios recientes indican que las mujeres infectadas persistentemente con HPV de *alto riesgo* presentan al menos 100 veces más riesgo de desarrollar lesiones neoplásicas cervicales en los próximos 5 años que aquellas no infectadas; por esta razón este grupo etario constituye el principal blanco de los programas de prevención del cáncer cervical.

Se estima que más del 60% de las lesiones de baja gravedad (LSIL), aun infectadas con HPV de alto riesgo, *regresan* espontáneamente en un promedio de 9 meses; alrededor del 30% *persisten* y cerca del 12% *progresan* a lesiones graves (HSIL) y carcinoma. Uno de los principales problemas en el manejo médico de las LSIL es la incapacidad de conocer en base a criterios morfológicos, cuál será el curso de su evolución, es decir en cuál de estos tres grupos se ubicará una determinada paciente. Por lo tanto, es de sumo interés la búsqueda de marcadores biológicos que permitan identificar lesiones en riesgo de progresión, detectando tempranamente cambios asociados a los procesos transformantes, tales como integración del genoma viral, disminución o anulación de la expresión de E2, aumento de los transcritos de E6 y E7, etc.

8. RESPUESTA INMUNE

La defensa del hospedador tiene un rol fundamental en la definición de la evolución de las lesiones asociadas con HPV, su extensión y gravedad y del resultado de su eventual tratamiento.

La respuesta inmune se inicia, en promedio, 3 meses después de haber comenzado una infección productiva, aunque puede ser mucho más rápida como también nunca ocurrir. El HPV no penetra debajo de la membrana basal, por lo tanto, la exposición inmunológica primaria se da a nivel epitelial. Las características del ciclo replicativo le brindan al HPV una alta eficiencia para evadir la inmunidad del hospedador. Las células epiteliales no son buenas presentadoras de antígeno; así, en tanto la célula esté intacta, el virus permanece oculto dentro de ella. Debido a que el HPV no lisa a la célula, puede permanecer sin ser advertido por las células dendríticas y mononucleares y los macrófagos que inician el reconocimiento inmune. El trauma que surge de la fricción o de un tratamiento, frecuentemente produce la lisis celular y desenmascara al HPV.

El rol crucial de la inmunidad celular en el control de esta infección queda evidenciado en los pacientes trasplantados y con serología positiva para HIV que con frecuencia presentan lesiones floridas y muy extendidas.

En los casos de lesiones persistentes, las células dendríticas están disminuidas y la actividad de las células *natural killer* estaría afectada. La producción disminuida de interferón gama e interleucina 2 ha sido detectada en condilomas persistentes.

La respuesta inmune normal ocurre en forma natural en el 20-30% de los individuos infectados, conduciendo a la eliminación de la lesión. En el 60% de los casos, la destrucción localizada de los condilomas estimula esta respuesta, llevando, finalmente a una remisión clínica. Sin embargo, en aproximadamente un 20%, las lesiones no generan una respuesta inmune y se hacen refractarias a los tratamientos convencionales. Los agentes inmunomoduladores pueden ayudar a estimularla y los tratamientos de resección pueden reducir el volumen de la lesión.

9. EL HPV EN LA GÉNESIS DEL CÁNCER

El potencial oncogénico de los papilomavirus ha sido estudiado desde hace décadas gracias a modelos animales (*virus papiloma del conejo* y *virus papiloma bovino* tipos 2 y 4) que han demostrado su asociación con el desarrollo de lesiones malignas.

Las primeras sospechas del potencial oncogénico de los papilomavirus en humanos datan de la década de 1950, cuando se observó que la epidermodisplasia verruciforme, enfermedad cutánea rara, caracterizada por lesiones verrugosas en toda la superficie del cuerpo, podía desarrollar cáncer de piel en aquellas placas ubicadas en zonas expuestas a la luz solar. Orth y col. demostraron en 1978 que estas lesiones contenían HPV tipos 5 y 8. A principios de la década de 1970, surgieron las primeras propuestas sobre la asociación de HPV con el cáncer de cérvix y, a partir de 1983, diversos tipos virales comenzaron a ser identificados a partir de biopsias de carcinomas cervicales.

Se estima que alrededor del 15% de los cánceres humanos (9 millones de nuevos casos en el mundo, en 1990) están asociados a agentes infecciosos, correspondiendo cerca de la tercera parte de ellos al HPV. La Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, Lyon, Francia) ha establecido desde 1995 que existen evidencias suficientes para considerar que los HPV de *alto riesgo*, en particular los tipos 16 y 18 son *carcinogénicos en humanos*; esta afirmación está sustentada en hallazgos epidemiológicos y experimentales.

Los datos epidemiológicos disponibles indican que la asociación entre la infección por ciertos tipos de HPV y el cáncer de cérvix cumple con los criterios establecidos de *causalidad*, propuestos por Sir Bradford Hill.

En una célula normal, la proliferación es regulada estrictamente por genes promotores del crecimiento, denominados *protooncogenes*, contrabalanceados por genes que restringen la proliferación celular, conocidos como *genes supresores tumorales*. Cualquier alteración sobre este equilibrio podría iniciar una cascada de eventos que resultaría en una progresiva transformación maligna. Es por ello que la tumorigénesis es considerada como un proceso *multietapas*, en el que la acumulación de alteraciones genéticas lleva finalmente al fenotipo maligno.

¿Cómo participa el HPV en la ruptura de este equilibrio?

Numerosos trabajos experimentales han identificado mecanismos utilizados por los tipos virales de *alto riesgo* para inducir la carcinogénesis. Los principales eventos considerados son:

- *Los cánceres de cérvix están precedidos por la infección con HPV de alto riesgo oncogénico.* En casi el 100% de las biopsias de cánceres de cérvix se ha detectado DNA de los HPV de *alto riesgo* (principalmente los tipos 16 y 18). Esto ha sido corroborado también en líneas celulares humanas, provenientes de carcinomas de cérvix, tales como HeLa (que contiene secuencias de HPV 18) y CaSki y SiHa (que contienen secuencias de HPV 16). Se considera, por lo tanto, que la infección persistente con los virus de alto riesgo es condición necesaria para el desarrollo del cáncer.

- *Los HPV poseen oncogenes virales (E6 y E7).* Los HPV poseen en su genoma secuencias con capacidad transformante: los *oncogenes E6 y E7*. Son considerados los genes más importantes en la estimulación de la proliferación y la transformación celular. Por esta razón estos virus, en particular los de *alto riesgo*, presentan la capacidad de inmortalizar *in vitro* fibroblastos y queratinocitos cervicales humanos los que, después de sucesivos subcultivos son tumorigénicos cuando se inoculan en ratones atímicos.

- *En las lesiones preneoplásicas graves y los cánceres, el DNA viral se encuentra integrado al genoma de la célula infectada.* En las lesiones benignas, el genoma viral permanece en su forma original de DNA circular y episómico, con replicación autónoma. Por el contrario, en la mayoría de las lesiones preneoplásicas graves y cánceres de cérvix, así como en las líneas celulares derivadas de estos tumores, el DNA viral se encuentra integrado al genoma de la célula hospedadora. Este evento involucra la ruptura del gen viral E2, conduciendo al descontrol en la expresión de E6 y E7 y a la desestabilización del genoma celular. La integración viral en los cromosomas es al azar, aunque en muchos casos se ha identificado en la proximidad de *sitios frágiles* o de oncogenes celulares (*ras*, *myc*, *raf*, etc.) promoviendo su activación. Durante este proceso pueden perderse algunos genes virales, aunque siempre se conservan los oncogenes virales E6 y E7 (Figuras 29.2 y 29.6).

- *Los oncogenes virales E6 y E7 se expresan.* En tumores, líneas celulares derivadas de carcinomas de cérvix y células transformadas *in vitro* por HPV, no sólo se detecta la presencia de estos genes virales, sino que, además, se están expresando. Esto conduce a la síntesis de los RNA mensajeros virales y sus correspondientes oncoproteínas E6 y E7. La expresión continua sería un requerimiento para el inicio y el mantenimiento del fenotipo maligno.

- *Las oncoproteínas virales interfieren con proteínas celulares supresoras tumorales.* Las oncoproteínas E6 y E7 de los HPVs de *alto riesgo* presentan *in vitro* la capacidad de unirse con elevada afinidad y degradar a las proteínas celulares supresoras tumorales p53 y pRB (proteína del retinoblastoma), respectivamente; esto originaría una inestabilidad genética sostenida que induciría la conversión maligna (Figura 29.6).

Las proteínas E6 y E7 son multifuncionales; se ha demostrado su capacidad de unión a diversas proteínas celulares (además de p53 y pRB), probablemente afectando a los procesos de reparación del DNA del hospedador en diversos puntos.

- *La oncoproteína viral E6 es capaz de estimular la telomerasa:* La telomerasa es una enzima de la célula que promueve la extensión de la porción final del cromosoma (telómero), con la incorporación de secuencias específicas; esto dificulta la finalización de la replicación del DNA, conduciendo a una proliferación celular indefinida. En las células somáticas normales, la telomerasa está inactiva y los telómeros se van acortando en los sucesivos pasajes. Por el contrario, en las células germinales y tejidos neoplásicos, la telomerasa está activa, estabilizando la longitud del telómero. Algo similar sucede en las células inmortalizadas *in vitro* por HPV de

alto riesgo: se demostró que la proteína E6 de HPV 16 es capaz de inducir la actividad telomerasa; algunos trabajos han detectado su presencia en tejidos cervicales preneoplásicos, HPV positivos. Esto ha sugerido que la telomerasa estaría asociada a la infección por HPV, jugando un rol en la carcinogénesis.

10. COFACTORES ASOCIADOS A LA CARCINOGENESIS INDUCIDA POR HPV

Cada año se detectan en el mundo 300 millones de casos nuevos de mujeres infectadas con HPV (Enfermedad de Transmisión Sexual viral más prevalente), aunque se estiman 10 millones con lesiones cervicales de alto grado (HSIL) y 500.000 casos nuevos de cánceres invasores de cérvix. La diferencia entre la cantidad de casos de mujeres infectadas y aquellas portadoras de lesiones preneoplásicas graves y cánceres indica que la infección, aun con tipos de alto riesgo, *per se* no conduce al cáncer. Otros factores deben conjugarse con los HPVs para permitir la transformación maligna; se considera, entre otros, la exposición a carcinógenos físicos (radiaciones), químicos (tabaquismo) y co-infecciones con patógenos inductores de inflamación local (herpes simplex, clamidias). Asimismo se consideran críticos los factores del hospedador como la herencia y el estado inmunológico y hormonal (Figura 29.6).

Las alteraciones genéticas del hospedador constituyen un especial foco de atención debido a la naturaleza *multietapas* de la oncogénesis, en la cual cada paso constituye un cambio genético independiente e irreversible que contribuye a incrementar la desregulación de la proliferación celular. Algunos estudios han mostrado activaciones de oncogenes de la familia *ras* por mutaciones puntuales en carcinomas cervicales y en lesiones preneoplásicas, asociados con HPV de *alto riesgo*; asimismo, se ha hallado amplificación en oncogenes *c-myc* vinculada con progresión maligna en el cérvix.

Dentro de los factores del hospedador, la respuesta inmune mediada por células constituye la principal vía de control y eliminación de la infección por HPV. En los distintos individuos se expresan formas diferentes de los *antígenos leucocitarios humanos* (HLA), responsables de la amplia diversidad en la selección y presentación de péptidos correspondientes a un determinado antígeno viral. Los haplotipos HLA de un individuo en particular podrían influenciar el curso de la historia natural de una infección por HPV, pudiendo ser uno de los determinantes de la *regresión*, *persistencia* o *progresión* de las lesiones cervicales (Figura 29.6). Datos publicados recientemente sugieren que ciertos haplotipos de los HLA se encuentran más frecuentemente en pacientes con lesiones graves por lo que se consideran *predisponentes* (Ej.: HLA DR4 y DQ*0302), mientras que otros detectados en mujeres infectadas que no desarrollaron lesiones serían haplotipos *protectivos* (Ej.: HLA DR13 y DQ2).

11. DIAGNÓSTICO DEL HPV EN EL LABORATORIO: ¿CUÁNDO Y CÓMO?

En la práctica ginecológica cotidiana, aplicando la citología (examen de Papanicolaou), colposcopia y biopsias dirigidas, accesibles a muchos centros hospitalarios, es posible, en la mayoría de los casos, establecer un diagnóstico y encarar un tratamiento adecuado. Desde el punto de vista infectológico, sin embargo, sólo detectando la partícula viral o parte de ella puede confirmarse su presencia. Además, la colposcopia, cito e histopatología son disciplinas de marcada subjetividad, influenciadas por el entrenamiento, la experiencia y el punto de vista personal del observador, lo que ha generado dificultades de reproducibilidad en la evaluación de lesiones del tracto anogenital. Éste no es un problema menor si se considera que un sobrediagnóstico puede conducir a intervenciones terapéuticas injustificadas, de alto costo económico, con perjuicios físicos y psicoemocionales para el paciente afectado. Por otro lado, es aceptado que la citología muestra limitaciones de sensibilidad considerables, pudiendo omitir entre un 20 y 50% de las lesiones graves y cánceres.



Al nivel mundial, se estima que una mujer muere por cáncer de cérvix cada dos minutos. En Europa, donde funcionan adecuadamente los sistemas de detección precoz, todavía se diagnostican anualmente 22.000 nuevos casos de cánceres invasores y 13.000 mujeres mueren cada año por esta enfermedad. Las predicciones para los próximos 20 años estiman un aumento del orden del 100% de cánceres de cérvix en mujeres jóvenes. Estos datos indican que las técnicas de diagnóstico tradicionales, si bien han permitido disminuir marcadamente la incidencia de esta neoplasia, presentan un margen de escape preocupante. Por esta razón, la comunidad científica internacional continúa analizando nuevas estrategias que permitan mejorar la detección precoz y optimizar el diagnóstico.

11.1 APLICACIÓN CLÍNICA DE LA DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DEL HPV

Se han destacado situaciones en las que el diagnóstico virológico de HPV presenta un comprobado valor clínico; ellas son:

- *Esclarecimiento de discordancias citohistocolposcópicas.* Ayuda en diagnósticos diferenciales y confirmación de enfermedad (Ej.: distrofias vs. metaplasias; metaplasias atípicas vs. HSIL).
- *Discernimiento de anomalías citológicas de significado indeterminado* (ASC-US; ASC-H).
- *Orientación terapéutica y de seguimiento.* Permite discriminar aquellas pacientes con SIL en mayor riesgo de progresión según tenga o no virus de alto riesgo e infección persistente. Esta información puede ser útil para la indicación terapéutica o la frecuencia de los controles durante el seguimiento.
- *Control post-terapia.* La presencia viral en el tejido luego de haber completado el tratamiento constituye un factor de riesgo de recurrencia, ya que se considera marcador de enfermedad residual o recidiva temprana.
- *Complemento del examen citológico en el tamizaje en mujeres mayores de 30 años.* Este grupo etario constituye el principal blanco de los programas de prevención del cáncer cervical. La detección HPV de alto riesgo en este grupo muestra mayor sensibilidad y mayor valor predictivo negativo que el Papanicolaou en el diagnóstico de las displasias cervicales, mientras que la

especificidad y el valor predictivo positivo son similares. En los casos de citología normal y detección viral negativa, se podrían espaciar los controles ginecológicos.

En el laboratorio virológico son utilizadas diversas técnicas para detectar y/o tipificar el HPV presente en células cérvico-vaginales o biopsias. Éstas se diferencian en cuanto a las características de las muestras, la necesidad o no de extraer el DNA, la accesibilidad y tiempo que demandan para su realización, la forma de lectura final, la sensibilidad y especificidad. Las diferentes técnicas deben evaluarse comparativamente de acuerdo a la disponibilidad y al objetivo que se desea alcanzar para hacer una correcta elección.

Debe destacarse, asimismo, la importancia de realizar un estricto control de calidad de las técnicas empleadas, al igual que su validación preferentemente contactando con el Laboratorio Nacional de Referencia (Servicio Virus Oncogénicos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires).

11.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR: DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS VIRALES

Pueden analizarse muestras tanto de material fresco (tejido o células obtenidas por cepillado) como fijado (células o cortes histológicos).

11.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- *PCR-RFLP.* El DNA extraído de la muestra clínica se amplifica por PCR empleando los cebadores consenso MY 9,11 que permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 450 pares de bases, correspondiente a la región L1 del genoma viral. Por ser ésta altamente conservada, es posible de esta manera detectar un amplio espectro de HPV's que habitualmente infectan el tracto anogenital (cerca de 40 tipos distintos) con un único par de cebadores y en una sola reacción. Para tipificar, los productos de la PCR son posteriormente analizados por restricción enzimática (*restriction fragment length polymorphism, RFLP*), digiriendo con siete endonucleasas distintas; cada tipo viral puede diferenciarse por un patrón de bandas característico (Figura 29.7).

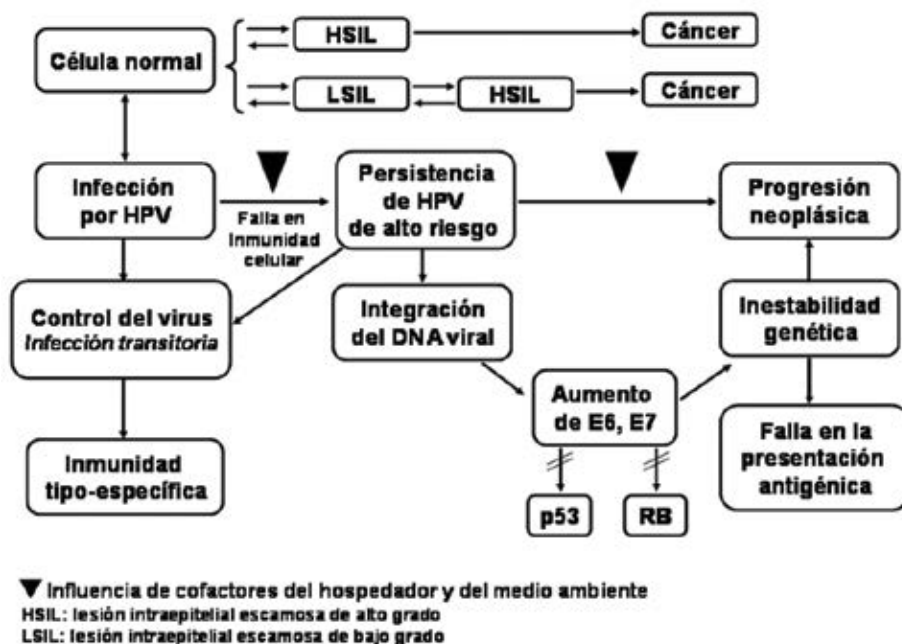


Figura 29.6. Historia natural de las infecciones por HPV y la neoplasia del cuello uterino. Influencia de los factores de riesgo del hospedador y del medio ambiente (Adaptado de Bosch y col.).

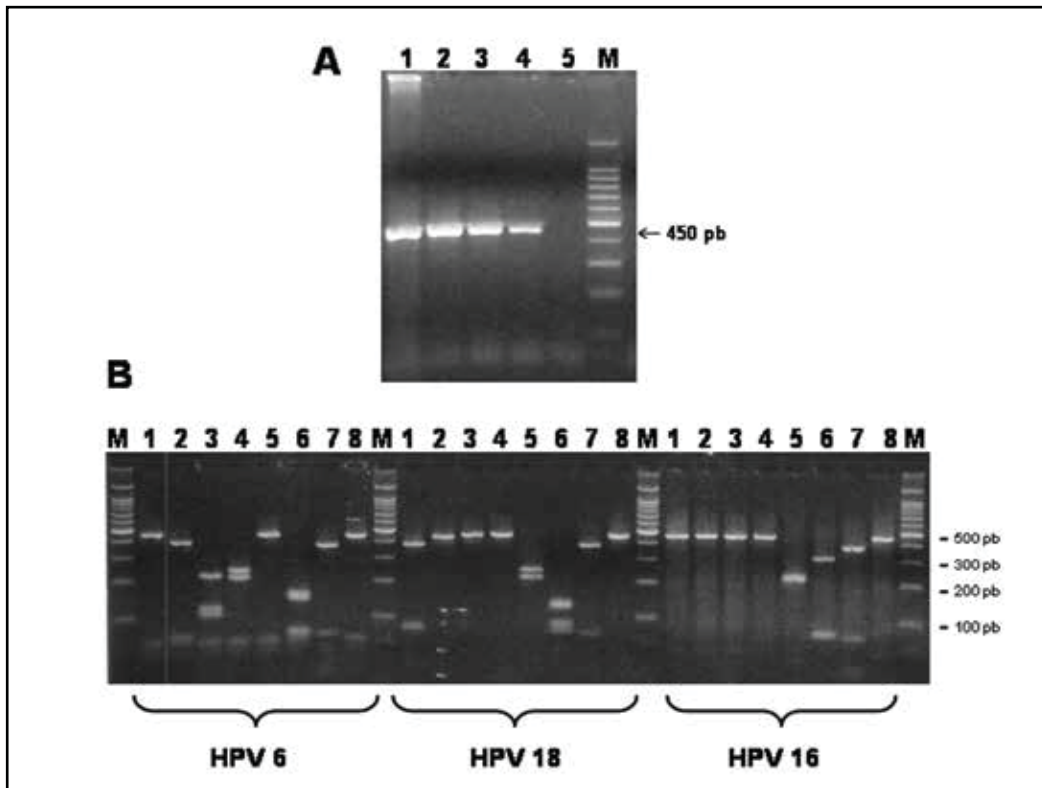


Figura 29.7. Tipificación de virus papiloma humano por PCR-RFLP. A. Detección del HPV por PCR genérica: los DNAs extraídos y purificados a partir de las muestras de cérvix, fueron amplificados con los cebadores MY 9,11 y luego evaluados mediante electroforesis en agarosa al 2% (80V, 1 hora). Calles: 1-3: muestras positivas; 4: control positivo (DNA células CaSki); 5: control negativo. M: marcador de tamaño molecular (escalera de a 100 pb). **B.** Tipificación del HPV por RFLP: alícuotas de los productos amplificados fueron digeridas en forma separada con 7 enzimas de restricción y sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 3% (80V., 3 horas). El gel fue teñido con bromuro de etidio y analizado por transiluminación ultravioleta. Calles: 1-7 productos de restricción con las enzimas *Bam*H I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Pst* I, *Rsa* I y *Sau*3A I respectivamente; 8: producto sin cortar (450 pb). M: marcador de tamaño molecular (escalera de a 100 pb). Las llaves indican el tipo viral identificado en base al patrón de restricción obtenido para cada muestra.

- **PCR-hibridación en dot blot.** El DNA extraído y purificado de la muestra clínica se amplifica por PCR empleando los *cebadores genéricos* GP 5+, 6+ que permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 140 pares de bases, correspondiente a la región L1 del genoma viral. Por la misma razón que en el caso anterior, es posible de esta manera detectar un amplio espectro de HPVs que habitualmente infectan el tracto anogenital, con un único par de cebadores y en una sola reacción. Para tipificar, los productos de la PCR luego son aplicados en forma de gota (*dot*, en inglés) sobre una membrana especial de nylon y son hibridados con sondas sintéticas de oligonucleótidos (20-30 nucleótidos) tipo-específicas.

11.2.2 Hibridación *in situ*

El DNA viral es identificado en cortes histológicos o células fijadas sobre portaobjetos empleando sondas marcadas, en general no radioactivas. El sistema de revelado de los híbridos formados depende del tipo de marcación de las sondas empleadas; en el caso de ser biotiniladas, se realiza mediante una reacción inmunoenzimática. Cuando la reacción es positiva, se obtiene una coloración específica en los núcleos de las células infectadas, observable en un microscopio óptico.

El número límite de copias de DNA viral capaz de ser detectado por este ensayo, varía de acuerdo a la marcación de la sonda; en general se requiere un mínimo de alrededor de 10-100 copias por célula.

Es el único ensayo que hace posible observar en forma conjunta la arquitectura del tejido y la morfología celular, correlacionando el

diagnóstico citohistológico con la presencia y distribución del DNA viral. También es de gran utilidad en diagnósticos retrospectivos en materiales de archivo.

11.2.3 Captura de híbridos

Éste es un ensayo comercial que se basa en una hibridación en fase líquida. El material clínico es tratado con una solución alcalina desnaturalizante e hibridado en condiciones de alta exigencia con dos mezclas de ribosondas (sondas a RNA) correspondientes a los HPVs de bajo riesgo (tipos 6, 11, 42, 43 y 44) y de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). La presencia de cualquiera de estos virus permite la formación de un híbrido DNA-RNA que es reconocido por un anticuerpo monoclonal específico conjugado con fosfatasa alcalina. El revelado se realiza por la acción de un sustrato quimioluminiscente y la luz emitida se mide en un luminómetro. Esta lectura final indica si la muestra resultó o no positiva para algún o algunos de los tipos virales presentes en alguna de las dos mezclas o en ambas (coinfecciones). No tipifica, sólo indica si el virus que se detecta en la muestra es de *alto* o *bajo* riesgo oncogénico. Si bien no permite medir la carga viral, posibilita una semicuantificación del DNA viral.

11.3 SEROLOGÍA

Se ha desarrollado una gran variedad de pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra HPV. Para la obtención del antígeno viral se han aplicado diversas estrategias de ingeniería genética que incluyen sistemas de proteínas de fusión expresadas en bac-

terias, péptidos sintéticos y partículas similares a virus (VLPs), para ensayos de *Western blot* y ELISA. Las pruebas serológicas son aplicadas en investigaciones sobre la inmunología del HPV, la historia natural y desarrollo de vacunas; sin embargo, ninguno de los ensayos actuales ha demostrado todavía ser útil en la práctica clínica.

12. PREVENCIÓN Y CONTROL

Las vacunas a subunidades desarrolladas emplean el sistema de partículas semejantes a virus (del inglés, *Virus Like Particles*, VLPs). Esta estrategia de ingeniería genética se basa en el clonado del gen que codifica la proteína mayoritaria de la cápside viral (L1) en un vector de expresión, que cultivado en un sistema adecuado produce dicha proteína; cuando su concentración en el medio de cultivo es suficientemente alta, las moléculas de proteína se auto-ensamblan generando cápsides virales vacías (VLP), cuya morfología es casi idéntica a la del virus nativo, pero sin genoma. Las VLPs muestran la conformación "natural" de los epítopes estructurales del virus requerida para la inducción de anticuerpos neutralizantes.

Dos vacunas fueron licenciadas en más de 120 países, incluyendo la Argentina. Ambas están compuestas por VLP de L1 y requieren ser administradas por vía intramuscular, en 3 dosis. Una es bivalente (*Cervarix*; GlaxoSmithKline), dirigida contra HPV 16 y HPV 18 y licenciada por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) en marzo 2008; la otra es tetravalente (*Gardasil*; Merck Sharp & Dohme), dirigida contra HPV 6, 11, 16 y 18, y licenciada por ANMAT en octubre 2006. Inducen protección contra la infección por los HPV tipos 16 y 18, responsables de alrededor de 75% de los casos de cáncer de cérvix a nivel mundial. Además, la vacuna cuadrivalente también está dirigida contra los HPV tipos 6 y 11 que causan lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL) y la mayoría de las verrugas genitales (condilomas). Generan casi 100% de seroconversión mediante la inducción de títulos de anticuerpos (Ac) neutralizantes IgG anti-L1, tipo-específicos, que superan ampliamente los de la infección natural. Se considera que el principal mecanismo de acción sería la transudación de los Ac séricos a las secreciones vaginales; allí neutralizarían al virus e impedirían la infección. Asimismo, hay una fuerte respuesta de células B de memoria, característica propia de las vacunas que tienen respuesta inmune durable. No son vacunas terapéuticas ya que no tiene acción sobre infecciones preexistentes.

Desde hace varios años están en marcha para ambas vacunas diversos ensayos clínicos placebo-controlados, aleatorios, doble ciego que incluyen más de 50.000 mujeres de los diferentes continentes. Las dos vacunas han demostrado ser altamente eficaces (95-100%) para prevenir HSIL causado por HPV16/18, con un seguimiento promedio de 5 años. En el caso de la vacuna tetravalente, ha mostrado además eficacia para prevenir la enfermedad intraepitelial de vagina y vulva y verrugas genitales externas. Se ha informado una protección adicional para la infección y enfermedad causada por tipos de HPV no vacunales, relacionados filogenéticamente con aquellos incluidos en la fórmula vacunal (HPV 31, 33, 35 y 45, entre otros); de confirmarse, las vacunas podrían prevenir al menos el 85% de los casos de cáncer de cérvix.

Dadas la característica profiláctica de estas vacunas, su máximo beneficio se obtendrá inmunizando individuos que no tuvieron contacto previo con el virus. Desde el punto de vista de la salud pública, el grupo blanco preferencial para la inmunización son las niñas entre 9 y 13 años, previo al inicio de la actividad sexual; sin

embargo, las mujeres adultas también podrían beneficiarse por la vacunación.

En 2009, la OMS publicó un documento donde alentaba la introducción de las vacunas contra HPV en los programas nacionales de inmunizaciones, como parte de una estrategia para prevenir el cáncer cervical y otras enfermedades asociadas a la infección por HPV. Asimismo, inició la organización de una Red Global de Laboratorios de HPV (WHO HPV LabNet) para armonizar los laboratorios de virología a nivel mundial a fin de establecer una efectiva vigilancia virológica y monitoreo del impacto de la vacunación contra HPV. Esta Red comprende hasta la fecha, dos laboratorios de referencia mundiales y ocho regionales; el Servicio Virus Oncogénicos del INEI-ANLIS "Dr. Malbrán" fue designado como Laboratorio Regional de Referencia para las Américas.

La 1ra generación de vacunas contra HPV ha demostrado ser segura, inmunogénica y eficaz, y constituirá la única opción de prevención primaria para la próxima década. Constituyen una herramienta de prevención sumamente valiosa; sin embargo, dado que no previenen la infección por todos los tipos de HPV asociados a cáncer, la vacunación deberá complementarse con un programa de tamizaje poblacional (con pruebas virológicas) para la detección temprana de lesiones preneoplásicas del cérvix en estadios curables. Se espera que la 2da generación de vacunas contra HPV sea polivalente, tanto a VLP (incluyendo L2) como a capsómeros, pero tienen aún un largo camino por recorrer.

13. CONCLUSIONES

La década actual marca un verdadero desafío en el control de las infecciones por HPV, fundamentalmente en dos áreas:

- 1) En la **prevención primaria** de la infección y sus enfermedades asociadas, con base en tres puntos críticos: a) una intensa campaña de educación e información dirigida a los adolescentes, adultos y efectores de salud insistiendo en la relación causal entre la adquisición del HPV y el desarrollo del cáncer de cérvix; b) la implementación de programas de tamizaje más efectivos, evaluando la posibilidad de la aplicación de la detección viral y desarrollar nuevas estrategias con mayor valor predictivo para la evaluación de la evolución de las lesiones inducidas por HPV; c) la introducción de vacunas profilácticas.
- 2) En cuanto a la **prevención secundaria**, los esfuerzos deberían enfocarse en el desarrollo de agentes antivirales específicos y vacunas terapéuticas para mejorar el tratamiento de las lesiones inducidas por HPV.

NOTA

En el año 2011, el Ministerio de Salud de Argentina incorporó la vacunación contra los papilomavirus al calendario oficial. A partir de esa fecha es de aplicación gratuita y obligatoria para niñas de 11 años.

Recientemente se han desarrollado PCRs cualitativas de origen comercial, cuyo valor clínico está aún en estudio.

Asimismo, existe un ensayo para detección en muestras clínicas, mediante NASBA, del RNAm de los genes E6 y E7, cuyo valor es pronóstico.

Este capítulo se finalizó en el año 2011.

Bibliografía

- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, *et al.* & International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. "Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective". *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. "The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer". *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65.
- Cuschieri KS, Cubie HA. "The role of human papillomavirus testing in cervical screening". *J Clin Virol* 2005; 1: S34-42.
- FUTURE I/II Study Group, Dillner J, Kjaer SK, Wheeler CM, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, *et al.* "Four year efficacy of prophylactic human papillomavirus quadrivalent vaccine against low grade cervical, vulvar, and vaginal intraepithelial neoplasia and anogenital warts: randomised controlled trial". *BMJ* 2010; 3 41:3493.
- Garland SM, Smith JS. "Human papillomavirus vaccines: current status and future prospects". *Drugs* 2010; 70:1079-98.
- IARC Working Group. "Human Papillomaviruses. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans". International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization (WHO), Lyon, 1995; vol 64.
- Knipe DM, Howley P. Papillomaviruses. In Fields Virology, 5th edition. BN Fields, DM Knipe, PM Howley (eds.). New York, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2007; p. 2300-54.
- Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. "Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections". *J Clin Virol* 2005; 1:S43-51.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, *et al.* "Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis". *J Virol* 2004; 78:11451-60.
- Muñoz N, Bosch FX, Castellsague X, Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, *et al.* "Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective". *Int J Cancer* 2004; 111:278-85.
- Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, *et al.* "Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women". *Lancet* 2009; 374:301-14.
- Stanley M. "Potential mechanisms for HPV vaccine-induced long-term protection". *Gynecol Oncol* 2010;118 (1 Suppl):S2-7.
- Sterling JC. "Human papillomaviruses and skin cancer". *J Clin Virol* 2005; 1:S67-71.
- Syrjanen S. "Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer". *J Clin Virol* 2005; 1:S59-66.
- Zur Hausen H. "Papillomavirus infection- a major cause of human cancers". *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288, F55-F78.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, *et al.* "Human papilloma virus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide". *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
- WHO HPV position paper. <http://www.who.int/wer/2009/wer8415.pdf>
- Zur Hausen H. "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application". *Nat Rev Cancer* 2002; 2:342-50.
- Zur Hausen H. "Papillomaviruses in the causation of human cancers, a brief historical account". *Virology* 2009;384: 260-5.

Poliovirus: Virus BK y JC

Marcela Echavarría - Guadalupe Carballal

1. INTRODUCCIÓN

En la familia *Papoviridae* se incluían anteriormente dos subfamilias: los poliovirus y los papilomavirus. El nombre *papova* proviene de *papiloma/polyoma/simian vacuolating virus* (SV 40), que eran los tres miembros característicos de esa familia. Recientemente, el Comité Internacional de Taxonomía viral ha considerado a esas subfamilias como familias separadas.

La familia *Polyomaviridae* incluye a los virus humanos BK y JC, al virus simiano SV40 y a otros virus que infectan a otros animales (monos, ganado bovino, roedores, conejos). El SV40 fue descrito en la década de 1960; en la siguiente, se identificaron dos poliovirus que producen enfermedad en humanos: el virus BK, aislado de orina de un paciente con trasplante renal y el virus JC, aislado del cerebro de un paciente con leucoencefalopatía. Los nombres de estos virus provienen de las iniciales de los pacientes. En el año 2007, se descubrieron dos nuevos poliovirus humanos, el virus KI y el virus WU, mediante estudios moleculares en muestras respiratorias y materia fecal. No existe aún clara evidencia de la asociación de estos virus con enfermedad respiratoria. (Véase el Capítulo 58 "Virus respiratorios emergentes y el nuevo impacto de los rinovirus por medio del diagnóstico molecular").

Los miembros de la familia *Polyomaviridae* se muestran en la Tabla 30.1.

Los poliovirus mejor estudiados a nivel experimental son los poliovirus del ratón y el virus SV40. El nombre de la familia deriva de *poly* = muchos y *omas* = tumores.

Este virus puede estar presente en el riñón de primates y fue reconocido por primera vez como contaminante de un cultivo primario de riñón de mono que fuera usado para producción de un lote de vacuna inactivada para poliomieltis.

La contaminación con SV40 de ese cultivo y el hecho de que este virus no fuera inactivado con el formol –empleado para inactivar el

poliovirus (proceso fallido en el así denominado accidente de Cutter)– produjo un lamentable desenlace que causó la muerte de los seres humanos vacunados con ese lote. De allí se destaca la necesidad de realizar controles rigurosos de los sustratos empleados en la producción de vacunas virales (véase el Capítulo 48 *Vacunas virales*).

1.1 ESTRUCTURA

Los poliovirus son virus desnudos y presentan una cápside icosaédrica de 40 nm formada por las proteínas VP1, VP2 y VP3. El icosaedro está formado por 72 pentámeros. Cada uno contiene 5 moléculas de VP1 y una molécula de VP2 o VP3. Presenta una sola copia de DNA circular unido en forma covalente. Los poliovirus humanos pueden aglutinar eritrocitos y pueden distinguirse por reacciones de neutralización o inhibición de la hemaglutinación.

1.2 GENOMA

El DNA es de doble cadena circular; posee 5 100 bp. Cada hebra posee la mitad de la información genética. Los RNA tempranos y tardíos son sintetizados en forma bidireccional desde los lados opuestos del genoma.

Los marcos de lectura de las regiones codificantes tienen información para proteínas tempranas (antígeno T menor y antígeno T mayor, T'135, T'136 y T'165) y proteínas tardías (como la agnoproteína, VP1, VP2 y VP3). Las regiones no codificantes codifican para elementos regulatorios.

1.3 REPLICACIÓN

Luego de la infección comienza la expresión de proteínas tempranas como Ag T (antígeno T mayor). Ésta inicia la replicación de

Miembros	Nombre	Hospedador	Transmisión	Enfermedad
Poliovirus humanos	Virus BK	Humanos	Transmisión respiratoria y por órganos trasplantados	Inmunocompetentes: infección común en infancia; persistencia Inmunocomprometidos: cistitis hemorrágica, nefropatía, estenosis uretral, neumonitis intersticial, meningoencefalitis subaguda
Poliovirus humanos	Virus JC	Humanos	¿Respiratoria y gastrointestinal?	Inmunocompetentes: no se observa Inmunocomprometidos: LMP
Poliovirus humanos	Ki Wu	Humanos	¿Respiratoria?	En estudio su asociación con enfermedad respiratoria
Poliovirus murinos	MPyV	Ratón	Reactivación de infección persistente: eliminación de virus por orina, secreciones respiratorias y genitales	Tumores en ratones recién nacidos; persistencia en riñón
Poliovirus simiano	SV40	Monos		Similar a LMP en monos
Poliovirus bovinos	BP yV	Ganado, bovinos		Persistencia en riñón

Tabla 30.1. Familia *Polyomaviridae*. LMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva. (Adaptado de *Viruses and human disease*. Capítulo 6, Strauss JH, H. Strauss. Academic Press. Elsevier, 2002; 259-265.

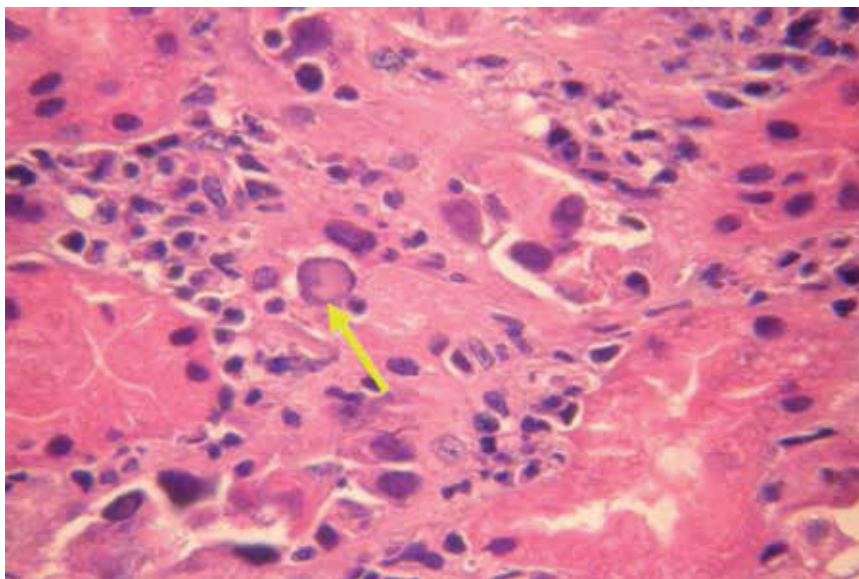


Figura 30.1. Biopsia renal, H & E. Nefritis intersticial por poliomavirus. Infiltrado intersticial a predominio de linfocitos. Notar la inclusión intranuclear grande anfófila con anillo de cromatina denso periférico en el núcleo de la célula tubular. Cortesía del Dr. Iotti, Servicio de Anatomía Patológica, CEMIC.

DNA viral que es seguida de la expresión del RNAm. Luego de la traducción de proteínas regulatorias tardías (agnoproteína) y de proteínas de la cápside, se produce el ensamblaje viral.

El tropismo de los poliomavirus humanos está constituido, principalmente, por células diferenciadas en reposo.

Estos virus inducen la producción de enzimas necesarias para la replicación viral en las células en reposo. Las actividades de estimulación del ciclo celular están inducidas por el Ag T.

El virus JC tiene un ciclo muy prolongado de hasta 20 días. Este virus solamente puede propagarse *in vitro* en cultivos primarios de células gliales fetales humanas.

La posible oncogenicidad de los poliomavirus en el ser humano permanece todavía incierta, a pesar del potencial oncogénico del Ag T.

2. VIRUS BK

2.1 CUADROS CLÍNICOS

Este virus produce enfermedad sólo en humanos y no se conoce reservorio animal alguno.

Aunque las vías de transmisión no han sido completamente elucidadas, se postula que la principal vía es la orofaríngea. En la actualidad se han descrito 4 serotipos de BK.

La infección primaria ocurre durante la niñez y puede cursar en forma asintomática o con síntomas respiratorios leves y fiebre. Este virus puede permanecer latente en el tracto urogenital, especialmente riñón, por largos períodos.

La infección por el virus BK tiene una distribución mundial pero las manifestaciones clínicas son muy infrecuentes en los pacientes inmunocompetentes. Por el contrario, durante estadios de inmunosupresión, el virus puede reactivarse y causar enfermedades tales como nefropatía, estenosis ureteral, cistitis hemorrágica y nefritis túbulo-intersticial. También puede producir, con menor frecuencia, neumonitis intersticial o meningoencefalitis aguda.

La cistitis hemorrágica tardía es frecuente en pacientes trasplantados de médula ósea. La estenosis ureteral y la nefritis intersticial se pueden observar en pacientes trasplantados de riñón y en aquellos infectados por HIV. Aproximadamente el 50% de los pacientes trasplantados de médula ósea presentan viruria por virus BK pero no todos ellos desarrollan cistitis hemorrágica.

Nefropatía

La nefropatía por virus BK, descrita por primera vez en 1995, es causa de disfunción del injerto renal en los pacientes trasplantados pudiendo llevar a la pérdida del mismo. La prevalencia de nefropatía asociada a virus BK es del 1-10% y la mayoría de los casos ocurre dentro del primer año pos-trasplante. Sin embargo, se han reportado infecciones hasta 3 años pos-trasplante. La nefropatía por virus BK puede llevar a la pérdida de injerto en un 10-80% de los casos. Estas cifras son menores en los centros donde se realiza una vigilancia periódica de la infección por virus BK y se instituye un tratamiento precoz.

Las manifestaciones clínicas de nefropatía por virus BK son similares a las del rechazo agudo o a toxicidad por drogas. Por ello, es fundamental realizar un diagnóstico de certeza de infección/enfermedad por este virus.

Los factores de riesgo asociados a nefropatía por virus BK incluyen el uso de determinadas drogas inmunosupresoras como tacrolimus y micofenolato mofetil, el estado serológico negativo para virus BK del receptor y *mismatch* de HLA.

El sexo masculino, edad adulta y enfermedades de base como diabetes *mellitus*, también se han asociado con mayor riesgo de desarrollar nefropatía por virus BK.

2.2 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de virus BK puede realizarse por cultivo, histología, citología o por técnicas moleculares.

Los niveles de anticuerpos no se correlacionan con el desarrollo de enfermedad; el aislamiento en cultivo no es práctico dado que este virus es de propagación dificultosa, lenta y sólo desarrolla en determinadas líneas celulares; la histología permite la observación de inclusiones celulares muy características en los tejidos; la citología puede aplicarse a muestras de orina e incluye la observación de células *decoy*. Las *decoy* son las células de los túbulos renales y uroepiteliales infectadas por el virus BK que se eliminan por la orina y se caracterizan por presentar una inclusión viral intranuclear. Estas células pueden observarse con un microscopio de contraste de fase o con tinciones como Papanicolaou.

El diagnóstico de nefropatía por virus BK se puede realizar por inmunohistoquímica en muestras de biopsia renal (Figura 30.1). Sin embargo, dada la naturaleza focal de esta enfermedad no presenta una distribución homogénea. Por ello, la sensibilidad de las biopsias

no alcanza un 100%, y es necesaria una correlación con la detección de viremia y viremia para realizar el diagnóstico de certeza.

La presencia de células *decoy* en orina puede utilizarse como prueba de tamizaje (*screening*) de la infección por virus BK dada su elevada sensibilidad (100%) para identificar replicación viral. Sin embargo, el valor predictivo positivo de nefropatía es menor al 20%.

Las técnicas moleculares (PCR) permiten la detección del DNA de virus BK y constituyen el procedimiento diagnóstico actualmente más utilizado. Puede emplearse con muestras de orina y sangre. Un resultado positivo por PCR en sangre tiene mayor valor predictivo positivo de enfermedad que en orina.

Además, el virus BK puede cuantificarse utilizando ensayos de *Real Time* PCR (carga viral). La determinación de la carga viral de virus BK en plasma se utiliza para el monitoreo de los pacientes con nefropatía. Dado que el diagnóstico temprano de nefropatía por virus BK ha sido asociado con un mejor pronóstico, se están postulando algoritmos para identificar a estos pacientes en forma rápida y eficaz.

Algunos centros de EE.UU. realizan el tamizaje o *screening* de los pacientes por citología (células *decoy*) o por PCR en orina. Los pacientes que presentan resultados negativos son monitoreados nuevamente al mes. En aquellos con un resultado positivo para BK en orina, se realiza una PCR cuantitativa (*Real Time* PCR) en sangre. Actualmente, se están estudiando los valores de corte en sangre que sean clínicamente relevantes para el diagnóstico de esta enfermedad y se ha observado una alta asociación de nefropatía en aquellos pacientes con una carga viral mayor a 10 000 copias de DNA de virus BK/mL de plasma.

No existe tratamiento específico para este virus. El manejo clínico de estos pacientes consiste en la disminución de la inmunosupresión, el cambio a drogas inmunosupresoras menos potentes, el uso de inmunoglobulinas y el cidofovir o leflunamida (véase el Capítulo 45 *Infecciones virales en pacientes con inmunosupresión postrasplante*).

3. VIRUS JC

3.1 CUADROS CLÍNICOS

La infección por virus JC está distribuida mundialmente. Sin embargo, la vía de transmisión no ha sido definida con claridad,

aunque el tracto respiratorio es la más probable. El contacto con orina de pacientes infectados podría ser otra ruta de transmisión.

Luego de la infección ocurre una viremia y posteriormente persistencia. El virus JC puede estar presente en la orina de individuos sanos.

Al contrario de BK, el virus JC no se ha asociado con enfermedad en el tracto urogenital ni en el pulmón. La enfermedad asociada al virus JC es un desorden del SNC denominado leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) que puede observarse en pacientes inmunosuprimidos, especialmente en pacientes con HIV/ SIDA (véanse los capítulos 45, 46 y 47).

La LMP es un desorden desmielinizante que ocurre como manifestación tardía de alguna enfermedad que produce una inmunodeficiencia grave. La destrucción del tejido nervioso es debida a la infección citolítica del virus JC en los oligodendrocitos.

El DNA del virus JC no presenta suficiente variación como para generar distintos serotipos. Por ello, sólo se definen diferentes genotipos.

3.2 DIAGNÓSTICO

Este virus es de muy difícil propagación por lo que no se utilizan técnicas de cultivo. El diagnóstico de certeza se realiza por procedimientos moleculares como PCR.

Para el diagnóstico de LMP se utilizan la evaluación neurológica y estudios por imágenes, siendo el diagnóstico definitivo la biopsia cerebral.

La concentración del virus JC es alta en el tejido cerebral pero mucho menor en el LCR. Por ello, se recomienda la obtención de muestras sucesivas de LCR ya que la PCR en LCR puede dar resultados divergentes en comparación con los de la biopsia.

El virus JC también puede estar presente en la orina de pacientes inmunosuprimidos como por ejemplo en trasplantados de médula ósea. Sin embargo, su presencia en esta muestra no se ha relacionado aún a enfermedad.

No existe aún tratamiento específico para LMP (véanse los capítulos 45 y 47).

Bibliografía

- Dörries, K. "Human Polyomaviruses". En: *Principles and Practice of Clinical Virology*, 5th Ed. Editorial Wiley, Inglaterra, 2004.
- Echavarría M., Basilotta N, Aguiar A, Davalos M, Ricarte C, Iotti A *et al.* "Nefropatía por virus BK post-trasplante renal: Diagnóstico y seguimiento por PCR en tiempo real". *Medicina* 2007; 67:719-22.
- Hirsch, H. "Polyomavirus BK nephropathy: A (re)-emerging complication in renal transplantation". *Am J Transplant* 2002;2:25-30.
- Limaye A, Jerome KR, Kuhr CS Ferrenberg J, Huang ML, Davis CL, *et al.* "Quantitation of BK virus load in serum for the diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients". *J Infect Dis* 2001;183:1669-72.
- Nickeleit V, Hirsch H, Binet IF, Gudat F, Prince O, Dalquen P, *et al.* "Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease". *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1080-89.
- Strauss JH, H Strauss. *Viruses and human disease*. Chapter 6. Academic Press, Elsevier, 2002;259-65.
- Norja P, Ubillos I, Templeton K, Simmonds P. "No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease". *J Clin Virol* 2007;40:307-11.
- Allander T, Andreasson K, *et al.* "Identification of a third human polyomavirus". *J Virol* 2007; 81:4130-6.

Encefalopatías espongiformes transmisibles

María I. Berría

1. INTRODUCCIÓN

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) son enfermedades neurodegenerativas invariablemente fatales que afectan a animales y humanos. Su comprobada transmisibilidad experimental es una característica que las diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, y la que justifica su inclusión en el ámbito de la Microbiología y, por tradición, de la Virología, ya que llegó a suponerse que su agente causal era un virus lento. Entre esas encefalopatías, definidas por un prolongado periodo de incubación (años a décadas) y curso clínico breve y progresivo a la muerte, se encontraba el scrapie, una enfermedad ovina cuyo agente exhibía una sorprendente resistencia a las radiaciones ionizantes. Ya en 1967 se había avanzado la hipótesis de que estuviera desprovisto de ácidos nucleicos, consistiendo exclusivamente en una proteína. Finalmente, en 1982, Prusiner acuñó el término prion para definir a "pequeñas partículas proteináceas infecciosas que resisten a la inactivación por la mayoría de los procedimientos que modifican los ácidos nucleicos". El componente proteico de esas partículas fue denominado proteína prion (PrP), de la que se conocen dos isoformas, una normal (PrP^C) y otra patológica (PrP^{Sc}).

Las enfermedades por priones, tanto animales como humanas (Tabla 31.1), fueron por décadas diagnosticadas con base en una característica tríada neuropatológica: vacuolización espongiforme en la sustancia gris cerebral, pérdida de neuronas y reacción glial. En algunas EETs (kuru, síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker, variante de Creutzfeldt-Jakob), se observan depósitos aberrantes de proteínas evidenciados por placas de amiloide compuestas por agregados fibrilares de PrP^{Sc}, aún cuando en todas las EETs la mayor parte de PrP^{Sc} se encuentra acumulada bajo forma no amiloidea.

2. EETs EN ANIMALES

2.1. OVINA (SCRAPIE)

También observada en caprinos, es una enfermedad neurológica endémica en muchas partes del mundo, incluyendo Europa y América del Norte. Fue experimentalmente transmitida por inoculación de tejidos neurales (encéfalo y médula), en principio de oveja a oveja y luego a otras especies animales (ratones, hámsters, etc.). La PrP^{Sc} también se detecta en tejidos linfáticos, amígdalas y bazo.

Otras dos enfermedades, similares al scrapie, se han comprobado en visones en cautividad, probablemente como consecuencia de la ingestión de tejidos ovinos infectados, y también en cérvidos en el oeste de Estados Unidos, donde es endémica y resultaría de la exposición a otros animales infectados.

2.2. BOVINA

En 1987 se identificó como prion al agente causal de una enfermedad que desde el año anterior se había reconocido como epidémica en el ganado bovino del Reino Unido de Gran Bretaña. Pronto se comprobó que su aparición había sido consecuencia de la utilización, desde años previos, de un suplemento alimenticio constituido por pasta de carne y huesos, ocasionalmente contaminado por cerebro y médula espinal de animales infectados. La epidemia, que alcanzó su pico en 1993, inició su descenso en 1999, ya con posterioridad a la completa exclusión de ese tipo de alimento. Con anterioridad a la adopción de esa medida, el ingreso de tejidos infectados a la cadena alimentaria había difundido la enfermedad a animales en cautividad en el zoológico de Londres (ungulados y primates) y a gatos domésticos. Se debate todavía si la enfermedad se originó como propia de los bovinos o como secundaria a la ingestión por bovinos de tejidos ovi-

Enfermedad	Hospedador	Descripción	Etiología
Scrapie	Ovinos	1732	Infecciosa
Enfermedad Creutzfeldt-Jakob esporádico	Humanos	1920	Espontánea
Enfermedad Creutzfeldt-Jakob familiar	Humanos	1924	Hereditaria
Síndrome Gerstmann-Straüssler-Scheinker	Humanos	1928	Hereditaria
Encefalopatía espongiforme	Visones	1965	Infecciosa
Kuru	Humanos	1957	Infecciosa
Encefalopatía espongiforme	Ciervos	1980	Infecciosa
Insomnio fatal familiar	Humanos	1986	Hereditaria
Encefalopatía espongiforme	Bovinos	1987	Infecciosa
Encefalopatía espongiforme	Animales zoo	1988	Infecciosa
Encefalopatía espongiforme	Felinos	1990	Infecciosa
Variante enfermedad Creutzfeldt-Jakob	Humanos	1996	Infecciosa
Insomnio fatal esporádico	Humanos	1999	Espontánea

Tabla 31.1. Espectro de las enfermedades por priones.

nos con scrapie. La EET bovina también ha sido detectada en casos autóctonos de varios países europeos y en Japón, Israel y Canadá, lo que sugiere la existencia de múltiples cepas esporádicas.

3. EETs EN HUMANOS

Según su etiología, se dividen en hereditarias (15%), esporádicas (80%) y adquiridas (5%). Las formas hereditarias resultan de la herencia de mutaciones en el gen prion (*prnp*), localizado sobre el cromosoma 20p, en tanto que las esporádicas son aquellas de ocurrencia espontánea por causa desconocida. A su vez, las adquiridas son consecutivas a la transmisión de la infección de humano a humano o de bovino a humano.

3.1. ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT-JAKOB

La forma esporádica (85% de todos los casos) presenta una incidencia anual y mundial de aproximadamente 1 por millón y se inicia a los 65-69 años con trastornos de la memoria que progresan a demencia, mutismo akinético y muerte, mientras la forma familiar presenta similares signos clínicos y patológicos, aunque de aparición más temprana.

3.2. SÍNDROME DE GERSTMANN-STRAÜSSLER-SCHENKER

La más común de las enfermedades familiares por priones, generalmente se evidencia en la 3^a-4^a década de la vida como ataxia cerebrosa crónica con signos piramidales. La demencia es de aparición más tardía que en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hacia los 5 años de establecido el diagnóstico.

3.3. INSOMNIO FAMILIAR FATAL

Es un insomnio progresivo intratable que se acompaña de disfunción autonómica y se observa en individuos con mutaciones a nivel del codón 178 en el gen *prnp*. Aunque raros, se han descrito casos definidos como formas esporádicas, por su ocurrencia en ausencia de mutaciones.

3.4. ADQUIRIDAS

3.4.1. Kuru

Fue una enfermedad geográficamente restringida al área Okapa en las tierras altas de Papúa Nueva Guinea. Desde 1957 se documentaron 2 700 casos sobre una población total de 36 000 personas. La comprobación de su transmisión experimental a primates en 1976, llevada a cabo por Gajdusek, inició una fascinante apertura en el estudio de las encefalopatías espongiiformes, ya que fueron reconocidas como transmisibles. Estimado el período de incubación del kuru en alrededor de 12 años, pudo establecerse que con posterioridad al cese de un endocanibalismo que había sido práctica ritual, dejó de observarse la enfermedad. De forma retrospectiva, se ha comprobado que los preferentemente afectados por el kuru habían sido homocigóticos para metionina en posición 129.

3.4.2. Creutzfeldt-Jakob iatrogénico

Todos los mecanismos de transmisión iatrogénica identificados (trasplante de córnea y aplicación profunda de electrodos, instrumental neuroquirúrgico, injertos de duramadre, administración intramuscular de hormonas hipofisarias) han resultado de contaminación cruzada con tejidos cerebrales o adyacentes a cerebro, y por tanto con elevados niveles de infectividad.

3.4.3. Variante de Creutzfeldt-Jakob

Consecutivamente a la emergencia de la encefalopatía bovina, en el Reino Unido se estableció un registro de Creutzfeldt-Jakob con el fin de detectar un eventual incremento de su incidencia, si bien la posibilidad de transmisión de un prion bovino al humano se consideraba remota. Sin embargo, a marzo de 1996 ya se había comprobado la

existencia de 10 casos compatibles con un Creutzfeldt-Jakob aparecido a edad notablemente temprana y con promedio de muerte a los 29 años. Se trataba de una enfermedad humana nueva, con isotipo de PrP similar al bovino y distribución de signos histopatológicos diferente a la propia del Creutzfeldt-Jakob esporádico. Si bien la PrP^{Sc} se detectaba en tejidos neurales, como ocurre en todas las EETs, también estaba presente en tejidos linfo-reticulares. En general, se acepta que la transmisión del bovino al humano se vio facilitada por la introducción de tejidos contaminados a alto título infectivo en la cadena alimentaria humana, particularmente bajo la forma de embutidos o relleno de pastas. A diciembre del 2005 se habían identificado un total de 183 casos, entre confirmados y probables. Esta cifra fue considerablemente menor a la temida en principio, y esa limitación ha sido resultado de la implementación en el Reino Unido de medidas prohibiendo la incorporación de determinados tejidos bovinos (cerebro, médula espinal, bazo, timo, amígdalas e intestino) a la alimentación humana. Los factores de riesgo para la enfermedad incluyen juventud, genotipo homocigota para metionina en el codón 129 del gen *prnp*, y previa residencia en el Reino Unido, aunque éste no es un antecedente forzoso, ya que no existía en los casos aislados que se detectaron en Francia e Italia.

4. ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA DE LA PRP

El carácter común a todas las enfermedades por priones está dado por el metabolismo aberrante de la PrP, que existe bajo por lo menos dos estadios conformacionales con diferentes propiedades físico-químicas. La forma normal (PrP^C) se evidencia como una sialoglicoproteína de 33-35 kDa codificada por el gen *prnp* y que se encuentra, vía un anclaje mediado por glicofosfatidil inositol, en la membrana de variados tipos celulares, aunque característicamente predominante en neuronas. La PrP^C se define por un elevado contenido de estructuras helicoidales alfa y escasa presencia de láminas beta, sensibilidad al tratamiento con proteasas, y solubilidad en detergentes. Por el contrario, la isoforma asociada a enfermedad (PrP^{Sc}) sólo se encuentra en cerebros infectados, es parcialmente resistente al tratamiento con proteasas dejando un fragmento carboxi-terminal de 27-30 kDa, y es relativamente insoluble en detergentes, persistiendo bajo la forma de agregados. Es ese core de 27-30 kDa, resistente al tratamiento con proteasas, el factor que se asocia a infectividad. Como los perfiles de migración electroforética de la isoforma patológica difieren en función de las diferentes cepas de priones, esa variación sugiere la existencia de diferentes conformaciones. Por otra parte, las cepas también muestran variaciones en la relación de sus respectivos porcentajes de glicosilación, los que se evalúan en función de las diferentes movilidades electroforéticas exhibidas por las 3 glicoformas (diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada) presentes en la PrP^{Sc}. Es probable entonces que las diferencias entre priones resulten de una combinación de efectos, en que la conformación PrP sería el determinante primario del tipo de cepa, mientras los perfiles de glicosilación serían determinantes secundarios de distintos fenotipos neuropatológicos, los que a su vez explicarían las diferencias de períodos de incubación o distribución de lesiones que llegan a observarse en el curso de la infección. En las enfermedades humanas, las isoformas patológicas anormalmente plegadas se darían de modo espontáneo (15% de los casos), o en pacientes portando una mutación que facilite el plegamiento anormal (80%), o bien provendrían de una fuente infecciosa exógena (5%). Una vez emergida una isoforma anormal sería capaz de inducir cambios conformacionales en las moléculas PrP^C contiguas, mediante una conversión post-traduccion que implicaría un proceso termodinámico por interacciones intermoleculares posibilitando una reacción en cadena mediante la cual se propagaría la enfermedad. El hallazgo del carácter homocigota para metionina en posición 129 en todos los casos de la variante de Creutzfeldt-Jakob y su predominio en los Creutzfeldt-Jakob iatrogénicos, sugiere que la presencia del carácter heterocigota a ese nivel provee protección ante la infección por priones, probablemente por reducir la capacidad de PrP para alterar su conformación.

5. PATOGENIA DE LA PrP

No se conoce lo suficiente el mecanismo por el cual la PrP^C sufre el cambio conformacional que la transforma en PrP^{Sc}, y por tanto en infectiva. Si bien la PrP^C es esencial para la transmisión y patogénesis de las enfermedades por priones, se ignora cuál sería su función normal. Quizás la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} ocurra en más de una forma, iniciándose por una PrP^{Sc} que desde el espacio extracelular interacciona directamente con una PrP^C que, por ser inducida a un cambio de conformación, genera en consecuencia una PrP^{Sc} adicional e intracelular, la que a su vez podría interactuar generando una conversión desde el interior de la célula infectada.

Con mayor precisión, ya ha podido establecerse que en las infecciones adquiridas a través del ingreso de un prion exógeno, se trata de un proceso dinámico en el que pueden distinguirse tres sucesivas etapas: a) infección y replicación periférica, involucrando transferencia de PrP^{Sc} al tracto digestivo y de ahí al sistema linfocítico, siendo los linfocitos B los principales responsables del transporte del prion; b) neuroinvasión, según dos potenciales rutas, una implicando al bazo y otra a los ganglios linfáticos viscerales; y c) neurodegeneración, cuyo factor determinante sería la conversión endógena de la PrP^C en PrP^{Sc}, ya que la ocurrencia de enfermedad requiere tanto de la presencia de PrP^{Sc} como de la síntesis de PrP^C.

6. DIAGNÓSTICO

Se realiza con base en la detección inmunológica de PrP en tejidos cerebrales y, en el caso de la variante de Creutzfeldt-Jakob, también en tejidos linfoides. Como la mayoría de los anticuerpos disponibles no distinguen entre PrP^C y PrP^{Sc}, se debe optimizar la tinción de PrP^{Sc} mediante la eliminación de PrP^C. Así, en el caso del *Western blot*, se recurre a la proteinasa K, mientras que para la marcación en tejidos, los cortes histológicos son pretratados mediante exposición a ácido fórmico, autoclave o microondas, y/o tiocianato de guanidina, sea en forma combinada o secuencial. La demostración de infectividad mediante inoculación a ratones es un procedimiento de alta sensibilidad, aunque por el tiempo y el costo que insume se reserva para investigaciones orientadas a la caracterización de cepas. Para precisar el carácter hereditario o la predisposición a contraer una enfermedad por prion, se recurre a la secuenciación de DNA para la identificación de mutaciones o inserciones en el gen *prnp*.

La renovada búsqueda de marcadores subrogantes responde al interés por identificar transcritos y proteínas diferencialmente expresados en los tejidos de animales infectados por priones, pero ausentes en los respectivos controles. A ese respecto, se ha comprobado que un gen extraneural, el factor relacionado con la diferenciación eritrocitaria (EDRF), reduce de forma progresiva sus niveles en bazo y sangre de animales experimentalmente infectados. En cuanto a la detección de la proteína 14-3-3 en LCR, su presencia en otras enfermedades neurodegenerativas le resta especificidad como diagnóstico orientador de infección por priones.

7. PREVENCIÓN DE LA TRANSMISIÓN ACCIDENTAL

7.1. ENFERMEDAD ANIMAL

Desde enero del 2001, la pesquisa de la encefalopatía bovina en tejidos cerebrales post-mortem iniciada en 1999 en Suiza en animales sospechosos de infección y en el 5% del ganado rutinariamente sacrificado en mataderos al superar los 30 meses de edad, se ha extendido a todos los países miembros de la Unión Europea. Todo ello tiende a la prevención del ingreso de materiales contaminados a la cadena alimentaria humana.

7.2. ENFERMEDAD HUMANA

No existen evidencias de transmisión normal de persona a persona. En cuanto a las posibilidades de transmisión accidental, se han reducido de modo considerable. Por ejemplo, los procedimientos actuales para producción de hormonas logran la inactivación o remoción de la infectividad en el producto final, mientras la producción comercial de duramadre para reparación quirúrgica hoy implica una reducción sustancial de la infectividad. Si el instrumental neuroquirúrgico ha sido empleado en un comprobado o presunto enfermo, corresponde su incineración. Si ése no fuera el caso, puede volver a usarse luego de un lavado previo para eliminar detritus y sangre, seguido del tratamiento con NaOH 1 M por una hora a temperatura ambiente y autoclave a 132 °C por otra hora.

La posibilidad del desarrollo de infecciones subclínicas en individuos heterocigóticos aparentemente sanos ha llevado a una particular pesquisa en donantes de sangre en el Reino Unido, ya que se ha comprobado la infección experimental por scrapie en ovinos a los que se había administrado sangre de ovejas en el período pre-clínico de la enfermedad. Fue durante el curso del 2004 que se identificaron los primeros casos humanos, uno cuyos síntomas aparecieron a los 3 años y medio de haber recibido una transfusión de glóbulos rojos donados por un individuo que 3-5 años después evidenció la enfermedad, y el segundo que, si bien murió por una enfermedad no neurológica, había mostrado PrP^{Sc} en bazo y ganglio linfático, a los 5 años de haber recibido sangre de un donante que posteriormente desarrolló la variante del Creutzfeldt-Jakob.

8. TRATAMIENTO

Como PrP^{Sc} está asociada a infectividad, la mayoría de los abordajes terapéuticos se había dirigido sobre todo a la prevención de su acumulación, pero esta estrategia sólo ha logrado resultados modestos en modelos animales. Es que el depósito de PrP^{Sc} no sería neurotóxico per se ni por tanto responsable de la degeneración neuronal. Es la conversión endógena de PrP^C a PrP^{Sc} la que implica la agresión a la sustancia gris cerebral, ya que ratones genéticamente desprovistos de PrP^C son resistentes a la inoculación de scrapie y no acumulan PrP^{Sc}, no propagan la infectividad ni desarrollan patología. Es posible que la diseminación neuronal de los priones resulte de la producción de intermediarios tóxicos o de la depleción de algún constituyente clave. En consecuencia, prevenir la formación de esas especies sería un blanco más adecuado para la terapéutica. A ese respecto, recientemente se ha logrado establecer que la inmunización pasiva con anticuerpos anti-proteína prion bloquea la replicación periférica y la progresión de la enfermedad en ratones inoculados con scrapie. Mas aún, mediante la depleción neuronal endógena de PrP^C en ratones ya en etapa de neuroinvasión, se ha logrado revertir los cambios espongiformes tempranos y prevenir la pérdida de neuronas.

Para concluir, corresponde señalar que, a semejanza de la hipótesis del microbio formulada hace más de 150 años, la hipótesis del prion estará definitivamente comprobada sólo cuando una enfermedad prion haya sido generada en su hospedador natural a partir de un prion infeccioso producido *in vitro*. Casi se ha alcanzado ese objetivo mediante la amplificación cíclica de un plegamiento proteico que reproduce la conversión PrP^C → PrPres (resistente a proteasas) resultando en una amplificación indefinida de PrPres, la que comparte similares propiedades bioquímicas y estructurales con la PrPres derivada de cerebros enfermos; esa PrPres producida *in vitro* induce en hamsters una enfermedad idéntica a la provocada por inoculación de tejidos cerebrales infectados. Se está entonces cada vez más cerca de la validación de la excluyente hipótesis del prion.

Bibliografía

- Aguzzi A, Heikenwalder M, Miele G. "Progress and problems in the biology, diagnostics, and therapeutics of prion diseases". *J Clin Invest* 2004; 114: 153-160.
- Caramelli M, Ru U, Acutis P, Forloni G. "Prion diseases: current understanding of epidemiology and pathogenesis, and therapeutic advances". *CNS Drugs* 2006; 20: 15-28.
- Caughey B. "Prion protein conversions: insight into mechanisms, TSE transmission barriers and strains". *Br Med Bull* 2003; 66: 109-20.
- Gambetti P, Parchi P, Chen SG. "Hereditary Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia". *Clin Lab Med* 2003; 23: 43-64.
- Ironside JW, Head MW. "Neuropathology and molecular biology of variant Creutzfeldt-Jakob disease". *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 284: 133-159.
- Mallucci G, Collinge J. "Rational targeting for prion therapeutics". *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 23-34.
- McKintosh E, Tabrizi SJ, Collinge J. "Prion diseases". *J Neurovirol* 2003; 9: 183-193.
- Taylor DM. "Preventing accidental transmission of human transmissible spongiform encephalopathies". *Br Med Bull* 66: 293-303, 2003.
- Will RG. "Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru". *Brit Med Bull* 2003; 66: 255-265.
- Zou WQ, Gambetti P. "From microbes to prions: the final proof of the prion hypothesis". *Cell* 2005; 121: 195-206.

Virosis emergentes y re-emergentes

Virus emergentes y re-emergentes

Guadalupe Carballal

Se define a una **enfermedad infecciosa emergente** como aquella que es identificada por primera vez en una población determinada, o bien, que involucra a un patógeno ya conocido que afecta a una nueva población o a una nueva área geográfica.

En el primer caso, es posible que los patógenos *nuevos* ya circularan en una comunidad determinada pero no fuera posible identificarlos porque se carecía de los ensayos diagnósticos adecuados.

El extraordinario desarrollo de las técnicas moleculares (PCRs, *random primers*, secuenciación y bioinformática) ha contribuido

Factores	Ejemplos
Ecológicos Cultivos intensivos de maíz, deforestación, destrucción de ambientes naturales, lo que produce disminución de predadores naturales (aves de rapiña, mamíferos) Aumento de malezas; inundaciones u otros fenómenos que modifican el hábitat de los roedores reservorios	Virus Junín, Machupo, hantavirus
Calentamiento global, cambios climáticos que favorecen la propagación de arbovirus, más lluvias y acumulación de aguas que favorecen el desarrollo de larvas de mosquitos	Dengue; otros arbovirus
Migraciones de aves silvestres	Influenza aviaria, Virus del Nilo Occidental
Agrícolas Cultivos intensivos; irrigación artificial de los campos que produce incremento en la población de mosquitos Deforestación	Virus Rift Valley Fever, dengue, fiebre amarilla, Oropuche, etc.
Sociales Hacinamiento y malas condiciones higiénicas; Acumulación de desechos que puedan contener agua estancada; Aumento en población de ratas; mayor contacto del hombre con roedores por tareas agrícolas, militares, recreativas u otras	Influenza Dengue Virus Seoul y otros hantavirus
Migraciones de poblaciones rurales: guerras y conflictos que desplazan grandes poblaciones a campamentos de refugiados en condiciones de salubridad inadecuadas Colapso de los sistemas de salud	Ébola, Marburg
Almacenamiento inadecuado de agua Aumento de densidad de población en ciudades con condiciones deficientes	Dengue
Viajes internacionales de individuos virémicos	Chikungunya
Ingreso del hombre a áreas selváticas por explotación de recursos naturales o turismo	Todos los arbovirus
Sociológicos Promiscuidad, cambios en hábitos sexuales, drogadicción endovenosa	HIV-1/2; HTLV-1/2, hepatitis B y hepatitis C Papilomavirus
Tecnología médica Aumento de trasplantes de órganos y transfusiones	HIV, HTLV, hepatitis B y hepatitis C, citomegalovirus, etc. Herpesvirus humano-6
Terapias inmunosupresoras que pueden favorecer la reactivación de:	Citomegalovirus; Epstein-Barr, virus BK, etc.

(continúa en la página siguiente)

Empleo indiscriminado de antivirales que favorecen la aparición de cepas resistentes	Citomegalovirus; herpes; HIV
En Europa o EE.UU. importación de primates con fines de investigación u otros	Marburg
Desconocidos	Coronavirus asociado al SARS
Bioterrorismo (uso probable)	Viruela
Factores virales	
Ruptura de la barrera entre especies	Influenza aviaria de aves a humanos (H5N1) HIV: probable transmisión del HIV de un primate reservorio al humano ¿?
Factores genéticos	Los virus a RNA presentan un alto grado de mutación y pueden existir mecanismos de reasociación genética (influenza pandémica A H1N1).

Tabla 32.1. Factores que pueden influenciar la emergencia y/o la re-emergencia de algunos virus.

con eficacia a la detección de numerosos nuevos virus tales como el metapneumovirus humano, el bocavirus, los nuevos coronavirus respiratorios, el virus de influenza pandémica A H1N1 de 2009, los virus de hepatitis C, hepatitis E, GBV-C, etc., entre muchos otros.

Se define como **enfermedad reemergente** a aquella cuyo agente etiológico ya es conocido y reaparece en un área determinada de la que estuvo ausente o en regiones nuevas. Muchas de las enfermedades reemergentes son poco estudiadas, dado que ocurren en regiones remotas del planeta y en áreas restringidas al hábitat de sus reservorios naturales.

Numerosos factores pueden contribuir a la emergencia o re-emergencia de virus en un área geográfica en un momento dado. Entre ellos podemos mencionar a factores ecológicos (inundaciones, sequías); cambios ambientales producidos por el hombre (agricultura, deforestación, calentamiento global); cambios demográficos (migraciones de poblaciones rurales, urbanización, comercio internacional y viajes, etc.); cambios de comportamiento humano (drogadicción, cambio de hábitos sexuales); tecnología médica; colapso de los sistemas de salud en países pobres y/o afectados por guerras y conflictos; y adaptación microbiana. Algunos ejemplos de los factores conocidos se indican en la Tabla 32.1.

Las enfermedades virales producidas por virus emergentes o reemergentes se tratan en los capítulos respectivos. En este capítulo ilustraremos estos conceptos con sólo dos ejemplos, si bien es necesario tener en cuenta que existen muchos más.

1. DENGUE

El dengue es una de las arbovirosis más importantes y es endémico en muchos los países tropicales y subtropicales, en especial en el Sudeste Asiático y en África.

En las Américas existían los cuatro serotipos de dengue, pero esta enfermedad pudo ser erradicada en 1960, quedando sólo algunos focos en el Caribe y en las selvas sudamericanas. Sin embargo, el dengue reemergió en Jamaica en 1963, luego en Cuba y en el resto del Caribe.

En 1981, se registró en Cuba una severa epidemia con 10 000 casos de dengue clásico y 160 muertos por dengue hemorrágico.

En Argentina, el mosquito vector (*Aedes aegypti*) que había sido aparentemente erradicado, reapareció a fines de la década de los 80 y se extendió a todas las áreas subtropicales y templadas de nuestro país.

Los primeros casos de dengue clásico se observaron en la provincia de Salta en 1997, en el norte de nuestro país. Posteriormente se detectaron brotes esporádicos asociados a epidemias en los países limítrofes (Paraguay y Brasil).

En 2003-2004 se pudieron detectar los serotipos 1, 2 y 3 de virus dengue en la provincia de Salta. En el 2010 se detectó el serotipo 4. La circulación de los cuatro serotipos en provincias del norte y la existencia de la mayoría de la población susceptible al virus en el resto del país, así como la existencia de condiciones favorables

para el desarrollo de las larvas de los *Aedes aegypti*, implica un gran riesgo para la emergencia de brotes epidémicos de dengue y también de dengue hemorrágico en Argentina.

En 2007 se registraron en la ciudad de Buenos Aires algunos casos de dengue clásico en individuos que habían viajado a Paraguay, así como también numerosos casos en habitantes de provincias limítrofes con Paraguay y Brasil.

El dengue constituye un claro ejemplo de virus reemergente en Argentina (véase el Capítulo 33 *Dengue*).

2. INFLUENZA DE ORIGEN AVIARIO CON POTENCIAL PANDÉMICO

Las numerosas aves acuáticas de vida silvestre que habitan el planeta son uno de los reservorios naturales de los virus influenza. En ellas circulan los virus de influenza A y se han podido detectar todos los subtipos de hemagglutininas de influenza (HA) –del 1 al 16– y de neuraminidasa (NA) –del 1 al 9– conocidos hasta el momento.

A lo largo de la evolución se ha establecido un equilibrio entre esas aves silvestres y los virus influenza, pero las aves pueden transmitir estos virus a numerosos mamíferos (porcinos, equinos, aves de corral), incluyendo el hombre. En estos nuevos hospedadores esos virus pueden producir infección y/o enfermedad.

A fines del siglo XX y comienzos del XXI se han registrado variaciones genéticas y antigénicas en estos virus influenza y un aumento de su patogenicidad para las aves. Esto produjo diversos brotes de influenza A H5N1 con gran mortalidad en las aves de corral en muchos países de Asia y, además, se registraron centenares de casos humanos con elevada mortalidad (véase el Capítulo 14 *Orthomyxovirus*).

Los casos humanos que se detectaron durante esos brotes se observaron en individuos que tenían un contacto directo con las aves infectadas y, hasta el momento la transmisión interhumana de la cepa H5N1 no ha sido confirmada.

Estos casos produjeron una justificada alarma a nivel mundial ya que, si el genoma de las cepas altamente patógenas de influenza aviaria se reasociaran con cepas de influenza humana –de alta transmisibilidad en humanos– o desarrollaran mutaciones que favorecieran la capacidad de transmisión interhumana, estaríamos en presencia de la emergencia de un virus pandémico. Dado que este virus encontraría a toda la población humana susceptible, la diseminación de un brote epidémico ocurriría rápidamente y produciría una pandemia. Sin embargo, la primera pandemia de influenza del siglo XXI no fue exclusivamente de origen aviario.

La pandemia de influenza A H1N1 del 2009 se analiza en los capítulos 59 y 59.1.

3. CONCLUSIÓN

Los dos ejemplos mencionados demuestran los riesgos para la Salud Pública inherentes a la emergencia (influenza aviaria en huma-

nos, SARS, hantavirus productores del síndrome pulmonar, etc.) o a la re-emergencia (dengue en las Américas) de virus altamente patógenos.

Es de enorme importancia mantener una activa vigilancia epidemiológica de estas enfermedades virales, implementar medidas de control, así como el empleo de técnicas rápidas y sensibles para su diagnóstico precoz.

Bibliografía

- Emerging Infectious Diseases: www.cdc.gov/eid
- Gayer M, Legros D, Formenty P, Connolly MA. "Conflict and emerging infectious diseases". *Emerg Infect Dis* 2007;13:1625-31
- Morse SS. "Factors and determinants of disease emergence". *Rev Sci Tech* 2004; 23:443-51.
- Morse SS. "Factors in the emergence of infectious diseases". *Emerg Infect Dis* 1995; 1:7-15.

ANEXO 1

Resumen de la actuación sobre el dengue en Argentina a comienzos de 2009

Guadalupe Carballal

En Argentina en la última década se han registrado casos autóctonos de dengue, con los serotipos 1, 2 y 3 en las provincias de Salta y Jujuy y con los serotipos 1 y 3 en Formosa, Misiones y Corrientes. No se ha notificado aún casos de dengue autóctono producidos por el serotipo 4.

En nuestro país el comportamiento del dengue es epidémico y restringido a los meses de mayores temperaturas (de noviembre a mayo) y en estrecha relación con la ocurrencias de brote en los países limítrofes.

El dengue avanza en forma alarmante en Argentina. Las provincias más afectadas son las de Chaco, Catamarca y Salta.

Al 1 de abril de 2009 se notificaron 5 164 casos confirmados por estudios de laboratorio o por nexo epidemiológico. De ellos, la mayoría correspondieron a las provincias de Chaco y Salta, y el resto a las de Catamarca y Jujuy.

Al 14 de abril de 2009, se notificaron 12 544 casos de dengue, confirmados por estudios de laboratorio o por

nexo epidemiológico y 3 casos de dengue hemorrágico, de los cuales 2 fueron casos importados y 2 casos fatales. El serotipo de dengue más frecuentemente detectado fue dengue 1.

En la semana epidemiológica 28, correspondiente al 17 de julio de 2009, según datos de la *Pan American Health Organization* (PAHO), se notificaron en Argentina 25 989 casos de dengue.

A principios de agosto de 2009 se está implementando un plan nacional para el control de esta enfermedad reemergente en Argentina, que incluirá aspectos de diagnóstico clínico, de confirmación de casos por ensayos virológicos, de vigilancia epidemiológica, así como medidas de prevención y de educación en la comunidad para la eliminación del vector y de los reservorios de sus huevos y para la consulta temprana ante la aparición de síntomas típicos de la enfermedad.

Bibliografía

- Ministerio de Salud de la Nación. Dengue: Informe sobre la situación epidemiológica en las provincias. 14 de abril, 2009. http://www.msal.gov.ar/htm/Site/sala_situación/pdf/inforde-dengue-cof-prensa-14-abril-09-pdf.
- PAHO (*Pan American Health Organization*). Number of reported cases of Dengue and Dengue hemorrhagic fever. Region of the Americas (by country and subregion, PAHO, Washington, 2009).
- Sala Virtual de situación de Salud. Plan de Prevención y Control Dengue. 2008-2009 Informe de Situación. Ministerio de Salud de la Nación. Argentina, 2009. http://www.msal.gov.ar/htm/Site/sala_situación/pdf/infor-dengue-senado.pdf

Dengue

Delia A. Enria - María A. Morales

1. INTRODUCCIÓN

Los virus dengue (DEN) son arbovirus que constituyen un grupo serológico dentro de la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, integrado por 4 serotipos virales antigénicamente relacionados: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4; todos ellos pueden causar fiebre de dengue (FD) o dengue clásico y dengue hemorrágico (DH).

Los 4 serotipos tienen historias naturales similares, que incluyen a los humanos como huéspedes vertebrados primarios y a mosquitos *Aedes* del subgénero *Stegomyia* como vectores primarios.

2. ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN VIRAL

Son virus a RNA de polaridad positiva. Las partículas virales son esféricas, de 40 a 50 nm de diámetro, con una envoltura lipoproteica que contiene una nucleocápside icosaédrica de 30 nm de diámetro. La envoltura del virión presenta finas proyecciones compuestas por proteínas estructurales de la envoltura y de la membrana celular. La nucleocápside está constituida por una proteína de la cápside y el genoma RNA. (Figura 33.1)

El RNA genómico es infeccioso, tiene aproximadamente 11 kb de extensión y se compone de 10 genes que codifican para tres proteínas estructurales y siete no estructurales. Entre las primeras se encuentran la proteína de la cápside o proteína del core (C), una proteína asociada a la membrana (M), una proteína de la envoltura (E). Las siete proteínas no estructurales (NS) se designan NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5.

El orden de los genes, como en los otros *flavivirus*, es: 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'. Las proteínas se sintetizan como una poliproteína de alrededor de 3 000 aminoácidos, que es luego procesada por proteasas virales y del huésped.

La glicoproteína E es la hemaglutinina viral; induce la inmunidad protectora en el huésped y también determina la existencia de anticuerpos no neutralizantes de reacción cruzada entre flavivirus, entre otras importantes funciones. Dentro de cada serotipo de virus *Dengue* se han reconocido diferentes genotipos, que representan a

grupos de virus con una diferencia en sus nucleótidos no mayor al 6% en la unión de los genes E/NS1. Datos obtenidos fundamentalmente en base a DEN-2 y DEN-3 sugieren que determinados genotipos poseen mayor virulencia y potencial epidémico.

3. EPIDEMIOLOGÍA

3.1. ORIGEN E HISTORIA NATURAL

El origen de los virus dengue ha sido objeto de múltiples discusiones. Algunos autores pensaron originariamente en un origen africano, con una posterior distribución alrededor del mundo con el comercio de esclavos. Más recientemente, se ha postulado que estos virus se podrían haber originado en un ciclo selvático involucrando primates inferiores y mosquitos en la península Malaya. Con independencia de su origen geográfico, se considera que con mucha probabilidad han evolucionado como virus de mosquitos antes de adaptarse a primates inferiores y al hombre. Biológicamente, los virus dengue están altamente adaptados a sus mosquitos vectores y se mantienen por transmisión vertical en especies de mosquitos responsables de ciclos selváticos, con amplificación periódica en primates inferiores.

Estos ciclos silvestres se han documentado en el sudoeste de Asia y África, e involucran a múltiples especies de primates inferiores y a tres subgéneros (*Stegomyia*, *Finlaya* y *Diceromyia*) de especies de mosquitos del género *Aedes*. En algún momento en el pasado, probablemente con la deforestación y el desarrollo de los asentamientos humanos, los virus se movieron de la selva hacia el medio rural. Las migraciones humanas y el comercio trasladaron los virus a los pueblos y ciudades, donde los virus son mantenidos en ciclos urbanos que involucran a los hombres y a los mosquitos.

3.2. SITUACIÓN MUNDIAL

En la actualidad el dengue es una enfermedad epidémica o endémica prácticamente en todos los países tropicales y subtropicales del mundo y constituye la arbovirosis de mayor implicancia en la Salud

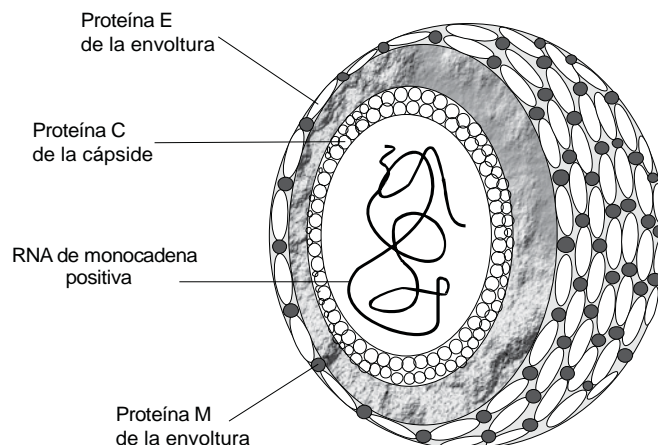


Figura 33.1. Estructura del virus dengue.

Pública humana. La enfermedad ha experimentado en los últimos años una emergencia y/o reemergencia global, con un aumento en la frecuencia de aparición y en la magnitud de las epidemias, acompañadas con una mayor severidad de los casos. Esta situación se ha originado por múltiples y complejos factores, alguno de los cuales no son totalmente comprendidos. El incremento poblacional, la urbanización inadecuada y no planificada, el aumento de los viajes aéreos y las migraciones, el calentamiento global, el deterioro de los sistemas de Salud Pública y la carencia de estrategias eficientes para el control de *Aedes aegypti* son algunos de los determinantes del aumento de la incidencia de esta enfermedad.

El promedio de los casos de fiebre de dengue (FD) o dengue clásico y dengue hemorrágico (DH) notificados anualmente a la OMS ha aumentado desde 908 en el período 1950-1959 a 514 139 en el período 1990-1999. De acuerdo a las estadísticas de la OMS, se estima que anualmente ocurren 500 000 casos de DH/síndrome de shock por dengue (SSD) con aproximadamente un 5% de mortalidad. Los casos de FD/DH/SSD representan una problemática importante para el Sur y el Sudeste de Asia, América Central y Sudamérica. Durante el 2002 se notificaron 17 363 casos de DH en 20 países de Latinoamérica y en 15 de ellos se constató la circulación de dos o más serotipos de virus dengue.

3.3. SITUACIÓN EN ARGENTINA

En la Argentina, se detectó la reinfestación con el mosquito vector *Aedes aegypti* en 1986 y desde entonces se ha producido su extensión progresiva en toda la zona subtropical y templada del país. Las primeras evidencias de circulación esporádica del virus dengue en Argentina surgieron en 1997, luego de 81 años sin notificación de casos, cuando se detectan 19 casos autóctonos en la provincia de Salta que se asociaron a la introducción de DEN-2. Desde entonces se produjeron brotes limitados en el tiempo, inicialmente con un único serotipo por región, seguido de circulación simultánea de dos o tres serotipos (DEN-1, DEN-2 y/o DEN-3) en distintas provincias del norte del país hasta el 2009. En el 2009 se produce el mayor brote de dengue registrado en Argentina con más de 29 000 casos notificados en 14 provincias, afectando por primera vez a las provincias del área templada. En el 2010 se confirma por primera vez, circulación autóctona de DEN-4 en un pequeño número de casos detectados en la ciudad de Rosario, situación que marca el riesgo de diseminación de este serotipo, que hasta el momento ha tenido una menor circulación en las Américas (Tabla 33.1). Los brotes de dengue ocurridos en Argentina han estado asociados a la existencia de casos en los países limítrofes, salvo el brote de dengue que afectó a la región del noroeste en el período 2003-4. La sospecha de endemicidad en el norte del país constituye un cambio en la epidemiología de esta patología en Argentina, que sigue la tendencia observada en toda Latinoamérica. La circulación de los cuatro serotipos de virus dengue en distintas áreas y la existencia de una gran cantidad de individuos susceptibles, presenta a nuestro país como un escenario altamente favorable para un aumento en la aparición de casos graves de dengue y epidemias en grandes centros urbanos.

4. CUADRO CLÍNICO

Las manifestaciones clínicas de las infecciones por los virus dengue son una representación de la compleja interacción virus-huésped. La mayoría de las infecciones son asintomáticas o se presentan solamente con síntomas febriles leves e inespecíficos. Los síntomas característicos de la fiebre del dengue clásico (FD) incluyen cefaleas, dolor retroorbital y artralgias severas y se acompañan frecuentemente de una erupción leve máculopapular. La enfermedad se acompaña de leucopenia y trombocitopenia leve y en algunas oportunidades de manifestaciones hemorrágicas también leves. Los síntomas se resuelven dentro de la semana. Las manifestaciones clínicas de las infecciones severas, la fiebre hemorrágica del dengue y síndrome de shock del dengue (FHD/SSD) incluyen manifestacio-

nes hemorrágicas, permeabilidad vascular incrementada o síndrome de derrame capilar y compromiso hepático. La FHD/SSD ocurre en un pequeño porcentaje de las infecciones por virus dengue. Las manifestaciones hemorrágicas incluyen desde una prueba de torniquete positiva (la producción de petequias luego de la insuflación de un manguito braquial de toma de presión, lo que es un indicador de fragilidad capilar) hasta el sangrado espontáneo de la nariz o del tracto gastrointestinal. La trombocitopenia marcada es típica. La fuga capilar se desarrolla rápidamente en un período de horas, característicamente cerca o al final del período febril, cuando los síntomas de FD clásico se resuelven. Los hallazgos iniciales de hipotensión o disminución de la presión de pulso pueden progresar rápidamente al shock. Las efusiones pleurales, ascitis y edema retroperitoneal evidencian la pérdida de volumen intravascular. Se considera a la hemoconcentración como un hallazgo esencial para la definición de FHD.

La nueva clasificación del dengue que se ha generado para mejorar el triage de los enfermos con mayores posibilidades de tener complicaciones diferencia a los casos en dos grupos: dengue y dengue grave. Entre ambas formas se ubican a los pacientes que presentan signos de alarma, que incluyen: dolor abdominal intenso y sostenido, vómitos persistentes, derrame seroso (en peritoneo, pleura o pericardio) detectado por clínica, por laboratorio (hipoalbuminemia) o por imágenes (ecografía de abdomen o radiografía de torax; sangrado de mucosa, hepatomegalia \geq a 2 cm. y/o incremento brusco del hematocrito concomitante con rápida disminución en el recuento de plaquetas.

5. PATOGENIA

En la infección natural, el virus es inoculado por el mosquito vector en el espacio subcutáneo o intradérmico. La replicación del virus ocurre inicialmente en el sitio de inoculación, en células del sistema retículo-endotelial y/o en fibroblastos. La replicación subsiguiente se realiza en los ganglios linfáticos regionales, desde donde el virus se disemina, de manera tal que la viremia es habitual precediendo el inicio de los síntomas y en los 3-5 días siguientes. Durante la FHD o el SSD, por lo general, no se detecta viremia y se encuentran niveles elevados de anticuerpos. Los mecanismos patogénicos que se han asociado a las diferentes manifestaciones del dengue incluyen:



Año	Provincia	Serotipos de virus dengue
1997	Salta	DEN-2
1998	Salta	DEN-2
2001	Misiones, Formosa	DEN-1
2002	Salta	DEN-1
2003	Salta	DEN-1, DEN-2, DEN-3
2004	Salta, Jujuy, Formosa	DEN-3
2006	Salta, Formosa, Misiones	DEN-2, DEN-3
2007	Salta, Misiones, Corrientes, Formosa	DEN-2, DEN-3
2008	Salta	DEN-1
2009	Salta, Jujuy, Chaco, Catamarca, Santiago del Estero, La Rioja, Santa Fé, Buenos Aires, Entre Ríos, Córdoba, Formosa, Tucumán, Corrientes y CABA.	DEN-1
2010	Salta-Misiones-Chaco-Santiago del Estero-Santa Fe	DEN-2, DEN-1, DEN-4

Tabla 33.1. Distribución temporal y geográfica de la circulación de serotipos de virus DEN en Argentina.

- 1) Efectos virales directos:
 - Inducción de la producción de citoquinas (TNF α , IL-1 β) por monocitos, que producen derrame capilar y shock
 - Supresión de la hematopoyesis, que resultaría en trombocitopenia y hemorragia
 - Inducción de la producción del inhibidor-activador del plasminógeno, resultando en hemorragia
 - Daño hepatocítico, demostrable por las transaminasas elevadas y la necrosis hepática
- 2) Respuesta del huésped a la infección:
 - Producción de citoquinas (IFN α , IL-2, TNF β) por linfocitos T específicos activados, lisis mediada por linfocitos T y células NK de monocitos infectados con inducción de la liberación de citoquinas, que producirían shock y derrame capilar
 - Reactividad cruzada de los anticuerpos anti-dengue con el plasminógeno, que resultaría en hemorragia
 - Reactividad cruzada de anticuerpos anti-NS1 con plaquetas y células endoteliales que conducen al daño de las mismas y a la actividad inflamatoria
 - Formación de complejos inmunes y activación del complemento, que producirían trombocitopenia, hemorragia, derrame capilar y shock

La evidencia disponible indica que las formas graves de la enfermedad se observan con más frecuencia con determinadas cepas virales. Existen también considerables evidencias de que el riesgo de FHD se incrementa durante las infecciones secundarias.

6. TRATAMIENTO

El tratamiento del dengue sin signos de alarma es de sostén y puede hacerse en forma ambulatoria. Se debe valorar correctamente el estado de hidratación de los pacientes. Está indicado el tratamiento para el dolor y la fiebre, usualmente con paracetamol; la aspirina está contraindicada por la posibilidad de exacerbar las manifestaciones hemorrágicas y por el riesgo incrementado de desarrollar síndrome de Reye. Los pacientes deshidratados o con dificultades para ingerir líquidos deben ser internados para administración parenteral de líquidos. También deben ser hospitalizados de inmediato los casos con presencia de cualquiera de los siguientes signos: lentitud o letargo, frialdad en las extremidades o cianosis; oliguria, pulso rápido y débil; hipotensión o reducción en ≤ 20 mmHg de la presión de pulso, e incremento abrupto o continuo del hematocrito aún ante la administración de líquidos. El adecuado reemplazo de volumen en la FHD es fundamental en la evolución, al igual que la corrección de las anomalías metabólicas y electrolíticas y la transfusión de sangre en caso de sangrado significativo.

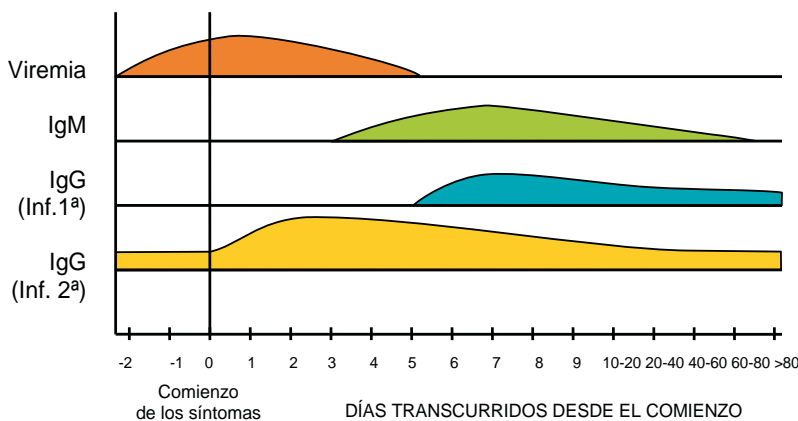
7. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico etiológico de las infecciones por virus dengue se realiza por técnicas directas e indirectas. La muestra de elección es el suero y la correcta aplicación de las técnicas disponibles requiere que el laboratorista conozca los días de evolución desde que el paciente inició la presentación de los síntomas.

Si la muestra se tomó con menos de 5 días de evolución, se intentará demostrar la presencia de antígenos virales (detección de proteínas virales no estructurales), aislar el virus (aislamiento viral en cultivos celulares, ratones o inoculación de mosquitos) o detectar el genoma viral (PCR, Nasba, Taqman, PCR en Tiempo Real, etc) (Figura 2). La inoculación de mosquitos constituye el sistema más sensible ya que se trata de los vectores naturales, pero su uso queda limitado a aquellos lugares que disponen de insectario. El uso de líneas celulares derivadas de mosquitos (por ej: C6/36 derivada de *Aedes albopictus*) representa el mejor sistema en base a sensibilidad, conveniencia y relación costo-efectividad para el aislamiento de los virus dengue. En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas moleculares que amplifican distintas regiones del genoma viral y que presentan la ventaja fundamental de obtener resultados en un tiempo menor, pero que de ningún modo desplazan a las técnicas de la virología clásica. Un resultado positivo de las técnicas directas confirma la infección por dengue, pero un resultado negativo no es suficiente para descartar un caso sospechoso y debe estudiarse una muestra de suero tomada durante la convalecencia.

Recientemente han comenzado a estar disponibles reactivos comerciales que permiten detectar la proteína no estructural NS1, constituyendo una herramienta hasta el momento en fase de evaluación, pero con un gran potencial. Se trata de una glicoproteína que participaría en la replicación viral, que es secretada en el suero de personas infectadas con dengue en el período agudo de la enfermedad, detectándose inclusive en presencia de anticuerpos IgM, tanto en infecciones primarias como secundarias. Esta técnica posee la limitación que no discrimina serotipo, pero permitiría el procesamiento de un gran número de muestras tempranas en laboratorios de menor complejidad técnica y en un corto tiempo, agilizando la respuesta laboratorial, sobretodo en situaciones de brote.

Las partículas virales son neutralizadas a medida que comienzan a aparecer los anticuerpos específicos y el diagnóstico se realiza clásicamente mediante técnicas serológicas en muestras que posean 5 o más días de evolución. Se pueden distinguir dos patrones de respuesta sérica a la infección aguda por dengue: primaria y secundaria (Figura 33.2). La respuesta primaria se detecta en individuos que no son inmunes a los flavivirus. La respuesta secundaria se observa en personas que sufrieron una infección previa por dengue, otro flavivirus o inclusive por vacunación para un flavivirus (por ej: fiebre amarilla o encefalitis japonesa) y se caracteriza por un



*Modificado de "Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control" Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica N° 548.

Figura 33.2. Niveles de viremia, anticuerpos IgM e IgG en el curso de una infección primaria y secundaria por dengue.



aumento rápido y en general, un predominio de los niveles de IgG sobre los de IgM.

Hacia el quinto día de la enfermedad, el 80% de los casos, tanto primarios como secundarios tienen niveles de IgM detectables que perduran hasta los 60-90 días. Algunas evidencias recientes obtenidas en el país, indicarían la posibilidad de una mayor persistencia de los anticuerpos IgM en la circulación de un porcentaje de los pacientes. Por lo tanto, la detección de estos anticuerpos es una herramienta fundamental para la vigilancia del dengue, pero no tiene valor confirmatorio considerando además, la existencia de cruces serológicos entre los flavivirus. La confirmación del diagnóstico se realiza mediante el estudio de un par serológico (período agudo-convaleciente) por técnicas de ELISA IgG, Inhibición de la Hemoaglutinación y/o Neutralización en cultivos celulares. La demostración de una cuadruplicación en el título de anticuerpos indicará la existencia de un proceso agudo.

La técnica de Neutralización es la más específica y en general es la empleada para minimizar las reacciones heterólogas que se presentan en las demás técnicas serológicas. El serotipo de virus dengue sólo puede identificarse con certeza en los aislamientos virales mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos de cada serotipo, por técnicas moleculares o por neutralización en cultivos celulares en algunos pacientes con patrones serológicos de respuesta primaria. Los altos títulos de anticuerpos

presentes en las infecciones secundarias exacerban la reactividad cruzada e impiden la identificación del serotipo de virus dengue o del flavivirus causante de la infección.

Actualmente, existe en el mercado una variedad de técnicas comerciales con diferentes formatos y principios. El empleo de estos reactivos requiere que se compruebe previamente que poseen sensibilidad y especificidad adecuadas, realizando controles de calidad en cada uno de los lotes de reactivos que se incorporan.

8. PREVENCIÓN

No existen aún vacunas disponibles para la prevención del dengue, si bien hay varias candidatas en ensayo clínico. Por esta razón, la transmisión puede reducirse sólo mediante medidas de control de los mosquitos vectores y/o evitando el contacto de los humanos con ellos. La mayoría de los países tienen programas de control, pero su eficiencia es aún discutible. Estos programas deben relacionar los métodos de control con una adecuada vigilancia e implican estrategias de comunicación social para estimular la participación comunitaria en el ordenamiento del medio.

Agradecimiento: A la Sra. Mara Eraso por el tipeo de los manuscritos y a los Sres. Diego Bonanno y Verónica Fasciani por la confección de figuras y tablas.

Bibliografía

- Avilés G, Rangeón G, Vorndam V, Briones A, Baroni P, Enria D and Sabbatini M. "Dengue Reemergence in Argentina". *Emerg Infect Dis* 1999;5:575-8.
- Avilés G, Rangeón G, Paz M, Baroni P, Sabbatini M, Enria D. "Respuestas serológicas secundarias en la epidemia de dengue de 1998 en Salta, Argentina, donde co-circulan otros *Flavivirus*". *Medicina* (Buenos Aires) 2001;61:129-36.
- Avilés G, Paz M, Rangeón G, Ranaivoarisoa M, Verzeri N, Roginski S, Baroni P and Enria D. "Laboratory Surveillance of Dengue in Argentina, 1995-2001". *Emerg Infect Dis* 2003;9:738-42.
- Calisher, CH. "Persistent Emergence of Dengue". *Emerg Infect Dis* 2005;11: 738-9.
- George R, Lum LCS. "Clinical spectrum of dengue infection". En: Gubler DJ, Kuno G. (eds.): *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Chapter 5. New York, Cab International, 1997;89-113.
- Guha-Sapir D, Schimmer B. "Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology". *Emerg Themes Epidemiol* 2005;2:1.
- Guzmán Tirao MG, Couri Flores G, Bravo González JR. "La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas. Reemergencia del dengue". *Rev Cubana Med Trop* 1999;51:5-13.
- Guzmán MG, Kouri G. "Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges". *J Clin Virol* 2003;27:1-13.
- Halstead, SB. "More Dengue, More Questions". *Emerg Infect Dis* 2005;11:740-1.
- Holmes EC, Twiddy SS. "The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus". *Infect Genet Evol* 2003;3:19-28.
- Nimmannitya, S. "Dengue hemorrhagic fever: diagnosis and management". En: Gubler DJ, G Kuno (eds.): *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Chapter 5. New York, Cab International, 1997, 133-145.
- Organización Panamericana de la Salud. "Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control". *Publicación científica* N° 548 1995.
- Pei-Yun Shu, Jyh-Hsiung Huang. "Current Advances in Dengue Diagnosis". *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:642-50.
- Rigau-Pérez JG, Clark GG. "Cómo responder a una epidemia de dengue: visión global y experiencia en Puerto Rico". *Rev Panam Salud Púb* 2005;17:282-93.
- Welsh RM, Rothman AL. "Dengue immune response: low affinity, high febrility". *Nat Med* 2003;9:820-2.



Virus del Nilo occidental (*West Nile*)

Delia A. Enría - María A. Morales

1. INTRODUCCIÓN

El virus del Nilo Occidental (en inglés *West Nile [WN] virus*) está taxonómicamente ubicado dentro de la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* y, en base a relaciones antigénicas determinadas por la prueba de neutralización, ha sido clasificado serológicamente dentro del complejo antigénico de la Encefalitis Japonesa (JE), que incluye también a los virus JE, Murray Valley, Encefalitis de San Luis y Rocío.

2. ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN VIRAL

La partícula viral es esférica, mide alrededor de 50 nm de diámetro y posee una envoltura lipídica que deriva de la célula hospedadora. La nucleocápside contiene el RNA de simple cadena y polaridad positiva, de aproximadamente 11 000 nucleótidos. Insertas dentro de la envoltura se encuentran la proteínas de la Envoltura (E) y de Membrana (M), que son responsables de importantes propiedades virales, incluyendo el rango de hospedadores, tropismo tisular, replicación, ensamblaje viral y la estimulación de las células B y T para el desarrollo de la respuesta inmune. El análisis filogenético de las secuencias del genoma del virus procedentes de distintas localizaciones geográficas revela la existencia de 2 linajes genéticos diferentes: linaje 1 (comprende cepas de Europa, África, Asia, Australia y América del Norte) y linaje 2 (sólo incluye cepas del Sahara africano y Madagascar). El linaje 1 ha sido dividido en 4 agrupamientos: Kunjin, India, A y B (que incluye un aislamiento de India). Las cepas integrantes del grupo B, son todas virulentas para el ratón, mientras que los demás agrupamientos comprenden cepas tanto virulentas como atenuadas para el ratón.

El genoma RNA, al igual que el del resto de los virus del género *Flavivirus*, posee una pequeña región no codificante en el extremo 5', seguida de la secuencia que codifica 3 proteínas estructurales (C, E y prM, precursor de la proteína M que luego es procesado por una proteasa celular cuando se produce la maduración del virión) y 7 proteínas no estructurales (NS) en el siguiente orden: NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3', seguida de una región no codificante de alrededor de 600 nucleótidos (Figura 34.1).

La replicación viral ocurre en el citoplasma, en una zona con alta asociación con el retículo endoplasmático rugoso (RER), seguido del ensamblaje viral en el interior del RER y liberación de la célula a través del sistema de secreción celular. Las diferencias en la patogenicidad se han relacionado a nucleótidos que codifican regiones específicas de la prM, E o proteínas no estructurales del virión.

3. EPIDEMIOLOGÍA

El virus WN es nativo de África; se detectó por primera vez en una mujer febril de Uganda en 1937 y en los años siguientes fue

reconocido como causante de cuadros febriles y, esporádicamente, de encefalitis en África, Asia y Europa. Entre las décadas de 1960 y 1970 fue aislado a partir de aves, mosquitos y mamíferos en diversos países de Europa, África, Medio Oriente e India. Se detectaron brotes epidémicos en Israel (1951, 1954 y 1957) y en Sudáfrica (1974), pero no era considerado un problema importante para la salud humana y animal a pesar de estar prácticamente disperso en todo el Viejo Mundo. En la década de los 90, la frecuencia de brotes humanos y equinos aumentó, sumado a un incremento en la gravedad de la enfermedad humana con mayor incidencia de casos con afectación neurológica, acompañados por altas tasas de mortalidad aviaria anteriormente no observadas. En el año 1999 se detectó por primera vez el virus en el área metropolitana de Nueva York y desde entonces ha causado las mayores epidemias de enfermedad neurológica en humanos y equinos y ha generado un impacto sobre la vida silvestre nunca antes alcanzado por otro arbovirus en los EE.UU.

En todo el área donde este virus posee actividad, se considera que los mosquitos del género *Culex* constituyen sus vectores primarios (Figura 34.2). Un aspecto que sin duda ha posibilitado su extensa diseminación en América del Norte es el amplio rango de especies de mosquitos que el virus ha logrado infectar. La transmisión vertical del virus WN en los vectores ha sido comprobada y podría tener un rol en el mantenimiento viral durante el invierno en las regiones de clima templado. Se han detectado garrapatas infectadas por este virus, pero se cree que no cumplen un rol sustancial en la transmisión. Sin embargo, a medida que el virus ingresa a nuevos ambientes, se incrementa su oportunidad para infectar nuevas especies de artrópodos que podrían sumarse a los ciclos de transmisión.

Más de 150 especies de aves y, como mínimo, otras 30 especies de vertebrados son susceptibles a la infección por el virus WN, incluyendo mascotas, animales de granja y animales silvestres. El desenlace de la infección depende de la especie, la edad del animal, su estado inmune y la patogenicidad de la cepa viral. Ciertas aves, en especial las pertenecientes a los órdenes *Passeriformes*, *Chadriiformes* y *Anseriformes*, son las que desarrollan niveles de viremia lo suficientemente elevados como para posibilitar la infección de mosquitos. De los otros vertebrados susceptibles, sólo lemures, algunas ranas y hámsters desarrollarían niveles suficientes de viremia como para sostener ciclos de transmisión con artrópodos. También se ha comprobado la transmisión directa por ingestión de tejidos u órganos contaminados, por ingestión de mosquitos infectados o a través de las secreciones o excreciones de las aves más susceptibles. Otro factor que puede influenciar la susceptibilidad a la infección y la presencia de enfermedad es la cepa viral. Se ha propuesto que las muertes inusuales en aves que comenzaron a detectarse en el año 1998 en Israel y luego en EE.UU. se originaron por la evolución del virus hacia una variante

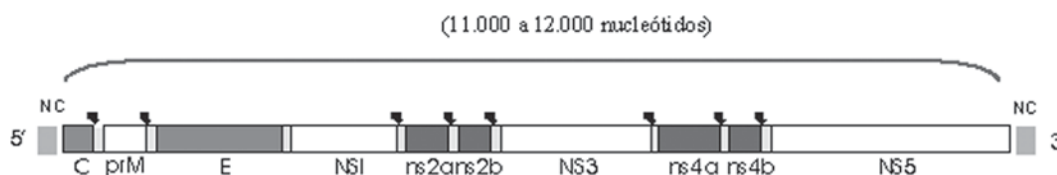


Figura 34.1. Estructura genómica de los flavivirus.

más patogénica que las aisladas anteriormente. Estudios filogenéticos de cepas del virus WN obtenidas en diversas localizaciones geográficas de EE.UU. y México sugieren que no ha habido una fuerte presión selectiva, pero que se está produciendo una evolución viral a medida que se dispersa en América.

Desde el ingreso del virus WN en Nueva York en 1999, se han notificado en EE.UU. más de 16 000 infectados, con más de 7 000 casos neurológicos y más de 600 defunciones humanas. Asimismo, se describió por primera vez la transmisión a través de transfusiones sanguíneas y trasplante de órganos, se documentó la transmisión intrauterina y se informó una posible transmisión por lactancia. El virus se diseminó hacia Canadá, América Central y el Caribe. Se han detectado evidencias de transmisión en Islas Caimanes, Jamaica, República Dominicana, México, Guadalupe, El Salvador, Belice, Puerto Rico y Cuba. A medida que el virus se ha diseminado hacia el Sur, se han detectado muy pocos casos humanos, lo que podría atribuirse a fallas en el reconocimiento de las diferentes formas clínicas, a dificultades en la realización del diagnóstico serológico en áreas donde circulan otros flavivirus o al rol protector que podrían tener anticuerpos generados por exposición múltiple a otros virus de esta familia viral.

En el 2006, se notificó por primera vez actividad del virus WN en nuestro país, al aislar el virus a partir de muestras de cerebro de 3 equinos muertos con sintomatología neurológica en establecimientos rurales de la provincia de Buenos Aires y Entre Ríos, distantes entre sí no más de 200 Km. Los estudios ecoepidemiológicos intentarán establecer posibles vías de introducción, ciclo de transmisión, vectores, reservorios, etc. La caracterización de las cepas virales permitió clasificarlas en el Linaje 1 e indica que comparten características genómicas con otras cepas virulentas aisladas en el mundo y en América, asociadas a la ocurrencia de enfermedad humana. Posteriormente, se detectaron anticuerpos neutralizantes específicos para el virus WN en pájaros y equinos residentes en las provincias de Córdoba, Santa Fe Corrientes, Chaco y Tucumán, inclusive en muestreos correspondientes a los años 2004 y 2005, dando evidencias que indicarían la presencia del virus desde años anteriores en nuestro país. Se desconoce si se trata de ciclos virales establecidos o de introducciones sucesivas.

En el período 2006-2010 se han confirmado por ensayos serológicos casos humanos esporádicos que se presentaron como cuadros febriles inespecíficos o con afectación neurológica en las provincias de Chaco, Formosa, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos y Santiago del Estero. Se remarca la importancia de incluir el diagnóstico etiológico de este flavivirus en la vigilancia de las encefalitis virales en Argentina para determinar el impacto real del virus WN en la salud humana del país.

4. CUADRO CLÍNICO

El período de incubación oscila entre 2 y 14 días. La mayoría de las infecciones son asintomáticas. Los síndromes no complicados se caracterizan por el comienzo brusco de fiebre, cefalea y mialgias, generalmente acompañados de síntomas gastrointestinales. La enfermedad aguda dura en general menos de una semana, pero es frecuente una convalecencia prolongada con fatiga. Se han descrito cuadros con exantema y linfadenomegalias generalizadas; otros cuadros clínicos observados corresponden a las meningoencefalitis.

Los casos de meningitis son clínicamente indistinguibles de los de otras meningitis virales. La encefalitis por virus WN suele estar precedida por un período prodrómico de pocos días de duración en el que se observa fiebre, cefalea y síntomas inespecíficos. Sin embargo, el cuadro puede también presentarse con comienzo abrupto de fiebre, con signos y síntomas encefalíticos tales como cambios de conducta y vómitos. En un porcentaje cercano al 15%, la disfunción cerebral progresa hasta el coma. Otras anomalías incluyen debilidad muscular, disminución en los reflejos osteo-tendinosos, parálisis flácida y fallo respiratorio. Son infrecuentes las convulsiones y los signos de foco.

Los hallazgos del LCR incluyen pleocitosis leve, con predominio linfocitario, incremento en la concentración de proteínas y glucosa normal.

En sangre periférica, puede observarse leucocitosis, aunque en algunos casos se encuentra leucopenia con linfopenia relativa y también anemia leve.

5. PATOGENIA

La infección de un individuo se inicia luego de la picadura de un mosquito infectado. Los mecanismos exactos y los sitios de replicación del virus WN luego de la picadura de un mosquito infectado son desconocidos, pero se postula una replicación inicial en la piel y en los ganglios regionales, que produce una viremia primaria que disemina el virus en el sistema retículo endotelial. La afección del SNC depende del nivel de viremia secundaria que se alcance como resultado de esta replicación en el sistema retículo endotelial. Los niveles de viremia están influenciados por factores específicos del virus y del huésped, que determinan las manifestaciones clínicas y el pronóstico.

La proteína E de la envoltura del virus actúa como ligando en el acoplamiento virus-célula y en la neuroinvasividad; asimismo, parece ser un factor primario en la virulencia. Se considera que los factores del hospedador que favorecen la acción del virus en el SNC son aquellos que favorecen la entrada y replicación en el endotelio

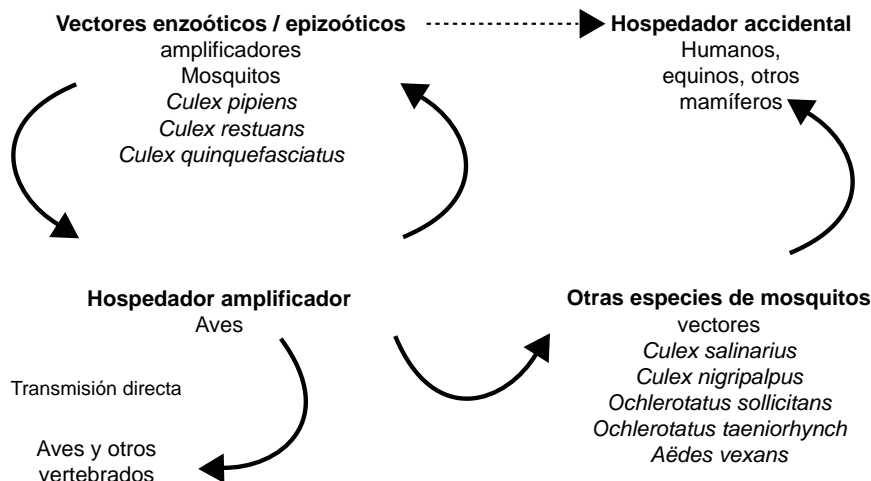


Figura 34.2. Ciclo de transmisión del virus WN en EE.UU.

de la barrera hemato-encefálica. Las posibles explicaciones para la mayor incidencia de meningo-encefalitis en los ancianos incluyen a los factores que causan trastornos en el endotelio cerebral, tales como hipertensión y enfermedades cerebro-vasculares o que pueden producir un incremento en la magnitud y duración de la viremia, tales como la inmunosupresión o el inmu-noenvejecimiento. Otros mecanismos propuestos de entrada al SNC incluyen transporte axonal a través de las neuronas olfatorias, diapédesis a través de las uniones endoteliales, o pasaje a través del plexo coroideo. Los cambios patológicos en el SNC son el resultado directo de cuatro factores: a) replicación viral dentro de las células neuronales y gliales, b) respuesta citotóxica inmune contra las células infectadas, c) inflamación perivascular difusa y d) formación de nódulos microgliales.

Al momento de la presentación del cuadro de meningo-encefalitis, la mayoría de los pacientes ha iniciado su respuesta inmune, detectándose habitualmente IgM en el suero y el líquido céfalo raquídeo (LCR), que pueden disminuir la replicación viral interfiriendo en la adsorción del virus a la célula o previniendo la reorganización estructural de la glicoproteína E, que usualmente permite la fusión endosomal.

6. DIAGNÓSTICO

La infección humana por virus WN puede ser sospechada a partir de la sintomatología clínica y la epidemiología que presente el caso, pero es necesario realizar pruebas específicas de laboratorio para establecer la etiología. La detección de anticuerpos IgM por la técnica de captura (MAC-ELISA IgM) suele ser el ensayo más eficiente cuando se lo aplica en sueros obtenidos entre los 8 y 14 días después de iniciados los síntomas o en el LCR. Debido a que los anticuerpos IgM no atraviesan la barrera hemato-encefálica, su presencia refleja la ocurrencia de una infección reciente del SNC. Se ha detectado persistencia de los anticuerpos IgM por más de 6 meses tanto en suero como en el LCR de algunas personas infectadas por WN, por lo que quienes residen en áreas endémicas pueden poseer anticuerpos IgM como respuesta a infecciones previas, que no se relacionen con su enfermedad actual. Los flavivirus se caracterizan por presentar reactividad cruzada en la mayoría de las técnicas serológicas. La persistencia de los anticuerpos IgM y la reactividad cruzada dentro de la familia viral determinan la necesidad de obtener una segunda muestra de suero en el período de convalecencia para confirmar los resultados. La técnica de Neutralización (NT) minimiza la reactividad cruzada y es empleada para descartar falsos resultados positivos. El par serológico debe ser procesado por NT frente a un panel de flavivirus con actividad o potencial actividad dentro de la región geográfica; por comparación de los títulos obtenidos, se puede llegar a inferir –y por ende indirectamente identificar– cuál fue el virus infectante en el caso de personas que experimentan su primera infección por el virus WN. En aquellos individuos que previamente han sido infectados por otro flavivirus, suele presentarse un aumento

de los títulos de anticuerpos que exacerban los cruces serológicos, impidiendo la identificación indirecta del agente por las técnicas serológicas. Se puede intentar el aislamiento del virus en diversas líneas celulares (VERO, C6/36) o la detección del genoma viral por técnicas moleculares, pero son escasas las posibilidades de éxito, ya que los niveles de viremia suelen ser muy bajos y, en general, preceden la sintomatología. Se puede detectar el genoma viral en el LCR del 50% de las personas que desarrollan meningo-encefalitis aguda por WN, por lo que un resultado negativo no descarta la infección, razón por la que se impone la realización de serología. El aislamiento viral puede ser positivo en materiales de autopsia, especialmente en muestras de cerebro y otros órganos sólidos y en personas con aumento de los títulos de virus, tal como se observa con los pacientes inmunosuprimidos.

Los métodos diagnósticos aplicados al estudio de los animales enfermos son similares a los utilizados para las muestras humanas. La selección de la técnica virológica a emplear depende de la especie animal y de su estado clínico.

7. PROFILAXIS

No hay vacunas disponibles para uso humano, si bien hay varias líneas de investigación. Existen vacunas para equinos, pero su eficacia no ha sido definitivamente demostrada.

Por estas razones, la efectiva prevención de las infecciones por virus WN se basa en el desarrollo de programas integrados de vigilancia de arbovirus y en el control de mosquitos vectores.

Un componente fundamental de los programas es la comunicación social, educando a la población en métodos para evitar o disminuir las picaduras de mosquitos como, por ejemplo, limitar las actividades al aire libre durante los períodos en que son más frecuentes las picaduras y utilizar ropas adecuadas y repelentes. El DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) y los repelentes que contienen permetrina son los aconsejados.

8. TRATAMIENTO

No hay un tratamiento específico disponible. Los agentes antivirales que se encuentran en estudio se integran en tres categorías: a) análogos de la purina y pirimidina, tales como la ribavirina, b) interferón y c) inmunoglobulinas humanas. El tratamiento de las infecciones no complicadas es sintomático.

Todos los pacientes con meningo-encefalitis deben ser hospitalizados para recibir tratamiento de sostén. La causa más frecuente de muerte en los casos de encefalitis es la disfunción neuronal, el fallo respiratorio y el edema cerebral.

Agradecimientos: A la Sra. Mara Eraso por tipear los manuscritos y a los Sres. Diego Bonanno y Verónica Fasciani por la confección de figuras y tablas.

Bibliografía

- Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. "West Nile virus. Review". *Lancet Infect Dis* 2002; 2:519-29.
- Guías de vigilancia de Encefalitis por Arbovirus-CDC. 1993. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/resources/wnv-guidelines-vg-2003.pdf>
- Guías de vigilancia del virus del oeste del Nilo- CDC. 2003 y 2004. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/resources/wnv-guidelines-vg-2003.pdf>
- Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. "Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease". *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1167-73.
- Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. "Virology, Pathology, and Clinical Manifestations of West Nile Virus Disease". *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1174-9.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. "Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses". *Nature Med Suppl* 2004; 10: S98-S109.
- Van der Meulen KM, Pensaert MB, Nauwincq HJ. "West Nile virus in the vertebrate world". *Arch Virol* 2005; 150:637-57.
- Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, García J, Visan A, Troño K, et al. "West Nile Virus isolation from equines in Argentina, 2006". *Emerg Infect Dis* 2006; 10: 1559-61.

Hantavirus

Delia A. Enría - María E. Lázaro - Silvana del C. Levis

1. INTRODUCCIÓN

Los hantavirus son virus de distribución mundial que pertenecen a la familia *Bunyaviridae*. Dentro de esta familia constituyen el género *Hantavirus*, que presenta características especiales ya –que a diferencia de los otros cuatro géneros que la integran– no tienen vector artrópodo conocido y la casi totalidad de sus miembros son virus transmitidos por roedores. Recientemente se han identificado nuevos hantavirus en múltiples especies de musarañas (Orden *Soricomorpha*, Familia *Soricidae*) en los Estados Unidos de Norteamérica, Europa y Asia, indicando que estos pequeños mamíferos podrían servir también como hospedadores reservorios de hantavirus. Se requieren estudios adicionales para determinar la ecología y la patogenicidad de estos nuevos miembros del género *Hantavirus*.

2. ESTRUCTURA

Los hantavirus son virus a RNA, de cadena única, y polaridad negativa. Los viriones son generalmente esféricos, algo pleomórficos y de 110 a 120 nm de diámetro; en la superficie exponen proyecciones proteicas de 5 a 10 nm, embebidas en una envoltura lipídica de 5 nm de ancho (Figura 35.1). El genoma viral está constituido por tres segmentos, que se han denominado grande (L), mediano (M) y pequeño (S), o RNA virales (vRNAs). El segmento L (6,5-6,8 kb) –2150 amino ácidos (aa)– codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp); la proteína L actúa al menos como replicasa, transcriptasa y endonucleasa. El segmento M (3,7-3,8 kb) codifica un precursor de la glicoproteína (1132-1148 aa), que se procesa luego en las glicoproteínas de la envoltura viral G1 y G2. El segmento S (1,8-2,1 kb) codifica para la proteína N de la nucleocápside (428-433 aa). El largo del segmento genómico S varía de forma significativa entre los diferentes hantavirus debido sobre todo a la región no codificante 3'. Los extremos 3' y 5' del genoma de los hantavirus son altamente conservados y complementarios, capaces de formar estructuras del tipo *panhandle*. Se piensa que estas estructuras cumplen un rol en la regulación de la transcripción y replicación viral.

3. REPLICACIÓN

La replicación de los hantavirus ocurre exclusivamente en el citoplasma de la célula hospedadora. Se cree que la entrada a ésta ocurre a través de la unión de los viriones a los receptores celulares y posterior endocitosis. Los componentes mínimos de la replicación viral incluyen: la RdRp, la proteína N y los moldes genómicos y antígenómicos. Después de la entrada del virión al citoplasma, la proteína L inicia la síntesis de los RNAs para los segmentos L, M y S, y de los RNA antígenómicos o complementarios, los cuales se acoplan con la proteína N a través de la transcripción y la replicación del genoma. Los viriones se formarían por asociación de las nucleocápsides con las glicoproteínas de la membrana del Golgi, seguido de brotación en las cisternas del Golgi. Los nuevos viriones son transportados en las vesículas secretorias a la membrana plasmática y liberados por exocitosis. Se desconoce si existen factores del hospedador que podrían estar involucrados en la replicación de los hantavirus.

4. EPIDEMIOLOGÍA

Los hantavirus se mantienen en la naturaleza por la infección crónica de roedores que constituyen sus reservorios naturales. La infección en el humano se manifiesta como dos entidades clínicas principales: la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR), endémica en Eurasia, y el síndrome pulmonar por hantavirus (SPH) de distribución panamericana (Figura 35.2).

4.1. HOSPEDADORES RESERVORIOS

Los miembros del género *Hantavirus* se distribuyen en Asia, Europa y América donde se encuentran los roedores mûridos (familia *Muridae*), sus hospederos naturales. Cada hantavirus está asociado primariamente con una especie de roedor hospedador. La alta concordancia observada entre las filogenias de los hospedadores reservorios y la de los hantavirus asociados sugiere una relación muy duradera y de evolución compartida entre ambos. Los hantavirus

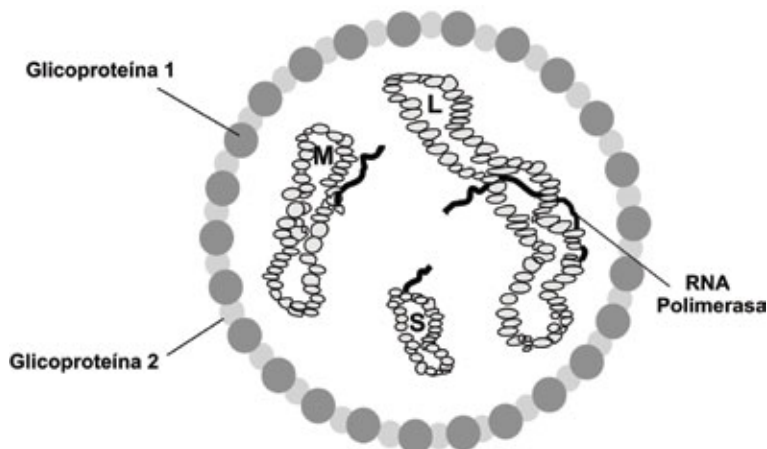


Figura 35.1. Representación esquemática de una partícula de hantavirus.

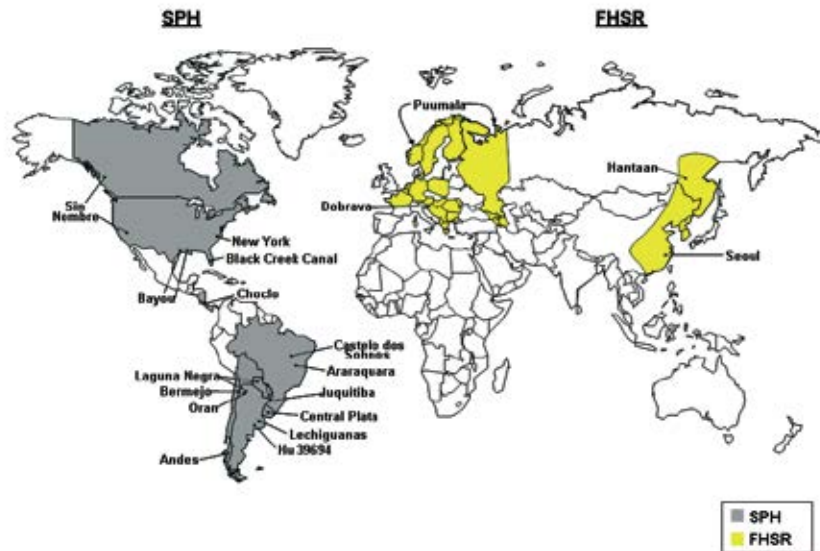


Figura 35.2. Los hantavirus patógenos en el mundo.

del Viejo Mundo, responsables de la FHSR, tienen sus reservorios en roedores de la subfamilia *Murinae* (virus Hantaan, Dobrava y Seoul) y *Arvicolinae* (virus Puumala), mientras que los hantavirus causales de SPH comparten un linaje común del Nuevo Mundo y sus reservorios son miembros de la subfamilia *Sigmodontinae*.

En el roedor hospedero la infección es asintomática. Los animales infectados excretan virus en orina, saliva y heces. La transmisión entre roedores es horizontal.

4.2. INFECCIÓN EN EL HOMBRE

El principal mecanismo de transmisión al hombre es por inhalación de las excretas aerosolizadas aunque también se han comunicado casos aislados por mordedura de roedor. La transmisión interhumana sólo ha sido demostrada para el virus Andes. El período de incubación estimado para las hantaviriosis es de 4 a 42 días (rango medio 9-12 días).

Tanto la FHSR como el SPH predominan en trabajadores rurales con actividades agrícolas, ganaderas o forestales que favorecen la exposición a roedores o sus excretas. La mayoría de los casos se presenta en forma esporádica en varones jóvenes y adultos. A diferencia de las otras hantaviriosis, las infecciones por virus Seoul son urbanas y de distribución mundial por la condición cosmopolita de su reservorio, el *Rattus norvegicus*.

La importancia sanitaria de la FHSR se manifiesta por la notificación de alrededor de 200 000 casos anuales con una letalidad que oscila entre 0,1 y 15% de acuerdo al virus, siendo Hantaan y Dobrava los responsables de las formas más graves.

A partir de la identificación del SPH en EE. UU., el reconocimiento de casos humanos en otros países (Argentina, Bolivia, Brasil, Canadá, Chile, Panamá, Paraguay y Uruguay), así como la caracterización de diversos hantavirus en humanos y roedores, revelaron su amplia circulación en las Américas. Si bien el SPH es una enfermedad de baja incidencia, su impacto sanitario está asociado a la característica presentación fulminante en personas previamente sanas y la elevada letalidad.

4.3. SPH EN ARGENTINA

En Argentina las primeras evidencias de circulación de hantavirus proceden de trabajos realizados en la década de los 80 que demostraron la presencia de anticuerpos en humanos y roedores, mientras que la enfermedad se identificó por primera vez en la región central de Argentina entre casos clínicos de Fiebre hemorrágica argentina

que no se confirmaron virológicamente. Hasta 2009 se han notificado más de 1300 casos distribuidos en 4 regiones endémicas: noroeste (provincias de Salta y Jujuy), noreste (Misiones y Formosa), central (Santa Fe, Buenos Aires y Entre Ríos) y surandina (franja occidental de las provincias de Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz). Más del 80% de los enfermos procede de las áreas noroeste (41%) y central (42%), mientras que los restantes (17%) corresponden al área surandina. En la Tabla 1 se presentan los hantavirus identificados en Argentina con sus respectivos reservorios. Todos ellos se han asociado a enfermedad en el hombre, excepto los virus Pergamino y Maciel.

En las cuatro regiones los casos predominan en ámbitos rurales o semiurbanos y en varones con riesgo de exposición ocupacional y peridomiliar. La transmisión interhumana sólo ha sido demostrada para el virus Andes. Si bien este fenómeno pudo evidenciarse en forma indudable en un brote ocurrido en el área surandina (El Bolsón, Río Negro) en 1996, es posible que ocurra en otras ocasiones y esté asociado a las presentaciones en casos agrupados familiares que se observan en las áreas endémicas de este virus (región surandina argentina y Chile). En dichas zonas también se ha observado mayor proporción de niños que lo comunicado para las infecciones por el virus Sin Nombre (<8%) en los EE. UU. En la región surandina argentina, donde la proporción de infecciones en menores de 16 años alcanza el 20%, la mitad de estos niños se presentaron como casos secundarios luego de la enfermedad de su padre o madre, por lo que es probable que la diferencia observada esté asociada a los grupos familiares y a la transmisión interhumana.

5. CUADRO CLÍNICO

5.1. FIEBRE HEMORRÁGICA CON SÍNDROME RENAL

La enfermedad causada por el virus Hantaan es generalmente grave y tiene una progresión característica en cinco fases: febril, hipotensiva, oligúrica, diurética y de convalecencia. El virus Seoul causa una FHSR similar a la descrita para el virus Hantaan, pero de menor gravedad y letalidad, aunque con un mayor compromiso hepático. Las infecciones por virus Puumala son mucho menos graves que las causadas por el virus Hantaan.

5.2. SÍNDROME PULMONAR POR HANTAVIRUS

La descripción original del SPH corresponde a las infecciones por el virus Sin Nombre, responsable de la mayoría de los casos de EE

UU. La enfermedad se desarrolla en cuatro fases: febril o prodrómica, cardiopulmonar, diurética y de convalecencia.

La fase prodrómica, de 3 a 5 días de duración, se inicia con fiebre y mialgias como síntomas más frecuentes a los que pueden asociarse cefaleas, astenia, náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea. El examen físico, las pruebas de laboratorio clínico y la radiografía de tórax suelen ser normales. Aunque el diagnóstico diferencial con otras enfermedades febriles virales como la influenza es difícil, puede ser de utilidad tener presente que algunas manifestaciones como rinorrea, dolor de garganta, odinofagia, otalgia, sinusitis y meningismo son muy infrecuentes en el SPH. Cuando se presentan síntomas gastrointestinales y dolor abdominal el diagnóstico puede confundirse con el de apendicitis, colecistitis, pielonefritis o enfermedad inflamatoria pelviana. Al final de la etapa prodrómica se agregan tos seca y disnea como manifestaciones del edema pulmonar incipiente anunciando el pasaje a la fase cardiopulmonar. La transición a esta segunda fase suele acompañarse de descenso plaquetario que constituye la alteración de laboratorio más precoz y orientadora.

La fase cardiopulmonar se caracteriza por la rápida progresión hacia la insuficiencia respiratoria y hemodinámica. Los pacientes presentan hipertermia, taquicardia, taquipnea e hipotensión como signos más frecuentes. La taquipnea puede observarse antes de la detección de rales pulmonares o de anomalías radiológicas. La hipoxia progresiva refleja el compromiso respiratorio por edema pulmonar no cardiogénico, producto de las alteraciones de la permeabilidad vascular en ese órgano. El pasaje de líquido proteico al intersticio y alvéolos pulmonares lleva a la hipovolemia, a la cual se suma depresión de la función miocárdica, favoreciendo la hipotensión y el shock. El patrón hemodinámico clásico se presenta con bajo gasto cardíaco, alta resistencia periférica e hipotensión grave. En la radiografía de tórax es característica la progresión a los infiltrados intersticiales o intersticio-alveolares difusos bilaterales; el derrame pleural es frecuente pero resulta más evidente en los estudios ecográficos. En esta fase las alteraciones de laboratorio son plaquetopenia, hematocrito elevado, leucocitosis con desviación de la fórmula a la izquierda y presencia de inmunoblastos en el frotis de sangre periférica. Puede haber aumento leve o moderado de las transaminasas hepáticas con fosfatasa alcalina normal o levemente aumentada y bilirrubina normal. Otras alteraciones incluyen elevación de láctico deshidrogenasa, hipoalbuminemia, hipocolesterolemia y prolongación de los tiempos de protrombina y de tromboplastina. De acuerdo a la evolución se distinguen una forma grave con requerimiento de asistencia respiratoria mecánica e inotrópicos (generalmente dentro de las 48 horas de internación) asociada a elevada letalidad y una forma moderada con evolución favorable. En esta etapa, los diagnósticos diferenciales más frecuentes incluyen los de neumonía bilateral por distintos agentes, sepsis

y cuadros de dificultad respiratoria por causas infecciosas o tóxicas. Algunas enfermedades endémicas como peste, tularemia, fiebres hemorrágicas virales asociadas a los arnavirus Junín, Machupo, Sabia y Guanarito, al dengue y a leptospirosis deben ser consideradas de acuerdo a su prevalencia regional.

La fase diurética se asocia a la rápida resolución del fallo respiratorio y hemodinámico y a la desaparición de la fiebre. La convalecencia suele prolongarse por varias semanas e incluso meses.

6. PATOGENIA

Tanto la FHSR como el SPH tienen similitudes en su patogenia. En las dos enfermedades, los anticuerpos están presentes desde las etapas tempranas y se encuentran linfocitos T activados en sangre periférica. En las autopsias de pacientes con fiebre hemorrágica asociada al virus Hantaan, se han descrito anomalías vasculares generalizadas, incluyendo congestión vascular, extravasación de eritrocitos y edema perivascular. La tríada que se describe es hemorragia del atrio derecho, de la región anterior de la glándula pituitaria y de la medular renal. En las infecciones por el virus Sin Nombre, las manifestaciones histopatológicas más consistentes se observan en el pulmón y el bazo. En los pulmones, el hallazgo básico es una neumonitis intersticial con infiltrado de células mononucleares, congestión y edema intersticial e intraalveolar. La escasa lesión histológica para explicar el desorden orgánico funcional y la muerte han sugerido la idea de que los hantavirus inducen alteración de la función sin muerte celular evidente. En el SPH, el edema pulmonar juega un rol esencial en el desenlace fatal de la enfermedad y el desorden del endotelio vascular parece ser central en la patogénesis. Se piensa que la base de estas alteraciones es fundamentalmente una consecuencia de la respuesta inmune a los virus. Se han descrito infiltrados linfoides en los pulmones con una combinación de linfocitos T, en particular aquellos que expresan CD8, y de macrófagos. Los datos disponibles sustentan la hipótesis de que la inmunidad celular mediada por células T activadas puede resultar en la injuria pulmonar que se observa en el SPH.

7. TRATAMIENTO

El tratamiento de los pacientes con FHSR se basa en adecuadas medidas de sostén, con apoyo de los cuidados intensivos en los casos más graves. El uso de la ribavirina redujo significativamente la letalidad cuando se administró de forma temprana en el curso de la enfermedad.

No existe un tratamiento específico efectivo para las infecciones por hantavirus del Nuevo Mundo, por lo que las medidas terapéuticas son sobre todo de soporte. La ribavirina no resultó eficaz. Uno de los problemas que limitan su posibilidad terapéutica en el SPH es la dificultad de administrar la droga precozmente en el período

Virus	Reservorio	Enfermedad	Localización geográfica
Orán	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	SPH ¹	Jujuy, Salta
Bermejo	<i>O. flavescens</i>	SPH	Jujuy
Laguna Negra	<i>Calomys callosus</i>	SPH	Jujuy
Lechiguanas	<i>O. flavescens</i>	SPH	Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos
Hu 39694	<i>O. flavescens</i>	SPH	Buenos Aires
Pergamino	<i>Akodon azarae</i>	No reconocida	Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos
Maciel	<i>Necromys benefactus</i>	No reconocida	Santa Fe
Andes	<i>O. longicaudatus</i>	SPH	Río Negro, Neuquén, Chubut
Juquitiba	<i>O. nigripes</i>	SPH	Misiones

Tabla 35.1. Hantavirus circulantes en Argentina. Reservorios roedores, enfermedad asociada y distribución geográfica.

¹ SPH: Síndrome pulmonar por hantavirus.

prodromico. En ausencia de una terapia efectiva, el tratamiento del SPH se basa en el manejo cuidadoso de la hidratación, el monitoreo hemodinámico y el soporte ventilatorio. Debe indicarse un antibiótico de amplio espectro debido a los diferentes diagnósticos diferenciales. Se ha sugerido el uso de corticoides sobre la hipótesis de que la modificación de la respuesta inmune podría ser beneficiosa. Su rol en el tratamiento de este síndrome no es claro y requiere una cuidadosa evaluación.

8. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

El diagnóstico etiológico de las infecciones por hantavirus se puede realizar a partir de muestras de sangre y de órganos en los casos fatales, en particular de pulmón.

El aislamiento de los hantavirus de especímenes clínicos plantea grandes dificultades. Son virus difíciles de cultivar, de multiplicación lenta y que requieren para su manipulación laboratorios de nivel 3 de bioseguridad, razones por las que el aislamiento no es una técnica utilizada con fines diagnósticos.

La reactividad serológica cruzada entre los miembros del género *Hantavirus* es elevada. En la infección humana, los anticuerpos contra la proteína N y G1 aparecen durante la fase aguda de la enfermedad mientras que los dirigidos contra G2 aparecen de forma tardía, en la convalecencia. Se han desarrollado ensayos específicos de diagnóstico serológico utilizando antígenos crudos y recombinantes de la proteína N expresada en *Escherichia coli* o mediante *baculovirus*.

La detección de anticuerpos Ig M por enzimoimmunoensayo (ELISA) es el ensayo de elección en el diagnóstico, dado que la mayoría de los casos de SPH presenta este tipo de anticuerpos en el período agudo de la enfermedad y permanecen detectables durante

3-6 meses. La aparición de Ig G específica ocurre pocos días después de la aparición de Ig M, pudiendo perdurar en niveles elevados durante varios años.

La seroconversión por Ig G mediante la técnica de ELISA se realiza en muestras pareadas del período agudo y de convalecencia de los enfermos.

La utilización de la técnica de PCR previa transcripción inversa (RT-PCR) permite la detección de RNA viral en sangre entera, coágulo o tejidos obtenidos en los primeros 10 días de la enfermedad, como así también en tejidos de roedores infectados. Esta prueba, seguida de la secuenciación nucleotídica de los fragmentos amplificados, permite, además, a diferencia de los ensayos serológicos, distinguir entre cepas virales.

La inmunohistoquímica es una técnica de gran utilidad en la demostración de antígeno viral en tejidos, en especial en los casos fatales en los que no se dispone de otro tipo de muestra.

9. PROFILAXIS

La reducción del contacto de los humanos con los roedores es la clave de la prevención. La disminución del riesgo personal se basa en los principios de control de roedores y de la infección. La aplicación de normas de bioseguridad en el manejo de los pacientes debe respetarse a fin de reducir la posibilidad de transmisión interhumana (ver capítulo de Bioseguridad). No existen vacunas para los hantavirus del Nuevo Mundo. En Asia se dispone de varios candidatos a vacunas a virus inactivados que parecen ser efectivas contra los virus Hantaan y Seoul, con escasos efectos adversos.

Agradecimientos: A la Sra. Mara Eraso por tipear los manuscritos y a los Sres. Diego Bonanno y Verónica Fasciani por la confección de figuras y tablas.

Bibliografía

- Enria DA, Briggiler AM, Pini N, Levis S. "Clinical manifestations of New World Hantaviruses". En: Schmaljohn C.S. y S.T. Nichol (eds.): *Curr Top Microbiol Immunol* Vol 256. Hantaviruses. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2001; 117-130.
- Kang HJ, Bennett SN, Dizney L, Sumibcay L, Arai S, Ruedas LA, et al. Host switch during evolution of a genetically distinct hantavirus in the American shrew mole (*Neurotrichus gibbsii*). *Virology* 2009;388:8-14.
- Lázaro M, Resa A, Barclay C, Calanni L, Samengo L, Martínez L, et al. "Síndrome pulmonar por hantavirus en el sur andino argentino". *Medicina* (Buenos Aires) 2000; 60:289-301.
- Levis S, Morzunov S, Rowe J, Enria D, Calderon G, Pini N, et al. "Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina". *J Infect Dis* 1998; 177:529-38.
- OPS. "Hantavirus en las Américas: Guía para el diagnóstico, el tratamiento, la prevención y el control". *OPS. Cuaderno técnico* N° 47, 1999.
- Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. "Hantaviruses: Genome structure, expression and evolution". *J Gen Virol* 1996; 77: 2677-87.



Síndrome respiratorio agudo grave

Julietta Trinks - José Raúl Oubiña

1. RESEÑA HISTÓRICA

A comienzos de 2003, los primeros casos de pacientes afectados con una neumonía atípica severa sin causa aparente fueron reportados en Hong Kong. Sin embargo, posteriormente se conoció que, en noviembre de 2002, había ocurrido un brote en la provincia china de Guangdong que no había sido notificado. Rápidamente, reportes de casos similares se presentaron en varios países del sudeste asiático, Europa y América, resultando Canadá, China, Hong Kong, Singapur, Taiwán y Vietnam las áreas más afectadas.

En marzo de 2003, este síndrome fue designado *Severe acute respiratory syndrome* (SARS) o *Síndrome Respiratorio Agudo Grave*, caracterizado por fiebre, tos, disnea y el desarrollo de neumonía que puede progresar a compromiso pulmonar bilateral y falla respiratoria. Se trata de una enfermedad infecciosa de muy alta contagiosidad y con una tasa de mortalidad global cercana al 10%. A partir de ese momento, esfuerzos globales se aunaron para detectar el agente etiológico de esta epidemia y evitar su diseminación.

Con ese objetivo, muestras de sangre, suero, hisopado nasofaríngeo, lavado o hisopado orofaríngeo, tejidos de órganos de autopsia y heces de pacientes, cuyo cuadro clínico reunía las características del SARS, fueron recolectadas y remitidas a los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta, EE.UU.

Descartadas inicialmente infecciones por otros patógenos del tracto respiratorio inferior en tan sólo cuatro semanas, la cooperación internacional de expertos de no menos de 10 países, permitió identificar dos virus en pacientes afectados por el SARS: un nuevo coronavirus (Flia. *Coronaviridae*) y –en algunos pacientes– también un metapneumovirus (Flia. *Paramyxoviridae*). Estudios simultáneos llevados a cabo en Europa documentaron también la presencia de dicho coronavirus en aislamientos independientes y no relacionados a los reportados en el CDC. La demostración de anticuerpos específicos en pacientes que sobrevivían a la enfermedad (y ausentes en cientos de sueros controles), sugería que el nuevo coronavirus podía ser el agente etiológico del SARS. Subsiguientes estudios confirmaron la asociación de este último con la enfermedad, al demostrarse que el nuevo coronavirus (SARS-CoV) aislado de cultivos celulares inoculados con muestras de pacientes con SARS, producía una enfermedad respiratoria semejante en primates, cumpliendo así con los postulados de Koch. Este estudio confirmó al SARS-CoV como el agente etiológico del SARS, en ausencia de la coinfección con el metapneumovirus.

La utilización combinada de ensayos habituales para el estudio de virus (cultivos celulares para el aislamiento, microscopía electrónica [ME]) con tinción negativa para la visualización del agente, y la ulterior caracterización genética molecular, así como la reactividad del suero de convalecientes del SARS frente a antígenos del nuevo coronavirus, comprobaron el rol etiológico de éste. A continuación se describen los procedimientos que permitieron la identificación del nuevo agente en 2003.

2. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO

2.1. AISLAMIENTO EN CULTIVOS CELULARES

Al cabo de 5 días de inoculadas las muestras clínicas en cultivos de células Vero E6 se observaba un efecto citopático focal consistente en

redondeamiento y refringencia celular, a lo que seguía días después el desprendimiento de las células de la monocapa (Figura 36.1A y B).

2.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En los cortes ultrafinos pudieron observarse partículas redondeadas de 100 a 150 nm de diámetro, con una envoltura cuyo diámetro oscilaba entre 80-140 nm, que exhibía complejas proyecciones (espículas) de superficie (20-40 nm) rodeando su periferia, una cápside helicoidal de estructura tubular y un centro electrón-denso. Las partículas se observaban brotando desde el citoplasma hacia el interior del retículo endoplásmico rugoso, asociadas a las cisternas del retículo endoplásmico rugoso, en vesículas, y en grupos adheridos a la membrana plasmática. Por tinción negativa se observaban partículas redondeadas que contenían una nucleocápside helicoidal y una envoltura con gruesas espículas, características de los Coronavirus (Figura 36.2).

2.3. ANÁLISIS MOLECULAR

La adscripción morfológica del virus aislado a la familia *Coronaviridae*, sugirió la utilización inicial de cebadores *consenso* para la

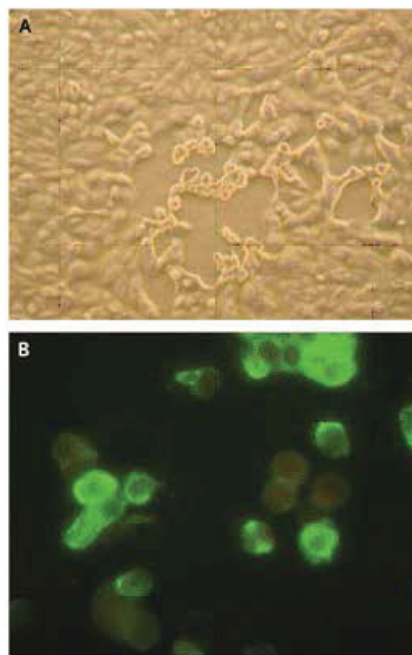


Figura 36.1. A. Imagen al microscopio óptico del efecto citopático producido por el coronavirus asociado al SARS en células Vero E6 (40x). **36.1. B:** Inmunofluorescencia indirecta demostrando la expresión de antígenos del coronavirus asociado al SARS al reaccionar con el suero de un paciente convaleciente de la enfermedad (400x). Reproducido –con autorización– del *N Engl J Med*, 2003, 348: 1953-66.

detección mediante RT-PCR y ulterior caracterización genómica del nuevo agente viral. La familia *Coronaviridae* es una familia diversa de virus envueltos, con genoma a RNA y de polaridad positiva causantes de enfermedad respiratoria y entérica en humanos y animales. Teniendo en cuenta el análisis filogenético, existían hasta entonces tres grupos de coronavirus: los grupos 1 y 2 constituidos por virus de mamíferos, y el grupo 3 por virus aviarios. Dentro de cada grupo, estos virus se clasifican en distintas especies según el rango de hospederos, relaciones antigénicas, y organización genómica. El genoma de los coronavirus humanos previamente conocidos se agrupaba tanto en el grupo 1 (por ejemplo, HCoV-229E), como en el grupo 2 (HCoV-OC43), siendo dichos agentes responsables de aproximadamente el 30% de las enfermedades leves del tracto respiratorio superior. Se estableció entonces que el coronavirus responsable del SARS no podía ser incluido dentro de grupo alguno entre los existentes, constituyéndose en el único miembro de un cuarto grupo filogenético.

2.4. ESTRUCTURA DEL GENOMA VIRAL

Actualmente, se reconoce que el genoma del SARS-CoV consta de 29,7 kb. Su organización genómica exhibe similitudes con otros miembros de la familia, aunque no codifica para una hemaglutinina-esterasa, habitual entre otros coronavirus del grupo 2. A partir del análisis de genomas completos de diversos aislamientos, se postula que el SARS-CoV se encuentra organizado en 9 genes con 14 marcos abiertos de lectura (ORFs). Algunos de estos genes codifican para proteínas comunes a todos los coronavirus conocidos (Figura 36.3), de naturaleza no estructural (poliproteína de la replicasa) o estructural (de nucleocápside [N], de espículas [S, en inglés, *Spike*], pequeña de envoltura [E], o glicoproteína de membrana [M]).

Los primeros dos tercios del genoma están comprendidos por el gen de la replicasa (ORFs 1a y 1b), que codifica para 2 poliproteínas (pp1a y pp1ab). El procesamiento proteolítico de las mismas, mediado por proteasas virales (PLP [proteasa símil-papaína] y 3CLpro [proteasa símil-3C]), genera proteínas no estructurales

(por ejemplo, Proteasas [NSP1, NSP2], polimerasa [NSP9], helicasa/NTPasa [NSP10]), responsables de la replicación del genoma viral y/o de la generación de RNA mensajeros subgenómicos que facilitan la expresión de los restantes ORFs del genoma. Todo el proceso de replicación viral ocurre en el citoplasma de la célula infectada.

Los ORFs de las proteínas estructurales (S, E, M y N) se localizan en la porción restante del genoma, ubicándose entre estos genes, los ORFs de las proteínas accesorias. (Figura 36.3) El número de proteínas accesorias codificadas –así como la secuencia nucleotídica de las mismas– presenta variaciones en cada coronavirus, aunque existiría cierto grado de conservación entre los integrantes de un mismo grupo. En el caso del SARS-CoV, su genoma codifica para 8 proteínas accesorias (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b).

3. PATOGENESIS

3.1. TROPISMO VIRAL Y RECEPTORES CELULARES

SARS-CoV fue aislado no sólo a partir de muestras de pulmón e intestino, sino también en hígado, riñón, cerebro, glándulas sudoríparas, paratiroides, pituitaria, páncreas y adrenales. Estos hallazgos sugieren que el SARS es una enfermedad sistémica con diseminación extrapulmonar generalizada, dando como resultado la presencia del virus en secreciones respiratorias, heces, orina y probablemente sudor.

A diferencia de los resultados arrojados por estudios histopatológicos realizados en muestras de tejido pulmonar, la arquitectura del intestino se encuentra levemente alterada (a pesar de la replicación viral activa en los enterocitos). Se ha especulado que la ausencia de inflamación y destrucción respondería a la sobreexpresión de una potente citoquina inmunosupresora (TGF- β) y a la respuesta antiapoptótica desencadenada desde el epitelio intestinal, respectivamente.

SARS-CoV, al igual que el resto de los coronavirus, interactúa con receptores celulares (a través de las proteínas de las espículas) para mediar la infección de sus células blanco. ACE 2 (*angiotensin*

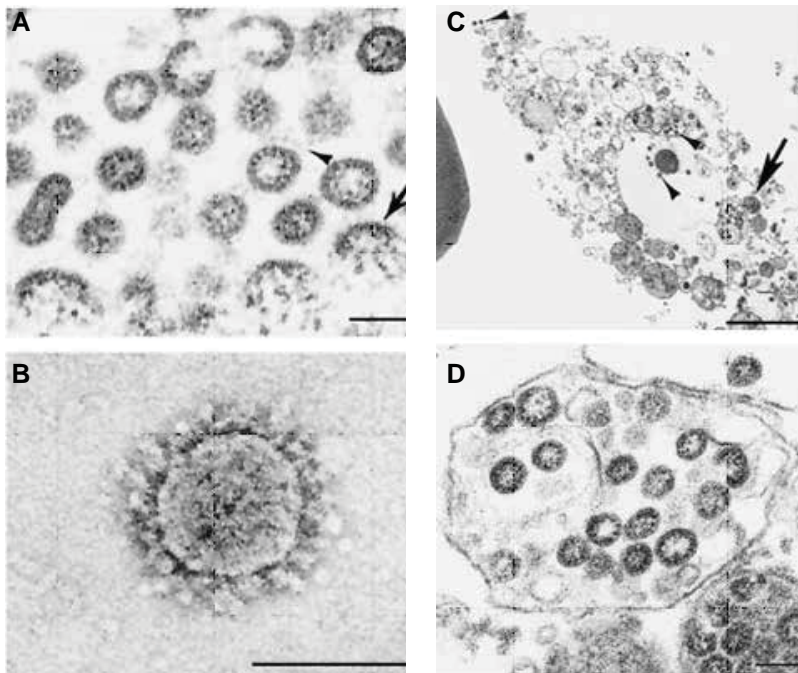


Figura 36.2. ME del coronavirus asociado al SARS. Imágenes obtenidas a partir de cultivos de células Vero infectadas con una muestra de paciente (A y B) y a partir de células de lavado broncoalveolar de un paciente con SARS (C y D). La barra representa 100 nm en los paneles A, B y D, y 1 micrón en C. La imagen D muestra a mayor aumento lo que indica la flecha en el panel C. Reproducido –con autorización– del *N Engl J Med*, 2003, 348:1953-66.

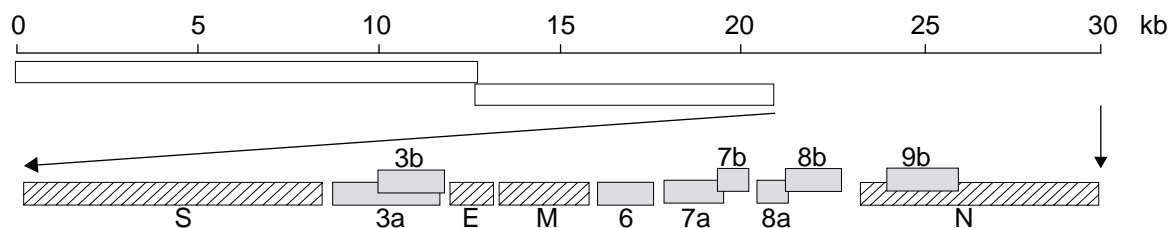


Figura 36.3. Estructura del genoma de SARS-CoV. Los 2/3 iniciales del genoma codifican para dos poliproteínas a partir del gen de la replicasa (rectángulos blancos). Los marcos abiertos de lectura en el tercio restante del genoma viral dan origen a 8 RNA mensajeros subgenómicos. Cuatro de ellos codifican las proteínas estructurales (rectángulos con rayas diagonales): proteínas de espículas (S), de membrana (M), de envoltura (E) y nucleocápside (N). Los rectángulos coloreados en gris representan a los 8 marcos abiertos de lectura de las proteínas accesorias propias del SARS-CoV (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b). Adaptado de *Antiviral Res* 2006;72:78-88.

converting enzyme 2 ó enzima convertidora de la angiotensina 2) constituye un receptor funcional para el SARS-CoV, siendo críticos para esta interacción los aminoácidos 270 a 510 de la proteína estructural S. Después de la unión al receptor, la proteína S experimenta un cambio conformacional por asociación de sus regiones HR (*Heptad repeat Region*, un dominio repetido de 7 aa.) 1 y HR2 permitiendo su fusión con la membrana plasmática y, de esta manera, facilitando el ingreso viral preferentemente por el polo apical. ACE 2 está presente en la superficie de la luz del epitelio tráqueo-bronquial y alveolar, aunque no en células del sistema inmune, epitelio colónico ni neuronas. Sin embargo, la infección de estas células por el SARS-CoV sugiere la existencia de receptores alternativos. Para actuar como receptor viral, ACE 2 requiere de la actividad proteolítica de la L catepsina, lo que podría justificar también la razón por la que ciertas células que expresan ACE 2 no se infectan (endoteliales, musculares). ACE 2 es una enzima que inhibe la actividad de ACE sobre el sistema renina-angiotensina, y disminuye la producción de angiotensina II. ACE 2 desempeña un rol protector sobre la injuria tisular aguda del pulmón, en contraposición con ACE y angiotensina II. La unión del SARS-CoV a ACE 2 inhibe su expresión en superficie y, por ende, su efecto protector, lo que podría contribuir a la severidad de la lesión pulmonar observada en pacientes con SARS.

Otra vía de ingreso del SARS-CoV a la célula, también mediada por la proteína estructural S, es la endocitosis dependiente de pH. Más aún, la proteína de las espículas posee capacidad de unión a DC-SIGN, expresada en células dendríticas. Sin embargo, SARS-CoV no parecería infectar productivamente a esta población celular. No obstante, la mera unión a la membrana plasmática de las células dendríticas facilitaría el acceso de este nuevo coronavirus a aquellas células que expresan el receptor funcional ACE 2 (evento de transfección, semejante a una *sinapsis* celular). DC-SIGN puede ser expresada en neumocitos como resultado de la infección con SARS-CoV. También se ha postulado que L-SIGN podría funcionar como molécula receptora para el virus. Ambas moléculas (DC-SIGN y L-SIGN) parecen ser menos eficientes que ACE 2 como receptores, y serían meros potenciadores de la infección de células permisivas.

El deterioro orgánico presente en los pacientes con SARS podría ser resultado tanto de la replicación viral local (efecto citopático), de la infección y destrucción de células del sistema inmune (macrófagos/monocitos y linfocitos), como de la consiguiente respuesta inmune alterada desarrollada por el propio hospedero (Figura 36.4).

3.2. EFECTO CITOPÁTICO VIRAL: ROL DE LAS PROTEÍNAS VIRALES

Es probable que el efecto citopático contribuya a la patogénesis de la infección, como lo sugiere la presencia de células multinucleadas gigantes en los pulmones de algunos pacientes. Tanto las

proteínas estructurales como no estructurales han sido asociadas a eventos de apoptosis *in vivo* en células epiteliales, neumocitos, monocitos/macrófagos, linfocitos y hepatocitos. La inducción de la expresión de TGF β 1 en células pulmonares potencia la apoptosis mediada por Fas.

3.2.1. Proteínas de la replicasa.

Además de cumplir funciones importantes en el mecanismo de replicación viral, se encuentran involucradas en mecanismos de señalización celular, virulencia y modificación de la expresión génica celular. Los roles de algunas de las proteínas no estructurales de la replicasa en la patogénesis del SARS se encuentran resumidos en la Tabla 36.1.

3.2.2. Proteínas estructurales

No sólo conforman la estructura del virión, sino que también interpondrían en la modificación del ambiente intracelular, mecanismos de señalización e inducción de la respuesta inmune. Cabe destacar que un reciente estudio demostró que la proteína de la nucleocápside desencadena la apoptosis en cultivos celulares a partir de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de citocromo c al citoplasma con la subsiguiente activación de caspasa 3 y el clivaje del DNA celular.

3.2.3 Proteínas accesorias

Si bien no desempeñan función alguna en el proceso de replicación viral en cultivos celulares, se observó recientemente que su delección limita la replicación del SARS-CoV en ratones infectados, que presentan una infección asintomática. Estas proteínas virales resultarían importantes para la interacción virus-hospedero y, por lo tanto, contribuirían como factores de virulencia a la patogénesis *in vivo*. Hasta el momento, se han estudiado los efectos de la sobreexpresión de algunas de las proteínas accesorias (3a, 3b, 6 y 7a) sobre la homeostasis celular (Tabla 36.2), desconociéndose aún la función de las restantes.

3.3. RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune participa a través de la génesis de mecanismos indirectos de lesión mediados por anticuerpos (autoanticuerpos que reaccionan contra el epitelio/endotelio pulmonar causando lesiones citotóxicas que, además, pueden promover vasculitis sistémicas por inmunocomplejos), y por linfocitos T citotóxicos que contribuyen al daño del tejido pulmonar. La reacción cruzada de anticuerpos anti-S que reaccionan contra antígenos del epitelio pulmonar y la exposición de autoantígenos celulares durante la injuria tisular explican los fenómenos de autoinmunidad. Aproximadamente un 50% de los monocitos y un 30% de los linfocitos circulantes durante la etapa aguda están infectados, lo que contribuye a la linfopenia y significativa destrucción del tejido esplénico y ganglionar linfático.

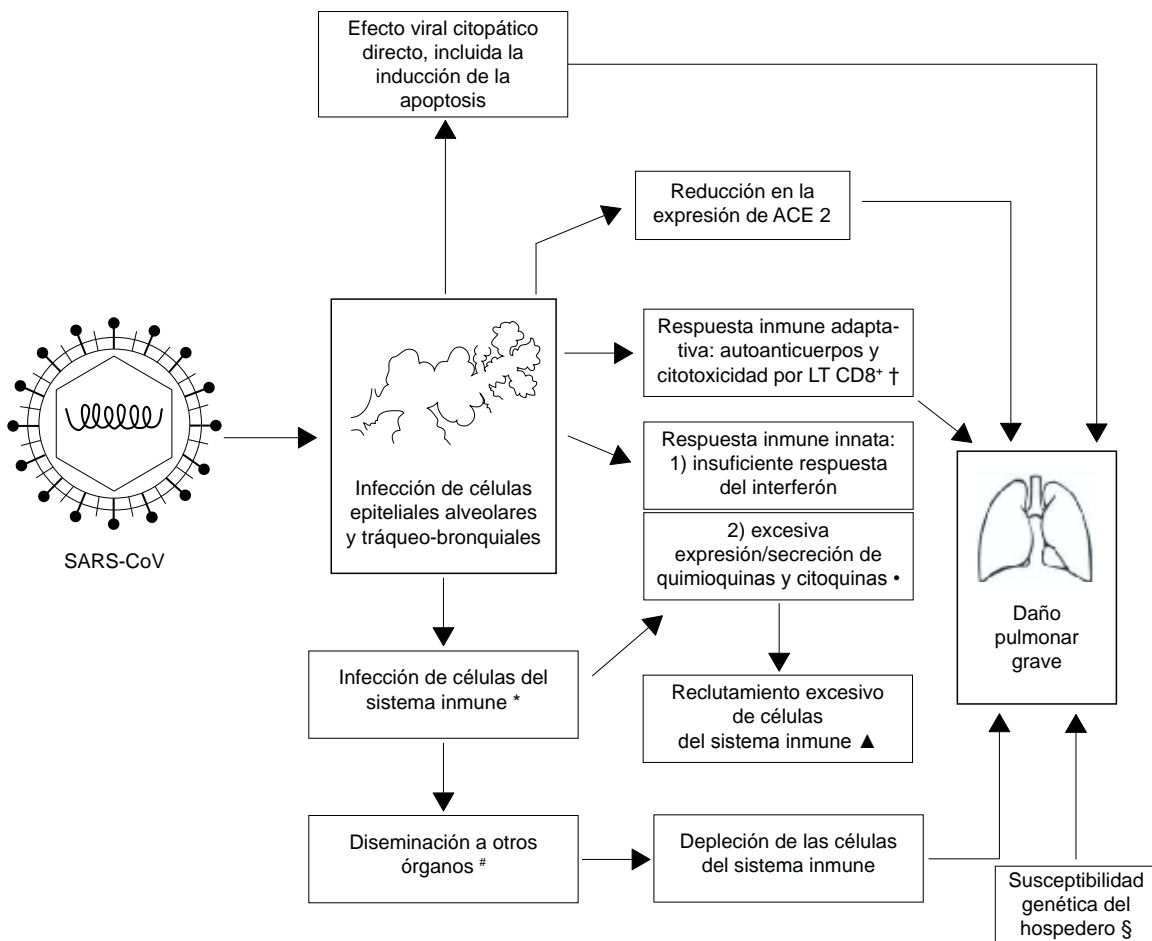


Figura 36.4. Principales mecanismos contribuyentes a la patogénesis de la infección por SARS-CoV. Estos eventos patológicos y su cascada de cambios constituyen la base de los síntomas clínicos y de los hallazgos patológicos en los distintos estadios de la infección (Adaptado de *Am J Pathol* 2007;170:1136-1147). * Macrófagos/monocitos, linfocitos y células dendríticas. / # Intestino, riñones y cerebro. / † Autoanticuerpos dirigidos contra el epitelio y endotelio pulmonar. / • incluidas MIP-1 α , RANTES, IP-10, IL-1, IL-8, TNF- α , TGF- β 1 y MCP-1. / ▲ Principalmente monocitos, neutrófilos y linfocitos T activados. / § Genotipos asociados a niveles séricos bajos o deficientes de MBL se vinculan con un aumento en la susceptibilidad del hospedero a la infección por SARS-CoV y/o un incremento en la gravedad de la enfermedad, al igual que se observa en quienes exhiben las moléculas HLA-B*0703 y HLA-DRB1-0301.

3.3.1. Respuesta inmune innata

Como se mencionó anteriormente, SARS-CoV no es capaz de infectar a los macrófagos ni a las células dendríticas productivamente en forma significativa. Solamente puede unirse a ellas, logrando así su diseminación por todo el organismo. Más aún, este nuevo coronavirus disminuye la actividad fagocítica de los macrófagos, mientras que al mismo tiempo incrementa la habilidad de estimular a células T. A pesar de la existencia de posiciones encontradas, el consenso general establece que el SARS-CoV activa la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12), lo que contribuiría al desarrollo de las imágenes histopatológicas evidenciadas en las biopsias de tejido pulmonar provenientes de pacientes infectados. Paralelamente, se han registrado incrementos de quimioquinas (IL-8, MCP-1 e IP-10) y citoquinas secretadas tanto por linfocitos Th1 (IFN- γ) como Th2 (IL-10).

La unión de las proteínas glicosiladas del SARS-CoV a las lectinas, como las proteínas A y D del surfactante pulmonar y la lectina de unión a manosa (MBL, *manose binding lectin*) presentes en el suero, desempeña un rol protector contra el desarrollo de la infección. Sin embargo, este virus presentaría mecanismos adicionales de evasión a la respuesta inmune innata, como por ejemplo la inhibición del sistema de defensa de los interferones tipo 1 (IFN- α y β).

3.3.2. Respuesta inmune adaptativa

En respuesta a la infección por SARS-CoV, el sistema inmune humoral genera anticuerpos neutralizantes dirigidos principalmente contra dos proteínas virales muy inmunogénicas: N y S (especialmente la región S1). Adicionalmente, se ha reportado que estas proteínas estructurales poseen epítopes que les permiten inducir una respuesta citotóxica específica y protectora.

En el suero de pacientes con SARS, también se han detectado anticuerpos dirigidos contra todas las proteínas accesorias; pero especialmente contra la proteína 3a, sugiriendo que ésta es la más abundante o inmunogénica entre ellas. Si bien hasta el momento no se ha podido demostrar que los anticuerpos anti-3a sean capaces de inhibir la infección viral, se evidenció la presentación de dicha proteína al sistema inmune durante la infección, sugiriendo que podría estimular respuestas inmunes protectoras en pacientes infectados.

El sistema de defensa de las células T se encuentra severamente deplecionado en sus subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺. Se desconoce el mecanismo molecular subyacente, aunque se ha planteado que respondería a la inducción de la apoptosis de los linfocitos no infectados probablemente mediada por la sobre-expresión de la proteína accesoria 7a.

<i>Proteína no estructural</i>	<i>Efectos</i>
1	Degrada el RNAm celular, inhibiendo de esta manera la expresión de genes de respuesta inmune como IFN- α . Incrementa la expresión de quimioquinas (CCL5, CXCL10 y CCL3) por una vía mediada por NF κ -B.
3	Posee actividad de proteasa y se encuentra involucrada en mecanismos de interacción virus-célula.
4	También llamada MP1 (proteína de membrana 1). Junto con las proteínas no estructurales 3 y 6 actuaría anclando los complejos de replicación viral en la membrana de vesículas citoplasmáticas.
14	Se asocia con las proteínas no estructurales 15 y 16 en el procesamiento y modificación del RNA celular y viral.

Tabla 36.1. Efectos de las proteínas no estructurales de la replicasa del SARS-CoV sobre las funciones celulares.

<i>Proteína accesoria</i>	<i>Efecto sobre las funciones celulares</i>
3a	Incrementa la expresión de fibrinógeno en los neumocitos. Induce apoptosis por un mecanismo dependiente de caspasa 8. Detiene el ciclo celular en G1 por reducción de los niveles de ciclina D3 e inhibición de la fosforilación de pRB.
3b	Detiene el ciclo celular en la fase G0/G1. Induce apoptosis.
6	Aumenta la virulencia de un coronavirus murino atenuado. Incrementa la síntesis de DNA.
7a	Induce apoptosis al inhibir la síntesis de las proteínas celulares e interferir con las funciones anti-apoptóticas de Bcl-X _L en linfocitos T. Induce la fosforilación y activación de la p38 MAPK. Bloquea la progresión del ciclo celular en la fase G0/G1.

Tabla 36.2. Efectos de las proteínas accesorias del SARS-CoV sobre las funciones celulares.

3.4. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA DEL HOSPEDERO

De acuerdo con recientes estudios, distintos haplotipos han sido asociados significativamente con un riesgo elevado de padecer SARS, como se detectó por ejemplo en individuos portadores del haplotipo YB de baja producción de MBL, y en quienes exhiben HLA-B*0703 y HLA-DRB1*0301. Individuos homocigotas para L-SIGN exhiben un menor riesgo de infección por SARS-CoV. Los polimorfismos del gen ACE 2 no fueron asociados con la susceptibilidad al SARS.

4. CUADRO CLÍNICO Y LABORATORIO

Luego de un período de incubación que habitualmente es de 2 a 10 días (se han reportado rangos que oscilan entre 1 a 16 días), la enfermedad comienza con una fase inicial, que dura de 3 a 7 días, con fiebre que típicamente es mayor de 38,5° C. En ese período puede haber síntomas respiratorios leves como tos y otras manifestaciones inespecíficas (por ejemplo, diarrea, exantema, etc.). Luego se manifiestan los síntomas respiratorios clásicos: tos no productiva y, en algunos pacientes, dificultad respiratoria con hipoxemia severa. Un 10-20% de los afectados presenta insuficiencia respiratoria que requiere asistencia respiratoria mecánica. Algunos pacientes presentan enfermedad leve y/u oligosintomática. Otros síntomas

menos frecuentes son: cefaleas, dolores y rigidez muscular, anorexia, astenia, confusión, además del exantema y diarrea ya mencionados.

La mortalidad global es cercana al 10%, aunque alcanza el 50% en mayores de 60 años. El pronóstico es favorable en los casos pediátricos.

La linfopenia es una característica común del SARS. Al inicio el recuento de glóbulos blancos está disminuido o es normal, registrándose los niveles más bajos en la segunda semana y recuperándose en la tercera. El descenso de las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ se asocia a un peor pronóstico. Por lo tanto, la linfopenia refleja la severidad de la infección y podría ser un buen marcador de enfermedad activa.

Al progresar la enfermedad, el 50% de los pacientes presenta leucopenia y trombocitopenia. Se ha reportado elevación de las CPK, LDH y de las transaminasas. La positividad para la proteína C reactiva ha sido asociada a casos fatales.

La radiografía de tórax puede ser normal, aunque lo más frecuente es la presencia de infiltrados intersticiales; ocasionalmente puede haber consolidación.

Cabe destacar que, aunque el síndrome recibió su nombre por la severidad de las manifestaciones respiratorias que condujeron a centenares de casos fatales, existen incontestables fundamentos clínicos, bioquímicos y diagnósticos que avalan la conclusión de

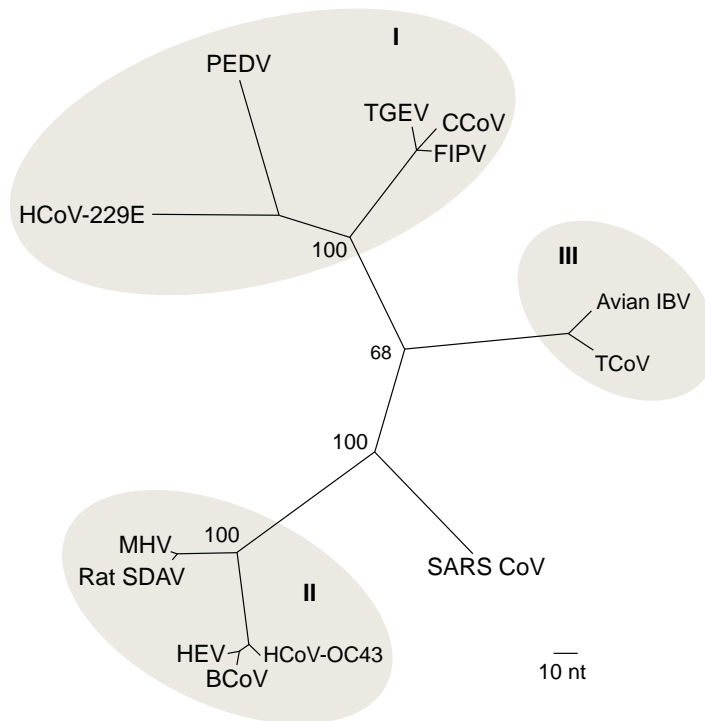


Figura 36.5. Análisis filogenético basado en secuencias nucleotídicas parciales de genomas de coronavirus humanos (HCoV)-OC43 y 229E (conocidos agentes del resfrío común), del nuevo coronavirus (SARS CoV) y de otras especies animales (CcoV: canine coronavirus; FIPV: feline infectious peritonitis virus; TGEV: porcine transmissible gastroenteritis virus; PEDV: porcine epidemic diarrhea virus; BCoV: bovine coronavirus; HEV: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus; SDAV: rat sialodacryoadenitis virus; MHV: mouse hepatitis virus; TCoV: turkey coronavirus; IBV: avian infectious bronchitis virus). Los números árabigos en las ramas del árbol representan la reproducibilidad de la topología del agrupamiento de secuencias nucleotídicas (máximo valor = 100). Reproducido –con autorización– del *N Engl J Med* 2003;348:1953-66.



que el SARS-CoV es capaz de alguna forma de replicar, diseminarse y provocar una enfermedad sistémica. Este modelo de infección es consistente con los cuadros clínicos causados por otros coronavirus capaces de provocar infección sistémica y presentar su principal blanco en los aparatos respiratorio, digestivo o nervioso.

5. EPIDEMIOLOGÍA

5.1. VÍAS DE TRANSMISIÓN

El SARS-CoV se transmite de persona a persona, a través del contacto directo o indirecto con secreciones respiratorias, materia fecal u otros fluidos corporales, y por vía respiratoria al diseminarse por microgotas de Flüge y posiblemente aerosoles provenientes de individuos infectados. La mayor parte de los casos reportados ha ocurrido en contactos cercanos de casos, personal de salud y visitas a los pacientes. Este agente infeccioso es viable hasta 9 días en suspensión, mientras que resiste 6 días en desecación.

5.2. RESERVORIOS DEL VIRUS

Se ha postulado recientemente que los murciélagos *herradura* constituirían el reservorio primario del ancestro de este nuevo agente infeccioso, al haberse detectado especies de coronavirus distantemente relacionadas desde el punto de vista filogenético al SARS-CoV y a los detectados en civetas (*Paguma larvata*) y perros mapaches. Virus muy relacionados al SARS-CoV han sido aislados en gatos civetas y perros mapaches de los mercados callejeros de la provincia de Guangdong. Posteriores estudios epidemiológicos y de filogenia molecular sugirieron que estos animales podrían ha-

ber constituido un nexo –como hospederos intermediarios– en la transmisión a humanos.

Cabe destacar que SARS-CoV aislado en humanos posee la capacidad de infectar a una gran variedad de animales. Esta capacidad sería el resultado de un pasaje inter-especie con cambios adaptativos subsiguientes –como la habilidad de unión a ACE 2 que le permitieron al virus ampliar su espectro de infección.

5.3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

5.3.1. El coronavirus asociado al SARS y su relación molecular con otros miembros de la familia *Coronaviridae*

Inicialmente se demostró que el genoma del coronavirus asociado al SARS no podía incluirse entre los diferentes grupos (*clusters*) de virus correspondientes a la familia *Coronaviridae*. (Figura 36.5) Esto demostraba que se trataba de un nuevo agente. Inicialmente propuesto como el prototipo de un nuevo y putativo genogrupo 4, fue luego reclasificado como un subgrupo dentro del grupo 2 (2b), tal como es considerado en la actualidad por el Comité Internacional de Taxonomía viral. Sin embargo, descubrimientos posteriores a dicha clasificación reciente, han desafiado la asignación definitiva del SARS-CoV como integrante del grupo 2.

5.3.2. Relaciones clínico-epidemiológicas de aislamientos de coronavirus asociados al SARS: el origen del brote de neumonía atípica

En la Figura 36.6 se observa la ruta de transmisión del virus desde la provincia china de Guangdong, donde un individuo (paciente A)

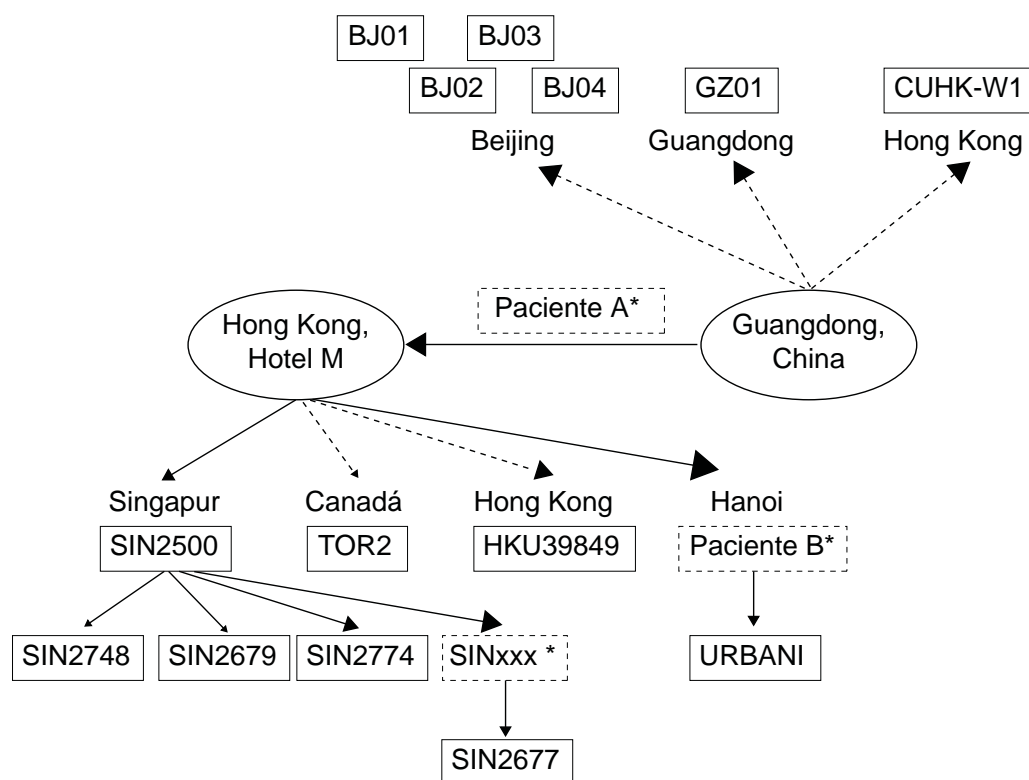


Figura 36.6. Relaciones clínico-epidemiológicas entre los aislamientos de coronavirus asociados a casos de SARS. Se observan las rutas de transmisión para los 14 aislamientos secuenciados (rectángulos con líneas continuas). Las flechas continuas indican vías conocidas de transmisión directa desde el Hotel M. Flechas discontinuas: no se dispone de información sobre relaciones directas. El paciente A es el caso índice de Hong Kong, quien viajó desde la provincia de Guangdong (China) y contagió a otros individuos en el Hotel M, quienes viajaban a Singapur, Canadá y Vietnam, resultando los casos índices en estos países. Las rutas de transmisión viral desde Guangdong son desconocidas y se muestran en líneas discontinuas. Los rectángulos con líneas discontinuas exhiben rutas inciertas de transmisión. Adaptado de *Lancet* 2003;361:1779-85.

adquirió la infección y la transmitió a otras personas en un Hotel (M) de Hong Kong. Otros pasajeros alojados en el mismo hotel, y que tenían como destino Singapur, Canadá, Hanoi (Vietnam) y la misma Hong Kong fueron infectados. El Dr. Carlo Urbani (médico perteneciente a la OMS que ofreció su vida en la atención de pacientes con SARS) adquirió posiblemente la infección al atender a un paciente (B) procedente del hotel M. En su homenaje, la cepa prototipo de SARS-CoV identificada en el CDC ha sido designada con su nombre.

5.3.3. Relaciones moleculares entre cepas de coronavirus asociados al SARS

Se ha podido identificar secuencias nucleotídicas específicas (huellas genómicas) que se corresponden con el origen geográfico de los aislamientos, documentándose hasta el momento al menos 2 genogrupos. Se observa que las secuencias nucleotídicas obtenidas de los aislamientos de virus a partir de pacientes de Singapur, Toronto, y del Dr. Urbani se agrupan separadamente de otros provenientes –por ejemplo– de Beijing, lo que sugiere la primera evidencia genética de diferencias entre cepas de coronavirus asociados al SARS.

6. DIAGNÓSTICO

Dada la transmisión aerógena del virus y la alta mortalidad asociada a la infección, se recomienda que el diagnóstico etiológico sólo se realice en Centros de Referencia, en laboratorios de máxima bioseguridad.

6.1. DIAGNÓSTICO DIRECTO

6.1.1. Muestras clínicas para diagnóstico

Se ha podido aislar el agente y/o detectar su genoma a partir de muestras de aspirados o hisopados nasofaríngeos, de esputo, de sangre, de orina y de heces. En muestras de autopsia, también se pudo detectar el virus en pulmón y en riñón.

6.1.2. Solicitud de los estudios

Se deben pedir durante el período de estado. Se ignora el momento en que cesa la excreción viral, aunque el primer estudio de cuantificación viral en aspirados nasofaríngeos (n = 14) mostró una imagen en V invertida, con un pico máximo en la segunda semana de evolución.

6.1.3. Estudios a realizar

Si bien el aislamiento en cultivos celulares puede permitir la detección del agente, la posibilidad de utilizar cebadores específicos para una reacción de transcripción inversa, acoplada a PCR (RT-PCR específica), posiblemente sea de utilidad ante la necesidad de estudios múltiples.

En biopsias de tejido pulmonar (no utilizadas en el diagnóstico de rutina) se han observado imágenes histopatológicas correspondientes a un daño alveolar difuso con diferentes niveles de severidad. Los cambios incluyen la formación de membranas hialinas, la presencia de infiltrados mononucleares intersticiales inflamatorios y la descamación de neumocitos en el espacio alveolar. En algunos casos se han observado sincicios.

6.2 DIAGNÓSTICO INDIRECTO

Es posible documentar la infección también mediante la detección de Igs específicas (IgM, IgG e IgA) contra las proteínas estructurales N y S en pruebas de inmunofluorescencia indirecta (sobre células Vero E6 infectadas con el SARS-CoV e irradiadas; Figura 36.1B) o de ELISA.

Al igual que lo que ocurre en toda infección viral aguda, el perfil de anticuerpos contra el SARS-CoV presenta un patrón típico de producción de IgM e IgG. Estos anticuerpos específicos comienzan a ser detectados a la semana de la aparición de los síntomas. Mientras que las IgM persisten en el suero hasta la semana 13, las IgG son detectables por un período más prolongado sugiriendo que estas últimas representan la respuesta inmune humoral protectora contra el SARS-CoV. Se puede detectar la conversión serológica para el SARS-CoV con el devenir de la infección (en promedio, aproximadamente a los 20 días).

7. PROFILAXIS

7.1. MEDIDAS GENERALES DE PREVENCIÓN

Un estudio de caso-control fue realizado en 5 hospitales de Hong Kong con 241 miembros del staff no infectado y con 13 infectados; todos ellos tuvieron una exposición documentada a 11 pacientes índice con SARS. Todos los participantes fueron monitoreados acerca del uso de barbijos de alta eficiencia (N95), protección ocular, guantes, camisolín y lavado frecuente y adecuado de manos. Los 69 miembros del staff que reportaron la observancia de todas las medidas no se infectaron, mientras que todo el personal infectado reportó la omisión de al menos una medida.

Este estudio demostró la importancia de la puesta en práctica de medidas de precaución para evitar las microgotas y el contacto, en la prevención de la infección luego de la exposición a pacientes con SARS.

Los pacientes internados con sospecha de SARS deben permanecer en una habitación privada con puerta cerrada, que disponga de presión negativa con respecto a las áreas circundantes y aire filtrado con filtros HEPA. Las salidas de dicho paciente fuera del área deben ser limitadas y, si lo hace, debe colocársele barbijo.

Durante todo este tiempo se deben respetar las recomendaciones antes descritas, a fin de minimizar las posibilidades de transmisión de la enfermedad.

7.2. PROFILAXIS ACTIVA

Antes de la epidemia del SARS, la naturaleza leve de la enfermedad respiratoria producto de la infección por los coronavirus humanos hasta ese momento descritos, condujo a que el desarrollo de vacunas contra los mismos no constituyese un objetivo de peso para las líneas internacionales de investigación.

Actualmente, dos tipos de vacunas se encuentran en distintas fases de experimentación: una inactivada y otra a DNA. Ninguna vacuna ha sido aún aprobada para ser aplicada a humanos.

• **Vacunas a virus inactivado:** Si bien las vacunas a virus vivos atenuados poseen un alto número de antígenos virales y representan para el sistema inmune del paciente un desafío antigénico que persiste por días o incluso semanas, en el caso del SARS-CoV, constituyen un riesgo para el vacunado. En cambio, las vacunas a virus inactivado, a pesar de desencadenar una respuesta independiente de las células T y con restricciones del complejo mayor de histocompatibilidad, representan por el momento una estrategia alternativa. En China, desde septiembre de 2004 se está llevando a cabo la fase I de ensayos clínicos de una vacuna a virus inactivado por calentamiento, desarrollada contra el SARS-CoV. Hasta el momento, ha resultado ser inofensiva y efectiva al lograr, sin evidenciarse efecto adverso alguno, la conversión serológica del 91,6 y 100% de los voluntarios que respectivamente recibieron dosis altas y bajas de dicha vacuna.

• **Vacunas a DNA:** Se dividen, a su vez, en aquellas basadas en la codificación de las proteínas estructurales S y N. En el caso de las primeras, lograrían inducir no sólo una respuesta específica de linfocitos T citotóxicos sino también la producción de anticuerpos neutralizantes. Actualmente, se han desarrollado numerosas vacunas recombinantes que contienen distintos epítopes de la proteína S y que han logrado promisorios resultados tanto en ensayos con animales como en voluntarios humanos. Se ha demostrado también la existencia de una respuesta protectora, probablemente de naturaleza T citotóxica, inducida por antígenos virales de localización no superficial, como lo es la proteína de la nucleocápside. Es interesante que, si dicha proteína se encuentra fusionada con calretinina, la inducción de linfocitos T citotóxicos por parte de la vacuna se incrementa significativamente. La calretinina podría facilitar la presentación de los péptidos antigénicos de N al sistema inmune.

En conclusión, una vacuna efectiva contra SARS-CoV será aquella que induzca una importante respuesta combinada de anticuerpos neutralizantes, así como de linfocitos T protectora, duradera y de amplio espectro.

7.3. PROFILAXIS PASIVA (POST-EXPOSICIÓN)

Se ha reportado que la administración profiláctica de anticuerpos monoclonales humanos neutralizantes ha logrado disminuir la replicación del SARS-CoV en los pulmones de los hurones infectados experimentalmente, previniendo el desarrollo de daño pulmonar macroscópico e inhibiendo la eliminación de partículas virales a través de las secreciones respiratorias. Esto sugiere que podría ser efectivo en el control de la infección humana por este virus.

8. TRATAMIENTO

No existe hasta el momento tratamiento específico; no obstante, se han utilizado diversas combinaciones de antibióticos, antivirales y antiinflamatorios potencialmente útiles, aunque no se dispone de estudios controlados que permitan establecer una recomendación definitiva.

Las recomendaciones actuales incluyen:

- Antibióticos de amplio espectro: levofloxacina, o ceftriaxona más azitromicina o claritromicina, según normas para el tratamiento de la neumopatía adquirida en la comunidad.
- Antivirales: ribavirina (análogo de ribonucleótido con amplio espectro antiviral sobre ciertos virus a RNA –entre otros, el sincicial respiratorio, metapneumovirus, coronavirus y virus de la hepatitis C– en los que induce mutagénesis letal en sus genomas), e inhibidor de neuraminidasa (utilizado para el tratamiento de los virus Influenza A y B).
- Tratamiento de la insuficiencia respiratoria: con el objetivo de mejorar la oxigenación. Esta estrategia de protección pulmonar ha disminuido la mortalidad, probablemente, por evitar el fallo multiorgánico.
- Glucocorticoides: su administración debe ser considerada en los casos severos con compromiso bilateral y/o hipoxia severa. La evidencia de su utilidad es circunstancial y no se dispone de estudios controlados que establezcan concluyentemente su utilidad.
- Medidas de aislamiento del paciente.
- Drogas en experimentación: como la glicirrizina –sustancia derivada del regaliz; utilizada en el tratamiento de infecciones por HIV y HCV– que detuvo la replicación del SARS-CoV *in vitro* e inhibió su adsorción y penetración; la pentoxifilina debido a sus propiedades anti-inflamatorias, antivirales, inmunomoduladoras y broncodilatadoras, su bajo costo y reducida toxicidad; el interferón β recombinante que resultó ser un potente inhibidor de la replicación viral en cultivos celulares; entre otras.



9. DESAFÍOS FUTUROS

Entre noviembre de 2002 y julio de 2003, SARS-CoV fue responsable de infectar a más de 8 500 personas y provocar la muerte de más de 800 en 26 países situados en los cinco continentes. Sumada a la severidad de la enfermedad asociada a esta infección viral, la emergencia y rápida diseminación global del SARS-CoV provocó profundos trastornos sociales y económicos. La epidemia del SARS-CoV representó la respuesta de salud pública más extensa y mejor coordinada montada contra un patógeno humano. Es probable que esta intervención, junto con restricciones impuestas en la diseminación del virus, fueran responsables del control y eliminación de transmisión detectable entre humanos.

Desde el último caso de SARS-CoV reportado en julio de 2003, ha habido un progreso considerable en muchas áreas de la investiga-

ción (epidemiología, patogénesis, replicación, genética y respuesta inmune anti-viral) que se tradujeron en avances en el desarrollo de vacunas efectivas. Sin embargo, la rápida emergencia y la aún más veloz eliminación de la epidemia, dejó una pregunta sin respuesta: ¿ocurrirá, en los años próximos, una re-emergencia del SARS?

ADENDUM

Mientras este capítulo se encontraba en prensa, un nuevo coronavirus humano (HCoV-EMC/2012) fue caracterizado en 2012 a partir de un caso fatal en un individuo que padeció neumonía y compromiso renal. Este virus emergente parece estar filogenéticamente relacionado a un coronavirus de murciélagos, habiéndose propuesto como un nuevo miembro del género *Betacoronavirus* (mBio. 2012 Nov-Dec; 3(6): e00473-12).

Bibliografía

- Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Chandra P, Rabenau H, Doerr HW. "Treatment of SARS with human interferons". *Lancet* 2003;362:293-4.
- Denison, MR. "Severe acute respiratory syndrome coronavirus pathogenesis, disease and vaccines. An update". *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:S207-S214.
- Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. "Identification of a novel Coronavirus in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome". *N Eng J Med* 2003;348:1967-76.
- Frieman M, Heise M, Baric R. "SARS coronavirus and innate immunity". *Virus Res* 2008; 133:101-12.
- Graham RL, Sparks JL, Eckerle LD, Sims AC, Denison MR. "SARS coronavirus replicase proteins in pathogenesis". *Virus Res* 2008; 133: 88-100.
- Gu J, C Korteweg. "Pathology and pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome". *Am J Pathol* 2007;170:1136-47.
- Holmes KV. "SARS-Associated Coronavirus". *N Eng J Med* 2003;348:1948-51.
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. "Coronavirus associated with Severe Acute Respiratory Syndrome". *N Eng J Med* 2003;348:1953-66.
- Ruan Y, Wei CL, Ling AE, Vega BV, Thoreau H, Se Thoe SY, et al. "Comparative full-length genome sequence analysis of 14 coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection". *Lancet* 2003;361:1779-85.
- Seto WH, Tsang D, Yung RW, Ching TY, Ng TK, Ho M, et al. "Effectiveness of precautions against droplets and contact in prevention of nosocomial transmission of severe acute respiratory syndrome". *Lancet* 2003;361:1519-20.
- Tan YJ, Lim SG, Hong W. "Understanding the accessory viral proteins unique to the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus". *Antiviral Res* 2006;72:78-88.
- ter Meulen J, Bakker AB, van der Brink EN, Weverling GJ, Martina BE, Haagmans BL. "Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets". *Lancet* 2004;363:2139-41.
- Zhang L, Wei L, Jiang D, Wang J, Cong X, Fei R. "SARS-CoV nucleocapsid protein induced apoptosis of COS-1 mediated by the mitochondrial pathway". *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007;35:237-53.
- Zhi Y, Wilson JM, Shen H. "SARS vaccine: progress and challenge". *Cell Mol Immunol* 2005;2:101-5.
- Zhu, M. "SARS immunity and vaccination". *Cell Mol Immunol* 2004;1:193-8.

PARTE 4

Infecciones virales por sistema

Infecciones respiratorias en Pediatría

Hugo Paganini [†]

1. INTRODUCCIÓN

En el año 1963, R. Parrot y colaboradores reportaron los resultados del primer estudio realizado en gran escala sobre infecciones virales del tracto respiratorio (IVTR) en niños. A partir de entonces se han sucedido una serie de avances significativos en el diagnóstico y tratamiento de las infecciones virales en niños. Otro cambio importante en las IVTR fue la aparición en el año 2009 de un nuevo virus de influenza A H1N1 que adquirió características pandémicas, afectando en forma importante a la población pediátrica. Estas infecciones producen alta morbilidad y mortalidad. Se estima que entre 4 y 5 millones de niños mueren todos los años por infecciones respiratorias agudas en países en vías de desarrollo. De estas infecciones, entre el 30 y el 48% son causadas por virus respiratorios. Solamente las infecciones causadas por el virus sincicial respiratorio (RSV) producen una erogación anual de 300 millones de dólares en EE.UU.

La tasa de hospitalización de los niños afectados por IVTR varía de acuerdo al virus involucrado. En el caso del RSV es de 12,9, 3 y 0,4 por cada 1.000 niños por año en niños menores de un año, de 1 a 2 años y de 2 a 5 años, respectivamente. Esta cifra disminuye a 3,2, 0,5 y 0,4 para el caso del virus parainfluenza y a 1,7, 0,5 y 0,2 para el virus influenza, respectivamente.

La tasa global de hospitalización en niños menores de 1 año de edad con infección por influenza A H1N1 de origen pandémico es de 11,9 por 100.000, siendo mayor en los menores de 2 meses de edad (36/100.000). En la Argentina, durante el año 2009 se confirmaron por estudios virológicos 11.931 casos de gripe A (H1N1), pero se estima que las enfermedades tipo influenza superaron las 1.400.000. Más de 14.000 personas debieron ser hospitalizadas por infecciones respiratorias agudas graves y se reportaron 626 fallecidos confirmados por gripe A (H1N1).

2. EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia de IVTR es más alta en los niños menores de 1 año de vida. El pico de incidencia es entre 30 y 35 infecciones por cada 100 niños por año. Gradualmente va decreciendo, hasta llegar a 5

infecciones por cada 100 niños por año entre los 9 y 10 años de edad. El modo de transmisión es preferentemente de contacto (a través de las manos) en las infecciones producidas por RSV y parainfluenza, mientras que es por vía aérea en influenza y adenovirus.

Diversas condiciones mórbidas aumentan el riesgo de presentar complicaciones o de morir en los niños que las padecen. Las más importantes son: inmunodeficiencias primarias y secundarias, cardiopatías congénitas, enfermedad crónica del pulmón (asma, fibrosis quística, displasia broncopulmonar), hemoglobinopatías, diabetes mellitus, enfermedad renal crónica, enfermedades metabólicas y tratamiento prolongado con aspirina.

3. AGENTES ETIOLÓGICOS

Las infecciones respiratorias bajas son causadas fundamentalmente por virus y bacterias. Dentro de estas últimas se destacan *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* b. En los niños mayores participan, además, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*, entre otros.

Una gran variedad de virus pueden producir infecciones respiratorias en los niños. Los más frecuentes son RSV, parainfluenza, influenza y adenovirus. En la Tabla 37.1 pueden observarse los agentes etiológicos y la frecuencia estimada de infección de cada uno de ellos. En la Argentina, diversos estudios epidemiológicos realizados en niños dan cuenta de una prevalencia mayor de RSV, en segundo lugar, influenza y en tercer término adenovirus.

En los comienzos del siglo XXI se han identificado nuevos virus respiratorios en niños pequeños, particularmente en aquellos con cuadros de obstrucción bronquial (metapneumovirus, rinovirus, bocavirus humano, etc.). En el año 2009 se detectó la aparición de un nuevo virus de influenza A que reasoció segmentos genéticos virales de diverso origen (humano, aviar, porcino) y que adquirió características pandémicas. Se trata de un virus de influenza A H1N1 que afectó en forma importante a la población mundial, particularmente la pediátrica.

Para consultar las características virológicas y el diagnóstico de cada uno de los virus, se sugiere revisar los capítulos correspondientes, y los capítulos 58 y 59, donde se describen los nuevos

Agente	Paciente ambulatorio	Paciente internado
RSV	14-44	32-63
Parainfluenza 1	7-8	5-12
Parainfluenza 2	4	2-12
Parainfluenza 3	6-19	1-23
Influenza A	< 1-10	1-13
Influenza B	3-9	0-8
Adenovirus	7-35	5-25
Rinovirus	3-6	0-25

Tabla 37.1. Etiología de las infecciones respiratorias en niños pequeños de la comunidad y en hospitalizados. Valores expresados en porcentajes. Adaptado de Henrickson KJ. *Adv Pediatr Infect Dis* 1994; 9:62.

Virus	Cuadro prevalente
RSV	IRA alta, laringotraqueobronquitis, bronquiolitis, neumonía
Parainfluenza	IRA alta, laringotraqueobronquitis, neumonía
Influenza	IRA alta, laringotraqueobronquitis, neumonía
Influenza pandémica	IRA alta, neumonía, bronquiolitis
Adenovirus	IRA alta, laringitis, laringotraqueobronquitis, neumonía
Metapneumovirus	IRA alta, bronquiolitis
Rinovirus	IRA alta, bronquiolitis, neumonía

Tabla 37.2. Relación entre los cuadros clínicos y los virus clásicos en IVTR en niños. Las características, diagnóstico y epidemiología de estos virus se mencionan en los capítulos correspondientes. Los virus respiratorios emergentes (bocavirus, coronavirus, etc.) y el impacto actual de los rinovirus mediante el diagnóstico molecular se analizan en el Capítulo 58.

virus respiratorios y el virus de influenza pandémica A (H1N1) del 2009, respectivamente.

4. SÍNDROMES CLÍNICOS

Las IVTR en niños pueden manifestarse de diversa manera. Estos síndromes pueden ser causados por cualquiera de los virus respiratorios, pero en algunos casos existe relación específica con cada uno de los virus respiratorios. En los niños que se infectan en los hospitales se puede observar un predominio de neumonía (29 a 38%) y de laringotraqueobronquitis (25 a 30%), mientras que los pacientes ambulatorios presentan un mayor porcentaje de traqueobronquitis (34%) y de bronquiolitis (29%). Los niños con infección por influenza A H1N1 pueden desarrollar un cuadro leve con tos, fiebre (no todos los niños la presentan), dolor de garganta, rinitis, cefaleas, dolor muscular, escalofríos, diarreas (más frecuente en niños que en adultos) y vómitos. Las complicaciones más graves son: neumonía, encefalopatía y la sobreinfección bacteriana (ej. *Streptococcus pneumoniae*). En la Tabla 37.2 puede observarse la relación existente entre los diferentes cuadros clínicos y los virus respiratorios involucrados en la génesis de la infección.

5. TRATAMIENTO

No se disponen de tratamientos efectivos y de baja toxicidad para las infecciones por RSV. La ribavirina fue licenciada en EE.UU. para el tratamiento de las infecciones graves, pero los estudios que han valorado su eficacia han sido desalentadores. Este hecho, sumado a la toxicidad de la droga para el paciente y para el personal que la manipula hace que no se la indique habitualmente. En cambio, los pacientes inmunocomprometidos tienen indicación de ser tratados en forma inhalatoria con ribavirina en forma precoz.

Para el tratamiento de las infecciones causadas por influenza se dispone de dos grupos de antivirales de eficacia comprobada. El primer grupo está constituido por la amantadina y la rimantadina. Estas drogas se pueden utilizar para el tratamiento y la prevención de la infección. En el segundo grupo se incluyen los

nuevos antivirales que pertenecen al grupo de los inhibidores de la neuraminidasa y está constituido por el oseltamivir y el zanamivir. En la Tabla 37.3 pueden observarse las indicaciones para la administración de estas drogas.

La experiencia reportada para el tratamiento de las infecciones por virus parainfluenza es escasa y se limita a la administración de antivirales (cidofovir) en niños inmunocomprometidos, con resultados dispares.

Para el tratamiento de las infecciones causadas por influenza A (H1N1) se recomienda utilizar oseltamivir a una dosis de 2-3 mg/kg/día, VO cada 24 horas durante 5 días. En los niños mayores de 7 años podrá indicarse zanamivir 10 mg (2 inhalaciones) por día durante 5 días.

6. PREVENCIÓN

Algunas IVTR pueden prevenirse mediante la administración de inmunoglobulinas y de vacunas. En el caso de la infección por RSV, no se encuentran disponibles vacunas eficaces para su prevención. Los ensayos clínicos con vacunas hasta el momento han arrojado resultados desalentadores. El uso de inmunoglobulinas policlonales endovenosas contra RSV es una opción costosa y de difícil administración. En el año 1998, la *Food and Drug Administration* de EE.UU., autorizó el uso de anticuerpos monoclonales (Palivizumab) para la prevención de la infección por RSV en niños pequeños (menores de 2 años) con antecedentes de prematuridad (edad gestacional menor a 32 semanas) o que tuvieran alguna enfermedad que condicionase mayor gravedad ante la infección por el RSV (por ejemplo: displasia broncopulmonar). Se debe administrar en cinco dosis durante los meses de invierno. Su costo estimado es de 5.000 dólares por tratamiento. Produce una disminución en la tasa de hospitalización de los niños afectados.

Las vacunas contra la gripe son un arma de suma importancia para prevenir la infección por el virus influenza. Se disponen de dos vacunas para la prevención de la gripe estacional: 1) vacuna trivalente inactivada (de uso parenteral); y 2) vacuna trivalente atenuada (de uso intranasal). En Argentina, sólo se dispone de la



	Amantadina*	Rimantadina ^{1*}	Zanamivir	Oseltamivir
Actividad	Influenza A	Influenza A	Influenza A y B	Influenza A y B
Vía de administración	Oral	Oral	Inhalatoria	Oral
Indicación de tratamiento	> 1 año	> 13 años	> 7 años	> 1 año
Indicación de profilaxis	> 1 año	> 1 año	En tramitación	1 año y > 3 años
Efectos adversos	SNC, GI	GI	Broncoespasmo	GI

Tabla 37.3. Antivirales para el tratamiento de la influenza e indicaciones. SNC: sistema nervioso central, GI: gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarrea, cólico) * El CDC (EE.UU.) no autoriza su uso para tratamiento o profilaxis sin antes testear la sensibilidad de las cepas, debido al aumento significativo de la resistencia a estos antivirales registrado recientemente. ^{1*} No disponible en Argentina.

primera, la que está indicada en niños a partir de los 6 meses de edad que presenten alguna condición de riesgo (enfermos pulmonares -p. ej. asmáticos-); cardíacos, hepáticos y renales crónicos; pacientes con enfermedades neuromusculares; metabolopatías crónicas (incluyendo diabetes mellitus); uso prolongado de aspirina en pacientes menores de 18 años; hospederos inmunocomprometidos; hemoglobinopatías; internados en instituciones cerradas y contacto con pacientes de riesgo. El CDC de EE.UU. extiende la indicación para todos los niños sanos entre 6 meses y 18 años de edad. Se administra en los meses de otoño y debe repetirse todos los años. Su eficacia es mayor al 75% para evitar las complicaciones asociadas.

La vacuna para prevenir la gripe pandémica se dispone en tres formas: 1) monovalente (sólo contiene el virus H1N1), 2) trivalente (contiene el virus H1N1, influenza B y un virus H3N2) y 3)

vacuna atenuada de uso intranasal (no disponible en nuestro medio). De acuerdo a las normativas del Ministerio de Salud de la Nación Argentina, estas vacunas están recomendadas para su uso en niños entre 6 meses y 5 años con o sin factores de riesgo asociados y pacientes mayores de 5 años con alguna enfermedad de riesgo de las mencionadas previamente.

A los niños a quienes no se les ha administrado la vacuna se les recomienda recibir profilaxis antiviral durante la época epidémica. El antiviral a elegir dependerá de la cepa viral circulante en ese momento.

NOTA

Este capítulo se finalizó en el 2009. Los editores lamentan el fallecimiento del Dr H. Paganini ocurrido el 23 de octubre de 2010.

Bibliografía

- Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, *et al.* "Human bocavirus and acute wheezing in children". *Clin Infect Dis*, 2007, 44:904.
- Centers for Disease Control and Prevention. "Prevention and control of influenza". *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2007; 56 (RR-6): 1-40.
- Centers for Disease Control and Prevention. "Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2009". *MMWR* 2009;58 (No. RR-8):1-40.
- Hackett S, Hill L, Patel J, Ratnaraja N, Ifeyinwa A, Farooqi M, *et al.* "Clinical characteristics of paediatric H1N1 admissions in Birmingham, UK". *Lancet* 2009;374:605.
- Henrickson KJ. "Lower respiratory viral infections in immunocompetent children". *Adv Pediatr Infect Dis*. 1994; 9:59-96.
- Kantola K, Hedman L, Allander T, Jartti T, Lehtinen P, Ruuskanen O, *et al.* "Serodiagnosis of human bocavirus infection". *Clin Infect Dis*. 2008, 46 (4): 540.
- Meissner HC. "Reducing the impact of viral respiratory infections in children". *Pediatr Clin N Am*. 2005; 52:695-710.
- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. "Campaña de vacunación para el nuevo virus de influenza A H1N1 en la Argentina. Manual del Vacunador año 2010". www.msal.gov.ar <<http://www.msal.gov.ar>>

Infecciones respiratorias en adultos

Pablo Bonvehí

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias son las infecciones más comunes en el ser humano; se estima que se producen diariamente en el mundo 94.000.000 de infecciones agudas con cerca de 4 millones de muertes (OMS, 2002), siendo la mayoría de origen viral. Asimismo, las neumonías de origen viral, si bien no se conoce con exactitud su incidencia, se estima que son responsables de aproximadamente el 8% de las infecciones respiratorias bajas de la comunidad solas o combinados con agentes bacterianos.

En la actualidad los avances en el diagnóstico virológico han permitido establecer en forma más frecuente a los virus como agentes causales de infección respiratoria y, al mismo tiempo, descubrir nuevos agentes responsables de infecciones. En este sentido, en los últimos años se ha podido reconocer al metapneumovirus humano, a los coronavirus responsables del síndrome respiratorio agudo grave (SARS) al virus de influenza H5N1 como etiología de gripe aviaria y potencial responsable de una futura pandemia y, recientemente, al virus de influenza A H1N1, responsable de la primera pandemia del siglo XXI.

Por otro lado, el incremento de la población susceptible a infecciones de todo tipo, incluyendo las virales, es un fenómeno que se presenta en aumento debido a que actualmente el número de personas que recibe terapia inmunosupresora o que presenta enfermedades que disminuyen la inmunidad y tienen una sobrevida más prolongada que la observada en el pasado.

Todas estas razones hacen que sea necesario considerar a los virus como agentes causales de infecciones del tracto respiratorio superior e inferior y perfeccionar los ensayos diagnósticos para poder reconocer etiología viral en aquellos casos donde no se pueda establecer diagnóstico etiológico.

2. RESFRÍO COMÚN O RINITIS AGUDA

2.1 PRESENTACIÓN CLÍNICA

Los pacientes con resfrío común presentan varios de estos signos y síntomas:

- Congestión nasal con secreciones mucosas que pueden tornarse purulentas
- Estornudos
- Disminución del gusto y olfato
- Ardor leve en los ojos
- Pesadez en los oídos y senos paranasales
- Disfonía
- Voz nasal
- Mialgias
- Astenia
- Cefalea leve
- Febrícula (más común en niños)

2.2 EPIDEMIOLOGÍA Y AGENTES ETIOLÓGICOS

Tanto los adultos como los niños pueden padecer entre 3 a 8 episodios anuales. Su etiología es viral (Tabla 38.1) y su epidemiología es independiente de la región geográfica, ya que es una entidad endémica durante todo el año. Se observa una incidencia mayor en los meses en los cuales por razones climáticas aumenta la conviven-

cia en ambientes cerrados (desde fines del otoño a principios de la primavera), particularmente entre los niños quienes constituyen un reservorio importante. La transmisión se produce de persona a persona por contacto habitualmente cercano. La incubación es de 1 a 7 días y la excreción del virus puede persistir entre 3 a 4 semanas. Su curso clínico es autolimitado y los síntomas duran entre 5 a 14 días. La hipertermia se autolimita en 48 a 72 horas, aunque la rinorrea y la tos pueden persistir hasta 3 semanas en un 25% de los casos.

2.3 TRATAMIENTO

Debido a la variedad de agentes etiológicos y a la diversidad de mecanismos fisiopatogénicos, el tratamiento está dirigido a disminuir los síntomas.

El ácido acetilsalicílico y el paracetamol en dosis habituales son utilizados como antitérmicos y analgésicos. Los anti-inflamatorios no esteroides (ibuprofeno y naproxeno) se pueden utilizar para el alivio de cefaleas, odinofagia, para reducir la fiebre y demostraron ser útiles para disminuir la tos. Las gotas nasales descongestivas, como así también los descongestivos por vía oral disminuyen la descarga nasal. Las primeras no deben ser utilizadas durante más de cinco días debido a su efecto rebote.

El bromuro de ipratropio ha demostrado ser efectivo para disminuir la rinorrea en mayores de 6 años. Los antihistamínicos de primera generación, por su efecto anticolinérgico, disminuyen la secreción nasal y los estornudos.

Los agentes antitusivos y mucolíticos no han demostrado claramente ser efectivos en el manejo de esta patología. No existe tratamiento antiviral específico para la mayoría de los virus causantes del resfrío común con excepción de que se identifique el virus de influenza como agente etiológico. En este caso, se pueden utilizar los agentes antivirales que se describen en el ítem 3.

2.4 PREVENCIÓN

No hay vacunas disponibles, excepto para influenza y no se dispone de datos concluyentes en cuanto a la utilidad de la vitamina C. Las

Virus	Proporción estimada de casos anuales
Rhinovirus	30-50%
Coronavirus	10-15%
Influenza	5-15%
Sincicial Respiratorio	5%
Parainfluenza	5%
Adenovirus	< 5%
Enterovirus	< 5%
Metapneumovirus	Desconocido
Sin agente etiológico	20-30%

Tabla 38.1. Virus causantes del resfrío común. Datos de: Heikkinen T, Järvinen A. "The common cold". *Lancet* 2003; 361:51-59.

medidas de prevención están dirigidas a evitar la diseminación y el contagio a través del lavado cuidadoso de manos y el descarte adecuado de los pañuelos contaminados con secreciones. Por otro lado, es importante señalar que los resfriados recurrentes no se asocian con déficit inmunológico conocido alguno.

2.5 COMPLICACIONES

Son infrecuentes, en el 0,5 a 2% de los casos se puede observar sinusitis (muchas veces causadas por el mismo virus); también se describe la asociación con episodios de asma en adultos y se registra una mayor utilización de los recursos médicos en los pacientes con EPOC.

3. INFLUENZA

3.1 PRESENTACIÓN CLÍNICA

Es una enfermedad respiratoria aguda y febril causada por los serotipos A y B del virus influenza. Se caracteriza por su comienzo brusco luego de un período de incubación de 1 a 2 días. Inicialmente, predominan los síntomas sistémicos como fiebre, escalofríos, cefalea, mialgias, astenia y anorexia que persisten usualmente durante tres días. Los síntomas respiratorios (tos seca, faringitis y obstrucción nasal) adquieren predominancia cuando disminuyen los síntomas sistémicos y persisten más tiempo, en algunos casos la tos puede persistir durante 3 a 4 semanas luego de resuelto el cuadro agudo. La predominancia de los síntomas sistémicos es lo que diferencia a la influenza de las otras infecciones virales de vías aéreas superiores.

La presencia de casos de influenza en Argentina puede ocurrir en forma esporádica en cualquier momento, sin embargo la circulación de estos virus en la comunidad se observa habitualmente entre los meses de mayo y septiembre (Figura 38.1).

Durante el año 2009 se produjo la pandemia producida por el virus de influenza A H1N1 que, en Argentina, se caracterizó por gran cantidad de casos ambulatorios, inicialmente en niños en edad escolar, luego en adultos jóvenes y se acompañó de un incremento en el número de hospitalizaciones por cuadros de infecciones respiratorias agudas graves.

A diferencia de lo que ocurre con influenza estacional, en algunos centros predominaron las internaciones en pacientes sin comorbilidades (Echavarría M, Querci M. *et al.* Pandemic (H1N1) Cases, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*, 2009) y Libster R, Bugna J, *et al.* Pediatric Hospitalizations Associated with 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) in Argentina. *N Engl J Med*, 2010) mientras que entre los casos fallecidos, la mayoría presentaron otras enfermedades subyacentes (Libster R, Bugna J, *et al.* Pediatric Hospitalizations Associated with 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) in Argentina. *N Engl J Med* 2010; y National Influenza H1N1 Committee. First Epidemiological Report of 289 deaths by pandemic (H1N1) Influenza - Argentina, 2009. 47th Annual Meeting, *Infect. Dis Soc. of America*. Philadelphia, USA).

La mayoría de los casos notificados de enfermedad tipo influenza se registraron entre las semanas epidemiológicas 21 y 31, observándose luego sólo casos esporádicos.

3.2 COMPLICACIONES

Además del cuadro clínico descrito anteriormente se pueden observar complicaciones, en particular en los grupos con mayor riesgo (estos grupos se describen en la Tabla 38.2).

- Neumonía viral: comienza dentro de las 72 h. de iniciados los síntomas, es rápidamente progresiva, produce hipoxemia, y presenta alta mortalidad.
- Neumonía bacteriana: se observa luego del 5° a 7° día, cuando comienza a mejorar el cuadro gripal y tiene las características habituales de una neumonía bacteriana.
- Traqueobronquitis, sinusitis, otitis.
- Descompensación de enfermedades respiratorias y cardíacas crónicas. Se registra un aumento en las internaciones en pacientes con patologías cardiopulmonares crónicas durante la época de influenza.
- Otras complicaciones menos frecuentes: miositis; miocarditis; pericarditis; Síndrome de Guillain-Barré.

Como se describió anteriormente, durante la pandemia por virus influenza A H1N1 se observó un incremento en el número de internaciones por cuadros de neumonía similares los descritos anteriormente como cuadros de neumonía viral. (véanse los Capítulos 59 y 59.1)

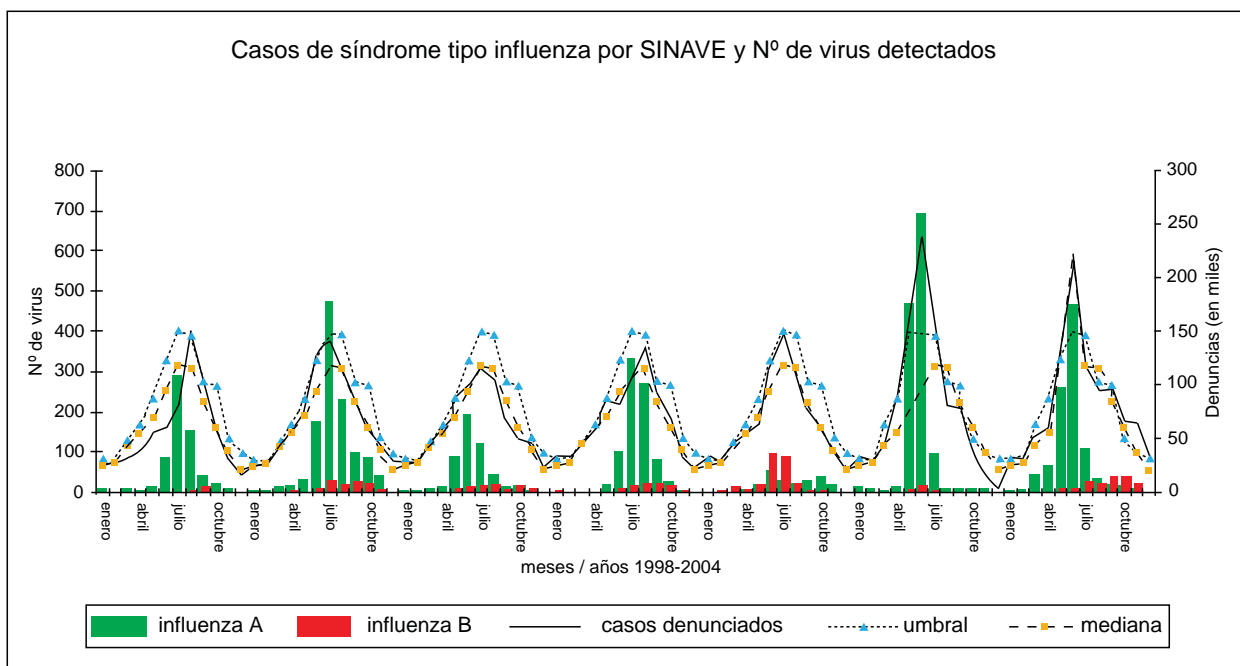


Figura 38.1. Casos de influenza en Argentina 1998-2004 (Boletín GROG 2004).

3.3 TRATAMIENTO ANTIVIRAL

Los agentes antivirales contra los virus influenza han demostrado ser útiles si son administrados dentro de las 48 horas de iniciados los síntomas. Disminuyen la duración de los mismos y la fiebre entre un 30-50% de los casos.

Los antivirales activos contra los virus influenza son los bloqueantes de la bomba de protones M2 o adamantanos (amantadina y rimantadina) y los inhibidores de neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir).

Tanto amantadina como rimantadina se administran por vía oral en dosis de 100 mg/12 horas durante 5-7 días y son activos solamente contra el virus influenza A. Ambos compuestos se diferencian en su perfil de tolerancia, ya que la rimantadina tiene menor tasa de efectos adversos a nivel del sistema nervioso central. Recientemente, se ha descrito alta resistencia del virus influenza A, subtipo H3N2 y del virus influenza aviaria H5N1 a estas drogas, por lo que se ha desaconsejado su utilización en ambas situaciones.

Los inhibidores de la neuraminidasa actúan sobre los virus influenza A y B. El oseltamivir se administra por vía oral en cápsulas de 75 mg/2 horas durante 5 días como tratamiento de influenza en adultos, mientras que zanamivir se administra por inhalación oral cada 12 horas durante un lapso similar.

El virus pandémico influenza A H1N1 demostró ser resistente a los adamantanos y sensible a los inhibidores de neuraminidasa, por lo cual este grupo de drogas fue el indicado para los casos asociados a este virus. De acuerdo a recomendaciones basadas en experiencias con virus de influenza aviar, en casos graves de influenza pandémica se indicaron dosis de 150 mg. cada 12 h. de oseltamivir y en forma más prolongada.

Un hecho observado en relación al tratamiento antiviral frente al virus pandémico es que los casos con mala evolución se asociaron, en general, a un retraso en el inicio de dicho tratamiento (Jain S, Kamimoto M, *et al.* Hospitalized Patients with 2009 H1N1 Influenza in the United States, April – June 2009. *N Engl J Med* 2009).

Todas las drogas antivirales para influenza han demostrado ser altamente efectivas para la prevención de esta enfermedad si son administrados durante la época de circulación del virus de influenza. En estos casos, se utiliza una única dosis de las drogas antes mencionadas durante el período de exposición a influenza.

Se pueden prescribir en forma preventiva en las siguientes situaciones:

- Pacientes que tengan indicación de vacuna y que por algún motivo no la pueden recibir. Se administran antivirales durante la época de circulación viral.
- En caso de brote, en aquellos no vacunados con alto riesgo de complicaciones de influenza, se aconseja vacunar y administrar antivirales durante los primeros 15 días post-vacunación hasta tanto se genera respuesta de anticuerpos.
- Si se comprueba un caso índice, se puede administrar a los convivientes no vacunados durante 1 semana ya que se ha demost-

trado para el oseltamivir una reducción significativa de la tasa de ataque secundaria en estos casos.

3.4 VACUNACIÓN ANTIGRI PAL

La vacuna antigripal se elabora en huevos embrionados de pollo y contiene virus inactivado, partes del virus o hemagglutininas de envoltura purificadas. Es una vacuna trivalente ya que contiene dos cepas del virus de influenza A (H3N2) y (H1N1) y una cepa de influenza B.

Se administra por vía intramuscular en aquellos grupos de adultos con indicación para recibir la misma (Tabla 38.2).

Debido a los cambios antigénicos menores que se observan cada uno a tres años en los virus de influenza, la composición de la vacuna se debe modificar con similar periodicidad y se debe administrar anualmente. La vacuna antigripal es efectiva para prevenir la enfermedad, las complicaciones de la misma y la mortalidad asociada a la enfermedad que producen los virus influenza.

El desarrollo de nuevas vacunas contra el virus de influenza se ha acelerado desde el año 2009 con el advenimiento de la pandemia de virus de influenza A H1N1. En este sentido ya se están elaborando vacunas en líneas celulares, no solo contra el virus pandémico, sino también contra las cepas estacionales. También, y para incrementar la inmunogenicidad de la vacuna, se han agregado adyuvantes como el denominado MF59 que es una emulsión de aceite en agua, que ya hace algunos años se utiliza en la vacuna estacional en Europa y que en 2010 se utilizó con la vacuna pandémica monovalente en Argentina (Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine* 2001).

Otra alternativa que ha demostrado mejorar la respuesta inmune frente a distintos antígenos, es la aplicación por vía intradérmica ya que a través de esta vía se activan las células dendríticas de la dermis que actúan más eficientemente en generar dicha respuesta. El mayor inconveniente de la vía intradérmica es el de poder lograr la aplicación en esa localización ya que es muy dependiente del operador. Recientemente, se ha desarrollado un dispositivo que asociado a la vacuna antigripal ha permitido la administración intradérmica y al mismo tiempo ha demostrado respuesta inmune similar o superior a la obtenida por vía intramuscular con menor concentración de antígeno de influenza. (Leroux-Roels I, Vets E et al. Seasonal influenza vaccine delivered by intradermal microinjection: A randomised controlled safety and immunogenicity trial in adults. *Vaccine*. 2008).

4. OTROS VIRUS RESPIRATORIOS EN ADULTOS

4.1 CORONAVIRUS

Como se mencionó anteriormente estos son los virus que con más frecuencia se detectan en los cuadros resfrío común, luego de los rinovirus. Los serotipos de coronavirus más frecuentemente aso-

1. Grupo de alto riesgo de complicaciones

- Mayores de 65 años
- Residentes en geriátricos o instituciones de cuidados prolongados
- Personas con afecciones respiratorias o cardíacas crónicas
- Diabetes, insuficiencia renal crónica, hemoglobinopatías, inmunosupresión
- Niños y adolescentes en tratamiento crónico con ácido acetilsalicílico
- Embarazadas que cursan el 2^{do} ó 3^{er} trimestre del embarazo en época de influenza
- Pacientes con trastornos cognitivos, lesiones medulares, convulsiones o cualquier otra disfunción neuromuscular que comprometa la función respiratoria, el manejo de secreciones respiratorias o implique riesgo de aspiración

2. Grupos de alto riesgo de transmitir influenza

- Personal de salud
- Convivientes de personas con alto riesgo de complicaciones de influenza

Tabla 38.2. Indicaciones de la vacuna antigripal en adultos.

ciados son los 229 E y OC 43. También se han observado estos virus como causa de exacerbación de asma en adultos y como agentes de neumonía en pacientes trasplantados de médula ósea.

Las medidas de prevención son las que se mencionaron para el resfrío común.

4.2 PARAINFLUENZA

Los serotipos 1 a 4 de virus parainfluenza se asocian también a cuadros respiratorios altos y faringitis en adultos y en este grupo etario se caracterizan por presentar excreción viral breve. También se han descrito como causante de neumonía en pacientes con trasplante de células progenitoras periféricas y de órgano sólido (riñón, pulmón).

4.3 VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO (RSV)

Si bien este virus puede provocar cuadros de resfrío común, en adultos puede causar un cuadro más grave y prolongado en el cual se puede observar congestión nasal, tos e hiperreactividad bronquial que pueden durar varios días.

En los gerontes la presentación clínica es similar a la que produce el virus influenza y, como la circulación del virus sincicial respiratorio en la comunidad se superpone y es más prolongada que el de influenza (aproximadamente cinco meses), en ocasiones estos cuadros se interpretan como cuadros gripales.

En ancianos y adultos con co-morbilidades, la carga de enfermedad producida por RSV en cuanto a la utilización de recursos de

salud, tanto en el ámbito ambulatorio como durante la hospitalización, es similar a la de influenza A en poblaciones con alta tasa de cobertura con vacuna para esta última infección.

La tasa de ataque por RSV puede ser aún mayor en adultos internados en instituciones geriátricas o en centros hospitalarios. En los pacientes con leucemia o trasplante de células progenitoras hematopoyéticas el riesgo de desarrollar neumonía en caso de infección por RSV es elevado (75% en caso de leucemia), como así también la mortalidad que oscila entre el 60-80%.

No está establecida la eficacia del tratamiento con ribavirina aerosolizada en adultos y existen reportes de su utilización combinada con inmunoglobulina G endovenosa o con inmunoglobulina específica para RSV en pacientes trasplantados de células progenitoras hematopoyéticas. No se dispone aún de una vacuna para prevenir la infección por RSV.

4.4 METAPNEUMOVIRUS HUMANO (HMPV)

La primera detección de este virus en humanos fue en niños en Holanda en 2001, aunque existen evidencias de infección en humanos desde 1950. Produce síntomas similares a RSV con infecciones del tracto respiratorio superior, bronquiolitis y neumonía. Los primeros casos notificados en adultos demostraron que el hMPV puede provocar enfermedad respiratoria aguda durante el invierno. Posteriormente, se lo asoció a casos de bronquitis, broncoespasmo y neumonitis en ancianos y también, como se señaló anteriormente, como agente causal de resfrío común.

Bibliografía

- "Prevention and Control of Influenza: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)". *MMWR* 2006; 55:1-42.
- Couch RB. "Prevention and Treatment of Influenza". *NEJM* 2000; 343:1778-87.
- De Roux A, Marcos MA, García E, Mensa J, Ewig S, Lode H, Torres A. "Viral community-acquired pneumonia in nonimmuno-compromised adults". *Chest*, 2004; 125:1343-51.
- De Vincenzo JP, Leombruno D, Soiffer RJ, Siber GR. "Immunotherapy of respiratory syncytial virus pneumonia following bone marrow transplantation". *Bone Marrow Transplant* 1996; 17:1051-6.
- Echavarría M, Querci M, Marcone D, Videla C, Martínez A, Bonvehí P, et al. "Pandemic (H1N1) Cases, Buenos Aires, Argentina". *Emerg Infect Dis* 2009;16:311-3.
- Libster R, Bugna J, Coviello S, Hijano DR, Dunaiewsky M, Reynoso N, et al. "Pediatric Hospitalizations Associated with 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) in Argentina". *N Eng J Med* 2010;362:45-55.
- Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. "Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults". *NEJM*. 2005; 352:1749-59.
- Hayden FG. "Antiviral resistance in influenza viruses--implications for management and pandemic response". *N Eng J Med* 2006;354:785-8.
- Heikkinen T, Järvinen A. "The common cold". *Lancet* 2003; 361:51-9.
- Jain S, Kamimoto M, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, et al. "Hospitalized Patients with 2009 H1N1 Influenza in the United States, April – June 2009". *N Eng J Med* 2009;361:1935-44
- Leroux-Roels I, Vets E, Freese R, Seiberling M, Weber F, Salamand C, et al. "Seasonal influenza vaccine delivered by intradermal microinjection: A randomised controlled safety and immunogenicity trial in adults". *Vaccine* 2008;26:6614-9.
- National Influenza H1N1 Committee. "First Epidemiological Report of 289 deaths by pandemic (H1N1) Influenza – Argentina, 2009". 47th Annual Meeting, Infectious Diseases Society of America Meeting. Philadelphia, PA. USA. Abstract.
- Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus AD, et al. "Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America". *J Infect Dis* 2002; 185:1660-3.
- Podda A. "The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine". *Vaccine* 2001;19:2673-80



Infecciones virales de piel y mucosas

Elena R. Temporiti

En las infecciones virales, las lesiones cutáneas son un hallazgo frecuente, por lo cual muchas veces orientan hacia la etiología de la enfermedad.

Los diagnósticos diferenciales ante lesiones cutáneo-mucosas son múltiples y pueden implicar enfermedades infecciosas y no infecciosas. En la actualidad las nuevas técnicas de diagnóstico virológico pueden ayudar a establecer la etiología precozmente.

1. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN VIRAL EN LA PIEL

Cuando las células son infectadas por virus pueden desarrollar distintos tipos de lesiones.

Pueden desarrollar cambios citopáticos y eventualmente morir. Este tipo de infección se denomina lítica. Sin embargo, algunos virus son capaces de replicarse sin causar daño celular. Otros tipos de infección no lítica son la latencia y la transformación neoplásica.

Existen varios tipos de infección viral. La más típica es la infección aguda seguida de la eliminación viral (*clearance*) a través de la respuesta inmune. Este tipo de presentación se observa frecuentemente con ciertos virus que producen **exantemas**, tales como sarampión, parvovirus B19, rubéola, etc. Entre las infecciones agudas que pueden devenir en persistentes, deben mencionarse las latentes, las que pueden posteriormente reactivarse. Esto se observa con herpes simplex, varicela-zóster, etc. Un tercer tipo es la infección persistente crónica, como se observa con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

Los virus pueden infectar la piel por tres vías: inoculación directa, infección sistémica o diseminación desde un foco interno. Las lesiones dérmicas se producen por el efecto directo de la replicación viral sobre la célula, la respuesta del hospedador al virus o la interacción entre ambas. Ejemplos de efecto directo son: el molusco contagioso, las verrugas y la primoinfección por herpes simplex. El sistema inmune probablemente influye en la evolución de estas entidades. El período de incubación generalmente es corto dado que las lesiones se producen en el sitio de inoculación. En las verrugas dicho período es más prolongado debido a que la replicación viral es lenta o a que la diseminación de célula a célula se da sólo en una extensión limitada.

En las infecciones sistémicas la piel es infectada durante la viremia, por lo que la dermis se infecta antes que la epidermis. Se desconoce el por qué de la distribución del exantema. En la viruela (ya erradicada) y la varicela la causa primaria del daño es el efecto lítico celular. Las lesiones cutáneas observadas en la rubéola y el sarampión son consecuencia, en parte, de la respuesta inmune a estos virus.

La patogenia de muchos exantemas asociados a infecciones por enterovirus queda por esclarecerse; en la enfermedad mano-pie-boca se ha observado replicación viral con efecto lítico sobre las células. El herpes zóster y el herpes simplex recurrente representan la diseminación local a la piel de virus que producen infecciones latentes en células neurales de nervios periféricos. La infección lítica desempeña un rol importante en estas lesiones, aunque las observadas durante la recurrencia contienen menos virus que aquellas de la primoinfección. Se postula que este fenómeno sería debido a la respuesta inmune.

2. RESPUESTA INMUNE

Si bien el inóculo viral y la puerta de entrada juegan un papel importante en la enfermedad, la respuesta inmunológica y no inmunológica

ca parecen ser importantes. La respuesta inmune varía de persona a persona y es la que va a determinar la gravedad de la enfermedad. El desarrollo de anticuerpos luego de una infección viral, representa la mayor defensa del hospedador a reinfectarse con el mismo virus. Los anticuerpos pueden inhibir la diseminación viral mediante diversos mecanismos: 1) la neutralización; 2) el incremento en el *clearance* viral por células fagocíticas, las que posteriormente inactivarán al virus y con la acción del complemento culminará con la lisis de las células infectadas. La inmunidad celular es también activada y puede influenciar el curso de muchas infecciones virales. La inmunidad celular usualmente es protectora. Los pacientes con deterioro de la misma presentan dificultad para la limitación de infecciones primarias o recurrentes. Este grupo tiene mayor riesgo de desarrollar primoinfecciones graves, infecciones de larga duración por herpes simplex, o herpes zóster diseminado, etc. Las células T sensibilizadas son capaces de producir la lisis de las células infectadas y liberar linfoquinas, que –a su vez– atraen células fagocíticas.

Algunas células inflamatorias producen y liberan citoquinas con actividad antiviral como el interferón. Todos los virus son capaces de inducir la producción de interferón y son sensibles a su acción, pero hay diferencias en el mecanismo de inducción, como así también en la sensibilidad al mismo (véase el capítulo 7 *Mecanismos de defensa del hospedador frente a las infecciones virales*).

3. EXANTEMAS: CLASIFICACIÓN

Los exantemas se pueden clasificar según la naturaleza de la erupción en: máculo-papulosos de distribución central o periférica; vesículo-costrosos; urticarianos; nodulares y purpúricos.

3.1 ERUPCIONES MÁCULO-PAPULOSAS DE DISTRIBUCIÓN CENTRAL

Son las que comienzan en el tronco y las más frecuentes. El sarampión comienza en la línea de nacimiento del cabello, y en 48-72 horas descendiendo al tronco, respetando palmas y plantas. Las lesiones son eritematosas, inicialmente separadas y luego confluentes. En la mucosa bucal se presenta un enantema que consiste en lesiones blanco-azuladas de 1-2 mm, rodeadas de un halo eritematoso, denominadas manchas de Köplik.

La rubéola se extiende en forma idéntica, pero -a diferencia del sarampión- el exantema (*rash*) tiende a desaparecer de las zonas inicialmente afectadas, conforme se va desplazando a otros sitios. Este *rash* puede ser pruriginoso. En los adultos son frecuentes las adenopatías retroauriculares, suboccipitales y la artritis.

Los enterovirus (ECHO, Coxsackie) producen exantemas que pueden ser similares a los de la rubéola o el sarampión.

El virus Epstein-Barr y el HIV pueden producir un exantema máculo-papular inespecífico. El parvovirus B19 -causante del eritema infeccioso o quinta enfermedad- característicamente produce un exantema que se presenta como un eritema brillante en las mejillas (mejillas abofeteadas o signo de la "cachetada") que palidece a la presión, luego afecta al tronco y los miembros, y generalmente es pruriginoso. En los adultos se puede presentar artritis.

La roséola infantil o exantema súbito post-febril se presenta en niños menores de 3 años; la erupción suele aparecer cuando la fiebre remite y se presenta como máculas y pápulas rosadas que se inician en el tronco y confluyen rápidamente.

Enfermedad	Etiología	Descripción	Epidemiología	Clínica
Erupciones máculo-papulosas de distribución central				
Sarampión	Virus sarampión	Lesiones pequeñas separadas, luego confluentes desde el nacimiento del cabello, que avanzan en forma descendente y que duran ≥ 3 días; manchas de Köplik en mucosas	No inmunizados	Tos, conjuntivitis, coriza, postración intensa
Rubéola	Virus rubéola	Lesiones desde el nacimiento del cabello, desaparecen a medida que avanza en forma descendente	No inmunizados	Adenopatías cervicales y retroauriculares, artritis
Eritema infeccioso o Quinta enfermedad exantemática	Parvovirus humano B19	"Mejillas abofeteadas" (rojas y brillantes), erupción reticular que aparece y desaparece durante 3 semanas	Más frecuente en niños de 3 a 12 años. Invierno y primavera	Fiebre, artritis en adultos
Exantema súbito o Roséola infantil o Sexta enfermedad	Herpesvirus humano-6	Máculo-pápulas difusas, a veces urticarianas, respeta la cara; desaparece en 2 días	Principalmente en niños menores de 3 años	El exantema aparece luego que la fiebre remite
Primoinfección por HIV	HIV	Máculas y pápulas inespecíficas, pueden ser urticarianas, úlceras orales	Infectados recientemente con el HIV	Faringitis, adenopatías generalizadas, artralgias
Mononucleosis infecciosa	Virus Epstein-Barr	Máculo-pápulas difusas a veces urticarianas, edema peri-orbitario, petequias en paladar	Adolescentes, adultos jóvenes	Hepato-esplenomegalia, faringitis, adenopatías cervicales, linfocitosis atípica
Otros exantemas virales	Echovirus 2, 4, 9, 11, 16, 19 y 25 coxsackievirus A9, B1 y B5	Simulan sarampión o rubéola	En niños es más frecuente que en adultos	Síndromes virales inespecíficos
Erupciones máculo-papulosas / vesiculosas periféricas				
Sarampión atípico	Virus sarampión	Erupción máculo-papulosa que comienza en parte distal de los miembros y se extiende en forma centripeta; puede evolucionar a vesículas y petequias	Personas afectadas por el sarampión que entre 1963 y 1967 recibieron en EE.UU. la vacuna con virus inactivados	Cefalea, neumonía nodular
Enfermedad mano-pie-boca	Coxsackievirus A16	Vesículas dolorosas, úlceras orales, pápulas en manos y pie con bordes eritematosos que evolucionan a vesículas dolorosas	Niños menores a 10 años; afecta a varios miembros de la familia. Más frecuente en otoño y verano	Fiebre
Erupciones vesículo - costrosas				
Varicela	Virus varicela-zóster	Rash máculo-pápulo-vesículo-costroso. Las lesiones aparecen en brotes (polimorfismo), puede afectar cuero cabelludo y producir enantema	Principalmente en niños. 10% de los adultos son susceptibles a la infección. Más frecuente en invierno y primavera	Fiebre, malestar general. Más grave y con complicaciones en el adulto y en niños inmunocomprometidos

Herpes diseminado	Virus varicela-zóster o virus herpes simplex (HSV)	Lesiones individuales similares. Zóster: >25 lesiones fuera del dermatoma afectado. HSV: lesiones mucocutáneas extensas y progresivas. Eccema <i>herpeticum</i> : las lesiones se diseminan a veces en la piel eczematosas. Puede haber diseminación visceral con escasa manifestación cutánea	Hsopedor inmunocomprometido, Eccema	Signos constitucionales, fiebre, puede haber afectación visceral
Erupciones purpúricas				
Erupción enteroviral petequeial	Echovirus 9 o coxsackievirus A9	Lesiones petequiales diseminadas, también pueden ser máculo-papulosas, vesiculosas o urticarianas	Aparece en brotes epidémicos frecuentemente	Faringitis, cefalea, meningitis aséptica si se debe a echovirus 9
Fiebres hemorrágicas virales	Arbovirus y arenavirus	Erupción petequeial	Residencia o viaje a zona endémica	Fiebre, <i>shock</i> y hemorragias mucosas o digestivas
Erupciones papulares y nodulares				
Verrugas	Virus papiloma humano	Pápulas o nódulos escamosos, ásperos y espinosos que pueden presentarse en diferentes áreas	Distribución mundial	Verrugas comunes o <i>vulgaris</i> : manos, dedos; verrugas planas: cara, manos, piernas; palmo-plantares; condilomas acuminados en región anogenital, periné; Papulosis bowenoide: orales; blandas rosadas o blancas levemente elevadas en boca, encías, mucosa labial, lengua o paladar duro
Molusco contagioso	Virus del molusco contagioso	Pápula pequeña que se agranda a 3-6 mm, discretas, lisas, color carne, perladas con umbilicación central. Afectan piel y mucosas, frecuentemente agrupadas en una o dos áreas. Cabeza, tronco y área genital más frecuentemente. Pueden resolver espontáneamente	Afecta niños, adultos sexualmente activos e inmunocomprometidos. Se transmite de persona a persona. Ptes. con SIDA son particularmente de riesgo	
Nódulos de Orf, nódulos de los ordeñadores, o ectima contagioso	Virus Orf (un parapoxvirus)	Nódulo eritematoso con un anillo blanco generalmente único asintomático o levemente doloroso de 1 cm en manos, antebrazo. Adenopatías: raramente	Distribución mundial, casos esporádicos. Transmisión por contacto directo con ganado infectado, los ordeñadores son los de mayor riesgo	

Tabla 39.1. Infecciones virales de piel y mucosas.

3.2 ERUPCIONES MÁCULO-PAPULOSAS DE DISTRIBUCIÓN PERIFÉRICA

Son las que se inician en la periferia, donde el exantema es más intenso y luego avanzan en forma centrípeta.

El eritema multiforme, con las clásicas lesiones en diana, se distribuye de manera simétrica en codos, rodillas, palmas y plantas. En los casos graves, puede afectar las mucosas.

Este tipo de erupción puede deberse a la ingesta de fármacos, infecciones y formas idiopáticas.

3.3 ERUPCIONES VESÍCULO-COSTROSAS

La varicela se caracteriza por un exantema máculo-pápulo vesículo-costroso que se presenta por brotes. Por ello, en un determinado

momento el paciente se presenta con lesiones en distintos estadios de evolución. En el hospedador inmunocomprometido, las vesículas pueden no presentar eritema basal y su contenido ser de aspecto hemorrágico.

El síndrome mano-pie-boca produce vesículas dolorosas en extremidades y úlceras orales.

En el hospedador inmunocomprometido afectado por herpes diseminado se observan lesiones individuales distribuidas por el cuerpo, al igual que en el zóster diseminado.

3.4 ERUPCIONES URTICARIANAS

Se manifiestas por zonas de edema eritematoso, en ocasiones inducido, pruriginoso y , a veces, acompañado de lesiones purpúricas.

3.5 ERUPCIONES PURPÚRICAS

La infección por echovirus 9 puede simular una meningococemia aguda.

En los pacientes con exposición epidemiológica posible y viajes recientes a zonas endémicas, es necesario considerar las fiebres hemorrágicas de etiología viral, en Argentina asociada a la infección por virus Junín.

3.6 ERUPCIONES PAPULARES Y NODULARES

La primera de este tipo de lesiones la vemos en el molusco contagioso, infección viral que afecta mucosas y piel. En el adulto puede ser transmitido por contacto sexual. Generalmente se presentan en grupos, y el número de lesiones varía desde unas decenas hasta un centenar de las mismas. En los adultos la localización más frecuente es el área genital.

Los nódulos de los ordeñadores o de ORF constituyen una infección viral de la piel, producida por el denominado virus Orf; se manifiesta por una o más lesiones que se localizan frecuentemente en las manos o antebrazos. Usualmente este virus es transmitido desde el ganado vacuno infectado.

Las verrugas resultantes de la infección por papilomavirus (HPV), se desarrollan lentamente. Se conocen entre 100 y 150 tipos de HPV. Se los divide en tres categorías: tipo cutáneo (no genital) como el HPV-1, -2, -3 y -4; tipo mucoso genital tales como HPV-6,

-11, -16, y -18; y los que frecuentemente se encuentran en la epidermodisplasia verruciforme como HPV-5 y -8.

Algunos papilomavirus han sido asociados con el desarrollo de enfermedades malignas de la piel.

4. CONCLUSIONES

La afectación cutáneo-mucosa por infecciones virales es un hallazgo frecuente. En determinadas ocasiones estas manifestaciones permiten aproximarnos al diagnóstico específico de la enfermedad. En el diagnóstico diferencial de lesiones cutáneas deben incluirse enfermedades no infecciosas e infecciosas y dentro de estas últimas las virales son causa frecuente de exantemas.

Las nuevas técnicas de laboratorio han permitido acortar el tiempo para arribar al diagnóstico.

Es necesario recordar que cuando las lesiones cutáneo-mucosas contienen virus, como ocurre por ejemplo en la infección por herpes simplex o varicela-zóster es posible obtener muestras para aislamiento viral, detección de antígenos o de ácidos nucleicos mediante ensayos moleculares.

Por el contrario, cuando el exantema es producto de depósitos de inmunocomplejos (sarampión, rubéola) no es posible detectar el virus en esas lesiones y deben emplearse otras muestras (Capítulo de Diagnóstico Viroológico).

Un diagnóstico correcto en las infecciones virales tiene implicancias en el tratamiento y el pronóstico y también contribuyen al control y a la vigilancia de estas enfermedades en la comunidad.

Bibliografía

- Freedberg AZ, Eisen A, Wolff K, Austen K, Goldsmith LA. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine Vol. II. Sixth Edition. 2003. Section 30. Caps. 208, 209, 210, 211, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 221, 223.
- Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J. "Fiebre y Erupciones". Harrison's Principles of Internal Medicine. 2005 16th Edition. Part Two. Section 2. Cap 18: 108-16.
- Koch WC. "Fifth and sixth diseases". *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14: 343-56.
- Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. "Viral Diseases". Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005. Sixth Edition. Vol 2, Part III Cap. 128:1729-42
- Palmieri OJ. "Enfermedades Exantemáticas". En "Enfermedades Infecciosas". España: Mc Graw-Hill Interamericana, 2001. Capítulo 20:159-68.
- Seward JF. "Update on Varicella". *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:619-21.
- Habij TP. Clinical Dermatology, 4th Edition. 2004. Chapter 1: 1-22. Chapter 12: 368-378.



Diagnóstico de gastroenteritis virales

Alfredo Martínez

INTRODUCCIÓN

Las gastroenteritis agudas se encuentran entre las enfermedades virales más frecuentes del ser humano, solamente superadas por las infecciones respiratorias de origen viral. Su presentación clínica es con diarrea autolimitada (menor de una semana), vómitos, pérdida del apetito, malestar general, y fiebre con deshidratación que, en los casos extremos, pueden llevar a la hospitalización y muerte del paciente.

En el hospedador inmunocomprometido la diarrea crónica es la principal manifestación del compromiso del tracto gastrointestinal. No es inusual que sea grave, persistente o refractaria al tratamiento, y ocasione deshidratación, malabsorción y malnutrición.

En el aparato digestivo la principal barrera inmunológica es la mediada por células, principalmente linfocitos T; y la humoral, que se expresa a través de los linfocitos B y sus inmunoglobulinas.

El sistema inmunocelular del tracto digestivo es el mayor órgano linfóide del cuerpo y está compuesto por los linfocitos interepiteliales, las células T y B de la lámina propia, los folículos linfoides y las placas de Peyer. La proporción de inmunoglobulina A secretoria sintetizada por las células plasmáticas del intestino, equivale al 50% del total del organismo, desempeñando un importante papel en la protección el aparato digestivo.

La diarrea es la presentación clínica más común en las infecciones del tracto digestivo y está relacionada con uno o varios cambios en los siguientes procesos fisiológicos: absorción, secreción, motilidad, e integridad de la mucosa gastrointestinal.

De acuerdo a las alteraciones de los procesos fisiológicos involucrados, las diarreas se clasifican en: diarrea osmótica por alteración de la absorción; diarrea secretoria por alteración de las funciones de secreción; diarrea inflamatoria por alteraciones de la mucosa; o diarreas producidas por cambios en la motilidad intestinal.

1. AGENTES VIRALES PRODUCTORES DE DIARREA

Los agentes virales productores de diarrea afectan tanto a pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos pero con frecuencia y distribución diferentes en el paciente con inmunocompromiso (dependiendo del tipo y grado de inmunosupresión, del hospedador, y de la condición del enfermo, ambulatorio o internado). Las características de los virus productores de diarrea y su patogenia analizan en el capítulo 21 *Virus productores de diarrea*.

1.1 DIARREAS EN INMUNOCOMPETENTES

Las gastroenteritis virales tienen como principal hospedador a los niños, en quienes los principales agentes causales son rotavirus y, con menor frecuencia, astrovirus, adenovirus y calicivirus.

En adultos, la gastroenteritis del viajero es causada principalmente por norovirus (virus Norwalk).

1.2 DIARREAS EN INMUNOCOMPROMETIDOS

En pacientes adultos trasplantados de órganos sólidos (principalmente riñón), las diarreas crónicas son debidas a rotavirus grupo A y están asociadas a picobirnavirus, mientras que en trasplantados

de médula ósea la mayor frecuencia es de rotavirus y distintos serotipos de adenovirus.

Por el contrario, en los pacientes adultos inmunocompetentes la presencia de gastroenteritis por estos mismos agentes es de baja frecuencia.

En pacientes pediátricos con trasplantes de médula ósea, los rotavirus ocupan el principal lugar, pero también se detectan astrovirus y calicivirus (norovirus-sapovirus). Estos agentes dan un cuadro endémico y de corta duración en pacientes inmunocompetentes. Sin embargo, su impacto en la población con trasplante no está bien establecido.

En pacientes HIV (+) con CD4⁺ disminuidos, la diarrea viral tiene como principal agente al picobirnavirus. Algunos trabajos muestran hasta un 9% de prevalencia de picobirnavirus en pacientes HIV (+) con diarrea.

En pacientes pediátricos internados con algún grado de inmunosupresión, los astrovirus y adenovirus pueden asociarse a diarrea.

1.3 AGENTES VIRALES

Los principales virus involucrados en esta patología pueden dividirse en dos grupos (Tabla 40.1).

Productores de diarrea
rotavirus
norovirus
adenovirus
astrovirus
Asociados a diarrea
picobirnavirus
torovirus
picornavirus (virus Aichi)
coronavirus

Tabla 40.1. Agentes productores y asociados a diarreas.

2. DIAGNÓSTICO DE LAS DIARREAS VIRALES

La mayoría de los pacientes con diarreas no requiere estudios complementarios, salvo en el caso de una diarrea importante con fiebre mayor de 38° C, presencia de sangre en las heces, afectación del estado general y deshidratación o en pacientes pediátricos, en mayores de 65 años, en inmunosuprimidos o en aquellos que presentan una enfermedad de base que pueda agravarse.

Los virus productores o asociados a diarreas son difíciles de cultivar, de allí que el diagnóstico estuvo reservado inicialmente a la observación con microscopía electrónica.

En la actualidad, el diagnóstico viral se realiza en materia fecal de reciente emisión, que se recolecta en frasco estéril sin ningún tipo de aditivo o con un hisopo, en cantidad suficiente

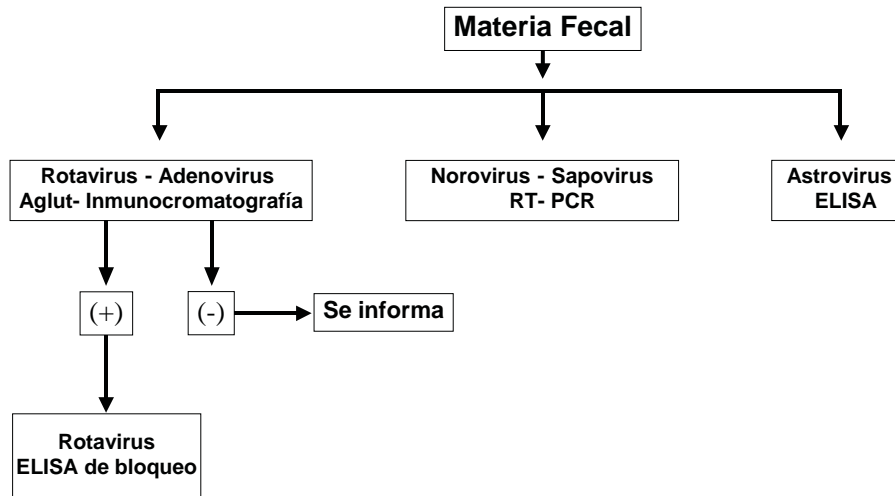


Figura 40.1. Algoritmo diagnóstico de diarreas virales.

(0,1 g en heces sólidas ó 100 µl en heces líquidas). Estas muestras pueden almacenarse para su procesamiento hasta 8 días a 2°-8°C, y a -20°C por largo tiempo.

En estas muestras se realizan las pruebas de tamizaje cuya sensibilidad varía entre 75 y 92%, con especificidad de 97,5-100%, dependiendo del ensayo que se utilice.

Las pruebas rápidas como la aglutinación de partículas de látex o la inmunocromatografía permiten obtener un resultado en 1 a 24 horas, en caso de ser positivas estas pruebas deben confirmarse con ensayos ELISA de bloqueo, que eliminan los falsos resultados positivos.

Sin embargo, la detección de algunos agentes virales debe reali-

zarse por técnicas de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus diferentes variantes. Estos ensayos no son comerciales y deben estar validados en cada laboratorio. Algunos virus requieren amplificar por PCR al menos dos porciones diferentes de su ácido nucleico, dado que presentan gran variabilidad y polimorfismo genético (por ejemplo: norovirus) (Figura 40.1).

NOTA

Este Capítulo se finalizó en el año 2008.



Bibliografía

- Anderson EJ, Weber SG. "Rotavirus Infection in adults". *Lancet infect Dis*. 2004; 4:91-9.
- Estes KM, Verkataram Prasad BV, Atmar RL. "Noroviruses everywhere: has something changed?" *Curr Opin Infect Dis* 2006;19:467-474.
- Giordano MO, Martínez LC, Rinaldi D, Guinard S, Naretto E, Casero R, et al. "Detection of picobirnavirus in HIV-infected patients with diarrhea in Argentina". *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1998;18:380-383.
- Goodgame, RW. "Viral causes of Diarrhea". *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:779-95.
- Liakopoulo E, Mutton K, Carrington D, Robinson S, Steward CG, Goulden NJ, et al. "Rotavirus as significant cause of prolonged diarrhoeal illness and morbidity following allogenic bone marrow transplantation". *Bone Marrow Transplant*. 2005; 63:691-4.
- Ponticelli C, P Passerini. "Gastrointestinal complications in renal transplant recipients". *Transp Int*. 2005; 18:643-50.
- Valle MC, Martínez LC, Ferreira LJ, Giordano MO, Isa MB, Pavan JV, et al. "Agentes virales asociados al síndrome diarreico en pacientes trasplantados renales". *Medicina* 2001; 61:179-82.

Hepatitis virales: diagnóstico diferencial

Alfredo Martínez

1. INTRODUCCIÓN

La hepatitis viral es una entidad clínica definida como una inflamación del hígado, cuyos agentes etiológicos pueden ser virus asociados a infecciones que afectan múltiples órganos, pudiendo también involucrar el hígado, también denominados virus con hepatotropismo secundario (como el citomegalovirus, virus Epstein-Barr, virus herpes simplex, entre otros) o virus hepatotrópicos primarios, como los agentes etiológicos de las hepatitis A (virus de la hepatitis A o HAV), hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV), D (HDV) y hepatitis E (HEV). Los virus hepatotrópicos primarios son muy importantes debido a su frecuencia y potencial gravedad patogénica (Figura 41.1). En este capítulo sólo se describirá el algoritmo diagnóstico de las hepatitis por agentes hepatotrópicos primarios.

Las diferentes presentaciones clínicas y las diversas formas de evolución hacen a esta patología una infección que puede pasar inadvertida (subclínica) o evolucionar hasta formas fulminantes (poco frecuentes).

Esta infección del hígado puede ser repentina y autolimitada, dando origen a la hepatitis viral aguda, o persistir por más de 6 meses como hepatitis crónica.

Es conveniente definir hepatitis viral aguda como el síndrome de hepatitis aguda que se presenta con síntomas y signos generales, con o sin ictericia y una elevación de las aminotransferasas (ALT, AST).

La presentación de la infección puede ser como:

1. **Enfermedad aguda:** un paciente sano, sin antecedente previo alguno de enfermedad hepática.

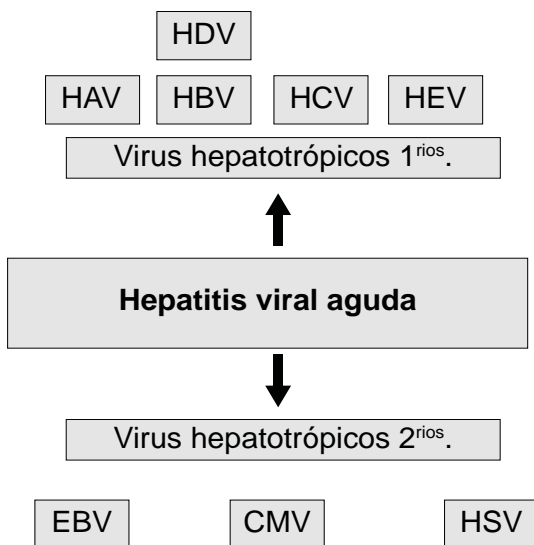


Figura 41.1. Virus hepatotrópicos 1^{rios} y 2^{rios} como agentes de hepatitis viral. EBV: virus Epstein-Barr; CMV: citomegalovirus; HSV: virus herpes simplex.

2. **Reactivación de una hepatopatía crónica (infecciosa o no):** hepatitis B (HBV), hepatitis autoinmune (HAI), enfermedad de Wilson.
3. **Enfermedad aguda sobre una hepatopatía crónica:** a modo de ejemplo, una hepatitis aguda por HAV en un paciente con cirrosis.

2. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN AGUDA

La infección aguda puede ponerse de manifiesto mediante la detección de anticuerpos de clase IgM específica. Para aquellos virus para los cuales no existen aún ensayos de detección de IgM específica, la etiología de una hepatitis aguda se puede establecer mediante detección del genoma viral.

2.1. HEPATITIS A AGUDA

El diagnóstico se realiza por detección de IgM anti-HAV. Son escasos los falsos positivos y negativos. La virucopria (virus en materia fecal: [MF] en la Figura 41.2) es máxima una semana antes de la sintomatología y declina luego, por lo cual no es material de elección para el diagnóstico.

2.2 HEPATITIS B AGUDA

El marcador serológico de hepatitis aguda B, es la IgM anti-core (IgM anti-HBc). La detección de HBsAg indica sólo infección por HBV (Figura 41.3) sin discriminar entre aguda y crónica.

La detección de IgM anti-HBc como marcador de infección aguda se utiliza en situaciones clínicas específicas que cada vez son más frecuentes. La presentación de una infección aguda por HBV con HBsAg negativo puede observarse en una hepatitis grave o fulminante, o cuando la evaluación de un paciente se realiza en forma tardía cuando el HBsAg ha desaparecido (ventana). Sin embargo, en estos casos la IgM anti-HBc continúa siendo positiva (Figura 41.4).

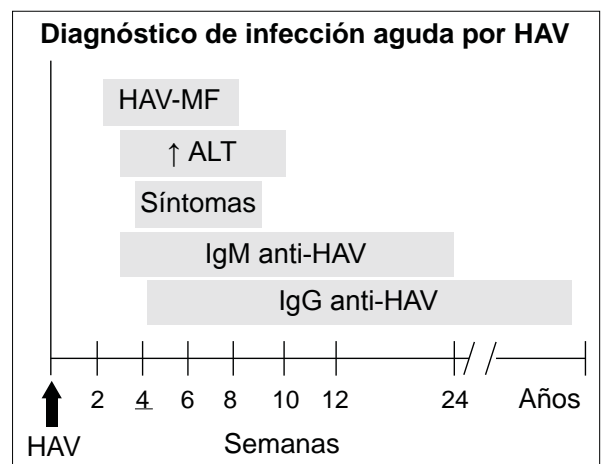


Figura 41.2. Hepatitis A aguda.

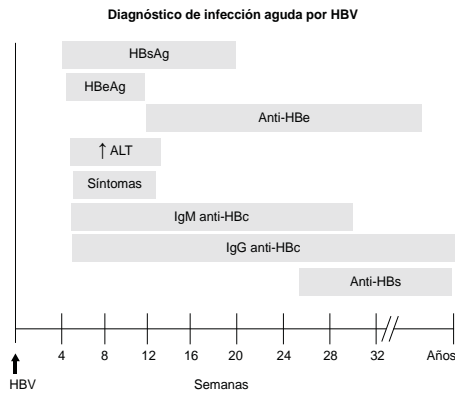


Figura 41.3. Diagnóstico de hepatitis B aguda.

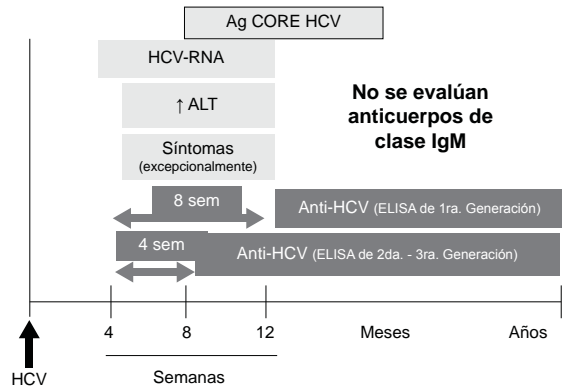


Figura 41.5. Diagnóstico de hepatitis C aguda.

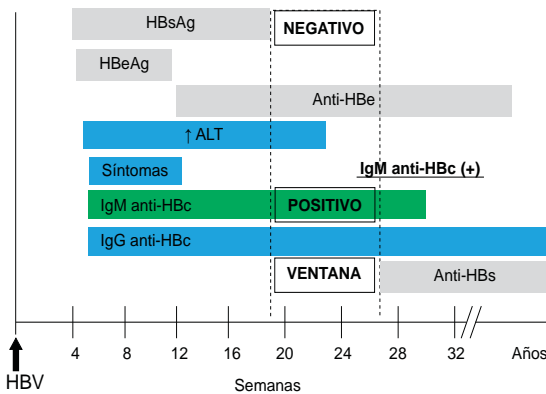


Figura 41.4. Determinación tardía del HBsAg.

De igual modo, es frecuente encontrar una infección persistente por HBV con HBsAg (+) por más de 6 meses y con una presentación clínica *aguda*. Esto se observa en tres situaciones: a) cuando hay activa replicación viral (carga viral de HBV [copias DNA] elevada); b) cuando una hepatitis B crónica inicia la inmunoeeliminación viral (es decir, se registra la seroconversión de HBeAg a anti-HBe); c) cuando se añade una enfermedad aguda por un agente distinto al HBV sobre una hepatitis crónica por HBV, por ejemplo una hepatitis por HAV o una hepatitis por drogas. En todos estos casos la IgM anti-HBc es negativa. Merece destacarse que la mera presencia de IgG anti-HBc no indica *per se* una infección persistente, ya que el paciente podría exhibir simultáneamente anticuerpos anti-HBs, habitualmente asociados a la eliminación de la infección.

2.3 HEPATITIS D AGUDA

Esta infección requiere la presencia previa del HBV o la coinfección con este virus. Es decir, existen dos situaciones:

- a) Coinfección: el HBV y el HDV infectan juntos al individuo. Los marcadores IgM anti-HBc, IgM anti-HDV y el HBsAg son positivos en la infección aguda. Cuando se resuelve la hepatitis B se resuelve también la infección por HDV.
- b) Sobreinfección: es una infección aguda por HDV que acontece en una infección persistente por hepatitis B. Los marcadores positivos son el HBsAg, y la IgM anti-HDV. La IgM anti-HBc es negativa.

2.4 INFECCIÓN AGUDA POR HCV

Es muy infrecuente en la práctica clínica realizar el diagnóstico de hepatitis C aguda, dado que su forma de presentación es subclínica. El período de ventana serológica es de 8 a 10 semanas y puede aumentar a 12 semanas según se utilice para su detección Enzi-

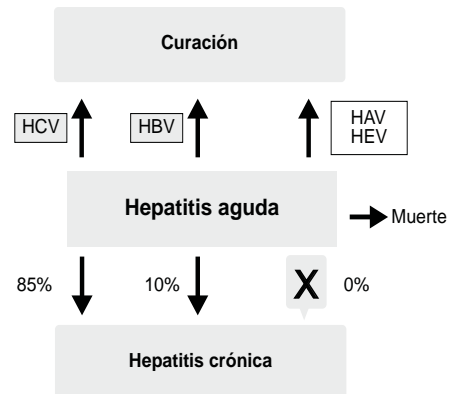


Figura 41.6. Diferente evolución de las hepatitis virales.

moinmunoensayos de 1ª, 2ª ó 3ª generación. Por esta razón, existe una ventana de 4 semanas sin expresión o con baja producción –no detectable– de anticuerpos de clase IgM o IgG. Por ello el diagnóstico en este período queda restringido a la detección del RNA del HCV por metodologías moleculares. Actualmente, se dispone de un equipo comercial para la detección de antígeno de Core de HCV en microplacas, que reduce la ventana serológica a 4 semanas y es comparable con la detección del RNA del HCV (Figura 41.5).

2.5 INFECCIÓN AGUDA POR HEV

El virus hepatitis E es un virus a RNA con muy baja frecuencia en nuestro país. El diagnóstico de infección aguda se realiza por detección de IgM anti-HEV. Sin embargo, aún no se encuentra disponible en forma comercial el único ensayo validado en Argentina.

3. INFECCIÓN PERSISTENTE

Se define así cuando la duración de la misma se extiende más allá de los 6 meses. Si bien es habitual la denominación de *infección crónica* en esta circunstancia, el lector deberá tener presente que el concepto de hepatitis crónica es también la denominación homónima de hallazgos histopatológicos característicos, que pueden o no estar presentes en la infección persistente. Sólo algunos de los virus **hepatotrópos** primarios (HBV, HCV) evolucionan con frecuencia hacia la infección persistente, dependiendo de diversos factores asociados (por ejemplo, un desbalance en el sistema inmunológico). Por el contrario, el HAV y el HEV no desarrollan habitualmente infecciones persistentes (Figura 41.6).

4. ALGORITMO DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS VIRAL

El diagnóstico de una hepatitis viral comienza con la consulta al médico, quien luego de una anamnesis exhaustiva (indagando



Síndrome de "hepatitis aguda"

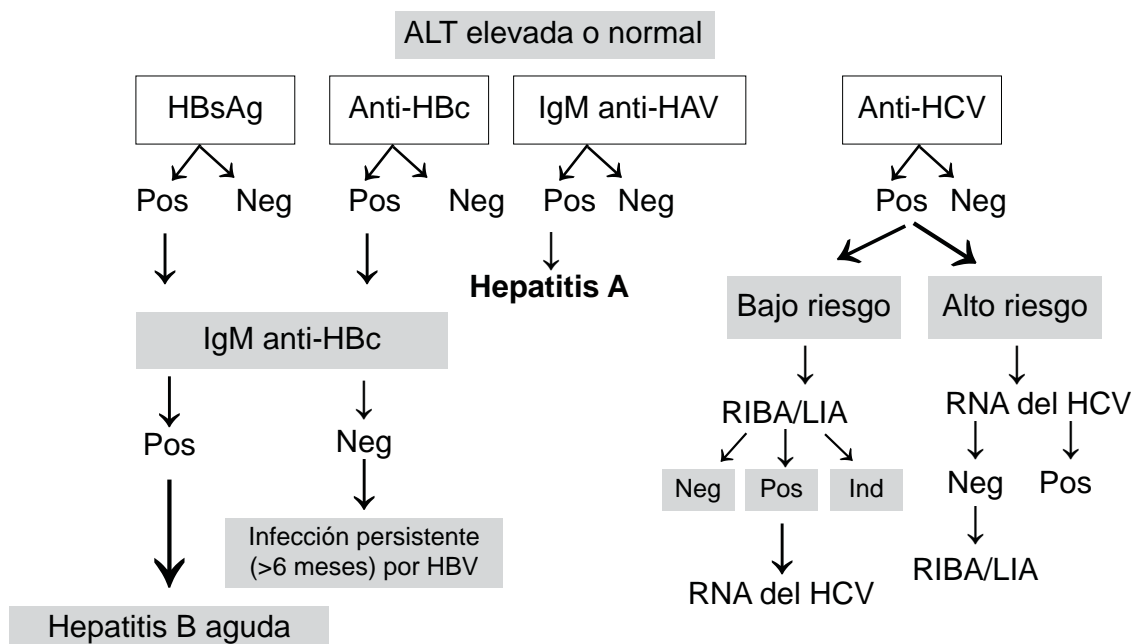


Figura 41.7. Algoritmo diagnóstico de hepatitis virales.

factores de riesgo, viajes a zonas endémicas, ingesta de fármacos etc.), el examen físico, estudios bioquímicos de laboratorio genéricamente denominados *de rutina* y una ecografía plantea una *hipótesis diagnóstica*. Luego, solicita los estudios virológicos específicos, estudios por imágenes, y/o procedimientos invasivos, si lo considera necesario.

Los estudios virológicos que deben solicitarse son: detección de HBsAg e IgG anti-HBc, IgM anti-HAV, anti-HCV, independientemente de los valores séricos de las transaminasas, que podrán estar elevadas o normales.

Si el HBsAg es positivo y la IgG anti-core de HBV (IgG anti-HBc) es positiva, se debe estudiar la IgM anti-HBc, que si es positiva define habitualmente el diagnóstico de hepatitis aguda por HBV.

En cambio, si el HBsAg y la IgG anti-core son positivos, la IgM anti-HBc es negativa, y el HBsAg se mantiene positivo por más de 6 meses, se define el diagnóstico de infección persistente (habitualmente denominada crónica, desde el punto de vista virológico, aunque no necesariamente histopatológico, como se expresara anteriormente) por HBV.

Si la IgM anti-HAV es positiva, el diagnóstico es de hepatitis A aguda. La detección de IgG anti-HAV indica que el paciente tuvo contacto previo con el virus de la hepatitis A, o bien recibió la vacunación.

La presencia de IgG anti-HCV positiva puede indicar dos situaciones distintas:

a) **Un verdadero positivo:** la mayoría de estos pacientes tienen antecedentes de transfusiones o del uso de drogas por vía endovenosa, y presentan elevación de las transaminasas ó alguna enfermedad hepática diagnosticada.

b) **Un falso positivo:** esto se observa en individuos sanos, sin antecedentes de transfusión ni factores de riesgo y con transaminasas normales.

En ambos casos es necesario confirmar el diagnóstico de infección por HCV con estudios suplementarios como son el RIBA/LIA que detectan anticuerpos específicos o la detección de RNA del HCV por RT-PCR u otra metodología alternativa.

Existen dos estrategias a seguir con los ensayos suplementarios (Figura 41.7):

1. Si el individuo es considerado como perteneciente al grupo de bajo riesgo (por ejemplo, un donante de sangre) se solicita un RIBA/LIA; en caso de obtenerse un resultado Positivo o Indeterminado, se solicita la detección de RNA del HCV, para completar el algoritmo;
2. Si el paciente tiene alto riesgo (por ejemplo, un paciente en diálisis) se solicita directamente la detección del RNA del HCV por RT-PCR, y sólo a los pacientes con resultado negativo se les solicita el RIBA/LIA.

Ambas estrategias son útiles y difieren en los costos de diagnóstico. En la actualidad, las técnicas de Biología Molecular (RNA del HCV por RT-PCR) comerciales o artesanales, son más económicas que las determinaciones de anticuerpos específicos mediante RIBA/LIA y permiten un diagnóstico más rápido de hepatitis C (Figura 41.7).

NOTA

Este capítulo se finalizó en el año 2009.

Bibliografía

- Consenso argentino de Hepatitis B: www.hepatitisviral.com.ar/pdf/consensohbv2002.
- Consenso argentino Hepatitis C - 2004. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana* 2005; 35; Supl N° 1.
- EASL International Consensus Conference On Hepatitis B. *J Hepatology*: 39, S3-S25, 2003.
- Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. "Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C." *Hepatology* 2004; 39: 1147-71.

Infecciones genitourinarias de origen viral

Analía Mykietiuik

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones virales genitales tienen una importancia clínica relevante debido tanto a su prevalencia como a la gravedad de sus complicaciones. En este capítulo se focalizará la atención especialmente en el herpes genital y en las infecciones por papilomavirus humano. El herpes genital fue publicado por primera vez en la literatura médica por J. Astruc, médico del rey de Francia, en su tratado sobre las enfermedades de transmisión sexual en 1754. Hoy en día aproximadamente un 60 a 95% de la población mundial está infectada por uno o más virus de la familia *Herpesviridae*. Los papilomavirus humanos se identificaron a comienzos del siglo XX como agentes etiológicos de los papilomas o verrugas. Debido a que no se han podido aislar *in vitro*, la comprensión de la patogénesis, los avances diagnósticos y las promisorias vacunas desarrolladas han sido posibles con las técnicas de biología molecular.

Las infecciones urinarias virales están relacionadas con la población de pacientes inmunocomprometidos, en especial, aquellos que reciben trasplante de células progenitoras hematopoyéticas y trasplante de riñón. La cistitis hemorrágica es más frecuente en trasplantes alogénicos de células progenitoras hematopoyéticas y con enfermedad injerto contra huésped y los virus más asiduamente asociados son los poliomavirus JC y BK, y los adenovirus.

2. INFECCIONES GENITALES VIRALES

2.1 HERPES GENITAL

2.1.1 Epidemiología

El herpes genital está causado por los virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) o 2 (HSV-2). Estos virus tienen distribución mundial, no existen vectores animales en su transmisión y los humanos parecen ser los únicos reservorios naturales. La infección por HSV-1 se adquiere tempranamente en el curso de la vida, usualmente a través del contacto oral-genital. Más del 90% de los adultos mayores de 50 años tiene anticuerpos contra HSV-1. La prevalencia del HSV-1 ha aumentado y actualmente representa el 20% de los casos de herpes genital. La transmisión del HSV-2 es a través del contacto sexual con una pareja infectada que secreta el virus en forma sintomática o asintomática y el riesgo de infección aumenta con el número de parejas sexuales. La excreción viral aumenta en pacientes con adquisición reciente de la infección, pacientes menores de 25 años, o embarazo, coinfección con HIV, vaginosis bacteriana, colonización por *Streptococcus* grupo B y anticoncepción hormonal.

Numerosos estudios de seroprevalencia han demostrado una pandemia de infección por HSV-2 durante las últimas dos décadas. En EE.UU., desde la década de 1970 a la actualidad, las tasas de seroprevalencia del HSV-2 han aumentado un 30%. Una de cada cuatro personas mayores de 30 años tiene HSV-2, aunque muchas nunca han presentado síntomas.

2.1.2 Presentación clínica

El período de incubación luego de la adquisición genital del HSV-1 o HSV-2 es aproximadamente 4 días (2 a 12 días). El primer episodio se caracteriza por síntomas generales: fiebre, cefalea, malestar general y mialgias (en el 60% de la población masculina y 40% de la población femenina) y síntomas locales: dolor, picazón, disu-

ria, secreciones vaginales o uretrales y adenopatías inguinales. La presentación *clásica* de la infección primaria se caracteriza por la presencia de máculas y pápulas que progresan a vesículas, pústulas y úlceras. Las lesiones en piel cicatrizan con costra mientras que las lesiones en mucosa lo hacen sin ella. Sin embargo, muchos pacientes presentan el herpes genital primario sin los síntomas clásicos. La mayoría de los pacientes presentan dolor en el sitio de la lesión y una adenopatía inflamatoria regional. Pueden ocurrir uretritis y cervicitis con la adquisición genital en más del 80% de los casos de infección primaria y faringitis con la adquisición oral. El HSV se ha aislado de la uretra y de la orina de mujeres y hombres sin lesiones externas. Ocasionalmente, se asocia a endometritis y salpingitis en mujeres y prostatitis en hombres. Tanto el HSV-1 como el HSV-2 pueden causar infecciones rectales o perianales sintomáticas o asintomáticas, usualmente vinculadas con la relación sexual anal, aunque también puede ocurrir un herpes perianal por reactivación en las células epiteliales perianales de un herpes latente en el dermatoma sacro de una infección genital previa. En pacientes HIV positivos son comunes las lesiones extensas perianales, proctitis por HSV o ambas. La primoinfección de herpes genital en pacientes que previamente tuvieron infección por HSV-1 se asocia con una menor frecuencia de síntomas generales y una cicatrización más rápida de las vesículas. El curso clínico de una infección por HSV-1 o HSV-2 de herpes genital es similar; sin embargo, las tasas de recurrencia de herpes genital son del 90% en pacientes con infección por HSV-2 y 55% en pacientes con infección por HSV-1.

2.1.3 Complicaciones

Las recurrencias de la infección genital por HSV-2 pueden ser sintomáticas o, más comúnmente asintomáticas. Los síntomas prodrómicos varían desde molestias locales 30 minutos a 48 horas previos a la aparición de las úlceras hasta dolores lancinantes 5 días antes de la erupción.

La duración de la excreción viral en la recurrencia es menor que en una infección primaria (promedio 4 días vs. 16 días) y hay menos lesiones presentes (promedio 6 lesiones vs. 16 lesiones).

A los 12 meses desde el diagnóstico de la infección primaria por HSV-2, el 90% de los pacientes tiene al menos una recurrencia, el 38% presenta 6 o más recurrencias y el 20% presenta 10 ó más recurrencias. Las recurrencias disminuyen con el tiempo, más allá del tipo de virus o del tratamiento antiviral. La importancia de las recurrencias asintomáticas con excreción viral radica en su papel en la transmisión del virus. Aunque la transmisión del HSV-2 es más alta cuando las lesiones genitales están presentes, la excreción asintomática ocurre más frecuentemente. En un estudio de 13 parejas discordantes para el HSV, la transmisión ocurrió en 9 de ellas (69%) cuando la pareja portadora del virus no tenía lesiones presentes ni síntomas prodrómicos.

El compromiso neurológico puede manifestarse como meningitis aséptica, mielitis transversa, radiculopatía sacra y meningitis linfocitaria benigna recurrente (meningitis de Mollaret). La meningitis aséptica es la más frecuente de las complicaciones neurológicas en las infecciones primarias por HSV-2. En una serie de pacientes con primoinfección por HSV-2, el 36% de las mujeres y el 12% de los hombres presentaron algún síntoma de meningismo, siendo necesaria la internación en el 6,4% de las mujeres y 1,6% de los hombres con meningitis aséptica por HSV. Se asocia a un curso benigno sin

secuelas neurológicas. No han sido publicados trabajos controlados comparativos, sobre el uso de aciclovir en estos casos.

Las lesiones extragenitales ocurren en el primer episodio de herpes genital y son más frecuentes en mujeres. Los pacientes con HSV-2 presentan estas lesiones en el 9% mientras que los pacientes con HSV-1 lo exhiben en el 25%. Típicamente, ocurren luego de la aparición de las lesiones genitales, usualmente durante la segunda semana de la infección.

La manifestación más grave del HSV es la enfermedad neonatal, que usualmente se adquiere por transmisión vertical. Varios estudios han demostrado que el mayor riesgo de transmisión en el período perinatal ocurre cuando se adquiere la primoinfección cercana al parto, más que con el herpes recurrente. Los signos de infección en los niños aparecen generalmente a las 3 semanas del nacimiento y consisten en: vesículas cutáneas, fiebre, irritabilidad, convulsiones, hepatitis, neumonitis y coagulación intravascular diseminada. A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento la morbilidad y la mortalidad siguen siendo elevadas.

Otras complicaciones del herpes genital por HSV-2 incluyen monoartritis, hepatitis, trombocitopenia y mioglobinuria. El embarazo predispone a diseminación grave visceral. La reactivación del herpes genital en pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquellos con trastornos de la inmunidad celular, puede asociarse con neumonía intersticial, hepatitis y neumonitis. Estas infecciones diseminadas están asociadas a una elevada mortalidad y deben tratarse en forma sistémica.

La infección prolongada por HSV es una de las más comunes presentaciones clínicas del paciente coinfectado con HIV, además la reactivación del HSV, especialmente la excreción perianal en hombres y la excreción vulvar subclínica en mujeres. Un bajo recuento de CD4 y una alta carga viral están asociados a una alta incidencia de reactivación. El tratamiento antirretroviral de alta eficiencia disminuye la frecuencia de las lesiones genitales pero la reactivación subclínica continúa siendo frecuentemente detectada. Las úlceras genitales, incluyendo las causadas por HSV-2, son un factor de riesgo reconocido para la transmisión de HIV. En las úlceras genitales herpéticas se encuentran altos títulos de HIV y la carga viral aumenta cuando se produce una reactivación de la infección por HSV-2 en los pacientes HIV positivos.

2.1.4 Diagnóstico

Para el diagnóstico de una infección por herpesvirus son útiles tanto el criterio clínico como el laboratorio. Un diagnóstico clínico puede realizarse en forma exitosa cuando las lesiones vesiculares típicas están presentes sobre una base eritematosa. Cuando el herpes genital se presenta en forma atípica el laboratorio es de gran ayuda en el diagnóstico y como guía terapéutica.

El aislamiento viral en cultivo está disponible y posibilita un diagnóstico en 2-5 días. La detección directa de antígenos es un ensayo rápido y es posible distinguir una infección por HSV-1 o HSV-2 con monoclonales específicos. También es posible utilizar una PCR para confirmar el diagnóstico de un herpes genital cuando las lesiones ya han formado la costra; sin embargo, por su elevado costo no se utiliza rutinariamente. La serología para HSV puede ser útil en el diagnóstico de pacientes que se presentan con úlceras ya resueltas, en las cuales el cultivo puede ser negativo y además puede ser utilizada para tamizaje (*screening*). Dicho tamizaje está recomendado en personas con riesgo de contraer HSV (infección por HIV, otras enfermedades de transmisión sexual, múltiples parejas, pareja con historia de infección por HSV) pero no en personas con historia de lesiones de herpes genital (véase el Capítulo 23.2 *Herpes simplex* para obtener detalles inherentes a la obtención de muestras y ensayos diagnósticos utilizados).

2.1.5 Tratamiento

Los análogos nucleósidos acíclicos (aciclovir, valaciclovir y famciclovir) son las drogas de elección para el tratamiento del herpes genital, tanto del primer episodio, del herpes recurrente como para la profilaxis de las recurrencias como tratamiento supresivo. El aci-

clovir tópico no aporta beneficio alguno en el tratamiento, por lo cual no está recomendado.

El tratamiento de las recurrencias puede ser episódico o supresivo. Cada vez hay mayor tendencia a recomendar el tratamiento supresivo debido a que la mayoría de los pacientes que experimentan una primoinfección por HSV se encuentran en riesgo de recurrencias y este tratamiento disminuye la gravedad de los síntomas de las recurrencias, la excreción asintomática del virus y, por lo tanto, la transmisión de la infección a las parejas seronegativas.

El uso de preservativos en parejas discordantes debe recomendarse aun cuando los pacientes estén asintomáticos debido al riesgo de la excreción viral. Un estudio reciente de 528 parejas monógamas discordantes para HSV-2 mostró que utilizando preservativos en más del 70% de los encuentros sexuales disminuía un 60% la transmisión. Otra opción es el tratamiento supresivo en la pareja seropositiva. En un estudio reciente, el tratamiento supresivo con 500 mg diarios de valaciclovir oral durante 8 meses disminuyó la transmisión en parejas discordantes en un 48%. Ningún enfoque, sin embargo, elimina el riesgo de transmisión.

Se encuentra en desarrollo una vacuna con la glicoproteína D para HSV-1 y HSV-2, que ha demostrado ser eficaz para evitar la transmisión del herpes genital en mujeres seronegativas para estos virus, pero no en varones ni en mujeres seropositivas para el HSV-1.

2.2 PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV)

2.2.1 Epidemiología

La infección genital por HPV es una de las más frecuentes enfermedades de transmisión sexual; su prevalencia en mujeres jóvenes se encuentra entre el 20 al 46% en diferentes países. Al menos el 50% de las mujeres y hombres sexualmente activos contraerán la infección genital por HPV en algún momento de sus vidas, y el 80% de las mujeres habrá contraído una infección genital por HPV al llegar a los 50 años de edad. La incidencia anual de infección en EE.UU. es de 6,2 millones de personas. La infección por HPV en la mujer tiene una prevalencia máxima a los 25-30 años de edad, que disminuye a partir de los 35 años.

Los estudios epidemiológicos claramente indican que ciertos tipos de HPV son la causa principal del cáncer cervical invasivo y de la neoplasia intraepitelial cervical. El cáncer cervical es la segunda causa de cáncer en la mujer en todo el mundo y la principal en países subdesarrollados. También se ha relacionado a este virus con el desarrollo de cáncer vaginal, vulvar, anal y cáncer peneano de células escamosas. Hoy se sabe que existen más de 100 genotipos de HPV. Los HPV genitales han sido subdivididos en un grupo de bajo riesgo, que se encuentra principalmente asociado a las verrugas genitales, y otro grupo de alto riesgo que se asocia con el cáncer cervical (véase el Capítulo 29 *Papilomavirus humanos*).

2.2.2 Presentación clínica

El período de incubación varía entre 3 a 4 meses desde la inoculación hasta el desarrollo de las verrugas, aunque puede tardar hasta dos años. La infección puede ser latente, asintomática, o generar un espectro de lesiones que van desde verrugas genitales hasta el cáncer de cervix. El virus puede inducir lesiones que resuelven completamente o que persisten con escasa o ninguna alteración citológica. La lesión puede resolverse o mantenerse, progresando a cáncer invasivo o permanecer como lesiones precursoras. Las infecciones con los virus de alto riesgo y una edad mayor son factores de riesgo para una infección por HPV persistente.

Las verrugas genitales o condilomas son las lesiones clínicas más comunes del HPV genital. En su mayoría son lesiones exofíticas, con forma de coliflor, llamados condilomas acuminados. Éstos consisten en pápulas exofíticas hiperqueratóticas que en los varones suelen localizarse en el pene, la uretra, la región perianal y, más raramente, en el escroto. En el hombre circuncidado la cavidad del prepucio se compromete en el 80 a 90% de los casos. El meato uretral se afecta hasta en el 25%, pero el compromiso de la uretra y la vejiga es excepcional. En las mujeres, las lesiones

se hallan en vagina, vulva, ano y cérvix uterino. Ocasionalmente, son grandes e invasivos (tumores de Busche-Löwenstein). El uso del colposcopio y la previa tinción del tejido a examinar con ácido acético al 3% ha permitido descubrir mayor cantidad de lesiones de menor tamaño, particularmente las producidas por HPV 16 y 18 (alto riesgo) que pueden ser muy pequeñas. La presencia en el examen con el colposcopio de las verrugas genitales puede indicar la existencia de lesiones del epitelio cervical escamosas producidas por HPV, incluyendo la neoplasia cervical intraepitelial (CIN). La definición histológica de la CIN depende del patrón de organización celular y de la atipia citológica. El cáncer cervical invasivo está precedido por una combinación progresiva de anomalías del epitelio cervical, que se clasifican en 4 categorías de menor a mayor gravedad.

Aproximadamente un cuarto de los pacientes afectados de verrugas anogenitales se encuentra asintomático. Sin embargo, es frecuente la consulta por picazón, ardor y dolor en el área de las lesiones, además de los efectos psicológicos que esta patología puede generar.

La infección por HIV es un importante factor de riesgo para la infección por HPV y para el desarrollo de lesiones asociadas a la infección en ambos sexos. La infección por HIV y los altos niveles de inmunodepresión son factores determinantes de una infección persistente. La elevada prevalencia y persistencia de estas infecciones sugiere un aumento del riesgo para el desarrollo de neoplasias intraepiteliales y de cáncer invasivo de cérvix, vagina, vulva, ano y región perianal.

2.2.3 Diagnóstico

Los programas de prevención de cáncer cervical se basan en la prueba citológica de una muestra de cérvix uterino en la mujer, el Papanicolaou. La infección del aparato genital puede ser subclínica y detectarse por el examen colposcópico, tras la aplicación de ácido acético al 3%. Si la apariencia de la lesiones es sospechosa se debe practicar una biopsia, ya que la histopatología de la lesión por HPV es característica. Actualmente, la búsqueda de DNA del HPV forma parte de la estrategia de tamizaje. El desarrollo de técnicas de hibridación ha permitido tipificar los genotipos del HPV y detectar el genoma en las células infectadas. La técnica de captura de híbridos II (Dygene®) es el único ensayo aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration* [Administración de Alimentos y Drogas de EE.UU.]) para la detección sistemática de HPV. Esta técnica identifica todos los genotipos de alto riesgo y 5 genotipos de bajo riesgo. La técnica de PCR, es de mayor sensibilidad y está disponible comercialmente pero con fines de investigación solamente al 2011 (RUO: Research Use Only). En el futuro probablemente se podrá disponer de nuevos marcadores biológicos que permitan identificar que lesiones remitirán y cuáles progresarán.

El uso del colposcopio durante una anoscopia (anoscopia de alta resolución) combinada con la citología anal ha sido aplicada con éxito en el diagnóstico de lesiones intra-anales por HPV.

2.2.4 Tratamiento

Al momento no se ha descubierto un tratamiento altamente efectivo y seguro para la enfermedad por HPV. Los tratamientos clásicos tenían como objetivo la eliminación física o química de las lesiones mientras que los nuevos tratamientos se basan en terapéuticas antivirales o inmunomoduladoras. Aunque las guías de tratamiento son útiles, no siempre es posible realizar recomendaciones firmes para la estrategia de tratamiento, debido a los distintos factores que influyen en la evolución de esta infección. La eficacia terapéutica en las verrugas anogenitales oscila entre el 22 y el 94%, con un 25% de recurrencias a los tres meses, que se atribuye a la persistencia del virus en tejido adyacente normal. Los tratamientos disponibles para las verrugas genitales externas incluyen la podofilotoxina (agente cáustico) y el imiquimod (inmunomodulador, inductor de interferón- α). El ácido tricloroacético o el ácido bicloroacético son opciones de tratamiento y ambos

pueden utilizarse durante el embarazo, sin embargo su aplicación es dolorosa y puede generar úlceras. La crioterapia es considerada un tratamiento efectivo y puede realizarse en el embarazo. Otros tratamientos disponibles son: el 5-fluorouracilo, el interferón intralesional, cidofovir al 1% y cirugía con láser. Las lesiones genitales internas están asociadas a displasias y neoplasias, por lo cual su manejo diagnóstico como terapéutico requiere ser referido a un especialista.

2.2.5 Prevención

Aunque se desconoce el efecto de los condones en la prevención de la infección por HPV, se ha asociado su uso a una tasa más baja de cáncer cervical. También hay estudios que demuestran que la circuncisión disminuye el riesgo de adquisición de HPV en el hombre y, por lo tanto, reduce el riesgo de cáncer cervical en la mujer. Al momento existen dos vacunas bajo investigación. Una desarrollada, por el laboratorio Merck, para uso en hombres y mujeres protege contra los HPV 16 y 18 (responsables del 70% de los casos de cáncer cervical, anal y genital) y los tipos 6 y 11 (que causan el 90% de las verrugas genitales). La otra vacuna desarrollada, por el laboratorio Glaxo Smith Kline, es para inmunizar a mujeres contra los tipos 16 y 18 de HPV (véase el Capítulo 29 *Papillomavirus humanos*).

3. INFECCIONES URINARIAS DE ORIGEN VIRAL

3.1. CISTITIS HEMORRÁGICA

La presentación clínica más grave de la cistitis en pacientes con cáncer, es la cistitis hemorrágica, que ocurre en el 10 a 40% de los pacientes que han recibido quimioterapia a altas dosis. Los pacientes con trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas muestran alto riesgo, con una incidencia del 30%; sin embargo, la presentación grave es la menos frecuente (10% de los casos). La cistitis hemorrágica puede ser consecuencia del tratamiento anti-neoplásico a través de dos vías: daño directo (cistitis por radiación, o inducida por quimioterapia), o lesión del epitelio vesical a través del contacto de metabolitos tóxicos excretados por el riñón. La cistitis hemorrágica infecciosa se desarrolla cuando el paciente que recibió quimioterapia, se encuentra inmunosuprimido. Puede tener una presentación dramática pero usualmente resuelve espontáneamente en menos de dos semanas con tratamiento de soporte (rehidratación y control del dolor). Según su presentación clínica se divide en leve (de manejo ambulatorio), moderada (requiere hidratación parenteral y prevención de la formación de coágulos con irrigación continua de la vejiga, cistoscopia e instilación de astringentes) y grave (requiere transfusiones de glóbulos rojos, instilación de formalina, embolización, hasta cistectomía). Se han reportado tasas de mortalidad que fluctúan entre el 2 y el 4%. Las cistitis hemorrágicas son comunes en el paciente trasplantado con células progenitoras hematopoyéticas alogénicas. En el período precoz pos-trasplante (72 horas post-trasplante) están mayoritariamente asociadas a las altas dosis de ciclofosfamida, y en el período post-trasplante tardío se asocia a infecciones virales como las producidas por los virus JC, BK y los adenovirus.

3.1.1. Poliomavirus

Las infecciones por poliomavirus humanos se han descubierto recientemente. El virus JC se aisló por primera vez en 1971 del cerebro de un paciente con leucoencefalopatía multifocal progresiva mientras que el virus BK se aisló —en cultivos de células de riñón embrionario humano y en fibroblastos humanos— en el mismo año a partir de orina de un paciente con trasplante renal. Los nombres de ambos virus provienen de las iniciales del nombre de de los pacientes de los cuales se aislaron.

La infección por estos virus está diseminada mundialmente, pero las manifestaciones clínicas son poco frecuentes en hospedadores inmunocompetentes. Estos virus son responsables de la cistitis hemorrágica tardía en pacientes trasplantados de médula ósea y de estenosis ureteral y de nefritis intersticial en pacientes

trasplantados de riñón y en pacientes infectados por HIV. Aproximadamente el 50% de los pacientes sometidos a trasplante de médula ósea presenta viruria excretando BK, usualmente durante los primeros dos meses post-trasplante. La hipótesis es que esta viruria representa la reactivación de una infección latente, ya que se ha descrito la excreción viral sólo en pacientes que eran seropositivos en el período pre-trasplante. La viruria por BK precede a los síntomas clínicos, sugiriendo que la excreción viral no es resultado del daño del epitelio vesical. La excreción del virus JC también ha sido detectada en un número reducido de pacientes trasplantados con células progenitoras hematopoyéticas, pero no hay suficiente evidencia aún para la asociación de la viruria por JC con las manifestaciones clínicas.

El diagnóstico se realiza por cultivo viral, citología en sedimento urinario y ensayos moleculares (PCR). El aislamiento en cultivo se realiza en instituciones dedicadas a la investigación, ya que el virus se propaga lentamente en algunas líneas celulares. El aislamiento del virus de una muestra clínica puede demandar un lapso que oscila entre semanas y meses. El examen citológico de la orina puede demostrar en forma rápida la presencia de un poliovirus. La anomalía más característica de las células infectadas es un gran núcleo con una única inclusión basofílica (células *decoy* o señuelo). La identificación de los cambios citopatológicos es altamente sugestiva de infección por poliovirus pero puede confundirse con lesiones neoplásicas o con infecciones por adenovirus o citomegalovirus. Otras desventajas son que no distingue entre infecciones por BK y JC y que

estos cambios pueden estar ausentes, aun en presencia de viruria detectada por PCR. Las técnicas moleculares (PCR) permiten detectar el DNA del virus BK y constituyen el procedimiento más utilizado. Además, el virus BK puede cuantificarse por ensayos de PCR en Tiempo Real (véase el Capítulo 30 *Poliovirus: Virus BK y JC*).

En la actualidad no hay tratamientos disponibles para estos virus, si bien el cidofovir tiene actividad *in vitro* para ambos virus y la adenina arabinósido para el JC.

3.1.2 Adenovirus

Los adenovirus –subgrupo B, tipos 11 y 21– se han asociado a cistitis hemorrágicas en niños. Ésta es una enfermedad autolimitada, más común en varones, que usualmente no se acompaña de fiebre ni de hipertensión.

En adultos, los adenovirus –subgrupo D, tipos 19 y 37– ocasionalmente se asocian con uretritis. En pacientes inmunosuprimidos, el subgrupo B, tipos 11, 34 y 35 pueden ser causa de cistitis hemorrágica y de nefritis túbulo-intersticial. Los ensayos diagnósticos disponibles en la actualidad son: el aislamiento en cultivo, la detección de antígenos, la pesquisa genómica mediante PCR y la biopsia de tejidos (véase el Capítulo 16 *Adenovirus*). Los tratamientos con ribavirina y cidofovir presentan buena actividad *in vitro*, pero no existen suficientes datos sobre su eficacia clínica.

NOTA

Este capítulo se finalizó en el año 2009.

Bibliografía

- Bernstein DL, Aoki FY, Tyring SK, Stanberry LR, St.-Pierre C, Shafran SD, *et al.* "Safety and Immunogenicity of glycoprotein D-adjuvant genital herpes vaccine." *Clin Infect Dis* 2005;40:1271-81.
- Corey L, Wald A, Patel R, Sacks SL, Tyring SK, Warren T, *et al.* "Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes." *N Engl J Med* 2004; 350:11-20.
- Margall Coscojuela N. "Infecciones por papilomavirus." En: *Editorial médica Panamericana Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. España, 2005; 783-93.
- Kimberlin DW, Rouse DJ. "Genital Herpes." *N Engl J Med* 2004; 350:1970-7.
- Kojoaghlanian T, Flomenberg P, Horwitz P. "The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host." *Rev Med Virol* 2003; 13:155-71.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, *et al.* "Epidemiologic classification of Human papillomavirus types associated with cervical cancer." *N Engl J Med* 2003; 348:518-27.
- "Sexually Transmitted Diseases treatment guidelines 2002". *MMWR Recomm Rep* 2002; 51 (RR-6): 1-78.
- Replöeg MD, Storch GA, Clifford DB. "BK virus: a clinical review." *Clin Infect Dis* 2001; 33:191-202.
- Simmons A. "Clinical manifestations and treatment considerations of Herpes simplex virus infection". *J Infect Dis* 2002; 186 (Suppl): S71-7.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, *et al.* "The 2001 Bethesda system terminology for reporting results of cervical cytology". *JAMA* 2002; 287:2114-19.



Infecciones virales en la embarazada y el recién nacido

Angélica L. Distéfano

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones en la embarazada son una causa importante de morbilidad y mortalidad del recién nacido. La embarazada generalmente está más expuesta a las infecciones asociadas a la niñez que el resto de los individuos. Los niños se enferman más frecuentemente y su contacto representa un factor adicional.

La mayor parte de las infecciones en las embarazadas involucran el tracto respiratorio, el gastrointestinal y el genital. Una vez que el microorganismo infecta por alguna de estas vías, diferentes factores pueden determinar la evolución de la enfermedad. Si como consecuencia de esta infección hay una invasión del torrente sanguíneo, las posibilidades de infección del feto son mucho mayores. La placenta cumple un rol fundamental actuando como barrera para proteger al embrión de los microorganismos circulantes. Asimismo, la respuesta inmune de la madre en la infección primaria genera anticuerpos de clase IgG que atraviesan la placenta, intentando proteger al feto o embrión. Por el contrario, los de clase IgM -debido a su tamaño- no atraviesan la placenta. El feto genera su propia respuesta inmune IgM específica luego de la infección.

2. FACTORES QUE DETERMINAN LA APARICIÓN Y EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD EN LA EMBARAZADA Y EL EMBRIÓN O FETO

Hay dos aspectos importantes que se deben tener presentes: a) la infección materna puede estar acompañada de síntomas leves o ser asintomática; y b) la infección en la madre no siempre significa que el recién nacido sea afectado. Por ello, la observación médica durante el embarazo y el conocimiento del estado inmunológico previo al embarazo son de gran importancia. El conocimiento del estado inmunológico previo al embarazo mediante la determinación de IgG específica orienta el comportamiento médico. Esta información es fundamental para el manejo de la paciente respecto al seguimiento y a los consejos. El tamizaje serológico prenatal o "screening prenatal" incluye las determinaciones de IgG anti-virus rubéola, varicela y HIV, y anti-*Treponema pallidum* (sífilis), así como la detección del HBsAg (antígeno de superficie de hepatitis B). Asimismo, en algunos países se incluyen las determinaciones de IgG e IgM para *Toxoplasma gondii* y citomegalovirus humano.

Si la determinación del estado inmune (IgG) para rubéola, varicela o la detección del HBsAg y anti-*core* son negativos, se infiere que la paciente no ha tenido la primo-infección; son pacientes susceptibles a una infección y se aconseja la aplicación de las vacunas correspondientes. En los casos de infecciones que no son inmunoprevenibles por vacunación como las causadas por el *Treponema pallidum* y el HIV, la presencia de una infección determina un tratamiento específico.

Las consecuencias para el embrión o el feto pueden variar de mayor a menor gravedad si la infección es primaria o no, y según el tiempo de gestación en que ocurra la infección. En las infecciones virales es también importante la virulencia de las cepas. Las primeras etapas de formación del embrión están más relacionadas con la aparición de malformaciones y aborto espontáneo. Hay factores secundarios, que también deben considerarse, tales como causas hormonales, nutrición, y otros externos como la rotura prematura de las membranas y el monitoreo fetal invasivo.

3. VÍAS DE TRANSMISIÓN

Los agentes virales, bacterianos o parasitarios pueden afectar el curso de un embarazo por infección transplacentaria, vía ascendente o no, y por infecciones adquiridas por pasaje a través del canal de parto. La infección transplacentaria ocurre cuando la embarazada adquiere una infección por la cual el virus circulante en su sangre (viremia) puede penetrar la placenta, afectar su funcionamiento e invadir al feto. A estas infecciones se las denomina también infecciones congénitas y se las define como aquellas que ocurren en el embrión o feto, antes de su nacimiento.

Las infecciones ascendentes, se producen cuando los microorganismos residentes en los genitales externos de la embarazada llegan al saco amniótico. Este evento es el principio por el cual atravesando la placenta o dañándola el virus puede llegar al líquido amniótico e infectar al embrión o feto en formación por tres mecanismos: a) aspiración, posterior pasaje al pulmón y a la circulación; b) ingestión; o c) penetración a través del conducto auditivo externo. A su vez, la reacción inflamatoria sobre el saco amniótico, desencadenada por la infección, puede iniciar la labor de parto antes que la maduración del feto se complete.

Algunos agentes virales localizados en los genitales externos, en el momento del pasaje por el canal de parto, pueden contaminar al feto, por exposición a las secreciones y a la sangre de la madre. Estas infecciones se denominan infecciones perinatales y son aquellas que se contraen durante el nacimiento hasta la cuarta semana de vida. Hay otras formas de transmisión como la lactancia materna, las infecciones adquiridas en la sala de cuidados intensivos y en el cuarto de bebés.

En las Figuras 43.1 y 43.2 se muestran las infecciones microbianas / parasitarias más comunes que pueden complicar un embarazo.

3.1 INFECCIONES TRANSPLACENTARIAS O CONGÉNITAS (ASCENDENTES O NO)

Una vez que la infección se ha producido en el embrión o el feto pueden ocurrir la muerte y reabsorción del embrión, el aborto o un recién nacido prematuro o a término, que puede ser normal o no. Las principales manifestaciones en el recién nacido son: bajo peso y desarrollo de malformaciones, las que pueden ser características de determinados agentes virales o comunes a varios de ellos. Las infecciones adquiridas en el útero materno pueden persistir, manifestarse rápidamente luego del nacimiento o ser reconocidas meses más tarde.

Los virus más frecuentemente asociados a la infección congénita son: rubéola, citomegalovirus, HIV, parvovirus B19, varicela, herpes simplex (tipos 1 y 2). El 5 – 15% de los casos de transmisión vertical del virus de la hepatitis B es causado por infección transplacentaria. Los echovirus y el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM) son agentes infrecuentes asociados a la transmisión congénita. También agentes tales como *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Treponema pallidum* y *Listeria monocytogenes* causan infecciones congénitas.

3.1.1 Manifestaciones clínicas más frecuentes asociadas a las infecciones virales congénitas

Rubéola: calcificaciones intracraneales, microcefalia, cataratas, defectos cardíacos, hepato-esplenomegalia, osteítis y sordera.

Citomegalovirus: calcificaciones intracraneales, microcefalia, hidrocefalia, hepatomegalia, trombocitopenia, sordera y corio-

retinitis. El 10-15% de los casos de transmisión vertical son sintomáticos; el 85-90% restantes son asintomáticos. De estos últimos el 10-20% presentan secuelas de aparición tardía.

Herpes simplex tipos 1 y 2: lesiones en piel, ojos o manos, encefalitis y sepsis.

Varicela zóster: Microcefalia, hidrocefalia, hipoplasia de miembros, cicatrices en ellos, coriorretinitis, cataratas e hidronefrosis.

Parvovirus B19: muerte intrauterina, hidropesía fetal y anemia fetal.

3.2 INFECCIONES PERINATALES

En las infecciones perinatales las manifestaciones más comunes son la septicemia, la neumonía y la meningitis.

Los virus más frecuentemente asociados son citomegalovirus, HIV, herpes simplex (tipos 1 y 2), varicela, hepatitis B y hepatitis C.

Otros agentes asociados a la transmisión perinatal son: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus hemolítico grupo B* y *Listeria monocytogenes*.

4. DIAGNÓSTICO

4.1 EL DIAGNÓSTICO EN LA EMBARAZADA

Es de fundamental importancia por sus implicancias en el desarrollo de un nuevo ser. Los estudios por imágenes evolucionaron mucho en los últimos años. El diagnóstico de laboratorio por serología de las infecciones en la embarazada sintomática es semejante al diag-

nóstico en el individuo adulto. Las técnicas se han perfeccionado y la serología por ELISA de afinidad permite diferenciar, en algunos casos, si la infección es reciente o pasada. Esta técnica consiste en un ELISA modificado que determina cuál es la fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo; esta unión se incrementa a medida que transcurre el tiempo luego de la primoinfección. Una alta avidéz indica que la infección ocurrió varios meses atrás, mientras que una baja avidéz indica una infección reciente. Algunas muestras pueden presentar avidéz intermedia y quedar indeterminadas.

El desarrollo de las técnicas moleculares, en particular la PCR, ha contribuido a la identificación del virus sospechoso en el líquido amniótico con una mayor sensibilidad en comparación con el aislamiento viral. Todos estos progresos han contribuido significativamente a los avances del diagnóstico de las infecciones virales en la embarazada.

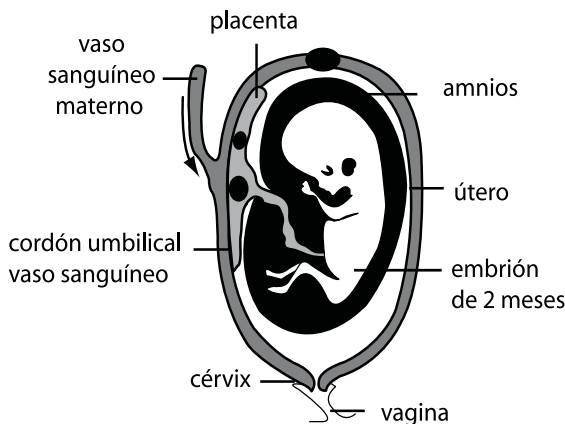
La serología previa al embarazo (IgG) *screening* o tamizaje pre-concepción debe ser realizada por motivos de prevención, aunque implique un costo mayor. En el caso de citomegalovirus, este "screening" previo al embarazo es muy discutido mundialmente. Muchos investigadores, consideran que es inaceptable la omisión de este análisis teniendo en cuenta que un resultado negativo permite indicar medidas de prevención y de seguimiento (Tabla 43.2).

4.2 EL DIAGNÓSTICO EN EL RECIÉN NACIDO

En el año 1971 fue acuñado el término TORCH por Namias y col. Este acrónimo proviene de reunir las iniciales de los siguientes vocablos: T (toxoplasmosis), O (otras infecciones virales y bacterianas), R (rubéola), C (citomegalovirus), H (herpesvirus).

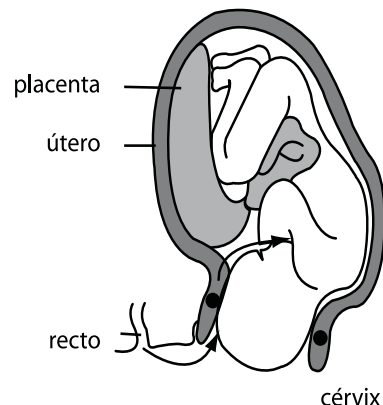
Virus	Prematuro	In útero RCI / BP	Desarrollo de anomalías	Enfermedad congénita	Infección post-natal persistente
Rubéola	-	+	+	+	+
CMV	+	+	+	+	+
HSV	+	+	-	+	+
Varicela-zóster	-	+	+	+	+
Parvovirus B19	-	-	-	(+)	-
HBV	+	-	-	+	+
HIV	(+)	(+)	(+)	+	+

Tabla 43.1. Efecto de las infecciones virales más frecuentes en el feto y el neonato. (+) Se ha sugerido una asociación entre la infección y la aparición del efecto. **RCI:** retardo del crecimiento intrauterino; **BP:** bajo peso; **CMV:** citomegalovirus; **HSV:** virus herpes simplex; **HBV:** virus hepatitis B.



● sitio de la infección → vía de la infección

Figura 43.1. Infección congénita (en útero).



● sitio de la infección → vía de la infección

Figura 43.2. Infección perinatal.



	Muestras	Serología	Técnicas moleculares	Aislamiento
Rubéola				
Embarazada	Sueros L. amniótico	IgG ⁽¹⁾ , IgM	PCR	Sí
RN	Suero Aspirado naso-faríngeo Sangre seca	IgM	PCR PCR	Sí ⁽²⁾
Citomegalovirus				
Embarazada	Sueros L. amniótico	IgG ^(1,3) , IgM ⁽⁴⁾	PCR	Sí ⁽⁵⁾
RN	Suero Orina LCR Sangre seca	IgM ⁽⁶⁾	PCR PCR PCR	Sí ⁽⁷⁾ Sí ⁽⁵⁾
Herpesvirus 1 y 2⁽⁸⁾				
Embarazada	Lesiones Flujo vaginal		PCR PCR	Sí Sí
RN	Lesiones LCR Sangre seca		PCR PCR PCR	Sí Sí ⁽⁵⁾
Varicela-zóster⁽⁸⁾				
Embarazada	Lesiones		PCR	Sí
RN	Lesiones LCR Sangre seca		PCR PCR PCR	Sí Sí ⁽⁵⁾
Parvovirus B19				
Embarazada	Suero LCR L. amniótico	IgG ⁽¹⁾ , IgM ⁽⁵⁾	PCR PCR PCR	No No No
RN	Suero	IgM	PCR	No

Tabla 43.2. Diagnóstico de Laboratorio: muestras y técnicas más frecuentes. RN: recién nacido; (1): sueros pareados, (2): con fines epidemiológicos; (3): ELISA por afinidad; (4): Las reactivaciones cursan con IgM [+]; (5) poco sensible; (6): frecuentes falsos negativos y positivos; (7): cultivo rápido; (8) si se sospecha una primoinfección (poco frecuente) se estudian los sueros de muestras pareadas (IgG) e IgM.

El término TORCH agrupaba a aquellas infecciones que se presentaban en el recién nacido con una sintomatología semejante. Mediante ese término se enviaba al laboratorio suero del recién nacido para detección de IgG específica contra los agentes mencionados.

Cabe destacar que, en esa época, no estaban disponibles los ensayos para IgM específica.

Por ello, un título elevado de IgG específica contra determinado patógeno y su disminución en los 4 a 6 meses luego del nacimiento sugerían una infección congénita.

Desde hace mucho años, ese término ya no se utiliza por las siguientes razones: a) se han descrito otros agentes como el HIV, hepatitis B ó C y Parvovirus B19; b) la determinación de IgG no es diagnóstica; y c) el seguimiento del recién nacido para obtener suero a los 4-6 meses es complicado.

Actualmente, los estudios por imágenes han mejorado notablemente, lo cual permite al neonatólogo orientarse hacia la sospecha clínica de determinada infección y solicitar al laboratorio pruebas específicas para cada virus en particular que confirmen su diagnóstico presuntivo. La serología, en particular la búsqueda de IgM específica es empleada frecuentemente y si es positiva es diagnóstico de infección congénita en las infecciones por rubéola y muchos

otros virus. Los posibles inconvenientes derivados de la presencia de factor reumatoideo en el suero se describen en el Capítulo 9.

Afortunadamente, el empleo de técnicas moleculares de elevada sensibilidad y especificidad, disponibles al presente, permiten la obtención de diagnósticos de certeza con mayor rapidez que el aislamiento viral (Tabla 43.2).

Los aspectos inherentes al diagnóstico virológico están desarrollados en los capítulos respectivos.

5. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES VIRALES CONGÉNITAS EN ARGENTINA

Rubéola. Las infecciones virales congénitas han variado en el mundo desarrollado según el agente viral a considerar. Desde la introducción de la vacuna en 1988 en EE. UU. y Canadá, los casos de rubéola congénita son aislados y los recién nacidos que la sufren son hijos de inmigrantes. La vigilancia de rubéola en los países subdesarrollados de América fue discontinua, y en el año 2002 aún faltaba incluir la vacuna en tres países (Perú, Haití y República Dominicana). Las campañas de vacunación han sido también incompletas.

En Argentina, el mayor registro de casos de rubéola ocurrió en 1992 (85.000 casos). Recién en el año 1998 fue introducida en forma gratuita y obligatoria la vacuna Triple Viral (resolución ministerial 107/97). Entre 1994 y el 2004, 378 casos sobre un total de 4.498 sospechosos tuvieron diagnóstico de rubéola. En el año 2003 se implementó la vacuna gratuita y obligatoria a los pre-adolescentes que no completaron el esquema de dos dosis y en el post-parto y post-aborto inmediato (resolución ministerial 174/2003).

La red de "Infecciones Virales en la Embarazada y el Recién Nacido" del ANLIS "Carlos G. Malbrán" realizó un estudio preliminar de detección de anticuerpos en pacientes embarazadas y población general. Se observó que la falta de cobertura de anticuerpos anti-rubéola varió según la región: 24% (Resistencia, Chaco); 20% (Guerica, Pcia. de Buenos Aires); 11,5% (Tucumán); 8,3% (Ushuaia, Tierra del Fuego); 7,8% (Formosa); 1% (San Luis); y cobertura del 100% en Córdoba, Mendoza y la C.A.B.A.

En 1999 fueron diagnosticados por serología tres casos de rubéola congénita y un caso en los años 2000 y 2003, respectivamente.

Los países de América establecieron durante la 44ta. Reunión del Consejo Directivo de OPS (2003) la meta de eliminación de la rubéola congénita para el año 2010, no registrándose casos en 2010 ni 2011.

Argentina inició su campaña de vacunación rubéola-sarampión entre septiembre y octubre de 2006, en mujeres de 15-39 años. Se continuó en 2008 en varones de 16-39 años y en el 2009 en niños de 1-4 años. La certificación de la eliminación de la rubéola y el síndrome de rubéola congénita por los organismos internacionales, requiere la interrupción de la transmisión endémica del virus durante –como mínimo– 3 años consecutivos.

Varicela. La varicela es actualmente una enfermedad inmunoprevenible por vacunación. En los países desarrollados la prevalencia de la infección es de 1 a 7 de cada 10.000 embarazadas; en Argentina la vacunación y la denuncia no son obligatorias. La infección no es frecuente en la embarazada, pero en los casos que la enfermedad se desarrolla tiene características de gravedad por el compromiso pulmonar. En el laboratorio del ANLIS "Carlos G. Malbrán" se diagnosticaron casos muy esporádicos de varicela congénita durante los últimos años.

Herpes simplex. Uno o dos casos anuales de infección congénita por herpes simplex tipo 1 y 2 se han detectado también en los últimos años. El diagnóstico de estos virus se realiza por PCR y la muestra del recién nacido es la sangre seca (dispensada sobre una tarjeta). En este material también se analizan citomegalovirus y varicela. La orina y el LCR son también estudiados para confirmar los hallazgos.

Citomegalovirus. La infección congénita por citomegalovirus es actualmente la más frecuente entre las producidas por dicha vía en los países desarrollados y tiene una prevalencia mundial del 0,2 al 1% de los nacidos vivos. La primoinfección se adquiere en la primera infancia, principalmente en la población de bajos recursos socio-económicos. La alta prevalencia de infecciones congénitas por citomegalovirus (4,6% de nacidos/año) que observamos en la pobla-

ción de baja condición socio-económica en nuestro país es causada por reactivaciones o reinfecciones de cepas circulantes, agravada por las malas condiciones de nutrición. Sin embargo, estas cifras son sesgadas, ya que las muestras enviadas para estudio al laboratorio del ANLIS "Carlos G. Malbrán" corresponden a casos sospechosos.

En un estudio serológico realizado por la red de "Infecciones Virales en la Embarazada y el Recién Nacido" en embarazadas observamos en las provincia de Chaco y Buenos Aires, en pacientes de baja condición socioeconómica una susceptibilidad de contraer la infección primaria de 0%, mientras que en C.A.B.A. y en Ushuaia fue de 2 y 8,6 %, respectivamente. En pacientes de alta-media condición social en la C.A.B.A. y Tucumán la susceptibilidad fue de 20% y en una población aislada de la provincia de Formosa dicha tasa alcanzó un 19,7%. Estos resultados indicaron que en la población de condición media-alta económica se mantienen los valores promedio señalados en la bibliografía mundial, en las regiones aisladas de Argentina probablemente la susceptibilidad alcance también estos valores (Comunicación a la Sociedad Argentina de Virología, XXIV Reunión Anual, noviembre de 2004).

Parvovirus B19. La infección por este agente viral no es inmunoprevenible por vacunación (véase el capítulo 19) ni es de denuncia obligatoria. La incidencia mundial estimada de infección primaria por parvovirus B19 en embarazadas es de 1,5%. El número de casos estudiados en el laboratorio del ANLIS "Carlos G. Malbrán" es muy bajo y los resultados son muy preliminares. Se observó que la prevalencia de pacientes con hidropesía fetal no inmunológica y exantema causados por parvovirus B19 fue de 29,4% y 20%, respectivamente. Dado que los casos enviados para estudio correspondieron a pacientes con sospecha clínica de infección por B19, dichos valores de prevalencia están sesgados.

HIV y HBV. Véanse los capítulos 22.5 (Transmisión madre a hijo del HIV) y 24.3 (Virus hepatitis B).

6. CONCLUSIONES

La realización de estudios serológicos previos al embarazo, las acciones tendientes a prevenir las infecciones inmunoprevenibles por vacunación, así como la educación sexual de la población deberían ser el objetivo principal de las autoridades sanitarias de la nación. Es también necesaria la educación de todo el personal de salud (incluyendo médicos y enfermeras), en relación al conocimiento de estas patologías, sus formas de prevención y su diagnóstico actual.

NOTA DE LOS EDITORES

Para el diagnóstico de infección viral en la embarazada, además de la serología, pueden emplearse técnicas invasivas como amniocentesis o muestreo de vellosidades coriónicas para detección de genomas virales por técnicas moleculares y cordocentesis (obtención de sangre fetal mediante punción del cordón umbilical) para búsqueda de IgM específica. Dado que su obtención implica riesgos, sólo se indicarían en casos especiales. La obtención de estas muestras para Virología no es habitual en nuestro medio.

Bibliografía

- Baquero-Artigao F. "Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus". *An Pediatr* (Barcelona). 2009; 71:535-47.
- Corey L, Wald A. "Maternal and neonatal herpes simplex virus Infections". *N Engl J Med* 2009; 361: 1376-85.
- Distéfano AL, González CA, Pardón F, Surubí MA, Canero-Velazco C. "Diagnóstico de la infección congénita por citomegalovirus en muestras de sangre seca de recién nacidos en la tarjeta de Guthrie. Una técnica promisoriosa". *Arch Argent Pediatr* 2008; 106: 132-7.
- Heegaard ED, Brown K. "Human parvovirus B19". *Clin Microbiol Rev* 2002, 15: 485-505.
- Kimberlin David W. "Neonatal herpes simplex infection". *Clin Microbiol Rev* 2004, 17:1-13.
- Revello MG, Gerna G. "Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant". *Clin Microbiol Rev* 2002, 15:680-715.
- Young SN, Brown EK. "Parvovirus B19". *N Engl J Med* 2004; 350: 586-97.



Infecciones virales transmisibles por vía transfusional

Jorgelina L. Blejer

1. INTRODUCCIÓN

La transmisión de infecciones por vía transfusional es una complicación de gran importancia en relación con la morbi-mortalidad en receptores de sangre. La trascendencia de la infección radica en que los donantes aparentemente sanos pueden tener infecciones, sobre todo virales, y en que con frecuencia no existe disponibilidad de tratamientos.

A lo largo del tiempo se fueron incrementando las medidas para disminuir el riesgo de transmisión de estas infecciones y en la actualidad, en los países desarrollados, es muy baja la posibilidad de desarrollar una enfermedad infecciosa como consecuencia de una transfusión.

A pesar del tamizaje de marcadores serológicos de enfermedades de transmisión por vía transfusional, existen cuatro razones por las que dicha transmisión aún puede ocurrir, a saber: a) cuando la donación de sangre se efectúa durante el período de ventana (lapso durante el cual el donante está infectado con un virus pero los resultados de la pesquisa serológica son negativos); b) la existencia de donantes asintomáticos portadores crónicos de una infección transmisible con resultados persistentemente negativos; c) infecciones con mutantes o cepas no detectables por las pruebas utilizadas; y por último d) errores técnicos en el laboratorio.

En la mayoría de los países se estudia para cada donación la presencia de los siguientes marcadores serológicos: anticuerpos anti-HIV-1/2, anticuerpos anti-virus hepatitis C (anti-HCV), antígeno de superficie del virus hepatitis B ([HBV]; HBsAg) y una prueba para sífilis. En algunos países se analiza además la presencia de anticuerpos anti-HTLV-I/II, antígeno p24 para HIV (Ag p24) y anticuerpos anti-*core* para HBV (anti-HBc). En nuestro país son obligatorias (Ley Nacional 22.990/83) las siguientes pruebas para enfermedades transmisibles: sífilis, brucelosis, Chagas, anti-HIV-1/2, anti-HCV y HBsAg para HBV. Además, según la Resolución 58/2005 del Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación (MSA), son obligatorias las determinaciones para anticuerpos anti-HBc para HBV, anti-HTLV-I/II y antígeno p24 para HIV.

La transmisión potencial de infecciones virales por vía transfusional fue reconocida desde hace más de 50 años. Aunque las primeras medidas adoptadas para disminuirla fueron dirigidas contra las hepatitis, no hay duda de que el HIV ha tenido la influencia más profunda en este campo.

2. INFECCIONES POR HBV, HCV Y OTROS VIRUS CAUSANTES DE HEPATITIS

La mayoría de los casos de hepatitis postransfusional conocidos son causados por los virus HBV o HCV, pero se piensa que existen otros agentes virales aún no identificados responsables de algunos casos. Desde los inicios de las transfusiones sanguíneas, se realizaron esfuerzos para prevenir estas infecciones, comenzando con el concepto de evitar la donación de personas con una historia de hepatitis previa y culminando con la utilización de técnicas de biología molecular para el tamizaje (*Nucleic Acid-Amplification Testing*: NAT).

2.1. VIRUS HEPATITIS B

El HBsAg fue descubierto en 1969 y desde 1972 fue obligatorio su estudio en donantes de sangre.

En EE.UU., las donaciones de sangre se estudian para HBsAg y anticuerpos anti-HBc. Schreiber y colaboradores estimaron el riesgo residual de 1:63 000 por unidad transfundida, basándose en el período de ventana y en la incidencia de nuevas infecciones.

En cuanto al papel cumplido por las pruebas subrogantes para detección de las hepatitis postransfusionales noA-noB (HPT-NANB), se introdujeron en los Bancos de Sangre de EE.UU., las pruebas para determinar ALT y anticuerpos anti-HBc ya que dos estudios importantes indicaban que la proporción de pacientes receptores de transfusiones que habían desarrollado HPT-NANB era mayor en aquellos que habían recibido unidades provenientes de donantes con niveles altos de ALT y con anticuerpos anti-HBc. El rango de seroconversión de HCV (principal causa de las HPT-NANB) disminuyó de un 0,52% a 0,36% por unidad transfundida después de implementar en 1987 la utilización de pruebas subrogantes.

En Argentina, en el año 2004, según la información de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS), la prevalencia para HBsAg en 470 669 donantes de sangre fue de 0,88% y para anticuerpos anti-HBc en 243 929 donantes del 2,96%. Los datos corresponden a unidades reactivas por técnicas de tamizaje sin confirmar por pruebas suplementarias.

2.2. VIRUS HEPATITIS C

El HCV fue descubierto en 1989. El primer ensayo inmunoenzimático (ELISA) de primera generación para detección de anticuerpos, contenía un solo antígeno recombinante derivado del gen no estructural NS4, el c100-3. Este ensayo comenzó a utilizarse en 1990 en donantes de sangre en EE.UU. y aún antes en Japón. Donahue y colaboradores estimaron que el riesgo de transmisión del virus era de alrededor del 0,45% antes de la iniciación del tamizaje en donantes. La implementación de la prueba de primera generación redujo el riesgo al 0,03%.

Los ensayos de segunda generación contienen antígenos del *core* y de NS3, y los de tercera generación han agregado el NS5. Las pruebas de segunda y tercera generación comenzaron a utilizarse en 1992 y 1996, respectivamente.

Schreiber y colaboradores estimaron que el riesgo de transmisión después de la implementación del ELISA de segunda generación era de 1:103 000 por unidad transfundida. El período de ventana se calculó en un promedio de 82 días con esta versión y de 70 días al utilizar el ELISA de tercera generación, con una disminución del riesgo transfusional.

Se ha estimado que la detección de RNA del HCV reduce en 59 días el período de ventana. Recientemente se ha desarrollado un ELISA para detección de antígeno del *core* del HCV. La reducción del período de ventana es menor a la obtenida con NAT. Este ensayo resultaría una alternativa aceptable para ser implementada con el fin de disminuir el riesgo de la transmisión del HCV en países en los que las técnicas de NAT resultan dificultosas de realizar por motivos económicos y logísticos.

En 1995, el Instituto Nacional de la Salud (NIH) de EE.UU. discontinuó la determinación de ALT y continuó la de anticuerpos anti-HBc, ya no para prevenir la transmisión del HCV, sino porque puede actuar como marcador subrogante de la infección por HIV y para prevenir algunos casos de HBV postransfusional.

En nuestro país, el compendio realizado por el ANLIS en el año 2004 arroja una prevalencia del 0,6% para anticuerpos anti-HCV en 469 785 donantes de sangre.

2.3. OTROS VIRUS CAUSANTES DE HEPATITIS

El virus hepatitis A puede ser transmitido por vía transfusional, pero la probabilidad de que esto suceda es mínima ya que causa una infección aguda y la fase virémica es muy corta y con frecuencia sintomática en los adultos. El virus hepatitis D es incompleto y requiere del HBV para su replicación. Es transmitido primariamente por contacto parenteral y las medidas para prevenir la transmisión de HBV son efectivas también para este virus. El virus hepatitis E presenta un modo de transmisión predominante por vía entérica, fundamentalmente en países en desarrollo. Como existe un período breve de viremia, hay un pequeño riesgo de transmisión por transfusiones de sangre y por derivados plasmáticos.

3. INFECCIONES POR RETROVIRUS

3.1. HIV

Las primeras informaciones acerca del SIDA implicaban que la enfermedad tenía etiología infecciosa y las medidas iniciales para reducir el riesgo de transmisión por transfusión fueron las de reducir la obtención de sangre de individuos con factores de riesgo de la enfermedad.

Busch y colaboradores estimaron que el riesgo de contraer una infección de HIV por vía transfusional en San Francisco a principios de la década de los 80 era del 1,2% por unidad transfundida. Este riesgo disminuyó al final de dicha década al 0,2%, como resultado de los esfuerzos de educar a los individuos pertenecientes a poblaciones de riesgo para evitar la donación de sangre.

El reconocimiento del HIV como agente etiológico del SIDA dio lugar al desarrollo de pruebas de ELISA para detección de anticuerpos para el virus. Los mismos fueron utilizados en EE.UU. a partir de marzo de 1985 para tamizaje en donantes de sangre. De todas maneras, continuaron describiéndose infecciones asociadas a transfusión. Esto se atribuyó en gran parte al período de ventana. Para determinar su extensión se desarrollaron modelos matemáticos en donantes a repetición. La estimación fue de 42-45 días con los ensayos de segunda generación que utilizaban antígenos recombinantes. El aumento en la sensibilidad de los ensayos de tercera generación, que detectan IgM además de IgG, redujo el período de ventana aproximadamente a 22 días y el riesgo residual en EE.UU. se estimó en 1:450 000 a 1:660 000.

El HIV-2 fue descubierto en 1985 en África Occidental. A partir de 1992 se utilizaron ensayos que utilizaban antígenos para ambos virus en la rutina del tamizaje en donantes de sangre.

En 1994, investigadores franceses describieron una variante endémica en países de África Central (HIV-1 grupo O); luego fueron desarrollados ELISAs para su detección.

El compendio realizado por el ANLIS en el año 2004 informa una prevalencia para anticuerpos anti-HIV del 0,18% en 466 978 donantes en Argentina, como resultado de pruebas de tamizaje.

En 1996 se estableció en EE.UU. el estudio del Ag p24 del HIV. Ensayos basados en paneles de seroconversión sugirieron que el tamizaje para Ag p24 reduciría el período de ventana a 16 días.

En nuestro país, en dos estudios realizado por Servicios de Medicina Transfusional, se confirmó reactividad para Agp24 en dos de 200 000 donantes. Por lo tanto, podríamos considerar que el tamizaje para Ag p24 es una alternativa útil hasta poder implementar el NAT.

3.2. HTLV- I y II

Reconocido en 1980, el HTLV-I fue el primer retrovirus humano, siendo posteriormente aislado el HTLV-II.

El HTLV-I es endémico en el sudoeste del Japón, el Caribe y África ecuatorial. Además, existen focos en poblaciones negras de

Colombia y Brasil, en indígenas en Colombia y Chile y en aborígenes de Australia Central. El HTLV-II es prevalente entre drogadictos por vía endovenosa y es endémico en poblaciones indígenas americanas.

El tamizaje para anticuerpos anti-HTLV-I en donantes de sangre fue iniciado en 1986 en Japón, y posteriormente se ha hecho obligatorio en varios países.

La probabilidad de transmisión por vía transfusional disminuye cuanto mayor es el almacenamiento, y como estos virus infectan a linfocitos, no se transmiten por productos extracelulares como plasma fresco congelado y crioprecipitados.

El HTLV-I está asociado al menos con dos enfermedades, la leucemia T del adulto, que presenta un período de incubación de 30-40 años, y una mielopatía asociada al HTLV-I, la paraparesia espástica tropical, cuyo período de incubación es de 3 a 5 años. El riesgo de adquirir la complicación hematológica es del 2-4% y el de desarrollar la mielopatía de menos del 1%. El HTLV-II no ha sido asociado hasta el momento con enfermedad alguna.

Schreiber y colaboradores estimaron que el riesgo residual de infección con HTLV en EE.UU. es de 1 en 641 000 unidades.

En nuestro país, la prevalencia en donantes de sangre es de 0,045 a 0,07% pero es muy importante destacar que en el norte de la Argentina es del 1,19%. También se han identificado individuos positivos para HTLV-II en ciertos grupos indígenas en el norte del país.

4. INFECCIONES POR OTROS VIRUS

4.1. CITOMEGALOVIRUS HUMANO (CMV)

Este virus, en general, no da lugar a enfermedad en el individuo inmunocompetente, pero puede resultar fatal en los inmunocomprometidos.

La seroprevalencia de anticuerpos anti-CMV en la población general es elevada, del 50 al 100% en diferentes países, dependiendo de factores tales como nivel socioeconómico, edad, área geográfica, etc. Este hecho ocasiona que la disponibilidad de unidades seronegativas sea muy limitada.

La transmisión de CMV por vía transfusional está asociada sólo a componentes celulares y la eliminación de leucocitos de preparaciones de glóbulos rojos y concentrados plaquetarios reduce la posibilidad de transmisión de la infección. En la actualidad, se utilizan unidades filtradas para los pacientes susceptibles, para reducir el número de linfocitos, y/o seronegativas para CMV.

4.2. PARVOVIRUS (ERYTHROVIRUS) B19

Este virus es responsable de una variedad de manifestaciones clínicas que dependen del estado hematológico e inmunológico del huésped. La seroprevalencia aumenta con la edad hasta alcanzar valores mayores al 90% en la población adulta.

El riesgo de transmisión por vía transfusional varía con la incidencia de la infección, que sigue un curso estacional y varía en diferentes años.

Aunque este virus puede causar enfermedad grave en fetos, individuos con anemias hemolíticas o hemoglobinopatías y en aquellos con inmunodeficiencias, sólo se han publicado pocos casos de enfermedades asociadas con transmisión por vía transfusional o por trasplante.

5. INFECCIONES POR VIRUS EMERGENTES

Los criterios para determinar la relevancia de un nuevo patógeno emergente en Medicina Transfusional son la patogenicidad, la prevalencia en la población de donantes y la persistencia en el hospedador.

5.1. VIRUS GB-C (GBV-C)

Este agente pertenece a la familia *Flaviviridae*. Fue identificado en 1995-1996. Tanto la sangre entera como derivados de plasma lo pueden transmitir.



La prevalencia en poblaciones de donantes de países desarrollados varía entre 1 y 5% cuando se mide la viremia y es entre 3 y 4 veces mayor cuando se evalúan los anticuerpos. En la ciudad de Buenos Aires, Argentina, se demostró que la viremia (detectada mediante RT-PCR anidada) está presente en el 5,5% de los hemodones. Aunque el virus cumple con los criterios de ser transmitido por transfusión y de provocar infecciones persistentes, no tiene patogenicidad conocida y, por lo tanto, el tamizaje de donaciones de sangre para GBV-C no está indicado.

5.2. TTV

En 1997 se identificó un nuevo virus en tres de cinco pacientes con hepatitis postransfusional en Japón. Es un virus a DNA, pequeño, sin envoltura. Los 6 genotipos se encuentran distribuidos universalmente y la infección resulta persistente en la mayoría de los individuos infectados. La prevalencia en donantes es elevada y se puede adquirir en edades muy tempranas.

Varios estudios han indicado evidencias de transmisión por vía transfusional pero gran cantidad de trabajos sugieren que este virus no es una causa significativa de enfermedad hepática, por lo tanto no se realiza la pesquisa del mismo en donantes de sangre.

5.3. SEN-V

Es un virus a DNA de cadena única, pequeño, sin envoltura. La prevalencia en donantes de sangre voluntarios de EE.UU. es del 1,8%.

La incidencia de infección por este virus después de recibir transfusiones fue del 30% a diferencia de un 3% en controles no transfundidos. El virus replicaría en hígado, pero no existiría asociación entre SEN-V y daño hepático.

5.4. HERPESVIRUS HUMANO-8 (HHV-8)

Es un gama herpesvirus que fue aislado en 1994 en pacientes serológicamente positivos para HIV afectados por el sarcoma de Kaposi (SK).

El SK se describió con una frecuencia relativamente alta luego de trasplantes renales, cardíacos y pulmonares, lo que llevó a sugerir la necesidad de su estudio en donantes de órganos. A pesar de esto, hasta el momento no se demostró la transmisión del HHV-8 por sangre y otros componentes, aunque esta posibilidad no puede ser excluida.

5.5. CORONAVIRUS ASOCIADO AL SARS

En noviembre de 2002, emergió una nueva infección humana en China. La misma causaba fiebre y síntomas respiratorios graves con un porcentaje de mortalidad del 7-15%. El agente etiológico es un nuevo coronavirus. La epidemia de SARS dio lugar a un esfuerzo público masivo para controlarlo. Las medidas incluían intervenciones para reducir el probable riesgo de transmisión por transfusión ya que el agente produce viremia, por lo menos durante la fase sintomática de la enfermedad. En muchos países los donantes potenciales se diferían si habían tenido un viaje reciente a las áreas afectadas, contacto con casos o enfermedad. Hasta el momento no ha habido casos de SARS atribuibles a transfusión.

5.6. VIRUS DEL OESTE DEL NILO (EN INGLÉS, WEST NILE VIRUS [WNV])

El caso del WNV resulta de gran interés, ya que induce una viremia aguda limitada en el tiempo en el contexto de una epidemia significativa.

Sin tener en cuenta estudios experimentales en Nueva York, no hubo casos conocidos de infección por WNV en el Hemisferio Occidental hasta el verano de 1999 en EE.UU., cuando se detectaron casos inusuales de encefalitis, que coincidieron con el hallazgo de pájaros enfermos, lo que fue atribuido al WNV. En ese año se registraron 62 casos y 7 muertes. Durante el 2000 y 2001 se registraron

87 casos más, confirmados como infección por WNV, y 11 muertes. El virus se diseminó a 44 estados y al distrito de Columbia, observándose más de 4 000 casos y 280 muertes durante el año 2002. En los siguientes años la cantidad de casos siguió aumentando.

El virus es miembro de la familia *Flaviviridae*. Es un agente pequeño, esférico, con envoltura, y RNA monocatenario. En la naturaleza se transmite entre pájaros a través de los mosquitos.

En cuanto a las características clínicas, la mayoría de los individuos infectados con WNV son asintomáticos. Entre el 20 y el 30% de los individuos infectados exhiben algunos síntomas que pueden implicar desde una fiebre leve y cefalea, hasta parálisis aguda y mielitis.

En cuanto a la transmisión por transfusión, el riesgo estimado en EE.UU. es muy alto, casi 2 000 veces mayor que para HCV y HIV y 200 veces mayor que para HBV, pero está limitado en tiempo y espacio.

En agosto de 2002, en respuesta a la posibilidad teórica de transmisión del WNV por vía transfusional, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) y el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de EE.UU., aconsejaron a los Bancos de Sangre y a los Centros de Salud estar alertas para poder detectar personas con infección por WNV que hubieran donado sangre la semana anterior a su enfermedad y por personas con encefalitis asociadas a fiebre, desarrollada después de recibir transfusiones de sangre.

En respuesta a estos mensajes, el 30 de agosto de 2002, el CDC recibió la información del primer caso de transmisión del WNV por vía transfusional en una mujer que recibió sangre luego de un proceso obstétrico. Luego, el CDC confirmó 23 casos de transmisión asociada al WNV de 61 pacientes identificados como posiblemente infectados con el virus por vía transfusional. Estuvieron implicados en la transmisión tanto glóbulos rojos, como plaquetas y plasma. Posteriormente se describieron más casos.

A partir de 2003, se estudiaron las donaciones de sangre para detectar RNA de WNV. Trabajos recientes indican que en 2,5 millones de donaciones, 877 fueron reactivas para NAT (3,5 cada 10 000 unidades).

La Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB), en su directiva final para WNV de junio de 2005, aconseja diferir a los donantes diagnosticados con WNV por 120 días y a realizar su seguimiento por NAT individual antes de su próxima donación.

Este virus emergente se ha diseminado a otros países como Canadá, México y el Caribe y no es posible excluir la posibilidad de que continúe su diseminación.

Es interesante destacar, que en nuestro país existen sistemas de humedales, como la Laguna de Mar Chiquita en Córdoba, que albergan una enorme diversidad de aves migratorias que se comparten con EE.UU. El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) confirmó que el día 21 de abril de 2006, se detectó la enfermedad por WNV en dos equinos de dos haras ubicados en el partido bonaerense de San Antonio de Areco. Por tal motivo, se suspendió transitoriamente la exportación de animales. No se comprobó mortandad inusual de aves en la región, ni presencia de síntomas compatibles entre el personal de los dos predios. Este hecho confirma nuestra preocupación por la relevancia del WNV en Medicina Transfusional en nuestro país.

6. TÉCNICAS PARA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (NAT) EN MEDICINA TRANSFUSIONAL

La utilización de NAT en Bancos de Sangre había sido propuesta por David Kessler, de la FDA, y por investigadores del *Retroviral Epidemiology Donors Study* (REDS) en 1996 en EE.UU.

En Alemania, la Agencia reguladora para componentes sanguíneos del Paul Ehrlich Institute, anunció en marzo de 1997 su intención de introducir el NAT para tamizaje de donaciones de sangre para HBV, HCV y HIV. Esta decisión se basó principalmente en datos reportados por la Cruz Roja Alemana de Westfalia que había detectado 6 casos de HBV y de 69 HCV por PCR y RT-PCR, respectivamente, en 650 403 donantes.

El Comité de Especialidades Farmacéuticas de la Agencia Europea del Medicamento (CPMP) requería que todos los derivados de plasma fueren estudiados para detectar RNA de HCV a partir del 1 de julio de 1999. Como muchos Bancos de Sangre y fabricantes de derivados de plasma de EE.UU. exportan productos sanguíneos a Europa, esto indujo a utilizar el tamizaje de NAT en ese país.

En respuesta a este requerimiento, AABB formó un grupo de trabajo integrado por miembros de varias instituciones para cumplir con estos objetivos.

Hasta hace poco tiempo la implementación de NAT se consideraba incompatible con las necesidades de un Banco de Sangre y no se consideraba una opción viable por las siguientes desventajas técnicas y económicas: a) el requerimiento de personal entrenado; b) la necesidad de gran espacio físico; c) la realización de las técnicas insume mucho tiempo, lo que atrasa la liberación de los productos; y d) el costo y la automatización parcial de los ensayos comerciales.

Los datos recientes de Francia, publicados en 2004, estimaron en el período 2000-2002 un riesgo residual sin realización de NAT de 1:1 400 000 para HIV, 1:1 000 000 para HCV y 1:400 000 para HBV. En los primeros tres años de utilización de NAT en EE.UU., 12 donaciones fueron serológicamente negativas pero confirmadas positivas para RNA de HIV y 170 para RNA de HCV en más de

37 000 000 de donaciones (1:3 100 000 para HIV y 1:270 000 para HCV).

La positividad para HIV era 4,1 veces mayor en donantes de primera vez que en donantes de repetición y para HCV 3,3 veces mayor. Los datos indican que la implementación de NAT en EE.UU. previene unos 5 casos de transmisión de HIV por vía transfusional y 56 HCV por año. Estos hallazgos son consistentes con lo predicho en modelos matemáticos. Busch estima que los niveles teóricos de riesgo de transmisión de infecciones virales por vía transfusional en EE.UU. es de 1:100 000 a 1:500 000 pre-NAT y 1:1 000 000 pos-NAT.

Así, a pesar de los temores iniciales, la fase de tamizaje de NAT ha ocurrido eficazmente y sin comprometer el abastecimiento de sangre. Con respecto al futuro, el sistema de implementación de NAT también permite una respuesta rápida a nuevos agentes emergentes que puedan afectar la seguridad en la transfusión de sangre, como en el WNV. Por otra parte, la utilización del NAT va a ser la única forma de discriminar entre personas infectadas y sujetos vacunados cuando estén desarrolladas las vacunas para HIV y HCV.

NOTA

Este capítulo se finalizó en el año 2008.

Bibliografía

- Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M. "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome". *Science* 1989;244:359-362.
- Schreiber G, Busch M, Kleinman S, Korelitz J. "The risk of transfusion-transmitted viral infection". *N Engl J Med* 1996;334:1685-90.
- Stramer S, Fang C, Foster G, Wagner A, Brodsky J, Dodd R. "West Nile virus among blood donors in the United States, 2003 and 2004". *N Engl J Med* 2005;353:451-459.
- Stramer S, Glynn S, Kleinman S, Strong M, Caglioti S, Wright D, Dodd R, Bush M. "Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by Nucleic Acid-Amplification Testing". *N Engl J Med* 2004;351:760-8.



Infecciones virales en pacientes con inmunosupresión post-trasplante

Laura Barcán - Fabián Herrera

1. INTRODUCCIÓN

Los pacientes receptores de trasplantes (Tx) de órgano sólido (TOS) y Tx de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) presentan un significativo inmunocompromiso generado en su mayor parte por los tratamientos inmunodepresores que reciben, que producen un importante impacto en la inmunidad celular. Es por esto que las infecciones virales tienen gran trascendencia, dado que pueden transmitirse por el injerto o por las transfusiones, pueden reactivarse con la inmunosupresión, e inclusive pueden potenciar los efectos inmunomoduladores que algunos virus poseen, induciendo una importante morbi-mortalidad.

Si bien los agentes etiológicos son los mismos para TOS y TCPH, existen entre ambos algunas diferencias en la incidencia, impacto clínico y estrategias de prevención. En este capítulo se tratarán en forma conjunta las características en común, y por separado las correspondientes a cada tipo de trasplante.

1.1 INFECCIONES EN TRASPLANTES DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS (TCPH)

El TCPH es un procedimiento en el que se realiza la supresión del sistema hematopoyético e inmune por efecto de quimioterapia con o sin radioterapia y se infunden células progenitoras hematopoyéticas (CD34⁺) de médula ósea o de sangre periférica del propio hospedador (Tx autólogo) o de un donante (Tx alogénico) relacionado o no relacionado. La incidencia, tiempo de aparición e impacto clínico de las infecciones difieren entre TCPH autólogos y alogénicos y están determinadas por el tipo y magnitud de la inmunosupresión predominante en el período post-trasplante (Figura 45.1). En el primer período, denominado *pre-engraftment* o prendimiento del injerto, el defecto inmune predominante es la neutropenia y el daño mucoso, siendo semejante en TCPH autólogos y alogénicos. En el segundo período o *post-engraftment* predomina la inmunodeficiencia celular, y en el tercer período o tardío, predominan la inmunodeficiencia celular y humoral. Éstas usualmente son menos profundas y se recuperan más rápidamente en los TCPH autólogos. Por el contrario, un porcentaje significativo de TCPH alogénicos, que varía según sea relacionado o no relacionado y el grado de compatibilidad entre el donante y el receptor, desarrollarán enfermedad injerto contra hospedador (EICH) aguda y/o crónica según el período post-TCPH. Ésta profundiza y prolonga la inmunosupresión celular, por lo que el mayor impacto de las infecciones virales se produce en los TCPH alogénicos. Sin embargo, factores tales como la enfermedad de base, el uso de quimioterapias con profundo efecto depresor sobre los linfocitos T (análogos de purina o anticuerpos anti-linfocitarios), infecciones previas o exposición epidemiológica incrementan el riesgo en ambos tipos de TCPH.

1.2 INFECCIONES EN TRASPLANTES DE ÓRGANO SÓLIDO (TOS)

Los pacientes que reciben un TOS requieren tratamiento inmunosupresor durante toda la vida para evitar el rechazo del órgano. La intensidad de la inmunosupresión es máxima a partir del segundo mes post-Tx, ya que el efecto de las drogas es acumulativo. El mayor riesgo de infecciones oportunistas ocurre entre los 2 y 6 meses, ya que si el paciente no presenta rechazos, luego de este período las

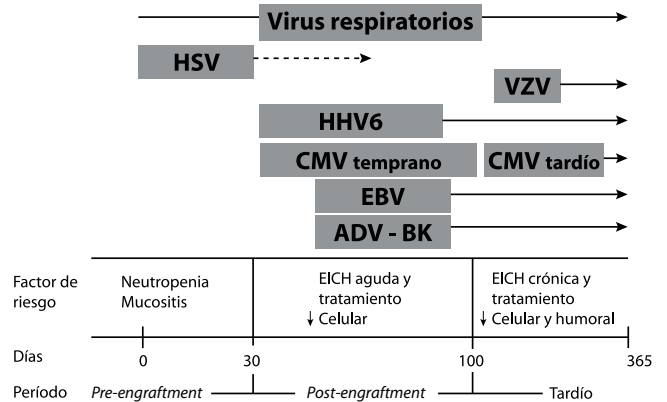


Figura 45.1. Tiempo de aparición de las infecciones pos TCPH alogénico. Modificado de: Kent A. Sepkowitz. "Risks and epidemiology of infections after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation". En: Raleigh A. Bowden, Per Ljungman, Carlos Paya. *Transplant Infections*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2003; pág. 32. EICH: Enfermedad injerto contra hospedador. Post-TCPH: post-trasplante de células hematopoyéticas.

dosis de las drogas inmunosupresoras indicadas decrecen progresivamente y algunas, como los corticoides, pueden ser discontinuadas. En ese caso, las infecciones más frecuentes son las adquiridas en la comunidad (Figura 45.2).

El rechazo agudo se trata con dosis altas de corticoides (pulso) y los rechazos que no responden se denominan cortico-resistentes y requieren tratamiento con globulinas anti-linfocitarias policlonales (GAL-GAT) o monoclonales (OKT3), o rotación de ciclosporina a tacrolimus. Las globulinas anti-linfocitarias producen una profunda depleción de linfocitos T, que puede prolongarse hasta los dos años del tratamiento, por lo que constituyen un factor de riesgo mayor para todas las infecciones virales en el período post-Tx.

2. CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV)

El HCMV es el patógeno viral de mayor trascendencia en pacientes que reciben un Tx, dado que tiene alta prevalencia y una morbi-mortalidad significativa. Se establece el diagnóstico de infección por HCMV mediante el aislamiento del virus o la detección de proteínas o ácidos nucleicos virales en sangre o tejidos; la enfermedad corresponde a las manifestaciones clínicas atribuibles a la infección. Afortunadamente, en los últimos años se han desarrollado técnicas de diagnóstico precoz y antivirales efectivos, motivo por el que los esfuerzos deben dirigirse hacia las estrategias de prevención.

2.1 TCPH

En los TCPH alogénicos la incidencia de infección y enfermedad están estrictamente relacionadas a la seroreactividad pre-Tx del donante y del receptor. En receptores seropositivos para HCMV (R⁺) la reactivación ocurre en el 80% y la incidencia de enfermedad temprana (dentro de los 100 días del Tx) era del 20-35% sin profilaxis, y actualmente es menor al 5% con ella. En receptores seronegativos que

reciben células progenitoras seropositivas (R/D⁺), la primoinfección ocurre en el 30% de los casos, pero la incidencia de enfermedad es muy baja con profilaxis. En pacientes R/D⁻ el riesgo de infección primaria es a través de las transfusiones de hemoderivados, motivo por el que se utilizan dadores seronegativos o, más frecuentemente hemoderivados con filtrado de leucocitos. El riesgo de infección y enfermedad con esta última estrategia es de alrededor del 1-2%. Otros factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad son: Tx no relacionados y HLA no idénticos (*mismatched*); tratamiento con dosis altas de corticoides (\geq de 1 mg/kg/día de prednisona) o con depleción de células T por selección de CD34⁺ o el tratamiento con anticuerpos anti-linfocitarios (anti-CD52) y análogos de purina; la EICH aguda y crónica el retraso en recuperar la respuesta T citotóxica y la carga viral de HCMV elevada.

El HCMV puede manifestarse con fiebre y citopenias o causar patología en múltiples órganos incluyendo neumonía, enterocolitis y hepatitis. La retinitis y la encefalitis son manifestaciones muy poco frecuentes que pueden aparecer en el período tardío. La enfermedad gastrointestinal afecta desde el esófago hasta el colon, pudiendo provocar erosiones y úlceras que obligan al diagnóstico diferencial con las lesiones producidas por virus herpes simplex (HSV) y adenovirus y por la EICH. A pesar de los avances terapéuticos, la neumonía sigue presentando una mortalidad mayor al 50%. Previamente, el pico de incidencia de la enfermedad temprana ocurría entre 45 y 60 días *post-engraftment* y en TCPH no relacionados que reciben alemtuzumab, el 50% de las reactivaciones se observan antes del día 27. En los últimos años, por efecto del uso de profilaxis que retrasa la respuesta inmune específica anti-HCMV, y la inmunosupresión grave y prolongada que tienen algunos Tx alogénicos, la enfermedad se diagnostica más frecuentemente en el período tardío (>100 días post-Tx) con una incidencia que oscila entre 4 y 15%. La mayoría de los casos ocurre entre los meses 4 y 12 post-TCPH.

Los factores de riesgo para enfermedad tardía son: la infección y enfermedad por HCMV en los primeros 3 meses post-Tx; la EICH crónica que requiera tratamiento inmunosupresor; el uso de altas dosis de corticoides y terapias antilinfocitarias; CD4⁺ < 50mm³ y TCPH alogénicos no relacionados, con disparidad HLA, con depleción de células T o de sangre de cordón.

En los TCPH autólogos seropositivos, la infección y la enfermedad son mucho menos frecuentes, presentándose en 39% y 1-5% de los casos, respectivamente. No obstante, la gravedad y la evolución de la neumonía es semejante a los TCPH alogénicos. Los factores de riesgo para enfermedad son: terapias anti-linfocitarias (fludarabina, gammaglobulina anti-linfocitaria, timoglobulina o alemtuzumab); y corticoides en altas dosis; la irradiación corporal total y la selección de CD34⁺.

2.1.1 Prevención y tratamiento

La prevención de enfermedad en el TCPH alogénico puede llevarse a cabo con dos estrategias: la profilaxis y el tratamiento preventivo (*preemptive therapy*), siendo esta última la más utilizada actualmente en los diferentes centros de Tx. La profilaxis consiste en el uso de ganciclovir EV (endovenoso) desde el *engraftment* o desde el día +10 post-TCPH, hasta el día + 100 a todos los trasplantados HCMV R⁺ o D⁺. En cambio, para el tratamiento preventivo, se realiza un monitoreo semanal o, en pacientes de muy alto riesgo, dos veces por semana desde el *engraftment* hasta el día + 100, con algún marcador de replicación viral (antígeno pp65, PCR cualitativa o carga viral plasmática para HCMV). Dado que las técnicas moleculares son las más sensibles, se emplean de preferencia en la actualidad, en especial la carga viral plasmática.

Los pacientes que tengan alguno de los factores de riesgo para desarrollar enfermedad tardía que fueron mencionados con anterioridad, deberán continuar monitoreándose más allá del día + 100 post-TX.

El tratamiento preventivo consiste en una fase de inducción con ganciclovir EV 5 mg/kg cada 12 h. por 7 a 14 días, seguido por una fase de mantenimiento con 5 mg/kg cada 24 h. hasta la

negativización de las pruebas de replicación viral. Los puntos de corte para indicar tratamiento varían según el período post TCPH (antes o después del día +100), la magnitud de la inmunosupresión, y la opinión de los consensos de expertos de los diferentes centros. Pacientes en período temprano e inmunosupresión grave, con cualquier valor de pp65 y 2 PCR cualitativas positivas deben iniciar tratamiento. Respecto de la carga viral plasmática, siempre iniciar tratamiento con \geq 1000 copias/ml. No obstante, algunos expertos recomiendan comenzar tratamiento con >100 a > 500 copias cuando la inmunosupresión es grave. En período tardío los puntos de corte para iniciar tratamiento son: \geq 5 núcleos de pp65, 2 PCR cualitativas positivas, y una carga viral plasmática > a 1000 copias o un incremento mayor a 5 veces respecto del valor previo.

Hasta ahora sólo el ganciclovir EV ha sido aprobado para uso en profilaxis y tratamiento preventivo; sin embargo, estudios recientes demostraron que valganciclovir oral en dosis de 900 mg cada 12 h. fue comparable en lograr la supresión de la replicación viral. Por este motivo, esta droga puede ser una alternativa válida, especialmente para pacientes en período tardío.

Dado que el riesgo de enfermedad en TCPH autólogos es menor, la mayoría de los centros no realiza monitoreo y el tratamiento preventivo de rutina, salvo que existan los factores de riesgo para enfermedad que fueron mencionados con anterioridad.

La estrategia de tratamiento de la enfermedad varía según el órgano afectado. Ante una neumonía, el tratamiento estándar se compone de ganciclovir EV 5 mg/kg cada 12 h. por lo menos 3 semanas con el agregado de gammaglobulina EV en altas dosis. La enfermedad gastrointestinal requiere ganciclovir EV en igual dosis que para la neumonía por 3-4 semanas sin gammaglobulina, seguido de varias semanas de mantenimiento con una dosis diaria. La recurrencia puede observarse hasta en el 30% de los pacientes que continúan gravemente inmunodeprimidos. Por esta razón, estos pacientes pueden beneficiarse con profilaxis secundaria hasta que la inmunodepresión pueda ser reducida.

El foscarnet es un tratamiento alternativo eficaz que se utiliza en pacientes que no puedan recibir ganciclovir.

2.2 TOS

Las tres formas de infección posibles en el post-Tx son:

- 1) Infección primaria: receptor negativo y adquisición de HCMV a través del órgano positivo o, menos frecuentemente, a través de transfusiones de sangre.
- 2) Reactivación: receptor positivo que reactiva su HCMV latente por la inmunosupresión.
- 3) Sobreinfección: receptor positivo y donante positivo en donde el HCMV endógeno (del receptor) o exógeno (del donante) se pueden reactivar. Se manifiesta generalmente a partir del 2° mes y, los casos en que aparece más allá del 6° mes se denominan tardíos.

La incidencia de enfermedad por HCMV sin profilaxis es de alrededor del 8% en el Tx renal, 25% en el Tx cardíaco, 29% en el Tx hepático, 40% en el Tx pulmonar y cercano al 50% en el Tx de páncreas e intestino.

La infección por HCMV produce efectos directos e indirectos. Los efectos directos son:

- 1) Síndrome viral: fiebre, decaimiento con o sin leucopenia o plaquetopenia.
- 2) Enfermedad de órgano: es más frecuente la afectación del órgano trasplantado, por ejemplo neumonitis en Tx de pulmón. Una localización importante es el tracto gastrointestinal, con síntomas como diarrea sanguinolenta y dolor abdominal causadas por ulceraciones en la mucosa intestinal. Es muy poco frecuente el compromiso de piel, SNC y retina.
- 3) Enfermedad diseminada con compromiso de más de un órgano.

Los efectos indirectos son:

- 1) Efecto inmunosupresor secundario: compromete la inmunidad celular y favorece particularmente la ocurrencia de las infecciones micóticas, por ejemplo por *Pneumocystis jirovecii*, y otras.

- 2) Relación con los rechazos agudos y crónicos.
- 3) Interacción con HHV-6 (mayor inmunosupresión), con EBV (Enfermedad linfoproliferativa post-Tx) y con otros virus de la familia *Herpesviridae*.
- 4) Vasculopatía: el virus infecta células endoteliales e induce proliferación neointimal.
- 5) Disminución de la sobrevida: se ha reportado mayor mortalidad en pacientes con TOS con infección por HCMV en comparación con los no infectados.

Los factores de riesgo para la enfermedad son: 1) la infección primaria (la forma que más riesgo de enfermedad presenta, así como de formas graves y de recurrencia); 2) el uso de globulinas anti-linfocitarias; y 3) los Tx de pulmón, intestino y páncreas debido a la intensidad de la inmunosupresión y a la carga viral del órgano trasplantado.

La serología (detección de anticuerpos Ig G, Ig M) es útil para determinar la presencia de infección en el receptor (pre-Tx) y en el donante, pero no es útil en el seguimiento post-Tx por la escasa sensibilidad del ensayo en pacientes inmunocomprometidos. Para detectar la infección primaria o la reactivación pueden utilizarse el aislamiento en cultivos celulares de diferentes muestras, el cultivo rápido en *shell-vial*, la detección del antígeno pp65 en sangre y la PCR cualitativa.

La detección de la antigenemia pp65 (Ag pp65) abrió una nueva era en el diagnóstico de HCMV por su rapidez (6-8 hs.) y mayor sensibilidad y especificidad. Por ello se ha convertido en un ensayo apto como monitoreo para iniciar el tratamiento preventivo o para el tratamiento. Es un ensayo semicuantitativo que se informa como el número de células positivas por neutrófilos analizados. Se ha demostrado que el mayor número de células positivas se correlaciona con enfermedad.

Las técnicas de biología molecular (PCR) pueden detectar RNA o DNA viral, ya sea de modo cualitativo o cuantitativo (carga viral). Para monitoreo, tanto de replicación como de respuesta al tratamiento, es preferible la carga viral. Se recomienda usar la técnica de PCR en tiempo real, ya que presenta mayor precisión.

Estas últimas 2 técnicas (Ag pp65 y PCR cuantitativa) son las recomendadas actualmente para el seguimiento de estos pacientes, si bien aún no existe estandarización de los valores de corte para ambas. La correlación entre dichas técnicas es buena, aunque no uniforme.

El diagnóstico de enfermedad tisular se efectúa por la visualización de cuerpos de inclusión en tejidos o en BAL, o detección del virus por inmunohistoquímica o hibridación *in situ*. La positividad de la PCR cualitativa u otras técnicas en tejidos no hace diagnóstico de enfermedad por HCMV. Se está evaluando el valor de la PCR cuantitativa (carga viral) en tejidos para diagnóstico.

2.2.1 Prevención y tratamiento

Prevención: existen 2 estrategias para la prevención de la enfermedad por HCMV en TOS.

Profilaxis universal. Consiste en la administración de drogas antivirales a todos los Tx, independientemente del estado serológico R/D, o a subpoblaciones de alto riesgo (*missmatch*, tratamiento con timoglobulina o Tx de pulmón e intestino). Las drogas recomendadas por consensos internacionales en 2009 y 2010 son: ganciclovir (EV u oral), valganciclovir y valaciclovir, este último solamente en Tx renal.

La duración de la profilaxis se extiende por 3-6 meses. Ventajas: previene efectos directos e indirectos de HCMV, puede prevenir además la reactivación de otros virus (HHV-6, HHV-7 y EBV) y no depende de la detección virológica de la reactivación. Desventajas: mayor costo, puede favorecer la emergencia de resistencia de HCMV, mayor posibilidad de efectos adversos a las drogas, mayor posibilidad de enfermedad tardía por HCMV.

Tratamiento preventivo (Preemptive therapy). Consiste en la administración de drogas antivirales a aquellos pacientes en los cuales se detecta reactivación virológica por diagnóstico de laboratorio,

con la idea de prevenir la enfermedad. Las 2 técnicas utilizadas para detectar la reactivación e iniciar el tratamiento son: antigenemia (Ag pp65) y PCR cuantitativa (carga viral). Se implementa con controles virológicos semanales durante 3 a 6 meses, si la Ag pp65 o la PCR cuantitativa se positivizan (valores de corte discutidos), se inicia tratamiento con ganciclovir EV o con valganciclovir, a dosis tratamiento, hasta que una o 2 determinaciones sean negativas (habitualmente alrededor de 2 semanas). Ventajas: reduce el costo y el número de pacientes expuestos a las drogas, con menor posibilidad de presentar efectos adversos y de desarrollar resistencia. Además, la frecuencia de enfermedad por HCMV tardía es menor. Desventajas: Dependencia de un ensayo virológico altamente predictivo y de una importante *compliance* de los pacientes para el control virológico sistemático; puede no identificar pacientes en riesgo de enfermar; no previene reactivación de otros virus ni efectos indirectos de HCMV, que pueden ocurrir con niveles bajos de replicación, no detectados por estas técnicas.

Aún no hay estudios aleatorios que demuestren con claridad cuál de los 2 ensayos es más efectivo. Las recomendaciones actuales establecen que, si bien ambas estrategias son válidas, para los pacientes de mayor riesgo (D⁺R⁻), la profilaxis puede presentar algunas ventajas.

Muchos centros utilizan una estrategia mixta: profilaxis para los pacientes de alto riesgo y tratamiento preventivo para el resto.

Tratamiento. Una vez establecida la enfermedad, debe tratarse con alguna de las drogas disponibles. El tratamiento debe ser continuado hasta la erradicación viral, pero no menos de 2 semanas. En casos de infección primaria o carga viral elevada al inicio, se recomienda prolongar el tratamiento.

Para el tratamiento de la enfermedad no grave por HCMV, las drogas recomendadas son: ganciclovir EV (5 mg/kg cada 12 h.) o valganciclovir 900 mg cada 12 hs. El estudio VICTOR demuestra que valganciclovir a dosis de 1800 mg/d no es inferior a ganciclovir EV en el tratamiento de la enfermedad por HCMV no grave en adultos. En casos de alergia, efectos adversos o resistencia pueden utilizarse foscarnet o cidofovir (esta última no está disponible en Argentina).

3. VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV)

El EBV puede dar origen a la enfermedad linfoproliferativa postrasplante (ELPT). Luego de la infección primaria en pacientes inmunocompetentes, el genoma del EBV forma un episoma y permanece latente en los linfocitos B de memoria. En ciertos inmunocomprometidos, como los pacientes que reciben un Tx, se pierde el control crítico de crecimiento de células B ejercido por las células T. Esto determina una marcada proliferación de las células B infectadas por EBV desencadenando una hiperplasia o un tumor.

3.1. TCPH

La mayoría de los casos de ELPT se observan en TPCPH con donantes y receptores seropositivos, siendo la linfoproliferación originada a partir del donante, motivo por el que esta entidad es usualmente patrimonio de los TPCPH alogénicos. La infección primaria con EBV también puede ocasionar ELPT, aunque ésta es más frecuente en población pediátrica. Los factores de riesgo incluyen: depleción de células T, disparidad (*mismatch*) de HLA, terapias anti-linfocitarias y anti-EICH, y TPCPH por inmunodeficiencias primarias. La incidencia en pacientes con factores de riesgo es de 5,7-24%. El tiempo medio de presentación fluctúa entre 70 a 90 días post-Tx y el espectro clínico es variado: fiebre y síntomas generales relacionados con la infección viral, adenopatías, lesiones por masa, disfunción orgánica y síntomas relacionados al linfoma.

Con respecto al TOS, la ELPT en TPCPH tiene una mayor incidencia de enfermedad diseminada y fulminante, con una mortalidad del 90%.

El diagnóstico se confirma mediante estudios histopatológicos e hibridación *in situ* de RNA temprano (EBER) y por PCR para EBV. El monitoreo de la carga viral plasmática en pacientes de alto riesgo puede

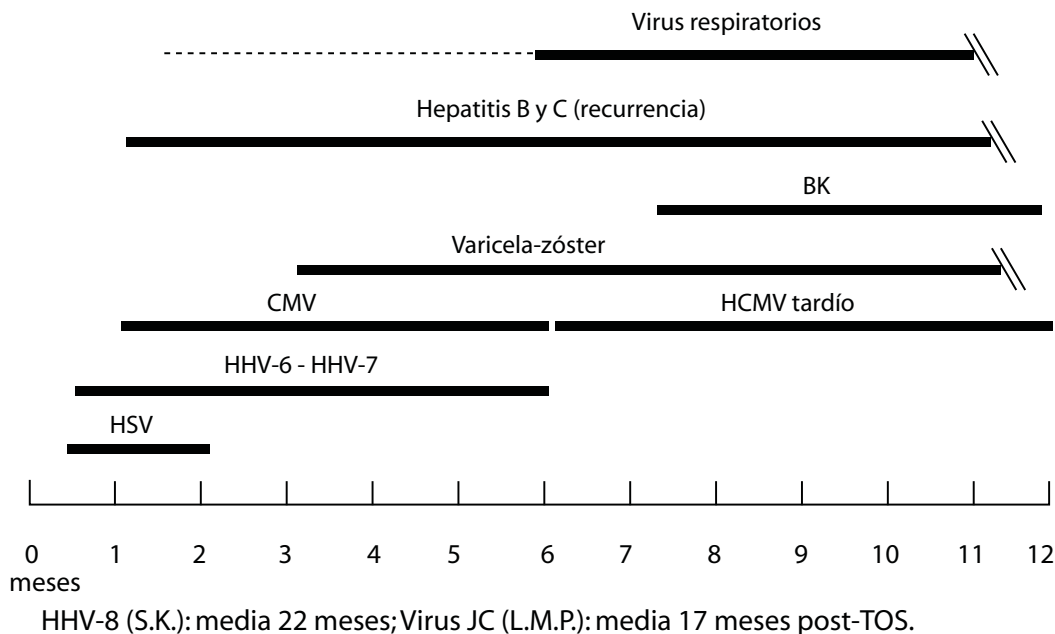


Figura 45.2. Tiempo de aparición de las infecciones en el post-TOS. Modificado de: Robert H Rubin. "Infection in the Organ Transplant Patient". En: Robert H Rubin, MD y Lowell S. Young, MD, Eds. *Clinical Approach to Infection in the compromised Host*. N. York: Kluwer Academic /Plenum Publishers, 2003; pág. 584. **post-TOS:** post-trasplante de órgano sólido.

tener un rol en la prevención de ELPT dado que posee una sensibilidad de 94-100% y un valor predictivo negativo de 100%. Usualmente se observa un incremento significativo 3 semanas previas a la aparición de enfermedad. La estrategia primaria consiste en la reducción de la inmunosupresión y, en caso de no ser posible o no obtenerse resultados satisfactorios, el uso de rituximab como tratamiento preventivo puede prevenir la aparición de ELPT.

Tratamiento. El pilar del tratamiento es la reducción de la inmunosupresión. Diferentes antivirales se han utilizado sin éxito comprobado. Otras opciones de tratamiento incluyen: rituximab (anticuerpos monoclonales anti-CD20), regímenes de quimioterapia convencional, resección quirúrgica o radioterapia local, terapias con citoquinas e inmunoterapia adoptiva.

3.2 TOS

El EBV puede reactivarse o transmitirse a través del injerto causando infección primaria, siendo mucho más probable en niños, ya que más del 90% de los adultos es seropositivo. Se manifiesta como síndrome *mononucleosiforme* o ELPT, que puede aparecer en ganglios o ser extraganglionar con compromiso de múltiples órganos e inclusive del injerto. Existe la forma temprana, dentro del año post-Tx y la tardía, en la que el rol del EBV es incierto. Los factores de riesgo para desarrollar ELPT son: D⁺/R⁻, inmunosupresión excesiva, en especial el uso de globulinas anti-linfocitarias y la enfermedad previa por HCMV.

En niños es tres veces más frecuente que en adultos. El mayor riesgo lo presenta el Tx de intestino (hasta 32%); los receptores de Tx de hígado, páncreas, pulmón y corazón presentan riesgo moderado (3-12%). El Tx renal presenta relativamente bajo riesgo (1-2%).

El diagnóstico se efectúa mediante examen histopatológico, de igual manera que en el TCPH. La carga viral de EBV está siendo estudiada para diagnóstico de ELPT. Datos recientes demuestran que una baja carga tiene buen valor predictivo negativo, no así las cargas virales elevadas como valor predictivo positivo (VPP). Existen algunos datos que apoyan el monitoreo con carga viral de EBV en los pacientes de alto riesgo de desarrollar ELPT. Las muestras deben ser semanales, sobre todo en los períodos de mayor riesgo. Las estrategias de prevención propuestas ante el aumento de la carga viral son la reducción de la inmunosupresión solamente, o con la

administración simultánea de antivirales + inmunoglobulinas. Si bien existen algunos reportes de disminución de la incidencia de ELPT con estas estrategias, no existe suficiente evidencia como para recomendar un manejo preventivo determinado.

El tratamiento se basa en la disminución de la inmunosupresión; el uso de antivirales es controvertido. La quimioterapia convencional y el rituximab inducen remisión completa en alrededor de 2/3 de los casos.

4. VIRUS HERPES SIMPLEX (HSV)

Las manifestaciones clínicas de la infección por HSV en Tx son más frecuentes, más severas y más prolongadas que en la población inmunocompetente. Sólo el 2% de los episodios representan infecciones primarias. La reactivación del HSV ocurre en el 70-80% de los pacientes seropositivos pre-Tx en ausencia de profilaxis, y la forma de presentación más común es la mucocutánea. Si bien inicialmente se asemeja a la observada en el hospedador normal, los pacientes con Tx debido a la inmunosupresión pueden tener una eliminación viral prolongada, mayor invasión, retraso en la curación y tendencia a la diseminación. El 85% de las lesiones son oro-labiales, pudiendo comprometer además la mucosa gingival, paladar, lengua, faringe y piel perilabial. Le sigue en frecuencia la localización genital o perianal. La esofagitis y neumonitis son mucho menos frecuentes y se producen usualmente como consecuencia de extensión de un foco primario mucocutáneo. La diseminación por viremia con compromiso de múltiples órganos es un evento grave pero afortunadamente infrecuente.

El diagnóstico virológico se realiza mediante aislamiento en cultivo o por detección directa de antígenos. La PCR es la técnica de elección para detección del virus en LCR.

4.1. TCPH

La mayoría de las infecciones se presenta en el período *pre-egraftment* y son infrecuentes más allá de los 60 días del Tx. Las erosiones y úlceras en cavidad oral pueden ocasionar intenso dolor, predisponen a sobreinfecciones bacterianas y fúngicas y son difíciles de distinguir de la mucositis inducida por la quimioterapia, por lo que es necesario

realizar cultivo viral ante la sospecha clínica. Las formas graves o potencialmente graves deben recibir tratamiento con aciclovir EV, en tanto que los cuadros más leves pueden tratarse con aciclovir oral, valaciclovir o famciclovir. El tratamiento debe continuarse hasta la completa resolución de las lesiones, siendo de aproximadamente de 10 días en la mayoría de los casos. La profilaxis con aciclovir EV en dosis de 250 mg/m² cada 12 h. u oral en dosis de 400-800 mg cada 12 h., o valaciclovir 500 mg cada 12 h. en pacientes seropositivos pre-Tx es altamente efectiva, reduciendo la incidencia del 70 al 5% o menos, motivo por el que se utiliza de rutina desde la administración de la quimioterapia hasta el *engraftment*, o hasta la resolución de la mucositis, lo que ocurra más tarde. La profilaxis más allá del día 30 debe considerarse en pacientes con historia de episodios de HSV recurrentes.

4.2. TOS

En estos pacientes el HSV suele aparecer precozmente dentro del primer mes post-Tx. Se pueden desarrollar ulceraciones mucocutáneas crónicas y extensas, de apariencia atípica, que requieren de biopsia o cultivos virales para su diagnóstico. La localización oro-labial es la más frecuente. Puede presentarse como gingivostomatitis, con graves dificultades para la nutrición, pudiendo propagarse a esófago y pulmón. El tratamiento no ofrece diferencias respecto del TCPH. La profilaxis en el TOS es segura y efectiva, aunque su uso no es tan frecuente como en el TCPH. La profilaxis debería ser considerada para todos los receptores de Tx seropositivos para HSV-1 y -2, que no reciban profilaxis para HCMV.

La intensificación de la inmunosupresión para tratamiento de rechazos se ha asociado con recurrencias del HSV, aunque usualmente no son formas graves.

La dosis de aciclovir de 200 mg cada 6 u 8 h. ha demostrado ser efectiva para profilaxis, así como 400 u 800 mg cada 12 h. La mayoría de las reactivaciones ocurre durante el primer mes post-Tx, por lo cual la duración de la profilaxis debería extenderse por ese período.

5. VIRUS VARICELA-ZÓSTER (VZV)

Dado que más del 90% de los adultos se encuentra infectado en forma latente por VZV, la infección primaria ocurre sobre todo en niños. En pacientes con Tx sin tratamiento apropiado, la varicela es usualmente grave, con lesiones múltiples y de mayor duración. Puede complicarse con lesiones bullosas, hemorrágicas, *púrpura fulminans*, fascitis necrotizante y sobreinfecciones bacterianas. Asimismo, en 30-50% de los casos ocurre compromiso visceral, especialmente neumonitis y hepatitis con una mortalidad del 20%. Sin embargo, si se realiza tratamiento precoz y apropiado con aciclovir EV, las complicaciones viscerales son poco frecuentes y la mortalidad es baja. El diagnóstico generalmente es clínico, pero puede ser necesario el diagnóstico virológico en las lesiones atípicas o viscerales.

5.1. TCPH

La incidencia de herpes zóster (HZ) en los primeros 12 meses post-Tx es de 20 a 40%, siendo semejante en TCPH autólogos y alogénicos. Los factores que incrementan el riesgo de HZ son: linfomas como enfermedad de base, linfocitopenia, terapias anti-linfocitarias y episodios de HZ pre-Tx. El tiempo medio de aparición es a los 5 meses, y entre el 78 a 85% de los episodios ocurre en el primer año post-Tx. La presentación clínica inicial es semejante a la del hospedador normal, pero usualmente el tiempo de duración del brote y la completa resolución de las lesiones son mayores. El compromiso de más de un dermatoma es más frecuente y la diseminación cutánea a partir de un dermatoma se observa en 15 a 30% de los episodios y es mayor en TCPH alogénicos. La recurrencia ocurre en menos del 5% de los casos. Entre 15 a 20% de los episodios puede presentarse de inicio como zóster atípico diseminado semejando varicela con alto riesgo de diseminación visceral.

El tratamiento de la varicela consiste en la administración de aciclovir EV 10 mg/kg cada 8 h. por 7 a 10 días, y debe iniciarse lo antes posible. Puede considerarse el pasaje a tratamiento oral con aciclovir 800 mg 5 veces al día o valaciclovir 1g. cada 8 h. cuando el paciente se encuentre afebril y sin formación de nuevas lesiones.

El tratamiento del HZ debe iniciarse con aciclovir EV en igual dosis que para varicela en Tx. gravemente inmunodeprimidos (TCPH alogénicos en los primeros 4 meses, EICH aguda y crónica y cualquier Tx que requiera tratamiento inmunosupresor intenso, incluyendo tratamiento anti-rechazo), y en casos de HZ con compromiso oftálmico u ótico. Una vez controlada la infección puede realizarse el pasaje a la vía oral. Los pacientes con menor nivel de inmunosupresión, como la mayoría de los TOS y TCPH autólogos pueden iniciar tratamiento por vía oral. En todos los casos la duración será de 10 a 14 días o hasta la completa resolución de las lesiones.

Las estrategias de prevención comprenden: a) profilaxis post-exposición a varicela, HZ o *rash* por vacuna antivariela: a pacientes VZV seronegativos (TCPH alogénicos \leq 24 meses post-Tx. o \geq 24 meses con EICH o con tratamiento inmunosupresor) y pacientes VZV seropositivos gravemente inmunodeprimidos, con altas dosis de corticoides, terapias anti-linfocitarias o depleción linfocitaria. En estos casos las alternativas consisten en la administración de IgG anti-VZV dentro de las 96 h. del contacto, o aciclovir o valaciclovir entre los días 3 y 22 post-exposición. b) Profilaxis de reactivación de HZ: administración de aciclovir o valaciclovir a pacientes con TCPH hasta los 12 meses pos-Tx. La profilaxis se prolonga más allá del año en caso de EICH y tratamiento inmunosupresor.

5.2 TOS

La enfermedad post-Tx en adultos es causada mucho más frecuentemente por reactivación (HZ) que por infección primaria (varicela). El riesgo de reactivación depende en gran medida de la intensidad de la inmunosupresión en el post-Tx. La aparición es más tardía que HSV, presentándose generalmente luego de los 3 meses. La incidencia de HZ es de 2 a 10% en el Tx renal y hepático y de 20% en el Tx cardíaco. Puede ser dermatómico o generalizado (zóster generalizado atípico); este último caso presenta alto riesgo de compromiso visceral. La diseminación hematogena al ojo puede causar necrosis retinal aguda y ceguera.

Para la prevención, es importante la vacunación de los candidatos seronegativos antes del trasplante. En cuanto a la profilaxis post-exposición con antivirales, debido a la impredecible absorción del aciclovir oral, el valaciclovir, con mejor biodisponibilidad, podría ser preferido. La recomendación actual es un curso de 7 días de aciclovir o valaciclovir, comenzando 7 a 10 días luego del contacto. En pacientes gravemente inmunocomprometidos, algunos expertos sugieren prolongar la duración de la profilaxis, desde el día 3 al 22, luego del contacto.

6. HERPESVIRUS HUMANO 6 (HHV-6)

La infección primaria con HHV-6 ocurre en los primeros años de vida y, al igual que otros herpesvirus, tiene la capacidad de permanecer latente. Más del 90% de los adultos tiene evidencia serológica de infección; por lo tanto, la mayoría de las infecciones por este virus en el post-Tx son reactivaciones.

6.1. TCPH

La reactivación ocurre en 33 a 48% de los pacientes, siendo semejante en autólogos y alogénicos, con una media de 17 a 23 días; en más del 75% de los casos se presenta dentro de los 30 días post-Tx. La reactivación es persistente en alrededor del 40% de los pacientes y la infección sintomática es más frecuente en TCPH que en TOS. Las manifestaciones clínicas más usuales son fiebre con o sin *rash* y mielosupresión, sobre todo retraso del *engraftment*, de plaquetas y glóbulos blancos. El compromiso de órganos en forma de encefalitis o disfunción del SNC, neumonitis, hepatitis y gastroduodenitis son

mucho menos frecuentes. Asimismo, por su efecto inmunomodulador, este virus facilita la reactivación de HCMV. La relación entre infección por HHV-6 y el desarrollo de EICH y el incremento de la mortalidad post-Tx ha sido sugerida en algunos estudios. Los factores de riesgo relacionados con la infección post-Tx son: uso de anticuerpos anti-linfocitarios, Tx no relacionados y *mismatched*, enfermedad hematológica fuera de primera remisión, uso de corticoides y edades tempranas.

El diagnóstico puede realizarse por cultivo en *shell-vial*, antigenemia o detección de DNA por PCR en leucocitos o plasma. Debido a su alta sensibilidad y especificidad para definir infección activa, la PCR cuantitativa es el ensayo recomendado para diagnóstico en sangre periférica y líquido cefaloraquídeo. Ninguna droga antiviral está aprobada para tratamiento de infecciones por HHV-6; sin embargo, ganciclovir, foscarnet y cidofovir han sido utilizados en base a datos de efectividad *in vitro* y a reportes de casos.

6.2 TOS

Aunque la mayoría de las infecciones son por reactivación, se ha descrito la transmisión con el injerto. Se ha reportado una incidencia de infección en 38 a 55% en los Tx renales, 22 a 40% en Tx hepático y 57% en Tx de pulmón y cardiopulmonar. La mayoría de las infecciones son precoces ocurriendo entre 2 a 4 semanas post-Tx. Al igual que el HCMV, el HHV-6 causa efectos directos e indirectos. Los efectos directos son: 1) síndrome viral (con o sin *rash*, similar al producido por HCMV); 2) mielosupresión (la leucopenia es la manifestación más frecuente); 3) encefalitis (si bien su patogenidad en el SNC en estos pacientes no está firmemente demostrada, es más frecuente la presencia de alteraciones neurológicas de causa no aclarada en pacientes con viremia por HHV-6 (29%) comparada con pacientes sin viremia (6%). Las manifestaciones más frecuentes son cefalea, confusión, coma y convulsiones. Los signos de foco son infrecuentes, pudiéndose observar pleocitosis en el LCR del 50% de los pacientes. Los efectos indirectos promovidos por el HHV-6 están asociados a su efecto inmunosupresor, que facilita otras infecciones como enfermedad de órgano por HCMV e infecciones fúngicas invasivas, y a su relación con los rechazos, que hasta el momento es controvertida.

Las consideraciones en cuanto al diagnóstico y al tratamiento son las mismas que para el TCPH.

7. HERPESVIRUS HUMANO 7 (HHV-7)

Al igual que con HHV-6, es frecuente la infección latente en adultos. Este virus presenta un tropismo selectivo por linfocitos CD4⁺. Es posible detectar viremia por HHV-7 en alrededor del 40% de los Tx renales y 57% de los TCPH, utilizando PCR para detectar el DNA viral en células mononucleares periféricas. Sin embargo, no se ha dilucidado aún el rol patogénico de HHV-7 en pacientes trasplantados. Podría ser un cofactor en la enfermedad por HCMV; se ha descrito una posible asociación con bronquiolititis obliterante en Tx de pulmón y con encefalitis fatal en un paciente con TCPH. Existen datos controvertidos sobre la sensibilidad *in vitro* de este virus a drogas como ganciclovir y cidofovir, pero hay muy escasos datos referidos a su eficacia clínica.

8. HERPESVIRUS HUMANO 8 (HHV-8)

Es un virus *transformante* capaz de inducir tumores en el hospedador, tales como el sarcoma de Kaposi (SK). Otras enfermedades neoplásicas menos frecuentes asociadas con este virus son la enfermedad de Castleman y el linfoma primario de cavidades. También se lo ha reportado como causa potencial de mielosupresión y gammapatía monoclonal en pacientes trasplantados. El HHV-8 promueve angiogénesis, básicamente mediante la producción de citoquinas. Las células características llamadas *en huso* parecen derivar de una célula mesenquimática pluripotencial. La incidencia del SK en Tx es paralela a la seroprevalencia de HHV-8 en la región, 0-5% en

EE.UU., Europa del Norte y Asia, 5-20% en la zona del Mediterráneo y Medio Oriente y >50% en algunas regiones de África. La diferencia a favor del género masculino en SK asociado al Tx es menos pronunciada: M/F: 2-3/1. La mayoría de los SK pos-Tx es atribuible a la reactivación del virus, pero puede existir transmisión con el injerto. La seroconversión es de 2 a 12 % (mayor en Tx hepático que renal). Se produce alrededor de los 5 meses y precede al desarrollo de SK en 11.5 meses. El tiempo de aparición promedio de SK en el periodo pos-Tx es de 30 meses, con un rango de 3 a 124 meses, siendo uno de los tumores más precoces en desarrollarse. La carga viral, medida por PCR, se correlaciona con la progresión del SK, también es útil para el seguimiento del tratamiento. En TCPH los reportes de SK son muy escasos. Se ha descrito la vinculación del HHV8 con fallo del injerto.

Si bien el compromiso cutáneo es el más frecuente, cerca del 40% de los pacientes presentan compromiso visceral (gastrointestinal, pulmonar, vejiga, laringe, etc.).

El tratamiento más importante es la reducción de la inmunosupresión. Se produce remisión más frecuentemente en las formas cutáneas, aunque con el costo de pérdida del injerto en más de la mitad de los casos. Se debe considerar el cambio de la inmunosupresión: de inhibidores de calcineurina a sirolimus (o rapamicina) ya que presenta propiedades antiproliferativas que pueden ser útiles en el tratamiento del SK. Se ha descrito la desaparición de las lesiones con el uso de esta droga. En los pacientes que presentan compromiso visceral o enfermedad diseminada, se obtiene menor respuesta, y debe recurrirse a otros tratamientos, como quimioterapia con doxorubicina, bleomicina y vincristina. En los casos que recibieron un nuevo Tx luego de la remisión, se observó que la recurrencia del tumor es casi universal, por lo que el re-trasplante no está recomendado.

9. VIRUS RESPIRATORIOS

Los virus respiratorios tienen un impacto significativo en la morbilidad y mortalidad de pacientes con Tx, causando un amplio rango de enfermedades que incluyen desde la infección respiratoria alta autolimitada hasta la neumonía y aun la enfermedad diseminada. Además, la infección viral puede predisponer a infecciones secundarias por bacterias y hongos. La facilidad con que estos virus se transmiten y la prolongación de su excreción en el contexto de inmunosupresión plantean serios problemas epidemiológicos tanto en la comunidad como en el hospital. Si bien el virus sincicial respiratorio (RSV), influenza, parainfluenza y adenovirus son los principales patógenos, los coronavirus, los rinovirus y el metapneumovirus humano han emergido en los últimos años como causas de enfermedad grave en esta población.

9.1 TCPH

En general, el comienzo de infecciones por virus respiratorios en TCPH se correlaciona con la prevalencia de los virus circulantes en la comunidad. Los pacientes con TCPH pueden tener manifestaciones atípicas y la fiebre puede estar ausente.

El riesgo de infección por virus respiratorios y la gravedad de los mismos se correlacionan con la adquisición en el post-Tx temprano, la presencia de EICH, el TCPH alogénico y la linfopenia. La excreción viral es más prolongada que en inmunocompetentes, siendo en algunos casos de varias semanas a varios meses. Esta puede prolongarse aun en presencia de tratamiento, contribuyendo a la aparición de resistencia. Finalmente, pueden ocasionar secuelas a largo plazo como la obstrucción al flujo aéreo. El diagnóstico se realiza mediante cultivo, detección de antígenos y por técnicas moleculares. Estas últimas, debido a su mayor sensibilidad constituyen el procedimiento de preferencia en pacientes inmunodeprimidos.

Virus sincicial respiratorio. En TCPH tiene una incidencia de 1,8% a 10% y comprende el 24 a 31% de los virus detectados en pacientes con infecciones respiratorias. Si bien la mayoría se adquieren en la comunidad, un porcentaje significativo son de adquisición hospitalaria, pudiendo ocasionar brotes en unidades de TCPH. El



80% a 90% de los pacientes comienza con síntomas de infección respiratoria alta y el 40% progresa a neumonía con una media de 7 días. Los factores de riesgo para neumonía grave son: adquisición en el período pre-*engraftment* y hasta los 30 días post-Tx; edad avanzada; presencia de enfermedad pulmonar crónica pre-existente; linfopenia y presencia de EICH. Hasta un 30% de pacientes presenta coinfecciones con patógenos bacterianos y fúngicos, lo que determina una peor evolución. La mortalidad por neumonía oscila entre 6,5 y 45%, aunque en pacientes con enfermedad grave que no reciben tratamiento o éste se implementa en tardíamente dicha tasa puede ascender hasta el 80%.

El tratamiento recomendado para la neumonía es la ribavirina aerosolizada, pero no se encuentra disponible en nuestro país. La evidencia de su eficacia en esta población ha sido dispar en los diferentes estudios publicados. Sin embargo, parecería ser muy importante el momento del inicio del tratamiento, ya que los datos disponibles sugieren que cuando éste se comienza luego de la falla respiratoria, es usualmente insatisfactorio. Asimismo, la presencia de copatógenos, en especial los hongos, como así también la presencia de linfopenia juegan un rol importante en la peor evolución.

Reportes de los últimos años sugieren que la ribavirina oral podría ser utilizada para el tratamiento de la infección respiratoria alta y neumonía en estos pacientes. Sin embargo, la evidencia es escasa por lo que aún no puede ser recomendada.

El rol de otras terapias tales como la gammaglobulina en altas dosis asociada a ribavirina aerosolizada u oral o los anticuerpos anti-RSV (palivizumab y motavizumab) no está claramente establecido en esta población.

Consensos de expertos recomiendan el tratamiento preventivo con ribavirina aerosolizada a pacientes con infección respiratoria alta por virus sincicial respiratorio para evitar la progresión a neumonía, sobre todo en TCPH durante los primeros 3 meses post-Tx., con linfopenia o con enfermedad pulmonar pre-existente.

Parainfluenza. En TCPH tiene una incidencia de 4 a 7% y se lo ha encontrado en 4 a 11% de pacientes con síntomas respiratorios. La progresión a neumonía ocurre en 18 a 44% con una mortalidad del 35%. Los factores de riesgo para desarrollar neumonía son presencia de linfopenia y uso de altas dosis de corticoides. En la mitad de los casos se encuentra asociado a otros patógenos. La excreción asintomática es frecuente y la obstrucción al flujo aéreo es una complicación importante que ocurre tanto con la neumonía como con la infección respiratoria alta.

No existen antivirales con probada eficacia clínica. La ribavirina es activa *in vitro*, aunque la evidencia publicada del uso en forma aerosolizada con o sin gammaglobulina EV no demostraron efectos beneficiosos en la evolución de neumonías ni reducción en la excreción viral.

Influenza. En TCPH el virus de influenza estacional tiene una incidencia de 1 a 3% y comprende el 9 a 47% de los virus detectados en pacientes con infección respiratoria durante el invierno. La progresión a neumonía ocurre en el 18% de los casos, con una mortalidad que alcanza el 4,7 - 28%. Los factores de riesgo para la enfermedad grave y la neumonía son la infección en post-Tx. temprano y presencia de linfopenia. Si bien las manifestaciones clínicas son semejantes a las presentadas en pacientes inmunocompetentes, las mialgias y la fiebre son menos frecuentes.

En 2009 surgió la pandemia del nuevo virus influenza A (H1N1), determinando un impacto significativo en poblaciones de riesgo, incluyendo pacientes con cáncer y TCPH. Un estudio observacional realizado en 12 centros de Buenos Aires, incluyó 61 pacientes con cáncer e influenza A (H1N1), de los cuales 15 habían recibido un TCPH. Se documentó neumonía en 66% de los pacientes, 75% requirió internación, 20% necesitó asistencia respiratoria mecánica y la mortalidad global a 30 días fue del 18%. La presencia de linfopenia fue el único factor de riesgo independiente que se correlacionó con una mala evolución. Estos datos confirman el marcado impacto de este nuevo virus en población de pacientes onco-hematológicos.

A diferencia de otros virus respiratorios, existen antivirales con probada eficacia tanto para tratamiento como para profilaxis, como

así también vacunas efectivas. Dado la altísima tasa de resistencia a amantadina y a rimantadina del virus influenza (H3N2), los únicos antivirales recomendados actualmente para influenza estacional y H1N1 son los inhibidores de la neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir) que son activos para influenza A y B. Una nueva droga de este grupo, el peramivir, se encuentra actualmente en evaluación. Estudios en pacientes con TCPH, han demostrado que el tratamiento temprano con estos antivirales reducen la progresión a neumonía y también la mortalidad. Por este motivo, deben prescribirse a todos los pacientes con cuadro de influenza.

Debido a la excreción viral prolongada en estos pacientes, algunos expertos recomiendan utilizar cursos más prolongados en pacientes con neumonías (10 días) en lugar de los 5 días de tratamiento habitual. Asimismo, en casos de enfermedad grave, se sugiere considerar utilizar dosis más elevadas de oseltamivir (150 mg cada 12 h.) en lugar de 75 mg cada 12 h.

Las estrategias de prevención comprenden: a) uso de oseltamivir post-exposición en pacientes que tienen contacto con influenza y profilaxis prolongada durante el brote en la comunidad en pacientes no vacunados y gravemente inmunodeprimidos; b) vacunación con vacuna trivalente (que incluye H1N1) a pacientes con TCPH a partir de los meses 4 a 6 post-Tx, como así también a los contactos convivientes y al personal de salud que atiende a estos pacientes.

9.2 TOS

Estos cuadros presentan en general importante morbi-mortalidad tanto en niños como en adultos. Se considera que la importancia de estos virus en el contexto de receptores de TOS está subestimada. Algunos estudios en pacientes adultos y pediátricos con TOS han documentado una prevalencia de infección por virus respiratorios de aproximadamente 3% en Tx renal, 8% en Tx hepático, 21% en Tx pulmonar y 29% en Tx intestinal. Los factores de riesgo para una mala evolución fueron: las edades tempranas, la infección dentro del mes post-Tx y la grave inmunosupresión. Si bien la mortalidad es relativamente más baja que en el TCPH, la morbilidad a largo plazo es significativa.

Virus sincicial respiratorio. Es un paramixovirus, que causa enfermedad respiratoria en epidemias estacionales. Los factores de riesgo para enfermedad grave en pacientes con TOS son: edad < 1 año; enfermedad pulmonar subyacente; adquisición de la infección temprana luego del Tx; o el aumento de la inmunosupresión.

En cuanto a la prevención, no existen vacunas contra este virus. Se debe implementar el aislamiento estándar para todos los casos sospechosos o confirmados. Se ha demostrado que la profilaxis con palivizumab (anticuerpo monoclonal específico) para niños de alto riesgo es efectiva. No existen estudios en Tx ni en pacientes adultos. Sin embargo, algunos expertos recomiendan su uso en menores de 1 año, que reciben un Tx durante los brotes epidémicos de sincicial respiratorio.

Para el tratamiento, se recomiendan medidas de soporte y disminución de la inmunosupresión. El uso de drogas antivirales es discutido. La ribavirina posee actividad *in vitro* y su uso en forma aerosolizada fue aprobado para infecciones por este virus. Existen reportes de tratamiento exitoso en pacientes con Tx de pulmón con ribavirina oral + intravenosa. Basado en la experiencia del Tx pediátrico, y a diferencia del TCPH, no se recomienda el uso de ribavirina en aerosol en pacientes con enfermedad de vía aérea superior y sin factores de riesgo asociados a gravedad en el TOS.

Parainfluenza. La enfermedad por este virus puede ser grave, especialmente en Tx de pulmón y en todos los Tx pediátricos. Aunque todos los virus respiratorios se asocian con riesgo de bronquiolitis obliterante en Tx de pulmón, la asociación con parainfluenza es más fuerte.

En cuanto a la prevención, no existen vacunas contra este virus, ni drogas antivirales. Se deben implementar las medidas de aislamiento estándar en los casos de infección.

La ribavirina presenta actividad *in vitro* contra el virus y se ha utilizado para el tratamiento de neumonías en receptores de Tx de

pulmón. Algunos expertos recomiendan la asociación con gamma-globulina EV en altas dosis.

Influenza. Causa epidemias todos los años en los meses de invierno, asociadas con importante morbimortalidad en algunos grupos. En pacientes con TOS influenza se asocia: con importante morbilidad, una alta proporción de complicaciones pulmonares y extrapulmonares, y alto índice de asociación con rechazo, sobre todo en Tx de pulmón.

La demora en el inicio del tratamiento se ha asociado significativamente con enfermedad grave y muerte en los pacientes trasplantados.

En 2009, la pandemia de influenza por el nuevo virus H1N1 ha planteando interrogantes acerca de diferencias y similitudes en cuanto a gravedad en los pacientes con TOS. Se realizó un estudio retrospectivo, en 10 centros de Argentina, para analizar datos de pacientes trasplantados e infectados por el virus. Se incluyeron 77 pacientes, de los cuales 44 (57%) requirieron internación, 10 de ellos en Terapia Intensiva. El 49% de los pacientes presentó neumonía, 6 pacientes fallecieron a causa de la influenza (7,8%).

Las estrategias de prevención son similares a las planteadas en TCPH, excepto que la profilaxis prolongada durante el brote en la comunidad no estaría indicada. Las consideraciones en cuanto al tratamiento no difieren de las de TCPH.

En el Tx renal el impacto del virus influenza es diferente en niños y en adultos. En niños, con frecuencia motiva la hospitalización, desencadena complicaciones en el 42% y tiene una mortalidad de alrededor del 8%, en tanto que en adultos usualmente causa enfermedad leve y prácticamente sin mortalidad. Las consideraciones sobre tratamiento y prevención son las mismas que para el TCPH.

10. VIRUS HEPATITIS B (HBV)

10.1. TCPH

La infección por HBV en receptores de TCPH puede ocurrir como consecuencia de transfusiones de hemoderivados, transmisión por el donante, reactivación de infección preexistente, o más raramente transmisión sexual, siendo una causa frecuente de disfunción hepática.

La presencia de HBV en el receptor o donante no constituye una contraindicación para el TCPH. No obstante, en caso de receptores HBV seronegativos, se prefieren donantes sin HBV, dado que si el donante es seropositivo la transmisión al receptor será del 30-50% y la presencia de carga viral plasmática elevada en el donante predispone a hepatitis en el post-Tx. En caso de que el único donante disponible tenga HBs Ag (+), las estrategias de prevención comprenden: vacunar al receptor previo al Tx; la administración de gammaglobulina hiperinmune anti-Hepatitis B (HIBIG); y el tratamiento al donante con lamivudina, entecavir o tenofovir hasta lograr una carga viral indetectable previo al Tx.

Los receptores HBs Ag (+) tienen una incidencia de alrededor de 75% de hepatitis en el post-Tx. temprano y en 30-50% de los casos será severa, pudiendo ocasionar fallo hepático fulminante. Esto es más frecuente en TCPH alogénicos. En la evolución a largo plazo pueden presentar reactivaciones ocasionales, siendo poco frecuente la evolución a cirrosis y no está afectada la sobrevida a los 10 años. Sin embargo, existen factores de riesgo para la reactivación del HBV y exacerbación de la replicación viral con hepatitis clínica: tratamiento con altas dosis de corticoides y con anticuerpos anti-linfocitarios (rituximab y alemtuzumab), reconstitución inmunológica y suspensión del tratamiento anti-HBV.

Los receptores HBs Ag (-) con anti-HBc (+), y aun aquellos con anti HBS Ag (+), pueden presentar reactivaciones en el post-Tx. Las estrategias de prevención de la enfermedad comprenden: a) pacientes con anti-HBc (+) y anti-HBs (+): monitoreo en el post-Tx con transaminasas, anti-HBs y carga viral plasmática; se inicia tratamiento si se documenta pérdida de los anticuerpos anti-HBs y carga viral detectable; b) pacientes HBs Ag (+) y/o carga viral plasmática detectable: realización de biopsia hepática pre-Tx., ya que si presentaran fibrosis o cirrosis hepática, tienen alta morbimortalidad asociada al tratamiento inmunosupresor. En este caso se aplica un

régimen inmunosupresor menos intenso en conjunto con tratamiento antiviral y seguimiento con carga viral plasmática en el post-Tx c) anti-HBc (+), HBs Ag (-) y anti-HBs (-): con carga viral plasmática indetectable, se indicará vacunación antes del Tx y monitoreo en el post-Tx, y con carga viral detectable se indicará tratamiento antiviral.

10.2 TOS

Los factores de riesgo para la adquisición de HBV *de novo* post-Tx son: el estado serológico D / R, las transfusiones y la falta de inmunización efectiva en el pre-Tx. Por este motivo, es fundamental que la vacunación en los pacientes evaluados para Tx sea efectuada en forma precoz, en lo posible antes de llegar a la insuficiencia del órgano, ya que la respuesta será mejor. Tx hepático: en este caso, la cirrosis por HBV es una indicación para Tx.

Antes de la era de la profilaxis, la recurrencia del HBV en el injerto llegaba al 80%. Desde hace más de 10 años, se comenzó a utilizar profilaxis con la combinación de HBIg y lamivudina, con lo cual el índice de recaídas disminuyó notablemente.

Las recurrencias se evidencian inicialmente por la detección de DNA viral en sangre, por lo cual se recomienda el seguimiento con DNA en el post-Tx cada 3 meses, aún en pacientes que se encuentren recibiendo profilaxis.

Para la profilaxis post-Tx. se recomienda utilizar con análogos nucleósidos/nucleótidos potentes, asociados o no a HBIg EV o IM. El tratamiento con antivirales debería continuarse indefinidamente luego del trasplante. Los receptores de hígados de donante con Ac anti-HBc, deberían recibir profilaxis indefinidamente post-TX.

En caso de hepatitis fulminante o co-infección con virus hepatitis D, la recurrencia es mucho menor.

Receptores de trasplantes no hepáticos. Los pacientes en hemodiálisis presentan índices de infección por HBV de 0,1 a 1,4% en EE.UU., lo que constituye una considerable disminución por mejor vacunación y control de infecciones.

Actualmente, existen drogas efectivas contra el virus (lamivudina, adefovir, tenofovir y entecavir), que permiten frenar la replicación viral y la evolución a la cronicidad. Se recomienda que los pacientes en hemodiálisis, con hepatopatía crónica por HBV, sean evaluados y tratados de acuerdo a las guías existentes para la población general.

En caso de cirrosis o hepatopatía crónica avanzada se debe evaluar efectuar Tx hepato-renal.

Los candidatos a Tx cardíaco, pulmonar y pancreático, no tienen factores de riesgo especiales para ser portadores de infección por HBV. Sin embargo, pacientes HBs Ag (+) que reciben un Tx cardíaco, evolucionan a cirrosis en 7 a 10 años post-Tx en 33 a 50% de los casos.

Los receptores de Tx renal y de otros órganos con hepatitis B "curada" (HBs Ag (-) y anti-HBs Ag [+]) pueden reactivar la hepatitis en el post-Tx, por lo cual deben ser monitorizados periódicamente. Esta posibilidad es baja (5%), pero cuando se produce puede evolucionar rápidamente a cirrosis y muerte.

11. VIRUS HEPATITIS C (HCV)

11.1 TPC

La prevalencia de la infección por HCV en TPC ha disminuido en los últimos años. Estudios multicéntricos en Europa demostraron la presencia de RNA del HCV en 6% de los pacientes que reciben TPC. Esto tiene mucha trascendencia dado que la historia natural de la infección en esta población puede ser diferente.

La presencia del HCV en el donante o el receptor no constituye una contraindicación para el Tx. No obstante, se prefieren donantes HCV seronegativos ya que la transmisión al receptor será del 100% si hay RNA detectable. En caso de no contar con donante alternativo, la estrategia preventiva consiste en realizar tratamiento con interferón pegylado y ribavirina al donante HCV seropositivo hasta obtener una carga viral indetectable previamente al Tx.

Alrededor de un 30% de receptores HCV seropositivos desarrollarán hepatitis en el post-Tx temprano, pero la hepatitis fulminante es excepcional. Si bien la sobrevida a 10 años no está afectada, hay mayor desarrollo de cirrosis a corto plazo, con una incidencia acumulativa de 24% a 20 años y una media de desarrollo de 18 años comparado con 40 años en pacientes con HCV sin TCPH.

Los pacientes con fibrosis o cirrosis hepática que reciben tratamientos inmunosupresores mielo-ablativos intensos tienen un riesgo 9,6 veces mayor de desarrollar enfermedad veno-oclusiva hepática y muerte. Por este motivo, resulta fundamental realizar biopsia hepática previamente al Tx a los receptores HCV sero-positivos con riesgo de enfermedad hepática crónica: presencia de sobrecarga de hierro, historia de exceso de alcohol, historia de HCV mayor a 10 años o evidencias clínicas de enfermedad hepática crónica. En este contexto, si se decide llevar a cabo el TCPH, deberán emplearse esquemas inmunosupresores con intensidad reducida.

11.2 TOS

La incidencia de adquisición del HCV en pacientes en hemodiálisis es de 0,7-3% por año. La infección por HCV no es contraindicación para el Tx renal. Se recomienda la biopsia hepática en los candidatos a Tx renal con HCV. El hallazgo de hepatopatía avanzada sugiere el Tx hepato-renal. Se puede intentar el tratamiento con interferón en el pre-Tx, aunque la tolerancia es muy mala en estos pacientes.

La hepatitis C es una de las indicaciones más frecuentes de Tx hepático. La reinfección del injerto es universal, pero sólo el 10-25% desarrollan cirrosis a los 5 años del Tx.

La sobrevida global del injerto y del paciente a los 5 años en receptores HCV + es inferior a la de pacientes HCV negativos (57% vs 68% y 70 vs 77%, respectivamente). Cuando se produce la recurrencia de la cirrosis por HCV, el 40% de los pacientes se descompensa dentro del año, cayendo la sobrevida a 1 y 4 años a 66 y 33%.

Los factores de riesgo para recurrencia acelerada son: tratamiento inmunosupresor del rechazo agudo (corticoides intravenosos, anticuerpos anti-linfocitarios), injuria de preservación, receptores o donantes añosos. Otros factores no tan claramente definidos para el riesgo de recurrencia son: carga viral pre-Tx: el genotipo del virus (1b); y las diferencias del HLA entre donante y receptor. En el pasado, algunos inmunosupresores se habían asociado con mayor riesgo de recurrencia en el post-Tx, pero estos datos se han desestimado en estudios más recientes.

Es difícil hacer el diagnóstico de la recaída sin efectuar biopsia hepática. En general se indica el tratamiento con interferón + ribavirina con recurrencia probada por biopsia (grado 3 o estadios 1-2 por METAVIR).

El tratamiento con interferón o interferón pegylado + ribavirina en el post-trasplante presenta un bajo índice de respuesta (20-30%).

12. OTROS VIRUS

12.1 VIRUS BK

12.1.1. TCPH

La infección por virus BK ocurre durante la infancia. Hasta 90% de los adultos son seropositivos. Luego de la infección primaria, el virus entra en fase de latencia y se aloja en células del uroepitelio y probablemente en linfocitos. La viruria por BK ocurre entre el 60-80% de los pacientes con TCPH, usualmente dentro de los primeros 2 meses post-Tx, y la incidencia es semejante en TCPH autólogos y alogénicos.

Debido su tropismo, la enfermedad del tracto genitourinario constituye la manifestación más frecuente e incluye: hematuria asintomática, cistitis hemorrágica, estenosis ureteral y nefritis intersticial. La enfermedad más prevalente es la cistitis hemorrágica que afecta al 5-15% de los TCPH entre las semanas 3 y 6 post-Tx., ocurriendo típicamente en el período post-engraftment, siendo más frecuente en TCPH alogénicos.

Los factores de riesgo potenciales incluyen: régimen quimioterápico mieloablativo, TCPH alogénico no relacionado, EICH aguda, carga viral en orina $\geq 10^{9-10}$ copias/ml o ≥ 3 logaritmos de incremento

respecto del basal, y presencia de viremia plasmática $> 10^4$ copias/ml. En años recientes, se han reportado otras manifestaciones clínicas vinculables al virus BK como encefalitis, meningitis, infección gastrointestinal y enfermedad diseminada, aunque éstas son muy infrecuentes.

Hasta el presente no existe una droga antiviral con probada eficacia. No obstante, el cidofovir, ha mostrado en algunas series de casos una reducción significativa de la viremia acompañado de mejoría clínica. Si bien las quinolonas pueden inhibir la replicación del virus BK en cultivos, no se ha demostrado una reducción significativa de la viremia ni de la aparición de cistitis hemorrágica en el TCPH. Finalmente, la leflunomida se ha utilizado para el tratamiento de la nefropatía por BK en Tx renal con diferente grado de éxito, pero no hay experiencia en el TCPH.

12.1.2. TOS

En el Tx renal la nefritis túbulo-intersticial es la manifestación más frecuente, provocando deterioro progresivo de la función renal, con pérdida del injerto en 1 a 5% de los casos. También puede causar estenosis ureteral en alrededor del 3% de los pacientes. Ambas patologías se presentan alrededor del año. Se ha descrito como factor de riesgo la inmunosupresión más potente con tacrolimus y micofenolato, y se asocia con episodios de rechazo.

El diagnóstico definitivo se efectúa por biopsia renal y la histopatología puede semejar la del rechazo, por lo que es muy importante la identificación del virus por inmunohistoquímica o por PCR.

Entre el 30 y el 50% de los pacientes con Tx renal y viruria elevada ($> 7 \log_{10}$ equivalentes genómicos (egq)/ml) progresan a viremia y nefropatía.

La disponibilidad de técnicas efectivas de tamizaje, como son la carga viral en orina y en plasma, permiten identificar a los pacientes en riesgo antes de que se produzca el daño renal, con lo cual la pérdida del injerto en esta población se ha reducido al 10% o menos.

Tratamiento de la nefropatía. El primer paso es reducir la inmunosupresión, para lo cual existen diversas estrategias. La respuesta al tratamiento se evalúa con creatinina (1 o 2 determinaciones por semana), carga viral en plasma y en orina cada 2 semanas, y en los casos de no respuesta, biopsia renal a los 2 meses del inicio del tratamiento. Se debe tener en cuenta que la mejoría puede evidenciarse recién a las 4 a 6 semanas. En casos sin respuesta se pueden asociar drogas antivirales: cidofovir, leflunomida, gammaglobulina EV o quinolonas.

Prevención y profilaxis. Se debe realizar monitoreo de replicación viral por lo menos 1 vez cada 3 meses durante los primeros 2 años post-Tx y luego anualmente hasta los 5 años.

La búsqueda de virus en orina tiene un alto valor predictivo positivo, ya sea por *decoy cells* o por carga viral.

Si las *decoy cells* son positivas o la carga viral es $> 7 \log_{10}$ egq/ml, se debe efectuar carga viral en plasma. Si ésta resulta $> 4 \log_{10}$ egq/ml por más de 3 semanas, se llega al diagnóstico presuntivo de nefropatía por BK, y se debe considerar una biopsia renal para llegar al diagnóstico definitivo. No se requieren valores elevados de creatinina para este diagnóstico. La detección de alta carga viral en orina precede alrededor de 6 semanas el desarrollo de nefropatía, por lo cual permite aplicar el proceso mencionado sin riesgo de demora.

12.2 VIRUS JC

Este poliovirus causa la leucoencefalopatía multifocal progresiva, enfermedad desmielinizante de curso habitualmente fatal. Aparece tanto en el TOS como en el TCPH. La presentación es usualmente subaguda, siendo la hemiparesia, apatía y confusión los hallazgos más frecuentes. El tiempo medio de aparición de la sintomatología corresponde a los 17 meses post-Tx. En la Resonancia Nuclear Magnética se aprecian lesiones desmielinizantes y asimétricas en la sustancia blanca subcortical y el LCR en general es normal. La mortalidad asciende al 71% a los 2,5 meses. El diagnóstico se realiza mediante PCR en LCR (sensibilidad de 72 a 93% y especificidad de 92 a 100% en un estudio reciente en pacientes HIV [+]), o por biopsia cerebral.

El tratamiento se basa en la disminución de la inmunosupresión y en administrar antivirales como cidofovir o adenina arabinósido.

12.3 PARVOVIRUS B19

Puede ocasionar anemia crónica sin reticulocitosis (aplasia roja pura) en TCPH y en TOS, siendo más frecuente en este último (1-2%). Con menos frecuencia, puede manifestarse con fiebre, *rash*, pancitopenia y hepatitis. En todo paciente trasplantado que desarrolla anemia aplásica o pancitopenia debe pensarse en este virus. El diagnóstico se efectúa por IgM o PCR, aunque esta última puede persistir positiva hasta 9 meses.

No existe tratamiento específico, pero el uso de gammaglobulina EV revierte la anemia y los síntomas causados por el virus.

12.4 ADENOVIRUS

Las infecciones por adenovirus pueden ocurrir debido a reactivación endógena o como infección primaria. Las manifestaciones clínicas más frecuentes en pacientes trasplantados incluyen: infección respiratoria alta, neumonía, hepatitis, enterocolitis, cistitis hemorrágica, meningoencefalitis y enfermedad diseminada. Las manifestaciones clínicas y los sitios de infección por adenovirus varían según el órgano trasplantado. Es frecuente el compromiso del injerto. El tiempo de aparición usual es en los primeros 100 días post-Tx. En Tx hepático, puede producir hepatitis con un comienzo medio a los 55 días. En Tx de pulmón, la neumonía por adenovirus puede provocar la pérdida del injerto o la evolución a bronquiolitis obliterante. En Tx de intestino puede producir enterocolitis, la cual debe diferenciarse del rechazo. En Tx renal se han descrito cistitis hemorrágica y nefropatía.

El diagnóstico se efectúa mediante el cultivo (*shell vial*), detección de antígenos, PCR y biopsia de tejidos, dependiendo de las manifestaciones clínicas.

Cidofovir, ribavirina, vidarabina y ganciclovir han mostrado poseer actividad *in vitro* contra adenovirus; no obstante, la eficacia clínica no ha sido evaluada en ensayos prospectivos aleatorios y controlados. De acuerdo con los datos disponibles, cidofovir es la droga con mayor efectividad, siendo actualmente el tratamiento recomendado.

12.4.1 TCPH

La incidencia de infección por adenovirus luego de un TCPH es entre 3- 47%. La diferencia depende de varios factores: es más frecuente en TCPH alogénicos comparados con autólogos, mayor en niños que en adultos y también es mayor en TCPH con inmunodepresión celular intensa. Los factores de riesgo para enfermedad incluyen: detección de adenovirus en varios sitios, presencia de viremia, EICH aguda, TCPH alogénicos no relacionados, con depleción de linfocitos T o con disparidad HLA y, uso de terapias anti-linfocitarias. La infopenia grave ($< 300/\text{mm}^3$) se asocia con enfermedad diseminada y la alta carga viral ($> 10^6$ copias/ml) se asocia con incremento de la mortalidad.

Sin tratamiento, la mortalidad en TCPH es de alrededor de 26% de todos los pacientes sintomáticos; no obstante, los pacientes con neumonía y enfermedad diseminada tienen una mortalidad de 50% y 80%, respectivamente.

En los últimos años, algunos expertos proponen realizar monitoreo semanal con carga viral plasmática hasta los 6 meses post-Tx a los pacientes de mayor riesgo para desarrollar enfermedad. Sin embargo, no está claro aún el punto de corte para iniciar el tratamiento preventivo. Asimismo, si bien el cidofovir puede reducir la carga viral plasmática, su eficacia en prevenir la mortalidad en el TCPH aún no está completamente establecida.

12.4.2 TOS

La incidencia es mayor en receptores pediátricos. El 60% de los pacientes infectados desarrolla enfermedad. Los factores de riesgo para enfermedad invasiva son: edades tempranas, aparición precoz y el aumento de la inmunosupresión.

Bibliografía

- Allen U, Preiksaitis J., and the AST Infectious Diseases Community of Practice. "Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients". *Am J Transplant* 2009; 9:S87-S96.
- Boeckh M. "The challenge of respiratory virus infections in hematopoietic cell transplant recipients". *Br J Haematology* 2008; 143: 455-67.
- Boeckh M, Ljungman P. "How I treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients". *Blood* 2009; 113: 5711-19.
- Dignani C, Costantini P, Jordán R, Salgueira C, Valledor A, Guerrini G, et al. "Pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection in cancer and hematopoietic stem cell transplant recipients. A multicenter observational study". ICHS Meeting. Budapest, Hungría, June 27-30, 2010. Abst # P 83.
- Dropulic LK, Jones RJ. "Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients". *Bone marrow Transplant* 2008; 41: 11-8.
- Hirsch H, Randhawa P, the AST Infectious Diseases Community of Practice. BK Virus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9:S136-S146.
- Humar A, Snyderman D, the AST Infectious Diseases Community of Practice. "Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients". *Am J Transplant* 2009;9:S78-S86.
- Ison M. "Adenovirus infections in transplant recipients". *Clin Infect Dis* 2006; 43: 331-9.
- Ison M, Michaels M, the AST Infectious Diseases Community of Practice. RNA respiratory viral infections in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9:S166-S172.
- Levitsky J, Doucette K, AST Infectious Diseases Community of Practice. Viral hepatitis in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9: Suppl 4:S116-30.
- Liang R. "How I treat and monitor viral hepatitis B infection in patients receiving intensive immunosuppressive therapies or undergoing hematopoietic stem cell transplantation". *Blood* 2009; 113: 3147-53.
- Ljungman P. *Viral infections*. En: Bowden RA, Ljungman P, Paya C. Transplant infections. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 277, 435.
- Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. "Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients". *Inf Dis Clin N Am* 2010; 24: 319-37.
- Loren AW, Porter DL, Stadtmauer EA, Tsai DE. "Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review". *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 145-55.
- Peffault de Latour R, Ribaud P, Ribaud P, Robin M, Valla D, Marcellin P, Socié G, et al. "Allogeneic hematopoietic cell transplant in HCV-infected patients". *J Hepatol* 2008; 48: 1008-17.
- Pergam S, Limaye A and the AST Infectious Diseases Community of Practice. "Varicella zoster virus (VZV) in solid organ transplant recipients". *Am J Transplant* 2009;9:S108-S115.
- Razonable R, Zerr D, the AST Infectious Diseases Community of Practice. "HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in solid organ transplant recipients". *Am J Transplant* 2009;9:S97-S103.
- Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. "Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: A global perspective". *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15: 1143-1238.
- Zuckerman R, Wald A, the AST Infectious Diseases Community of Practice. "Herpes simplex virus infection in solid organ transplant recipients". *Am J Transplant* 2009;9:S104-S107.



Infecciones virales del Sistema Nervioso Central

Jorge A. Benetucci - Marcelo Corti

El presente capítulo es una apretada síntesis de las infecciones virales que afectan al sistema nervioso central. Se mencionan aquellos virus que suelen detectarse con mayor frecuencia y producen las manifestaciones clínicas más relevantes dejando de lado los casos anecdóticos o las rarezas.

En las Tablas 46.1 y 46.2 se destacan la familia y el tipo viral involucrado, las manifestaciones clínicas preponderantes, la población afectada con mayor frecuencia y los comentarios epidemiológicos relevantes.

Las formas de infección con estos virus así como su diagnóstico etiológico se abordan en los capítulos respectivos.

Familias de Virus a RNA	Virus	Patología	Población afectada	Comentario
<i>Reoviridae</i>	Reovirus 1, 2, 3	Meningitis, encefalomiелitis	Niños, adultos jóvenes	Muy raras y graves
	Virus fiebre por garrapatas de Colorado	Meningitis, encefalomiелitis	Niños, adultos jóvenes	Muy raras y graves
<i>Togaviridae</i>	Alfavirus	Encefalitis equinas del este, oeste y de Venezuela	Lactantes, niños, adultos mayores	Endémica en áreas del Norte, Centro y Sudamérica
	Rubéola	Encefalitis	Adultos jóvenes; rara en niños	Rara (1/5000 casos) y grave (mortalidad 20-50%)
<i>Flaviviridae</i>	Virus de Fiebre amarilla, dengue, encefalitis japonesa, encefalitis del Nilo occidental, encefalitis de St. Louis	Encefalitis	Adultos generalmente entre 15 y 50 años; viajeros	Endemoepidémicas; mortalidad variable
<i>Paramyxoviridae</i>	Virus parotiditis	Meningitis (frecuente), encefalitis precoz o tardía (raras)	Niños, adolescentes, adultos jóvenes	Las meningitis son benignas; las encefalitis son graves, especialmente las posinfecciosas o tardías
	Virus sarampión	Encefalitis aguda o crónica (desmielinizantes)	Niños, adolescentes, adultos jóvenes	Las agudas son menos graves; las crónicas son muy graves
<i>Rhabdoviridae</i>	Virus rabia	Encefalitis (rabia furiosa), parálisis ascendente (rabia paralítica)	Cualquier edad	Mortal
<i>Filoviridae</i>	Virus Marburg Virus Ébola	Encefalitis	Adultos	Graves. Marburg: mortalidad = 20%; Ébola: mortalidad = 50-85%
<i>Orthomyxoviridae</i>	Virus influenza	Encefalitis, Síndrome de Guillain-Barré	Adultos	Graves durante epidemias; raras fuera de ellas
<i>Bunyaviridae</i>	Encefalitis de California (EC) (Bunyavirus) Fiebre del Valle del Rift (FVR) (Phlebovirus)	Encefalitis; la EC es similar a la herpética; la FVR es muy grave	Menores de 15 años (EC); adultos (FVR)	EC: Baja mortalidad FVT: Alta mortalidad (20-35%)

Continúa en página siguiente

<i>Arenaviridae</i>	Virus de la coriomeningitis linfocitaria	Meningitis, menor compromiso encefálico	Adultos jóvenes	Baja mortalidad
	Complejo Tacaribe (fiebres hemorrágicas sudamericanas)	Encefalitis, cerebelitis	Adultos	Mortalidad alta si hay convulsiones
<i>Retroviridae</i>	HTLV-I y II	Mielopatía crónica, compromiso encefálico menos importante	Adultos jóvenes y mayores	Muy invalidante
	HIV-1	Meningoencefalitis (en infección aguda), demencia asociada al SIDA (ADC), mielopatía vacuolar (en infección crónica)	Niños, adultos menores de 45 años; raro en mayores	Meningoencefalitis autolimitada ADC manejable con terapia antirretroviral Mielopatía responde poco
<i>Picornaviridae</i>	Poliovirus	Poliomielitis parálitica meningitis, Encefalitis más rara	Lactantes, niños, adultos jóvenes	Poliomielitis invalidante Meningitis más benignas Encefalitis grave en lactantes
	Enterovirus (ECHO, Coxsackie, nuevos enterovirus)	Meningitis aséptica Encefalitis Mielopatías parálíticas flácidas	Lactantes, niños pequeños Lactantes, niños y adolescentes Lactantes, niños y adolescentes	Baja mortalidad; más grave en lactantes
	Hepatovirus (virus hepatitis A)	Encefalitis, síndrome de Guillain-Barré	Niños y adolescentes; menos frecuentes en adultos	Raras

Tabla 46.1. Síntesis de las infecciones virales del Sistema Nervioso Central producidas por virus a RNA.



Familias de Virus a DNA	Virus	Patología	Población afectada	Comentario
<i>Herpesviridae</i>	HSV-1	Encefalitis	Niños, adultos jóvenes	Grave; alta mortalidad
	HSV-2	Meningitis	Niños, adolescentes Adultos jóvenes	Generalmente evolución benigna autolimitada
	VZV	Encefalitis	Niños y adolescentes Adultos inmunodeprimidos	Grave; mortalidad: 5-20%
	CMV	Meningoencefalitis Radiculopatías	Adultos jóvenes inmunocompetentes	Infrecuentes
		Radiculopatías Mielitis Encefalitis	Adultos jóvenes inmunodeprimidos (SIDA, trasplantados, etc.)	Moderadas a graves
	EBV	Meningitis, Encefalitis, Mielitis transversa	Niños y adultos jóvenes inmunocompetentes	Complicación de la mononucleosis infecciosa (< 1% de los casos)
Inductor de neoplasias		Inmunodeprimidos	Relacionado con linfoma de Burkitt, de Hodgkin, primario del SNC y con carcinoma nasofaríngeo	
	HHV-8	Inductor de neoplasias	Inmunodeprimidos	Sarcoma de Kaposi
<i>Adenoviridae</i>	Tipos 1, 6, 7 y 12	Meningitis, encefalitis	Niños y adultos jóvenes	Complicación de infección respiratoria

Continúa en página siguiente

<i>Polyomaviridae</i>	JC y BK	LMP (JC) Nefritis (BK)	Inmunodeprimidos	Graves. Difícil tratamiento
<i>Parvoviridae</i>	Parvovirus B19	Meningitis Encefalitis Radiculitis	Niños, adolescentes	Muy raras. Evolución benigna generalmente
<i>Poxviridae</i>	Virus vaccinia	Encefalomiелitis	Niños, adultos jóvenes	Rara y grave. Complicación de la primovacunación con virus vaccinia. Hoy ya no se observa

Tabla 46.2. Síntesis de las infecciones del Sistema Nervioso Central producidas por virus a DNA. HSV-1 y 2: virus herpes simplex-1 y 2; **VZV:** virus varicela-zóster; **CMV:** citomegalovirus humano; **EBV:** virus Epstein-Barr; **HHV-8:** herpesvirus humano tipo 8.

Bibliografía

- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Enfermedades Infecciosas. Principios y Prácticas*. 6ª Ed. en Español. Elsevier España, Madrid, 2006.
- Palmieri, OJ. *Enfermedades Infecciosas*. 1ª Ed. en castellano. Edición del autor, Buenos Aires, 2005.
- Scheld WM, Withley RJ, Durack DT. *Infections of the Central Nervous System*. 3ª Ed. Lippincott-Raven: Philadelphia, 2005.

Infecciones oportunistas virales en pacientes con enfermedad HIV/SIDA

Jorge A. Benetucci - Marcelo Corti

1. CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV)

El HCMV es el agente etiológico más frecuente de infecciones virales en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y su consecuencia, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La retinitis, la enfermedad gastrointestinal y el compromiso del SNC constituyen las principales manifestaciones clínicas de la reactivación de la infección por este virus en pacientes con enfermedad HIV/SIDA avanzada y con recuentos de linfocitos T CD4⁺ de menos de 100 células / μ L.

1.1 ENFERMEDAD OCULAR

La retinitis es la causa más frecuente de enfermedad ocular en estos pacientes y compromete aproximadamente del 20 al 40% de esta población durante la historia natural de la enfermedad. El riesgo de padecer esta complicación se relaciona directamente con la disminución de los niveles de linfocitos T CD4⁺ y, sin tratamiento, la enfermedad progresa hasta comprometer la mácula y provocar ceguera en la mayoría de los pacientes. Es generalmente unilateral, pero puede extenderse al otro ojo. El examen de fondo de ojo permite apreciar hemorragias y exudados perivasculares que deben hacer sospechar el diagnóstico e iniciar la terapéutica específica.

1.2 ENFERMEDAD GASTROINTESTINAL

Se caracteriza por lesiones ulceradas que pueden comprometer cualquier sitio del tracto gastrointestinal, en especial, esófago y colon distal. El HCMV también es una de las causas más comunes de colangiopatía asociada al SIDA.

La esofagitis se caracteriza por odinodisfagia y dolor retroesternal o epigástrico. El principal diagnóstico diferencial es la esofagitis candidiásica, con la que puede coexistir en pacientes gravemente inmunocomprometidos. El examen endoscópico permite observar úlceras, por lo general únicas, grandes y que siguen el eje mayor del órgano.

La rectocolitis puede presentarse en forma aguda, con fiebre, dolor abdominal y diarrea o evolucionar en forma crónica con fiebre, pérdida de peso, dolor abdominal y diarrea intermitente. El examen endoscópico puede ser normal hasta en un 25% de los pacientes. En el resto, la mucosa está comprometida en forma difusa o en parches con áreas de ulceración, necrosis, edema y hemorragias. La colitis por HCMV puede ser causa de abdomen agudo y, con frecuencia, se asocia a infección ocular.

1.3 ENFERMEDAD NEUROLÓGICA

A nivel del SNC, el HCMV puede causar meningoencefalitis, mielitis y polirradiculopatía ascendente, todas complicaciones graves, de evolución aguda y rápida progresión hacia las secuelas neurológicas irreversibles. La meningoencefalitis constituye una entidad de difícil diagnóstico ya que, con frecuencia, presenta manifestaciones clínicas inespecíficas que pueden confundirse con la encefalopatía por HIV o con la leucoencefalopatía multifocal progresiva. Más raramente, el HCMV puede ser causa de masa cerebral ocupante que se diagnostica por biopsia estereotáxica en pacientes que no responden al tratamiento empírico para toxoplasmosis.

La mayoría de los casos de meningoencefalitis por HCMV ocurren en el contexto de una enfermedad diseminada. El estudio del LCR revela aspectos similares a los de una meningitis bacteriana, incluyendo hiperproteínoorraquia, pleocitosis con más del 50% de polimorfonucleares e hipoglucorraquia. El diagnóstico se confirma a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite detectar el genoma de HCMV en LCR (anteriormente por medio de la comprobación de síntesis intratecal de anticuerpos).

La mielitis aguda necrotizante debida a HCMV es un cuadro grave de comienzo agudo con paraplejía flácida, compromiso sensitivo con nivel, arreflexia e incontinencia urinaria y fecal. El diagnóstico se confirma por los mismos ensayos que para las meningoencefalitis, es decir, la PCR en el LCR. El examen de la médula espinal por resonancia nuclear magnética revela un patrón de compromiso medular y la histopatología evidencia focos de desmielinización y necrosis.

Otro cuadro clínico de gran interés causado por el HCMV es la polirradiculopatía ascendente que se caracteriza por debilidad y parestesias en miembros inferiores, con dolor e hipotonía muscular, arreflexia osteotendinosa y, a veces, nivel sensitivo. El examen del LCR revela idénticas alteraciones a los dos cuadros descritos.

Existen dos agentes antivirales aprobados para el tratamiento de estas complicaciones: ganciclovir y foscarnet. El ganciclovir es un análogo de la guanosina, inactivo como prodroga que requiere una triple fosforilación intracelular para actuar. Para el tratamiento de inducción se utiliza a la dosis de 5 mg/kg cada 12 h. por vía intravenosa durante 21 días. La dosis de mantenimiento es de 5 mg/kg/día durante 5 a 7 días de la semana. El principal efecto adverso de este fármaco es la depresión medular con citopenias.

El foscarnet es un inhibidor de la DNA polimerasa viral que también inhibe la transcriptasa inversa del HIV. Es activo contra cepas de HCMV deficientes en timidina quinasa y, por lo tanto, resistentes al ganciclovir. La dosis de foscarnet para la terapia de inducción es de 180 mg/kg/día por vía intravenosa en 2 ó 3 administraciones diarias durante 14 días. La dosis para la terapia de mantenimiento es de 90 a 120 mg/kg/día por vía intravenosa todos los días. El foscarnet es nefrotóxico y puede provocar alteraciones del medio interno como hipokalemia, hiperfosfatemia e hipomagnesemia.

La profilaxis secundaria puede interrumpirse en aquellos pacientes que presentan evidencias de reconstitución inmune con recuentos de linfocitos T CD4⁺ mayores de 150 células/ μ L por más de 6 meses en respuesta a la terapia antirretroviral. La carga viral de estos pacientes puede ser variable, siendo el nivel de CD4 el elemento primario para decidir la interrupción de la profilaxis secundaria debiendo mantenerse los controles oftalmológicos. La profilaxis secundaria deberá reinstalarse en pacientes que vuelvan a presentar deterioro inmunológico con recuentos de linfocitos T CD4⁺ menores de 100 células/ μ L.

En pacientes que han superado un episodio de retinitis por HCMV y reciben terapia antirretroviral con reconstitución inmune puede presentarse un cuadro de vitreítis como exteriorización de esa reconstitución inmunológica.

2. HERPES SIMPLEX (HSV)

2.1 ENFERMEDAD OCULAR

Puede adoptar dos modalidades, ambas muy graves y que pueden comprometer la agudeza visual del paciente. La necrosis retinia-

na aguda se caracteriza por el compromiso bilateral, rápidamente progresivo y, por lo general, irreversible, con necrosis de todo el espesor de la retina acompañada de vitreítis, vasculitis, papilitis y compromiso inflamatorio del segmento anterior del ojo. Conduce a un rápido deterioro de la visión y, en aproximadamente el 75% de los casos, al desprendimiento de la retina. Un cuadro similar puede ser provocado por el virus varicela-zóster (VZV).

La necrosis retinal exterior progresiva (*PORN* por sus siglas en inglés) se caracteriza por lesiones rápidamente progresivas e inflamación ocular mínima lo que obliga al diagnóstico diferencial con la retinitis por HCMV. El pronóstico es malo en relación con la agudeza visual. El tratamiento se realiza con aciclovir a la dosis de 10 mg/kg/cada 8 h. Igual que la forma clínica anterior, también puede ser causado por el VZV y, en este caso, generalmente va precedida por un episodio de VZV cutáneo.

2.2 ENFERMEDAD MUCOCUTÁNEA

Se caracteriza por grandes úlceras y erosiones localizadas en la mucosa oral y en la región anogenital. El diagnóstico se confirma por la escarificación de las lesiones con el citodiagnóstico de Tzanck para observar la formación de sincicios virales, por inmunofluorescencia para la detección de antígenos virales o bien por biopsia de la porción externa de las úlceras, en especial las de localización yuxtaanal o intrarrectal con ayuda de la endoscopia. El HSV es la causa más común de lesiones ulcerosas perianales y obliga al diagnóstico diferencial con las úlceras debidas a *Mycobacterium tuberculosis*, citomegalovirus, y con las lesiones de la sífilis primaria.

2.3 ENFERMEDAD NEUROLÓGICA

El HSV suele coinfectar el SNC de pacientes con encefalitis por HCMV y enfermedad HIV/SIDA avanzada, pero la típica meningoencefalitis focal temporoparietal uni- o bilateral es rara. La presentación clínica habitual incluye ventriculitis, encefalitis y mielitis aguda necrotizante.

El diagnóstico se realizaba anteriormente por la detección de síntesis intratecal de anticuerpos anti-HSV-1/2 o por la detección de antígenos en biopsia cerebral. En la actualidad estos procedimientos se han reemplazado por la PCR, que permite detectar en forma rápida y con alta sensibilidad el genoma viral del HSV en el LCR.

El tratamiento se realiza con aciclovir a la dosis de 30 mg/kg/día, intravenosa durante 14 a 21 días. Como alternativa o en coinfecciones con HCMV puede utilizarse foscarnet a la dosis de 180 mg/kg/día, intravenoso durante 14 a 21 días.

2.4 ENFERMEDAD GASTROINTESTINAL

El HSV es la causa más frecuente de esofagitis aguda ulcerosa de etiología viral en pacientes con SIDA. Se caracteriza por la presencia de múltiples y pequeñas lesiones habitualmente localizadas en el tercio inferior del órgano. Clínicamente, se presenta con disfagia y dolor retroesternal o epigástrico. El diagnóstico se confirma por la fibroendoscopia digestiva alta que permite observar las lesiones y obtener material para estudio histopatológico, inmunohistoquímica y eventual cultivo viral. Puede coexistir con lesiones candidiásicas.

El tratamiento se realiza con aciclovir a las dosis ya mencionadas.

3. VIRUS VARICELA-ZÓSTER (VZV)

3.1 ENFERMEDAD OCULAR

Igual que el HSV, el virus varicela-zóster puede provocar necrosis retinal aguda y necrosis retinal externa progresiva.

3.2 ENFERMEDAD NEUROLÓGICA

El VZV provoca una encefalitis sumamente grave y no pocas veces fatal, caracterizada por focos de desmielinización y necrosis multifo-

cal. Clínicamente se presenta como un cuadro de comienzo subagudo con deterioro del sensorio y ataxia. La resonancia magnética nuclear muestra múltiples lesiones que comprometen la sustancia blanca y gris. El diagnóstico se confirma por el estudio del LCR por PCR para detección del genoma viral (anteriormente, por la detección de síntesis intratecal de anticuerpos). La biopsia puede ser necesaria en algunos casos. El tratamiento se basa en el uso de aciclovir a las dosis ya comentadas.

3.3 ENFERMEDAD CUTÁNEA

El herpes zóster monometamérico debe hacer sospechar siempre la posibilidad de infección por HIV y, muchas veces, es la primera manifestación de la inmunodeficiencia. Pero también, con relativa frecuencia, esta forma clínica es una de las expresiones más comunes del síndrome inflamatorio de reconstitución inmune asociado con la terapia antirretroviral de alta eficacia (*HAART*, por sus siglas en inglés). En pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad e inmunodeficiencia severa, las lesiones pueden perder su carácter metamérico y diseminarse, tornándose ulceradas, necróticas y con tendencia a la sobreinfección bacteriana.

Para el tratamiento, el fármaco de elección es el aciclovir a la dosis de 3 a 4 gr/día durante 10 a 14 días. Como alternativas se pueden utilizar los derivados valaciclovir y famciclovir con espectro antiviral similar al aciclovir.

4. POLIOMAVIRUS JC

4.1 LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA (LEMP)

Es una enfermedad desmielinizante crónica del SNC causada por un poliovirus, el denominado virus JC. Tiene una baja frecuencia, que alcanza el 2-4% de los pacientes con SIDA y con recuentos de linfocitos T CD4⁺ inferiores a 100 células/ μ L.

La LEMP compromete fundamentalmente la sustancia blanca y el hallazgo neuropatológico característico desde el punto de vista macroscópico es la desmielinización que habitualmente, es multifocal. Las lesiones pueden comprometer cualquier porción de la sustancia blanca, pero típicamente, comprometen la región parieto-occipital; en cambio, resultan infrecuentes a nivel de la médula espinal. En ocasiones se observa compromiso exclusivo de las estructuras de la fosa posterior.

La histopatología se caracteriza por la existencia de múltiples focos de desmielinización, hiper Cromáticos, conteniendo oligodendrocitos con grandes núcleos y grandes astrocitos bizarros con núcleos hiper Cromáticos y lobulados.

Desde un punto de vista clínico, la LEMP se caracteriza por su comienzo insidioso, caracterizado con cambios en la personalidad o modificaciones en el carácter, déficit en la memoria, o compromiso cognitivo que puede ser leve a moderado. Con frecuencia, los primeros síntomas corresponden a la esfera visual por el compromiso de la cisura calcarina a nivel de los lóbulos occipitales. Posteriormente aparecen los signos neurológicos focales como hemiparesia, hemianopsia, afasia o compromiso cerebeloso, como manifestación de lesiones multifocales.

El examen del LCR revela un moderado incremento de las proteínas con una discreta pleocitosis. La detección del DNA del virus JC en el LCR por PCR muestra una sensibilidad diagnóstica del 70% con una especificidad del 73%.

Es habitual que la resonancia magnética nuclear demuestre lesiones espontáneamente hiperintensas en los pulsos T2, que comprometen los lóbulos parieto-occipitales en forma bilateral y simétrica y que se introducen en las fibras subcorticales en U o fibras arcuadas.

El tratamiento de la LEMP asociada con el SIDA en base a la *HAART* ha mejorado el pronóstico de esta enfermedad igual que el de otras complicaciones oportunistas vinculadas con la inmunodeficiencia a la que conduce el retrovirus.

5. VIRUS EPSTEIN-BARR (EBV)

5.1 LEUCOPLASIA ORAL VELLOSA

También llamada leucoplasia pilosa, es una manifestación clínica de la infección por este virus, casi exclusiva de los pacientes HIV positivos con enfermedad avanzada. Se trata de una hiperplasia epitelial benigna con hiperqueratosis y acantosis, que se presenta como una lesión blanca de la cavidad oral, localizada en la punta y los bordes de la lengua, generalmente bilateral y asintomática. Más raramente puede observarse en el dorso de la lengua. Es una manifestación predictor de inmunodeficiencia, igual que la candidiasis de las mucosas oral y genital y el herpes zóster. Por técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, se demuestra el genoma del EBV en las lesiones.

5.2 LINFOMAS PRIMARIOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (LPSNC)

El papel del EBV en la patogenia de los LPSNC ha quedado definitivamente establecido. D'Arminio y col. comprobaron la fuerte asociación que existe entre la detección del DNA del EBV en el LCR por PCR y el diagnóstico histológico de LPSNC. En este sentido, Antinori y col. en una evaluación que incluyó a 93 pacientes HIV positivos obtuvieron un 100% de sensibilidad para la PCR en LCR con un 89% de especificidad para el diagnóstico de LPSNC. En otro

estudio, los mismos autores obtuvieron un 100% de sensibilidad y un 100% de valor predictivo positivo para esta técnica y sugieren que la utilidad de la detección del EBV en el LCR se incrementa cuando se asocia con SPECT con talio 201 (²⁰¹Tl).

6. VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV)

Las verrugas anogenitales o condilomas acuminados son pápulas hiperqueratóticas producidas por diferentes genotipos de este virus (6, 11, 16 y 18 son los más comunes). Se trata de una infección de transmisión sexual, con alta prevalencia global en la población HIV positiva que alcanza el 17%, pero que asciende al 40% entre los homosexuales infectados, quienes presentan alta incidencia de lesiones perianales o intraanales. Las manifestaciones clínicas no difieren de las de los sujetos inmunocompetentes, aunque las lesiones suelen ser de mayor tamaño y más extendidas. Actualmente, se acepta que las lesiones anogenitales causadas por los genotipos oncogénicos del HPV, especialmente los tipos 16 y 18, se asocian con un riesgo incrementado de desarrollo de neoplasia cervical y de carcinoma anal y del pene.

NOTA

Este capítulo se finalizó en el año 2008.

Bibliografía

- Antinori A, De Rossi G, Ammassari A, Murri R, Di Guida D, De Luca A, et al. "Value of combined approach with thallium-201 single emission computed tomography and Epstein-Barr virus DNA polymerase chain reaction in CSF for the diagnosis of AIDS-related primary CNS lymphoma". *J Clin Oncol* 1999;17:554-60.
- Berger JR, Kaszovitz B, Donovan Post J, Dickinson G. "Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection". *Ann Intern Med* 1987;107:78-87.
- Bonacini M, L Laine. "Esophageal disease in patients with AIDS". *Gastrointest Endosc Clin North Am* 1998;8:811-23.
- Cinque P, Vago L, Dahl L, Brytting M, Terreni MR, Fornara C, et al. "Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic diseases in the central nervous system in HIV-infected patients". *AIDS* 1996;10:951-8.
- Corti M, Soto I, Villafañe MF, Bouzas B, Duarte JM, Yampolsky C, et al. "Mielitis aguda necrotizante en un paciente con SIDA". *Medicina* (Buenos Aires) 2003;63:143-6.
- Corti M, Villafañe F, Trione N, Schtirbu R, Yampolsky C, Narbaitz M. "Linfomas primarios del sistema nervioso central en pacientes con SIDA". *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:332-6.
- D'Arminio Monforte A, Cinque P, Vago K, Rocca A, Castagna A, Gervasoni C, et al. "A comparison of brain biopsy and CSF-PCR in the diagnosis of CNS lesions in AIDS patients". *J Neurol* 1997;244:35-9.
- Drew, WL. "Cytomegalovirus infection in patients with AIDS". *J Infect Dis* 1988;158:449-546.
- Esquivel P, Corti M, Muzzio E, Schtirbu R. "Leucoencefalopatía multifocal progresiva con compromiso exclusivo de cerebelo y tronco cerebral en un paciente con SIDA". *Rev Arg Infectol* 2002;15:22-4.
- Gallant JE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Chaisson RE. "Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced immunodeficiency virus disease treated with zidovudine". *J Infect Dis* 1992;166:1123-7.
- Greenspan D, Greenspan JS, Hearst NG, Pan LZ, Conant MA, Abrams DL, et al. "Relation of oral hairy leukoplakia to infection with the human immunodeficiency virus and the risk of developing AIDS". *J Infect Dis* 1987;155:475-81.
- Jacobson MA, J Mills. "Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Clinical findings, diagnosis, and treatment". *Ann Intern Med* 1988;108:585-94.
- Jayaweera DT, Cassetti LI, Espinoza L, Lopardo GD, Hansman-Whiteman M, Scerpella EG. "Polirradiculomielopatía causada por citomegalovirus en pacientes con sida". *Medicina* (Buenos Aires) 1998;58:135-40.
- Mammani L, Moreno A, Villafañe MF, Trione N, Corti M, Bouzas MB. "Metodología diagnóstica para el estudio del compromiso del SNC por virus Herpes en pacientes con enfermedad HIV/SIDA". VII Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires 19 al 22/09/05. Abstract 10707.
- Mc Crary M, Severson J, Tying S. "Varicella-zoster virus". *J Am Acad dermatol* 1999;41:1-14.
- Moulinier A, Pialoux, G, Dega H, Dupont B, Huerre M, Baudrimont M. "Brain stem encephalitis due to varicella-zoster virus in a patient with AIDS". *Clin Infect Dis* 1995;20:1378-80.
- Quereda C, Corral I, Laguna F, Valencia ME, Tenorio A, Echeverría JE, et al. "Diagnostic utility of a multiplex herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders". *J Clin Microbiol* 2000; 8:3061-6.
- Simpson DM, Tagliati M. "Neurologic manifestations of HIV infection". *Ann Intern Med*. 1994;121:769-85.
- Sköldenberg B, Kalimo K, Carlstrom A, Forsgren M, Halonen P. "Herpes simplex encephalitis: a serological follow-up study. Synthesis of herpes simplex virus immunoglobulin M, A, and G antibodies and development of oligoclonal immunoglobulin G in the central nervous system". *Acta Neurol Scand* 1981 ;63:273-85.
- Petito CK, Cho ES, Lemann W, Navia BA, Price RW. "Neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): an autopsy review". *J Neuropathol Exp Neurol* 1986;45:35-46.
- Ormerod LD, Larkin JA, Margo CA, Pavan PR, Menosky MM, Haight DO, et al. "Rapidly progressive herpetic retinal necrosis: a blinding disease characteristic of advanced AIDS". *Clin Infect Dis* 1998;26:34-45.
- Vernon S, Holmes K, Reeves W. "Human papillomavirus infection and associated disease in persons infected with HIV". *Clin Infect Dis* 1995;21(suppl1):121-4.
- Wiley CA, Nelson JA. "Role of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus in AIDS encephalitis". *Am J Pathol* 1988;133:73-81.

PARTE 5

Profilaxis y tratamiento de las Infecciones Virales

Vacunas virales

Guadalupe Carballal - José Raúl Oubiña

INTRODUCCIÓN

Las vacunas virales constituyen uno de los más trascendentales logros de la ciencia médica. Han permitido salvar millones de vidas mediante la prevención de enfermedades infecciosas, muchas veces mortales. Aunque existen drogas antivirales, éstas frecuentemente no curan sino que modifican el curso de la enfermedad. Por ello, la prevención de las infecciones virales se basa en dos pilares fundamentales: a) la inmunización de los individuos en riesgo; y b) la educación. Sin embargo, a pesar de la obtención de vacunas seguras y eficaces, la OMS estimó que mueren millones de personas al año debido a causas infecciosas, y que millones de niños no tienen acceso a la inmunización.

Durante el curso de una infección, los diferentes antígenos virales actuarán como inmunógenos capaces de inducir –en el hospedador inmunocompetente– una respuesta inmune protectora que habitualmente podrá evitar la enfermedad y proteger contra futuras re-infecciones por el mismo virus. La respuesta antiviral puede ser principalmente humoral, celular o mixta. Este tipo de inmunidad se denomina **activa** ya que es producida activamente por el hospedador, y **natural** porque se desencadena luego de una infección naturalmente adquirida. Por el contrario, cuando la inmunidad se adquiere por medio de vacunas se la denomina **activa y artificial**, ya que es producida por el hospedador, pero el inmunógeno –contenido en la vacuna– es introducido artificialmente al organismo (por inyección o por vía oral) en el acto de la vacunación (Tabla 48.1).

Cuando la madre transfiere anticuerpos antivirales específicos preformados al niño, ya sea por vía transplacentaria (IgG) o durante la lactancia (IgA), este tipo de inmunidad se denomina **pasiva y natural**.

Asimismo, cuando se transfieren pasivamente a un paciente anticuerpos preformados con fines terapéuticos o profilácticos (seroterapia), el concepto se refiere a **inmunidad pasiva artificial**. Por ejemplo, en el tratamiento de la fiebre hemorrágica argentina (plasma de convaleciente), en la profilaxis anti-rábica (IgG de individuos inmunizados), en el tratamiento de niños con infecciones graves por virus sincicial respiratorio (anticuerpos monoclonales humanizados), etc.

En este capítulo analizaremos algunos conceptos importantes sobre las vacunas virales de uso humano. Las vacunas específicas, sus indicaciones, contraindicaciones, dosis, etc. se tratan en los capítulos correspondientes.

Uno de los mayores progresos de la Virología es la producción de nuevas y más eficaces vacunas que han contribuido a disminuir el número de casos de poliomielitis, sarampión, rubéola, hepatitis A y B y, en ciertos casos, han logrado la erradicación de algunas enfermedades. Para muchas infecciones virales, el método de control más adecuado es la inmunización de la población susceptible. El mejor ejemplo es la viruela, que fue erradicada del planeta en 1980 por medio de la vacunación anti-variólica (*Capítulo 28, Poxvirus*).

En el hemisferio norte también se logró un control efectivo de la rabia urbana y, en 1994 se estableció que el virus polio salvaje ha sido erradicado del continente americano.

El desarrollo de las diferentes vacunas en función del devenir del tiempo se observa en la Tabla 48.2.

Clásicamente, **las vacunas virales se elaboran con virus homólogo inactivado o bien con virus vivo y atenuado** (Tabla 48.3). El término *vivo* hace referencia a la capacidad de replicación de la cepa

utilizada en este tipo de vacuna. Por ende, dichas vacunas infectarán a quien las recibe. Por el contrario, en las vacunas a virus inactivado, el virus es incapaz de replicar en el hospedador debido al proceso de inactivación, pero sí puede actuar como eficaz inmunógeno.

Se denomina **virus vivo y atenuado** a aquella variante de un virus que induce inmunidad protectora, similar a la de una infección natural (ya que replica en el hospedador), pero con riesgos mínimos de producir enfermedad y efectos adversos. Las cepas virales atenuadas para ser usadas en vacunas se pueden obtener de la naturaleza, mediante la identificación de cepas naturalmente atenuadas, o bien en el laboratorio *presionando* sobre el genoma viral, empleando hospedadores diferentes del habitual, modificando las condiciones del medio, o ambos métodos para favorecer la aparición de mutantes que presenten las características de atenuación buscadas.

Otra posibilidad para obtener una cepa vacunal es emplear un **virus heterólogo**, es decir antigénicamente relacionado al virus contra el cual se desea proteger. Estas vacunas se denominan *jennerianas*, en honor a Edward Jenner, médico inglés que demostró por primera vez protección contra la viruela mediante la administración de un virus heterólogo (vaccinia).

También se han desarrollado **nuevas alternativas**, tales como: vacunas a subunidades, péptidos sintéticos, productos antigénicos obtenidos por ingeniería genética en células procariontas o eucariotas, y la obtención de recombinantes entre un virus no patógeno para el hombre (por ejemplo, vaccinia) en cuyo genoma se han insertado genes que codifican para epítopes protectores del virus cuya enfermedad asociada se intenta prevenir.

A pesar de los avances en biología molecular, al presente, sólo dos vacunas elaboradas mediante la tecnología del DNA recombinante han sido aprobadas para uso humano: la vacuna anti-hepatitis B y la vacuna anti-HPV.

Cualquiera sea el método adoptado para la producción de vacunas es imprescindible que el **antígeno** obtenido sea **eficaz** en su capacidad de inducir protección (inmunidad activa y artificial) e **inocuo**, es decir incapaz de producir daño al hospedador, ya sea por mecanismos directos (inherentes al virus; por ejemplo: el neurotropismo) o por mecanismos indirectos de lesión (inmunopatológicos).

El desafío para el siglo XXI es la aplicación de los conocimientos de biología molecular, virología e inmunología para desarrollar

Inmunidad activa	Natural	Luego de una infección
	Artificial	Luego de una vacunación
Inmunidad pasiva	Natural	Por vía transplacentaria (IgG)
		Por lactancia materna (IgA)
	Artificial	Seroterapia: administración de suero, plasma inmune o gammaglobulina hiperinmune con fines terapéuticos o profilácticos

Tabla 48.1. Inmunidad protectora.

Etapas	Vacunas					
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
Sustrato / Característica	Animales	Huevos	Cultivo celular	Tecnología de DNA recombinante	Vacunas a DNA Vacunas por vía mucosa Virus recombinantes ^(a)	Virus con genoma reasociado Partículas virus-símil (VLPs) ^(b) Genética inversa Virus recombinantes Plantas transgénicas
Ejemplos	Anti-variólica Anti-rábica	Anti-amarílica Anti-influenza Anti-parotídica Anti-rubeólica	Anti-polio Anti-sarampionosa	Anti-hepatitis B	En desarrollo y/o ensayo clínico	Anti-rotavirus Anti-HPV (VLPs) Otras ^(c)
Año	1900	1950	1960	1980	1990	2006...

Tabla 48.2. El desarrollo de las vacunas virales a través del tiempo. ^(a) Anti-virus del Nilo Occidental recombinante: envoltura y preM del virus del Nilo Occidental en esqueleto génico del virus de la vacuna anti-amarílica. ^(b) VLPs: Partículas virus-símil (*Virus-like Particles*). ^(c) Vacunas profilácticas y terapéuticas para HIV y HCV, ambas en desarrollo.

vacunas que simulen la infección natural y que confieran protección tanto contra enfermedades agudas como crónicas (por ejemplo, las causadas por HIV, virus hepatitis C, papilomavirus, etc.).

1. ASPECTOS HISTÓRICOS

La práctica de la *variolización* era conocida en la antigua China y fue introducida en Europa en 1721 por la esposa del embajador inglés en dicho país. La variolización consistía en la introducción de costras desecadas (provenientes de enfermos de viruela) en las fosas nasales de los individuos susceptibles. El procedimiento era totalmente empírico y a veces, en lugar de la protección, se producía la enfermedad debido a una inactivación insuficiente del virus en las costras.

Las bases científicas de la vacunación fueron establecidas por el médico inglés Edward Jenner, quien observó que los campesinos que presentaban en sus manos una lesión conocida como *nódulo de los ordeñadores*, que adquirían inadvertidamente por contacto con bovinos infectados con viruela bovina o *cow-pox*, nunca enfermaban de viruela cuando se registraban los brotes epidémicos que diezaban en esa época a la población en Europa. Jenner publicó la conclusión de que "la infección con *cow-pox* protegía al ser humano de la viruela" en 1798, cuando el concepto de virus no existía y sólo se contaba con los primeros y primitivos microscopios de muy escaso aumento. Jenner pudo demostrar experimentalmente su hipótesis en 1796 cuando se atrevió a inocular al material extraído de las vesículas de una ordeñadora infectada con viruela bovina a un niño virgen de enfermedad (James Phipps), quien se contagió con este agente. Meses después, Jenner inoculó al niño con líquido de la lesión de un paciente con viruela, pero el niño no enfermó. Había sido *inmunizado* mediante el procedimiento que Jenner acuñó con la denominación de *vacunación*. El éxito había sido tan rotundo que algunos estados de Alemania declararon feriado nacional el día del cumpleaños del científico, la Casa Real de Inglaterra decidió la vacunación de sus miembros y en Rusia se llamó Vaccinov al primer niño vacunado.

Sin embargo, debieron transcurrir 182 años (1798-1980) desde los trabajos pioneros de Jenner hasta lograrse la erradicación de la viruela del planeta Tierra, lo que se logró mediante una vacuna a virus *vivo* y atenuado, derivada del virus de viruela bovina y que se denomina virus vaccinia. De allí proviene el nombre *vacuna* (del latín, *vacca*), que se utiliza para todo antígeno capaz de inducir protección. Por estos estudios, Jenner es considerado el padre de la Vaccinología y este tipo de vacunas a virus heterólogo se denomina **vacuna Jenneriana**.

Existen numerosos métodos para obtener vacunas virales (Tabla 48.3). La mayoría de los virus son lábiles a la desecación y al calor y

esta observación sirvió de base para la preparación de las primeras vacunas anti-rábicas.

La primera vacuna anti-rábica creada por el genial Louis Pasteur en 1885, fue preparada en médula espinal de conejo inoculado con una cepa de virus rábico denominado *virus fijo* —que había sido propagado varias veces en conejo y producía la enfermedad al cabo de un período de incubación *fijo*—, en contraposición al virus salvaje o *virus calle*, que lo hacía luego de un período de incubación variable.

La vacunación consistía en la administración de varias dosis de médulas espinales de conejos infectados desecadas a temperatura ambiente, con diferentes tiempos de desecación. Las primeras dosis contenían médulas con más tiempo de desecación mientras que las últimas tenían un menor período de inactivación térmica. Esta vacuna fue ensayada por primera vez en el niño Joseph Meister, quien había sido mordido gravemente por un perro rabioso siendo su pronóstico, por ende, fatal. Esta primitiva e histórica vacuna de Pasteur tuvo éxito y el niño sobrevivió ya que la vacuna indujo la formación de los anticuerpos necesarios para neutralizar al virus salvaje antes de que pudiera acceder al sistema nervioso central. Meister fue muerto durante la ocupación alemana de París al negarse a mostrar la tumba de Pasteur que hasta entonces cuidaba.

Es necesario recordar que en la época de Pasteur no se conocían los métodos de cultivo de virus ni los de cuantificación y recién comenzaban los primeros intentos de aislamiento de virus en animales.

La vacuna de Pasteur presentaba dos grandes riesgos: 1) que el virus no estuviese completamente inactivado; y 2) la posibilidad de reacciones auto-inmunes contra la mielina, presente en la médula de conejo adulto.

Posteriormente, las vacunas anti-rábicas se perfeccionaron lentamente hasta llegar a las actuales, que se preparan en cultivos celulares y presentan riesgos mínimos o nulos (véase el Capítulo 26: Rabia). Asimismo, se desarrollaron inactivantes más seguros que la desecación, como la formalina (solución de formaldehído al 37%), la luz ultravioleta, la betapropiolactona, etc.

El larguísimo camino recorrido desde la primitiva vacuna de Pasteur hasta las nuevas vacunas a DNA recombinante señalan la asombrosa capacidad creativa del ser humano.

2. FACTORES ESENCIALES A CONSIDERAR EN LA PREPARACIÓN DE VACUNAS

En la preparación de las vacunas para uso humano es necesario tener en cuenta los siguientes factores: 1) la inducción de inmunidad protectora; 2) el desarrollo de modelos en animales de experimentación;

3) la elección de la cepa viral; 4) la elección del sustrato para su replicación; 5) los métodos de inactivación o de atenuación; 6) la purificación; 7) la inmunogenicidad; y 8) los beneficios versus los riesgos de su aplicación al ser humano.

2.1 INDUCCIÓN DE INMUNIDAD CON LOS DIFERENTES TIPOS DE VACUNAS

Una de las ventajas de las vacunas a virus vivo y atenuado es que producen una infección. Como consecuencia, se estimula intensamente la respuesta inmune humoral y celular y la protección conferida perdura muchos años. Además, péptidos virales son presentados en el contexto de una infección natural –ya que replican intracelularmente, con la consiguiente neosíntesis proteica– por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y, por ello, la respuesta incluye la producción de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺), capaces de destruir las células infectadas, además de la formación de anticuerpos neutralizantes.

Por el contrario, las vacunas a virus inactivados no pueden replicar. Los antígenos son endocitados, degradados, transportados como péptidos a la superficie celular y presentados habitualmente al sistema inmune por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. En este caso se inducirá principalmente la síntesis de anticuerpos neutralizantes, pero no una respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos CD8⁺.

Si la formación de anticuerpos neutralizantes es suficiente, éstos podrán prevenir las enfermedades asociadas a futuras reinfecciones. Sin embargo, para algunos virus, por ejemplo HIV, se requiere la inducción tanto de anticuerpos neutralizantes como de una intensa respuesta celular para lograr protección, no existiendo aún una vacuna eficaz.

2.2 DESARROLLO DE MODELOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Es imprescindible contar con modelos animales para reproducir las enfermedades virales humanas y así poder ensayar las vacunas antes de su aplicación al ser humano. Éste es un proceso difícil ya que no todos los animales de experimentación (ratones, ratas, cobayos, conejos, primates) desarrollan una enfermedad similar a la producida por los virus en el hombre. Una vez lograda la reproducción de una

enfermedad similar a la humana en los animales, éstos se podrán inmunizar con la vacuna en estudio, se estudiarán las características de la respuesta inmune y –si ésta es adecuada– se podrán desafiar los animales inmunizados con cepas patógenas del virus en cuestión. Si se logra protección ante el desafío, la cepa vacunal podrá ser ensayada en voluntarios humanos.

2.3 CEPA VIRAL

La cepa seleccionada para una vacuna de uso humano debe tener una historia conocida de pasajes (propagación viral en un determinado sustrato celular o animal). En la actualidad, se descartan aquellas cepas que hayan experimentado pasajes por hospedadores no aceptados para la producción de vacunas humanas, debido al posible riesgo de contaminación con agentes adventicios (por ejemplo, virus contaminantes de origen animal). No sucedía lo mismo en épocas anteriores; por ejemplo, el virus vaccinia que se empleó con éxito en la erradicación de la viruela tiene un origen incierto, habiéndose demostrado con técnicas de biología molecular que sería un recombinante entre el virus de la viruela bovina o *cow-pox* y el virus de la viruela humana.

Además, debe elegirse la o las cepas que contengan todos los antígenos prevalentes en las cepas circulantes en la comunidad donde se aplicará la vacuna. Por ejemplo, en las vacunas inactivadas anti-influenza se deben incluir los nuevos subtipos que emergen debido a las variaciones mayores y menores de este virus. Los anticuerpos formados son subtipo-específicos. La protección conferida por las vacunas actuales para influenza es restringida ya que inducirán protección completa sólo contra los subtipos contenidos en la misma, pero no contra un subtipo completamente diferente que pueda emerger en los años siguientes. Por ello, las cepas vacunales deben actualizarse cada año de acuerdo a las cepas circulantes en el hemisferio norte o sur y la vacunación debe repetirse cada año.

Por ejemplo, las cepas vacunales recomendadas por la OMS para influenza para el año 2003 fueron: influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) ó similar; influenza A/Moscow/10/99 (H3N2) o similar e influenza B/Hong Kong/330/2001 o similar.

Para el año 2005, las cepas recomendadas fueron modificadas y las propuestas fueron: influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1); influenza A/Wellington/1/2004 (H3N2); influenza B (Shangai/361/2002)

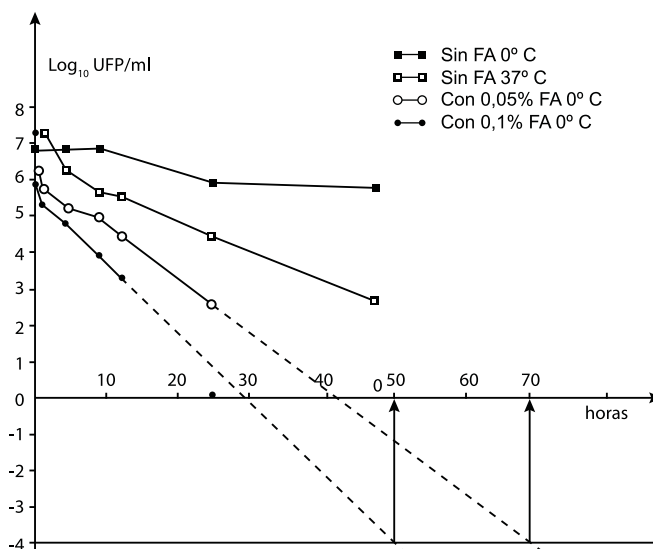


Figura 48.1. Curva de inactivación del virus Junín con formaldehído a diferentes concentraciones. Las dos curvas superiores muestran la inactivación térmica del virus Junín a 0° C y a 37° C sin el agregado de formaldehído (FA). A 0° C el título viral se mantiene invariable durante 48 h, mientras que a 37° C disminuye con el tiempo, descendiendo a 3 logs a las 48 h. Las dos curvas inferiores muestran la inactivación con FA a dos concentraciones diferentes y a 0° C. Con una concentración del 0,05% no se detectan viriones a las 48 h mientras que con una concentración mayor de FA 0,1 %, el título desciende rápidamente y no se detecta infectividad ya a las 24 h. Todas las titulaciones se realizaron por plaqueo y se expresan en Unidades Formadoras de Placas –UFP– / ml. Las líneas punteadas son extrapolaciones de las curvas de inactivación del virus Junín con FA. Luego de 50 y 70 h de tratamiento con FA al 0,1% y 0,05% respectivamente, se obtiene menos de 1 virión por cada 10 litros de suspensión viral (10⁻⁴ UFP / ml).

o equivalente (Capítulo 14). Las características de la vacuna para el nuevo virus influenza A H1N1, pandémico de 2009 se describen en el Capítulo 59.1.

Para el año 2012, las cepas recomendadas para las vacunas para el hemisferio sur son las mismas que para 2011: influenza A/California/7/2009 (H1N1); influenza A/Perth/16/2009 (H3N2) e influenza B/Brisbane/60/2008.

2.4 SUSTRATO

El sustrato donde replicará la cepa vacunal es un factor de trascendental importancia. El descubrimiento realizado por Enders, Wellers y Robbins en 1949 fue un hito fundamental en el desarrollo de vacunas para poliomielitis. Estos investigadores demostraron que el virus polio era capaz de replicar *in vitro* en cultivo de células *no nerviosas* (cultivos de riñón de mono). Esto permitió obtener una gran masa viral para su empleo como vacuna.

Los sustratos empleados para producción de vacunas de uso humano **deberán estar libres de otros patógenos**. Si la replicación se realiza en huevos embrionados (de gallina o pato) o en cultivos primarios de embrión de pollo, éstos deben provenir de aves libres de patógenos endógenos (linfomatosis aviaria, encefalomiélitis aviaria, enfermedad de Newcastle, adenovirus, etc.)

Actualmente, se preparan en huevos embrionados las vacunas inactivadas para influenza y en cultivos primarios de fibroblastos de embriones de pollo, las vacunas a virus *vivo* y atenuado para rubéola, sarampión, parotiditis y fiebre amarilla.

El cerebro de ratones lactantes permite la replicación de numerosos virus; por ello, muchas vacunas se prepararon inicialmente en este sustrato (fiebre amarilla, encefalitis equinas, rabia, la primera vacuna para fiebre hemorrágica argentina, etc.). En la actualidad, el empleo de ratones o ratas como sustrato para vacunas de uso humano fue abandonado, debido al riesgo de contaminación con virus murinos y a la presencia de mielina, aunque este factor puede ser minimizado mediante el uso de animales lactantes (que contienen menos mielina) y la ultracentrifugación de la suspensión de cerebro para eliminar detritus celulares y la mayor parte de la mielina.

Desde hace décadas, la mayoría de las vacunas de uso humano se preparan en cultivos celulares ya que son sistemas más *limpios*, es decir, más fácilmente controlables que los animales en cuanto a la ausencia de agentes adventicios.

En general, se emplean células de origen humano tales como MRC-5 o WI-38 (líneas diploides humanas) o de primates FRL (*fetal rhesus lung* –pulmón de mono rhesus–). Recientemente, se ha aceptado una sublínea de células VERO (línea continua de riñón de mono verde africano) para la producción de vacuna anti-poliomielitis, tipo Salk, vacuna anti-rábica y otras.

En las células que se emplean como sustrato debe controlarse el cariotipo y la ausencia de otros virus adventicios (SV40 –*Simian vacuolating virus*–; *Foamy virus* y otros virus simianos), así como la ausencia de bacterias (especialmente micoplasmas) y hongos.

2.5 MÉTODOS DE INACTIVACIÓN Y DE ATENUACIÓN

Inactivación

La elección del inactivante adecuado para un virus determinado, así como la determinación del correcto nivel de inactivación son factores fundamentales. Los inactivantes usados para vacunas de uso humano son: la formalina (solución de formaldehído 37% peso/volumen) que se emplea en concentraciones de 0,05 - 0,1%, la luz ultravioleta y la beta-propiolactona. En todos los casos, es imprescindible determinar la "dosis" (concentración y tiempo de inactivación) adecuada del inactivante para cada virus en particular (Figura 48.1).

Jonas Salk desarrolló la primer vacuna anti-poliomielítica replicando el virus patógeno en cultivo de riñón de primate, e inactivándolo con formol y calor. En los comienzos de la utilización de esa vacuna se registraron algunos accidentes graves, ya que un lote estaba inactivado en forma insuficiente (episodio recordado como incidente del laboratorio Cutter). Otro problema fue la contaminación

de un lote con SV40, un poliovirus simiano endógeno presente en los cultivos celulares de primate usados para la replicación del virus polio. Este último fue inactivado por el formol pero no así el SV40 que fue resistente a la dosis del inactivante utilizado.

De allí la importancia de emplear sustratos en los que se excluya cuidadosamente la presencia de otros virus adventicios, así como cumplimentar los rigurosos controles del proceso de inactivación.

Atenuación

Cuando se trata de una vacuna a virus *vivo* y atenuado, la determinación del correcto nivel de atenuación es un paso de fundamental importancia. Para ello, es imprescindible contar con modelos animales que reproduzcan la enfermedad humana al ser inoculados con cepas virulentas aisladas de pacientes.

El proceso de selección de una cepa atenuada candidata a vacuna es complejo. Muchas de estas cepas son mutantes termosensibles (*ts*), que se propagan a temperaturas en general inferiores a las que se replica la cepa original. Las cepas atenuadas –candidatas a vacunas– **deberán inducir protección duradera sin producir enfermedad ni daño tisular**. Los métodos empleados habitualmente para la búsqueda de cepas vacunales son:

1) Búsqueda de mutantes atenuadas en la naturaleza

Por ejemplo, el virus vaccinia es un virus atenuado para el hombre. Por métodos de biología molecular se determinó que sería un recombinante entre el virus de la viruela bovina y el de la viruela humana.

2) Adaptación del virus a un hospedador diferente del habitual

Se han obtenido cepas vacunales mediante pasajes repetidos en huevos embrionados (fiebre amarilla, rabia, sarampión).

Los cultivos celulares presentan grandes ventajas ya que, además de la presión selectiva que se ejerce desde el hospedador (tipo de cultivo, temperatura, pH, etc.) se pueden agregar métodos de clonado. El clonado permite aislar la progenie de partículas genéticamente homogéneas a partir de una población inicial (en general heterogénea). Por ello, los procedimientos de clonado son un método eficiente para aislar poblaciones virales con las características de atenuación buscadas.

Los métodos más usados son: a) clonado por dilución terminal; b) por separación de unidades formadoras de placas bajo agarosa; y c) clonados por "simple explosión".

3) Reasociación genética entre cepas virales virulentas y atenuadas, y entre humanas y animales

Dado que los rotavirus humanos y animales pertenecientes al grupo A comparten un antígeno de grupo, inicialmente se habían desarrollado vacunas de tipo *jenneriana*, utilizando una cepa animal para inmunizar humanos. Sin embargo, estas vacunas no dieron la protección adecuada dado que la respuesta heterotípica fue transitoria y de menor efectividad que la homotípica.

Posteriormente, se desarrollaron vacunas que contenían parte del genoma de una cepa de rotavirus de origen animal reasociado con el de cepas humanas de diferentes serotipos, lo que permitió generar así vacunas multivalentes que contienen los antígenos de los serotipos humanos prevalentes (vacunas homo/heterotípicas reasociadas multivalentes). Una de estas vacunas fue eficaz en la protección contra la enfermedad grave y fue aprobada y comercializada en EE.UU. en 1998. Sin embargo, su empleo fue rápidamente suspendido debido a que se la asoció a casos de invaginación intestinal en algunos de los niños vacunados.

En la actualidad ya fueron aprobadas, completaron la fase III de estudios clínicos y están siendo comercializadas dos nuevas fórmulas vacunales para rotavirus, una monovalente preparada a partir de una cepa humana atenuada mediante múltiples pasajes en cultivos celulares (sin evento de reasociación alguna entre su genoma y el de otras cepas) y otra pentavalente obtenida por reasociación genómica entre una cepa bovina y otra humana (Capítulo 21).

4) Inducción experimental de mutaciones. Inicialmente, las mutaciones en el genoma de los virus se lograba mediante radiaciones ionizantes, así como mediante la propagación seriada en hospedadores no habituales para el virus en cuestión.

Virus o antígenos	Preparación	Inactivada con
Virus inactivado completo		
Polio, tipo Salk (tipos 1, 2 y 3)	Cultivos de riñón de primate	Formalina
Rabia, tipo Fuenzalida-Palacios*	Cerebro de ratón lactante	Luz ultravioleta
Rabia	Cultivo células diploides (MRC-5, WI-38)	Beta-propiolactona
Influenza (trivalente)	Huevos embrionados	Formalina
Encefalitis equinas*	Cultivo celular	Formalina
Subunidades antigénicas de virus inactivado		
Influenza (trivalente: dos cepas de influenza A -H3N1 y H3N2- y una de influenza B)	Hemaglutinina y neuraminidasa purificadas Cepas obtenidas en huevos	Formalina
Influenza H1N1 pandémica	Hemaglutinina y neuraminidasa purificadas Cepas obtenidas en huevos	Formalina
Antígenos obtenidos por tecnología a DNA recombinante		
Hepatitis B (vacuna de 2ª y 3ª generación)	Inserción de genes virales (que codifican epítopes esenciales) en levaduras o células de ovario de hámster chino permite la producción de polipéptidos inmunogénicos, p. ej. el HBs Ag	- - -
VLPs (<i>virus-like particles</i>) Papilomavirus humano bivalente (16 y 18) o tetravalente (6, 11, 16 y 18) recombinantes	Antígenos L1/L2 de la cápside	- - -
A virus vivo y atenuado		
Polio, tipo Sabin (tipos 1, 2 y 3)	Cultivos de riñón de primate ó células diploides humanas	- - -
Sarampión, cepa Edmonston Enders, Moraten u otras	Cultivos de fibroblastos de embrión de pollo	- - -
Rubéola, cepa HPV-77; Cenderhill, o Wistar RA 27/3	Cultivos de embrión de pato	- - -
Fiebre amarilla, cepa 17D	Cultivos de fibroblastos de pollo	- - -
Parotiditis, cepa Jeryl Lynn, o Urabe AM-9	Cultivos de fibroblastos de pollo	- - -
Viruela, virus vaccinia*	Piel de ternera Cultivos celulares	- - -
Triple viral (combinada): Sarampión (Schwarz) Parotiditis (Urabe AM-9) Rubéola (RA 27/3)	Cultivos de embrión de pollo Cultivos de células diploides humanas	- - -
Influenza (trivalente) mutante "adaptada a frío" (<i>cold adapted</i>) Tipos A (H1N1 y H3N2) y B (administración por vía intranasal)	Cultivos celulares	- - -
Rotavirus Monovalente Pentavalente Vía oral	Cultivos de células VERO Cepa humana atenuada Reasociación genómica entre una cepa bovina y una humana (serotipos G1, G2, G3, G4 y P1A[8])	- - -
Virus Junín*, cepa Candid-1	Cultivo celular	- - -
Varicela-zóster, cepa OKA	Cultivo celular	- - -

Tabla 48.3. Vacunas virales humanas actualmente en uso. * De uso muy restringido actualmente.

Como ejemplo del segundo método se puede mencionar a la **vacuna anti-poliomielítica tipo Sabin, que consiste en cepas aisladas** de casos humanos y atenuadas por pasajes sucesivos en cultivos primarios de riñón de mono y purificadas por clonado en cultivos.

Otro ejemplo es la vacuna anti-sarampionosa, cepa Edmonston, obtenida por Enders mediante 24 pasajes en células renales humanas, 28 en cultivo de amnios humano, 6 en huevos embrionados y luego un pasaje más en cultivos de embrión de pollo. A partir de esta cepa, se desarrollaron otras de mayor atenuación (cepa Schwarz, Moraten, Beckenham, Belgrado). Asimismo, se obtuvieron otras cepas atenuadas que no parten de la Edmonston, tales como Leningrado -4, -16 y otras.

Muy recientemente –como se indica más arriba– una vacuna atenuada para prevenir las gastroenteritis por rotavirus fue desarrollada también mediante múltiples pasajes de propagación viral en cultivos celulares.

Desde la década de 1990, el advenimiento de la **tecnología de la genética inversa** –o por extensión también denominada genética reversa (del inglés *reverse genetics*)–, **permite la generación *in vitro* de cDNAs correspondientes al genoma de virus a RNA mediante transcripción inversa** del mismo por una DNA polimerasa-RNA dependiente. Estas moléculas de cDNA pueden –a su vez– ser modificadas mediante mutagénesis sitio-dirigida y los RNAs resultantes (sintetizados por una RNA polimerasa, como por ejemplo la T7 RNA polimerasa) pueden ser subsiguientemente estudiados en sus propiedades biológicas. Mediante dicho estudio, es posible seleccionar variantes virales asociadas a la atenuación de su patogenicidad, y –por ende– ser analizadas como potenciales fuentes de obtención de inmunógenos.

2.6 BASES GENÉTICAS DE LA ATENUACIÓN

Sorprendentemente, cuando se analizó el genoma de cepas atenuadas se observó un número limitado de mutaciones en genes claves. Por ejemplo, comparando el genoma del poliovirus salvaje tipo 1 con la cepa atenuada se observaron 55 sustituciones sobre 7.441 bases. Sólo 21 de esas sustituciones producían cambios de aminoácidos. Con el poliovirus tipo 3 atenuado –el que más frecuentemente revierte a la virulencia– sólo 10 nucleótidos estaban mutados en la cepa vacunal, de los cuales sólo 3 resultaron en cambios en aminoácidos en la proteína estructural. En el serotipo 3, la sustitución nucleotídica C → U en la posición 472 del extremo 5' no codificante (5' NC) está íntimamente asociada a la atenuación viral. En forma análoga, las posiciones 483 (A → G) y 484 (G → A) se asocian a la atenuación de los serotipos 1 y 2 de poliovirus, respectivamente.

2.7 PURIFICACIÓN

La cepa viral en la vacuna deberá estar purificada de componentes celulares y no deberá contener virus adventicios de origen animal (que pueden, inadvertidamente, estar presentes en los cultivos celulares), ni contaminantes bacterianos (especialmente micoplasmas) o micóticos.

Luego, es necesario purificar la cepa viral de los componentes celulares, lo que a veces resulta difícil. Por ejemplo, las vacunas preparadas en embriones de aves pueden contener proteínas del huevo que, en individuos alérgicos, pueden ocasionar reacciones de hipersensibilidad por lo que su aplicación en esos casos está contraindicada.

En la vacuna para hepatitis B de primera generación –ya en desuso–, obtenida a partir de plasma de portadores persistentemente infectados con virus hepatitis B, la purificación consistía en eliminar las partículas infecciosas de 42 nm (partículas de Dane) por centrifugación zonal para dejar **solamente las partículas de 22 nm (partículas defectivas, sin ácido nucleico y por ende no infecciosas, pero sí inmunogénicas)**. Estas partículas de 22 nm eran luego inactivadas con formol para evitar el riesgo que implicaría la parcial eliminación de las partículas de Dane o la eventual presencia de otros agentes adventicios, tales como retrovirus (HIV, HTLV, etc.), virus hepatitis D y parvovirus. Esta vacuna de 1ª generación ya no se utiliza debido a que se han desarrollado vacunas eficaces y más seguras para este

virus, como son las vacunas de 2da. y 3ra. generación obtenidas mediante ingeniería genética.

2.8 EL USO DE ADYUVANTES PARA AUMENTAR LA INMUNOGENICIDAD

El término adyuvante proviene del latín *adjuvare*, que significa ayudar. El propósito del uso de los adyuvantes es incrementar la respuesta inmune dirigida contra antígenos de las cepas vacunales (Figura 48.2).

La cepa vacunal seleccionada deberá ser lo suficientemente inmunogénica porque si no lo es no será útil como vacuna. Deberá, además, contener todos los epítopes requeridos para la inducción de anticuerpos neutralizantes para todos los serotipos virales contra los que se quiera proteger.

Las vacunas a virus *vivo* y atenuado son en general más inmunogénicas que aquellas a virus inactivado, debido a que en las primeras el virus replica en el organismo y produce una infección subclínica, como consecuencia de la cual se desarrollan mecanismos de inmunidad no sólo humoral sino también a nivel de mucosas e intensa inmunidad mediada por células. También se ha demostrado que la administración de vacunas, en especial a virus *vivo* y atenuado por vía oral o inhalatoria estimula el tejido linforeticular asociado al intestino (GALT-*gut associated lymphoreticular tissue*-) y al tejido pulmonar, induciendo la migración de linfocitos precursores de los productores de IgA a lugares distantes del sitio de la inmunización tales como las glándulas asociadas a la secreción de leche, saliva, lágrimas, etc.

Las vacunas a virus inactivado actúan sólo como antígeno, es decir, el virus no replica dado que está inactivado. En general, son menos inmunogénicas, por lo que requieren ser administradas en **múltiples dosis** y con el añadido de **adyuvantes** para aumentar la inmunogenicidad de la vacuna.

Los adyuvantes clásicos son el **hidróxido de aluminio** –que se emplea para vacunas de uso humano–, y aceites minerales y la saponina –para vacunas de uso veterinario–. El único adyuvante permitido para uso humano en la mayoría de los países es el hidróxido de aluminio. Sin embargo, éste **promueve una respuesta Tfh** (T follicular helper), **con una disminuida respuesta Th1** (por ejemplo, reducido número de linfocitos T citotóxicos) y está limitado al uso de vacunas administradas por vía parenteral. Este adyuvante tiene **tres acciones**: 1) formación de un **depósito tisular de antígenos**, para promover una exposición prolongada a los mismos; 2) producción de partículas **antigénicas** para favorecer la interacción con las células presentadoras de antígenos; y 3) activación del complemento y estimulación de **macrófagos** para inducir la retención y **activación de linfocitos** en los ganglios linfáticos. Debido a algunos de las desventajas observadas por el uso del hidróxido de aluminio como adyuvante, tales como la induración / inflamación local, la ausencia de biodegradabilidad, el efecto "depósito local" y la débil respuesta Th1, se ha comenzado con el desarrollo y evaluación de otros adyuvantes, ya que si bien existían otros conocidos de gran poder como el adyuvante completo o el incompleto de Freund (que contienen micobacterias) no están permitidos para ser incluidos en vacunas de uso humano o animal.

El desarrollo de nuevos adyuvantes para aumentar el poder inmunogénico de las vacunas ha despertado un notable interés en las últimas décadas. Se han estudiado otras sustancias con poder adyuvante como los péptidos murámicos (muramil-dipéptido o MDP), liposomas, moléculas transportadoras naturales o sintéticas (ISCOMS [*immune stimulating complexes*] o –también denominadas– micelas lipídicas), bacterias como *Bordetella pertussis*, etc.

Los péptidos murámicos son copias sintéticas de estructuras repetitivas del peptidoglicano de las bacterias. El MDP o sus derivados unidos a diversos antígenos, aumentan las propiedades biológicas de éstos, aun cuando son administrados por vía oral. Actuarían aumentando la acción macrofágica. Hasta ahora, se han empleado a nivel experimental (en animales) para aumentar la respuesta inmune a diversos antígenos.

Un desarrollo reciente ha mostrado la utilidad del uso de **virosomas** como adecuados transportadores de antígenos y como



adyuvantes, con el objeto de incrementar la respuesta inmune inducida. Estas estructuras virosómicas corresponden a la inclusión de glicoproteínas del virus influenza (hemaglutinina y neuraminidasa) en un contexto fosfolipídico de liposomas (70% de lecitina, 20% de cefalina [un estimulador de células B sin necesidad de la cooperación T y una molécula a la cual se unen partículas de hepatitis A]) y de lípidos de la envoltura del virus influenza [10%]). De allí la denominación de inmunopotenciador reconstituido de virosomas de influenza (en inglés, IRIV [*immunopotentiating reconstituted influenza virosomes*]). **Los virosomas son partículas virus-símil** (en inglés, *virus-like particles* o VLPs) obtenidas por solubilización con detergente y posterior procedimiento de remoción, que carecen de material genético por lo que no son infectantes *per se*. Como se referirá hacia el final de este capítulo, las VLPs pueden obtenerse también habitualmente mediante técnicas de ingeniería genética en las que sistemas de expresión tales como los virus vaccinia o baculovirus recombinantes pueden lograr que células eucarióticas produzcan las proteínas vacunales de interés al portar el gen correspondiente (de un virus foráneo) en su genoma.

La adición de virosomas a una formulación vacunal promueve la *encapsulación* del virus inactivado en cuestión, formando una estructura esférica de unos 150 nm. Dicha *cápsula* expresa en su superficie la neuraminidasa y la hemaglutinina del virus influenza, por medio de la cual se promueve la internalización del virosoma a células presentadoras de antígenos en un proceso de endocitosis mediado por receptores. Además, pueden estar unidos a dicha superficie virosomal otros antígenos como los que son de interés para generar la respuesta inmune. Luego de un cambio conformacional (pH-dependiente) de la hemaglutinina, se fusionan la membrana del virosoma con la del endosoma, liberándose el contenido vacunal encapsulado (por ejemplo, un virus inactivado) en su interior. Los antígenos unidos a la superficie del virosoma son liberados en el endosoma y presentados por moléculas del CMH-II. La liberación al citosol de las proteínas *encapsuladas* por el virosoma promueve la presentación al sistema inmune a través de moléculas del CMH-I, lo cual genera la subsiguiente participación de linfocitos T citotóxicos. En síntesis, los virosomas son capaces de promover una respuesta mediada por linfocitos B y T, combinando en una única partícula la presencia del antígeno y el adyuvante. Un ejemplo de este tipo de vacuna lo constituye una de las comercializadas para la profilaxis de la hepatitis A. Esta es una vacuna a virus inactivado (cepa RG-SB) propagada en células diploides, e inactivada con formalina, que está acoplada en forma no covalente a la superficie de virosomas, mediante enlaces electrostáticos con residuos de fosfatidiletanolamina presentes en el virosoma. Esta vacuna induce un 100% de protección al cabo de 10 días de una única dosis vacunal, lo cual está asociado al desarrollo de anticuerpos neutralizantes que perduran por muchos años.

Más recientemente aún, **se han incorporado a las estructuras virosomales ligandos lipopeptídicos para receptores específicos como TLR-2**, lo cual permite la activación tanto de linfocitos B como de células dendríticas. A diferencia de otros adyuvantes como el hidróxido de aluminio, los virosomas permiten la simultánea activación y presentación antigénica de una misma célula correspondiente a dichas estirpes celulares.

También con el propósito de aumentar la respuesta inmune se han estudiado **en ensayos clínicos controlados** el uso de **inmunomoduladores** (ya sea como tales, o bien en casetes de DNA codificante para ellos) por ejemplo, interferones, interleuquina 12 o timopoyetina, así como el empleo de **oligodesoxinucleótidos (ODN) con islas CpG** (véase en este capítulo el Ítem 7, Perspectivas para el futuro). También, recientemente se ha propuesto la utilización de **copolímeros** que además de las tres acciones mencionadas para el hidróxido de aluminio, poseen propiedades de adhesión especial de moléculas y pueden también determinar el isotipo (IgG 1 o IgG 2) y la especificidad de los anticuerpos formados ante la administración de un inmunógeno. Estos copolímeros están constituidos por bloques no iónicos hidrofílicos de polietileno (POE) e hidrofóbicos de polipropileno (POP). Los poloxámeros están formados por cadenas de POE y POP.

3. BENEFICIOS VERSUS RIESGOS EN LA VACUNACIÓN

Si bien los significativos avances logrados en los últimos años han permitido obtener vacunas con riesgos mínimos o nulos, no sucedía lo mismo con las primeras vacunas.

Siempre debe tenerse en cuenta el beneficio (inducción de protección, disminución del costo de atención de los casos clínicos y de las secuelas de la enfermedad, etc.) en relación al riesgo de la vacunación.

El ejemplo clásico es la vacunación anti-variólica (este tema se trata en el Capítulo 28, *Poxvirus*). La viruela fue desde la antigüedad un gravísimo problema sanitario, debido a su transmisión respiratoria, a la elevada mortalidad y secuelas deformantes que producía. La vacunación antivariólica fue iniciada por Jenner en el siglo XVIII, pero —como se refirió anteriormente— recién en 1980 pudo declararse al planeta Tierra libre de esta enfermedad. Esto se logró mediante un esfuerzo combinado de todos los países, coordinado por la OMS para la aplicación de la vacuna anti-variólica a nivel mundial.

A partir de la erradicación de la enfermedad, la OMS aconsejó suspender la vacunación (antes obligatoria en países que tenían viruela o en los viajeros hacia países donde era endémica la enfermedad), ya que los riesgos asociados a la vacuna eran mayores que el beneficio (prevención de la enfermedad) dado que ya no existían casos humanos ni reservorios animales que mantuvieran el virus en la naturaleza.

Los riesgos calculados de la vacunación anti-variólica son: vacuna diseminada (250 / 1 000 000 de vacunados) miocarditis (70 / 1 000 000), eczema vacunal (30 / 1 000 000), encefalitis post-vacunal (4 / 1 000 000), y muerte (5 / 1 000 000).

Sorprendentemente, en el siglo XXI el riesgo teórico de adquirir la viruela ha resurgido como consecuencia del probable empleo del virus viruela como un arma biológica por agentes del bioterrorismo. La diseminación intencional del virus viruela encontraría a la población mundial sin protección, ya que la vacunación ha sido suspendida, y la enfermedad se diseminaría fácilmente dada su transmisión respiratoria y su elevada resistencia el medio externo (Capítulo 28, *Poxvirus*).

Otro ejemplo del análisis del riesgo versus beneficio lo constituye las vacunas anti-poliomielitis a virus *vivo* y atenuado tipo *Sabin*. Esta vacuna posee enormes ventajas como la facilidad de su administración por vía oral, la inducción de inmunidad humoral y secretoria de larga duración y la inmunización de contactos, pero posee el inconveniente de la reversión a la virulencia. Datos de la OMS obtenidos en diferentes países sobre casos de polio parálisis post-vacunación han demostrado la importancia de este problema. Si bien la reversión a la virulencia se observa en escaso número de vacunados (1 caso de polio parálisis en vacunados cada 3 000 000 de dosis aplicadas) y de contactos (1 caso cada 5 000 000 de dosis) representa un inconveniente que debe ser cuidadosamente evaluado en el momento de elegir una vacuna de aplicación masiva. Es de destacar que en países desarrollados el virus polio salvaje ha sido erradicado y los escasos casos de polio parálisis que se observan son debidos a la cepa vacunal. En Argentina no se registra la circulación del virus polio salvaje desde hace años, aunque se detecta un número bajo de casos de polio asociados a la administración de la cepa vacunal.

Estos hallazgos han estimulado el desarrollo de nuevas vacunas anti-poliomielitis inactivadas (tipo *Salk*) y concentradas para aumentar enormemente su potencia. En algunos países se emplea esta nueva vacuna anti-polio inactivada asociada a la vacuna triple bacteriana (anti-tetánica / anti-diférica / anti-coqueluche).

4. VACUNAS A VIRUS INACTIVADO

4.1 A VIRUS COMPLETO

Las vacunas a virus inactivado consisten en suspensiones de virus, propagados en diversos sustratos (inicialmente, en cerebro de ratones; actualmente, en huevos embrionados y cultivos celulares) e inactivados cuidadosamente mediante procedimientos controla-

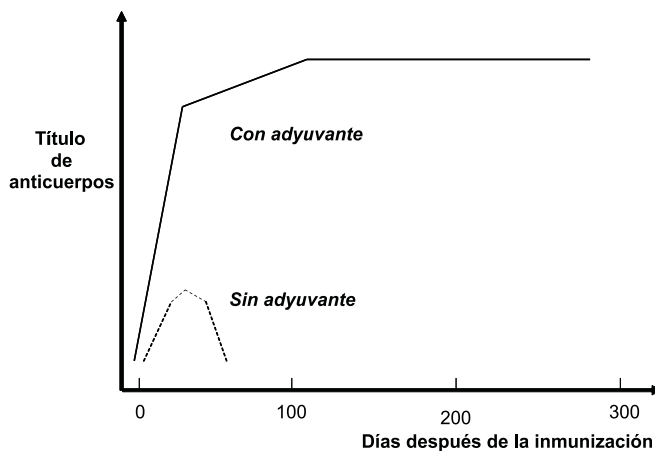


Figura 48.2. Efecto de la administración de adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos formados en ratón ante la inyección de albúmina de huevo. Los ratones fueron inoculados con 2 mg de albúmina suspendidos en solución salina (línea punteada) o con adyuvante incompleto de Freund (línea continua). Se indican los títulos de anticuerpos a través del tiempo en ambos grupos.

dos. La inactivación puede realizarse con formalina y calor, beta-propiolactona o luz ultravioleta.

Dado que el virus contenido en la vacuna está inactivado, es incapaz de replicar en el hospedador. Estas vacunas al ser introducidas al organismo por vía parenteral, actúan como antígeno produciendo una respuesta inmunológica humoral (Tabla 48.4). Como respuesta a la primera dosis (respuesta primaria) habrá inicialmente producción de IgM y posteriormente de IgG; como respuesta a las dosis siguientes (respuesta secundaria) habrá principalmente producción de IgG (Figura 48.3A y 48.4).

Para que una vacuna sea efectiva debe inducir la formación de anticuerpos neutralizantes (con adecuada maduración de su afinidad) que protejan contra la infección. En general, se requieren varias dosis para lograr una inmunidad duradera (vacuna *Salk*) y ésta es siempre de menor duración que en el caso de una infección natural.

Ventajas

Las vacunas a virus inactivado **no ofrecen riesgos**, siempre que se controle adecuadamente su nivel de inactivación y que el sustrato en el que replicó el virus no sea capaz de inducir mecanismos inmunológicos de lesión en el hospedador. Dado que no producen viremia se pueden administrar sin riesgo alguno a la mujer embarazada o a pacientes inmunosuprimidos.

Desventajas

Dado que el virus vacunal no replicará, se requiere inocular una **gran cantidad de antígeno** para desencadenar una respuesta eficaz. La producción de elevada cantidad de estos antígenos tiene un alto costo. Otra desventaja es que se requieren múltiples dosis a administrar para producir la respuesta deseada.

Los riesgos asociados a las primeras vacunas anti-rábicas (tipo Pasteur o tipo Semple) se debían fundamentalmente a la mielina que contenían, proveniente del tejido nervioso en los que se replicaba el virus. La mielina actuaba como antígeno induciendo gravísimas reacciones de hipersensibilidad que conducían a la desmielinización y al daño neurológico irreversible. Estos inconvenientes fueron superados paulatinamente con el uso de cerebro de ratones lactantes (en vez de adultos) para replicar el virus rábico y con la centrifugación a alta velocidad para eliminar la mielina remanente. Esta vacuna se inactivaba con luz ultravioleta. Estos avances fueron logrados por dos investigadores chilenos (Fuenzalida y Palacios) y esta vacuna, denominada Fuenzalida-Palacios en honor a esos investigadores fue empleada con éxito durante muchos años en nuestro país siendo preparada en el Instituto Nacional de Microbiología Carlos G. Malbrán (Buenos Aires), actualmente ANLIS C. G. Malbrán.

En la actualidad, ya no se emplean animales como sustrato para vacunas de uso humano, con la excepción de huevos embrionados para algunas vacunas anti-influenza. La mayoría de las vacunas se preparan en cultivos celulares, (líneas celulares diploides o cultivos primarios), cuidadosamente controlados para la exclusión de otros virus endógenos contaminantes. Las vacunas preparadas en huevos están contraindicadas en los individuos alérgicos a las proteínas del huevo. Además, dado que contienen pequeñas cantidades de antibióticos (polimixina B, neomicina y estreptomycin) están contraindicadas en los individuos alérgicos a los mismos.

Vacunas inactivadas de uso actual

Al presente, las vacunas inactivadas a virus completo en uso son: 1) la vacuna anti-poliomielítica tipo *Salk* (mono o polivalente) inactivada con formalina, de la cual existen dos formas, la clásica y la concentrada que puede incluirse en una única preparación vacunal junto a la vacuna triple bacteriana; 2) la vacuna anti-hepatitis A; 3) vacunas anti-rábicas preparadas en células diploides; 4) vacunas para encefalitis equinas inactivadas con formalina (de uso veterinario); y 5) vacunas anti-influenza a virus fraccionados o con antígenos purificados (que reemplazaron a otra previamente utilizada que empleaba virus completo inactivado).

Las ventajas e inconvenientes de las vacunas inactivadas versus las vacunas a virus *vivo* y atenuado se mencionan en la Tabla 48.5 y un listado de las inactivadas en uso en la Tabla 48.3.

4.2 VACUNAS INACTIVADAS CON FRACCIÓN ANTIGÉNICA, A SUBUNIDADES Y VLPs

Dado que la respuesta inmune a un virus es habitualmente dirigida principalmente contra una proteína crítica de superficie, esta proteína puede ser usada como vacuna si es adecuadamente presentada al sistema inmune.

Las vacunas a subunidades pueden prepararse mediante múltiples métodos: a) purificación de la/las proteínas de superficie importantes a partir de la partícula viral; b) por técnicas de DNA recombinante, clonado y expresión de la proteína viral deseada en una célula hospedadora adecuada como, por ejemplo, una levadura o una bacteria no patógena.

Vacunas a subunidades

Un ejemplo son las vacunas actuales para influenza, que contienen las glicoproteínas de envoltura –hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA)– purificadas de las cepas de influenza A y B. Estas vacunas deben ser actualizadas cada año con las cepas prevalentes en circulación en el hemisferio norte o en el hemisferio sur, debido a los cambios an-

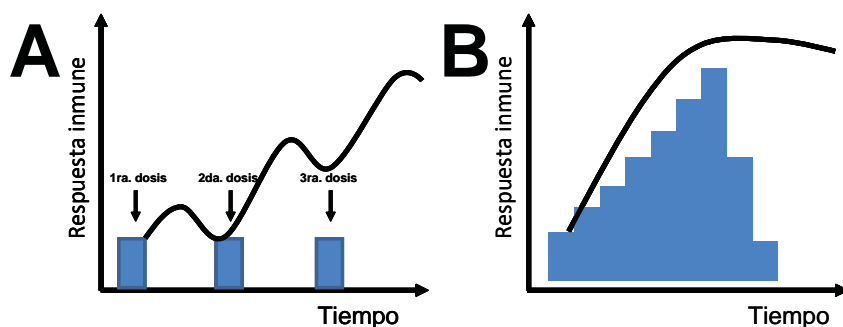


Figura 48.3. Estimulación antigénica y respuesta inmune inducida por una vacuna inactivada (A) y por una atenuada (B). La vacuna inactivada (por ejemplo, la anti-poliomielítica Salk) se comporta como un antígeno inerte, mientras que la vacuna atenuada (por ejemplo, la anti-amarílica) se asocia a un incremento de la dosis de antígeno administrado, ya que replica en el organismo infectándolo.

Propiedad	A virus inactivado o a subunidades	A virus vivo y atenuado
Inducción de anticuerpos	++++	++++
Linfocitos T citotóxicos CD8 ⁺	- (<i>habitualmente</i>)	++++
Linfocitos T ayudadores CD4 ⁺	++++	++++
Respuesta contra todos los antígenos virales	Raramente	Habitualmente
Duración de la inmunidad	Meses o años	Décadas o años
Riesgo de enfermedad	-	+

Tabla 48.4. Características de la respuesta inmune inducida por vacunas a virus inactivado y a virus vivo y atenuado.

tigénicos mayores (*shift*) y menores (*drift*) que suelen experimentar los virus influenza.

Otra forma de obtener estos antígenos es por ruptura de la envoltura viral (vacuna a virus fraccionados o *split*).

Las vacunas para influenza son trivalentes y en ellas se incluyen dos subtipos de influenza A (H1N1 y H3N2) y una cepa de influenza B, todas seleccionadas entre las prevalentes en circulación de acuerdo a los datos obtenidos por medio de la vigilancia epidemiológica de estos virus a nivel mundial (Capítulo 14, *Orthomyxovirus* y Capítulo 59.1, Vacuna para influenza A H1N1 pandémica).

Otro ejemplo (histórico) es la vacuna para hepatitis B de 1^a generación, que se obtenía a partir de plasma de portadores crónicos de hepatitis B mediante centrifugación para separar las partículas de 22 nm de las partículas infecciosas (partículas de Dane). Esta preparación, inactivada con formalina y calor, constituyó la primera vacuna para hepatitis B pero está en desuso desde hace varios años.

Otro ejemplo es la vacuna para hepatitis B de uso actual que contiene el antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBs Ag), obtenido por expresión de un gen viral clonado en levaduras.

VLPs (Virus-Like Particles)

En los últimos años se han desarrollado vacunas profilácticas para prevenir la infección con papilomavirus humanos, en especial las asociadas a los tipos 16 y 18 que presentan mayor riesgo de oncogenicidad. El sistema empleado fue preparar **partículas semejantes a virus o VLPs**. Lo que se realizó por la aplicación de técnicas de ingeniería genética que permitieron el clonado del gen que codifica la proteína principal de la cápside (L1) en un vector plasmídico de expresión, el cual introducido en un sistema eucariótico adecuado (por ejemplo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) produce la proteína deseada, que se secreta. Cuando

la concentración de dicha proteína en el medio de cultivo es alta esas moléculas se auto-ensamblan produciendo cápsides vacías (VLPs) con una morfología similar a la del virus original pero carentes de genoma y por ende no infectantes. Por ello, a las VLPs también se las denomina "pseudo-viriones". Otras formas de obtener VLPs además del uso de sistemas de expresión de proteínas virales de interés como inmunógenos (tales como los utilizados por los virus vaccinia o baculovirus recombinantes al infectar células de primates o de insectos, respectivamente) consiste en la solubilización de envolturas virales como las de influenza, luego sometidas a un procedimiento de remoción y purificación, lo que origina VLPs denominados virosomas (véase en este capítulo el ítem *Adyuvantes*).

Una ventaja de las VLPs es que los epítopes estructurales del virus necesarios para la inducción de anticuerpos neutralizantes presentan la conformación natural. Estas vacunas han sido aprobadas por la FDA (EE. UU.) y en el 2007 se están aplicando, aunque su costo es muy elevado en formulaciones vacunales cuadrivalentes (anti-HPV 6, 11, 16 y 18; Capítulo 29, Papilomavirus). Otra vacuna bivalente a VLPs (anti-HPV 16 y 18 producida en células de insecto infectadas con baculovirus recombinante) ha sido también evaluada en ensayos de fase III con resultados semejantes a los de la cuadrivalente antes mencionada, por lo que se comercializa desde 2007. Además del adyuvante hidróxido de aluminio presente en la vacuna cuadrivalente, la bivalente contiene monofosforil lípido A (un derivado de endotoxina bacteriana).

Se encuentran en ensayo clínico, múltiples estrategias para lograr una respuesta protectora ante la administración de una vacuna a VLPs contra el HIV/SIDA, combinadas con otras formulaciones inmunogénicas.

Las VLPs interactúan con las células dendríticas promoviendo una respuesta antiviral mediada por interferón- α e interferón- γ y por IL-10.

4.3 ETAPAS EN LA PREPARACIÓN DE UNA VACUNA A VIRUS INACTIVADO

El proceso de la preparación de una vacuna es lento, complejo y de alto costo. Aquí resumiremos las etapas a seguir. Todos estos pasos están sujetos a rigurosos controles y reglamentaciones internacionales.

- 1) Aislar el o los serotipos virales causantes de enfermedad.
- 2) Obtener altos títulos de virus mediante replicación en sustratos aptos para vacunas de uso humano (líneas celulares especiales ó huevos embrionados libres de patógenos).
- 3) Separar el virus de las células en las que replicó y concentrar la preparación viral.
- 4) Inactivar el virus con dosis controladas de inactivantes: formol, luz ultravioleta, beta-propiolactona, etc.
- 5) Asegurar que la inactivación sea completa por determinación del título viral inicial (previo a la inactivación) y secuencialmente durante el proceso.
- 6) Inocular animales de experimentación con la vacuna inactivada para observar ausencia total de enfermedad e inducción de anticuerpos neutralizantes en títulos adecuados.
- 7) Determinar la resistencia de los animales inmunizados al desafío con cepas patógenas del virus en cuestión. Inicialmente se pueden usar diversos animales pero en las etapas finales deben emplearse primates.
- 8) Si los animales sobreviven se habrá determinado la inocuidad de la vacuna.
- 9) Determinar la mínima cantidad de proteína viral necesaria para inducir protección en animales y el número de dosis necesario para lograr la protección adecuada.
- 9) Una vez obtenido el lote semilla, determinar cuidadosamente la ausencia de contaminantes (bacterianos, micóticos, micoplasmas, virus endógenos, etc.). Luego se diluirá la vacuna para obtener la cantidad de antígeno necesaria para cada dosis.
- 10) Finalmente, la vacuna es liofilizada y conservada refrigerada.
- 11) Una vez determinada su inocuidad y antigenicidad en voluntarios y luego de aprobar los estudios de fase I, II y III y de ser aprobada por organismos internacionales, se podrá aplicarla en las poblaciones susceptibles.

5. VACUNAS A VIRUS VIVO Y ATENUADO

Las formas de obtención de cepas vivas atenuadas para su uso como vacunas es aún más compleja que la de aquellas a virus inactivado. Las vacunas a virus *vivo* y atenuado presentan una **disminución ostensible en su patogenicidad para el hombre pero conservan**

su inmunogenicidad. Su inoculación produce una infección ya que la cepa vacunal replica en el organismo, aunque habitualmente no produce manifestaciones clínicas o, si existen, son leves (fiebre, exantema, etc.).

VENTAJAS

La replicación viral **genera una intensa respuesta inmune humoral y celular**, y por lo tanto protección, **similar a la producida por la infección natural. La inmunidad desencadenada por las vacunas a virus *vivo* y atenuado es habitualmente de mayor intensidad y duración que la producida por las vacunas inactivadas.** Las ventajas e inconvenientes de unas y otras se observan en las Tablas 48.4 y 48.5.

En el caso de la vacuna anti-poliomielítica tipo Sabin otra ventaja es la administración oral, lo que facilita la vacunación masiva y disminuye el costo. La producción de IgA secretoria que resulta de la infección de la mucosa intestinal con virus vacunal promueve en el inmunizado la interrupción de la cadena epidemiológica de transmisión del virus polio salvaje (Figura 48.3.B y 48.4).

DESVENTAJAS

Es necesario tener presente que las vacunas a virus *vivo* y atenuado están contraindicadas en la mujer embarazada, ya que pueden producir viremia y pasar al feto. Algunas de ellas también están contraindicadas en los inmunosuprimidos (por ejemplo, anti-polio oral).

Un factor de gran importancia es la conservación de las vacunas. Una vez liofilizadas, las vacunas a virus *vivo* y atenuado pueden conservarse durante meses a bajas temperaturas pero, una vez reconstituidas, pierden actividad rápidamente a temperatura ambiente, y aun a 4° C, debiendo usarse dentro del día de su reconstitución. Por estas razones, la conservación de una adecuada **cadena de frío** es de fundamental importancia en las campañas de vacunación, especialmente en países con altas temperaturas ambientales. Muchas fallas en las campañas de vacunación se deben a alteración de dicha **cadena de frío**. En la actualidad, las heladeras donde se conservan las vacunas deben tener un control constante de temperatura a fin de monitorear su adecuado funcionamiento.

Uno de los mayores riesgos de las vacunas a virus *vivo* y atenuado es la reversión a la virulencia. Este aspecto ha sido exhaustivamente estudiado en relación con casos de poliomyelitis paralítica como consecuencia de la inmunización con la vacuna *Sabin*, en especial con el serotipo 3 de esta vacuna (véase "Beneficios versus riesgos").



Vacuna	A virus vivo y atenuado	A virus inactivado
Ejemplo	<i>Anti-poliomyelitis, tipo Sabin</i>	<i>Anti-poliomyelitis, tipo Salk</i>
Ventajas	Fácil administración (vía oral) Símil infección natural Produce infección inaparente Persistencia de la inmunidad Intensa respuesta humoral Respuesta inmune en mucosa intestinal (IgA) Infección de contactos	Actúa sólo como antígeno; no replica Segura Intensa respuesta humoral Facilidad en su conservación Puede aplicarse a inmunosuprimidos
Inconvenientes	Riesgo de reversión a la virulencia Interferencia con otros virus Infección de contactos Alto costo para determinar nivel de atenuación Inactivación a altas temperaturas ambientales Necesidad de cadena de frío	Necesidad de varias dosis No provee inmunidad en mucosas* Alto costo por la inoculación parenteral de múltiples dosis; costo de jeringas, agujas, personal

Tabla 48.5. Ventajas e inconvenientes de las vacunas a virus *vivo* y atenuado versus las vacunas inactivadas.

* La vacuna Salk sólo induce la formación de IgA específica en la mucosa, si se administra luego de una dosis inicial con vacuna Sabin.

5.1 ETAPAS EN LA OBTENCIÓN DE VACUNAS A VIRUS VIVO Y ATENUADO

La obtención de una cepa atenuada y los estudios que deben realizarse para determinar su grado de atenuación y su inmunogenicidad son sumamente largos y complejos. Habitualmente insumen muchos años de trabajo ininterrumpido y de muy alto costo. Los pasos son:

- 1) Búsqueda de mutantes atenuadas a partir de la naturaleza o en el laboratorio.
- 2) Determinación de su nivel de atenuación mediante la observación de las características de la infección en animales de experimentación en contraposición a la infección producida por cepas salvajes.
- 3) Amplificación de la mutante en cultivos aptos para el desarrollo de vacunas de uso humano.
- 4) Control riguroso del nivel de atenuación y de la ausencia de inducción de neurovirulencia o de mecanismos inmunopatológicos de lesión en diversos animales, incluyendo primates.
- 5) Determinación de su antigenicidad e inducción de anticuerpos neutralizantes y/o inmunidad celular.
- 6) Determinación de su capacidad de inducir protección en animales frente al desafío con cepas patógenas.
- 7) Una vez obtenida la cepa eficaz e inocua se prepararán los lotes semilla en condiciones estrictas y se titularán para determinar la cantidad a ser incorporada en la vacuna (por métodos de plaqueo, DICT₅₀, etc.).
- 8) Se determinará la ausencia de otros contaminantes (otros virus, bacterias, hongos).
- 9) La vacuna será liofilizada y conservada a 4° C.
- 10) Una vez reconstituida será inoculada a voluntarios.
- 11) Se determinará el nivel y duración de los anticuerpos neutralizantes, la ausencia de efectos adversos y la cantidad de dosis necesarias, así como el título viral en las mismas para inducir anticuerpos de larga duración y la mejor vía de inoculación.
- 12) Finalmente, luego de los ensayos de fase I, II y III y de la obtención de la aprobación por organismos internacionales se podrá emplear en la inmunización de poblaciones susceptibles.

Las principales vacunas a virus *vivo* y atenuado en uso en la actualidad son las siguientes: anti-poliomielítica tipo Sabin (incluye los 3 serotipos de poliovirus), anti-arampionosa, anti-rubeólica y anti-parotídica. Estas tres últimas se pueden administrar simultáneamente en forma de una vacuna denominada *triple viral* o MMR (del inglés: *measles, mumps, rubella*). Estas vacunas integran el calendario oficial de vacunación en Argentina.

Otras vacunas a virus *vivo* y atenuado, de uso más reciente son las que corresponden a la prevención de la varicela y de diarreas por rotavirus.

Existen otras vacunas a virus *vivo* y atenuado que están restringidas a pobladores de áreas endémicas o a viajeros a las mismas, o a personal de laboratorio como la vacuna para fiebre amarilla (cepa 17D o cepa Dakar), vacunas para encefalitis equinas, para fiebre hemorrágica argentina (cepa Candid-1), etc. En EE. UU. se emplea una vacuna a virus *vivo* y atenuado contra influenza por vía intranasal que no está disponible en Argentina.

6. VACUNAS DE USO ACTUAL EN ADULTOS Y NIÑOS: CALENDARIO OFICIAL DE VACUNACIÓN EN ARGENTINA

Los esquemas e indicaciones de las vacunas virales de uso actual en adultos y niños se observan en la Tabla 48.6 y el Calendario oficial de Vacunación para Argentina, que es obligatorio y gratuito, se observa en la Tabla 48.7.

VACUNAS OBLIGATORIAS PARA NIÑOS, SEGÚN EL CALENDARIO OFICIAL DE VACUNACIÓN EN ARGENTINA Y OTRAS VACUNAS NO OBLIGATORIAS

Las vacunas virales obligatorias son las siguientes: anti-poliomielitis (Sabin) vía oral; triple viral que incluye sarampión, paperas y rubéola, vía intramuscular. Estas vacunas son a virus *vivo* y atenuado. También son obligatorias las vacunas anti-hepatitis A y anti-hepatitis B (a virus inactivado o fracción antigénica, respectivamente; se aplican por vía intramuscular); la vacuna inactivada para influenza (trivalente que incluye la cepa pandémica) se aplica por vía intramuscular y está indicada para niños de 6 a 24 meses –independientemente de los factores de riesgo– y para niños mayores de 2 años con factores de riesgo (Capítulo 59.1). Desde 2011 se incorporó al calendario oficial una vacuna para HPV. Ver dosis e indicaciones en la Tabla 48.7 (Calendario Oficial de Vacunación en Argentina).

Existen otras vacunas no obligatorias para niños, pero que se emplean en la actualidad. Éstas son:

1. La vacuna anti-varicela-zóster (a virus *vivo* y atenuado). Se aplica 1 dosis SC en niños de 12 meses a 12 años. En mayores de 13 años susceptibles se aplican 2 dosis con intervalo de 6 semanas. Puede emplearse en niños con leucemia, previa suspensión del tratamiento anti-neoplásico. Está contraindicada en el embarazo por ser a virus *vivo*, en alérgicos a neomicina y en pacientes con linfopenia.

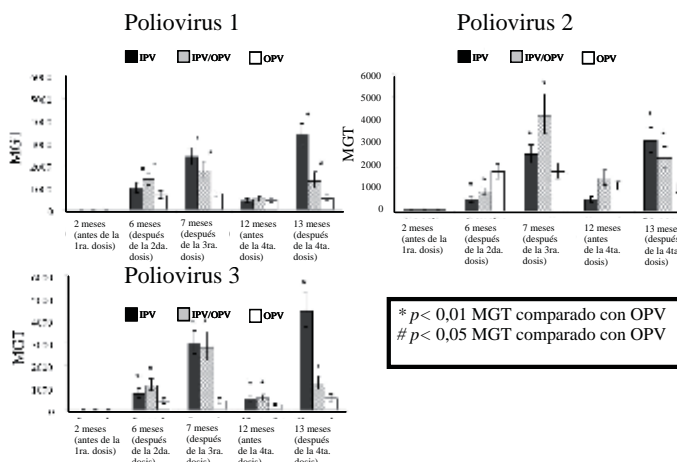


Figura 48.4. Comparación de la respuesta inmune humoral a las vacunas anti-poliomielíticas. Media geométrica del título de anticuerpos (MGT) según el serotipo, la dosis y el esquema de virus polio administrado. IPV: vacuna inactivada anti-poliomielítica. OPV: vacuna oral anti-poliomielítica. Las tasas de seropositividad a los 2 meses después de la 2da. dosis con IPV fueron de 98 – 100% para los 3 tipos, mientras que los vacunados con OPV alcanzaron el 97,1%, el 99,3% y el 92,1 % de seropositividad para los tipos 1, 2 y 3, respectivamente, siendo estadísticamente significativa la diferencia en la respuesta humoral para este último serotipo entre ambos esquemas de inmunización ($p < 0,001$). Un mes después de la 3ra. dosis, el 100% de los vacunados con IPV exhibía anticuerpos contra los 3 tipos, mientras que un 99%, 100% y 97% de los vacunados con OPV habían desarrollado dicha respuesta para los tipos 1, 2 y 3, respectivamente. Los niños que recibieron IPV solamente, exhibían una MGT mayor que aquellos a quienes se administró OPV. Fuente: Asturias EJ *et al.* J Infect Dis 2007; 196: 692–8.

- Las nuevas vacunas anti-rotavirus, vía oral. Al presente se comercializan dos: una monovalente humana atenuada (con mayor distribución en Europa) y otra multivalente (obtenida por reasociación de fragmentos genómicos entre rotavirus humano y bovino –apatógena para el hombre–). De la primera se deben administrar dos dosis, mientras que para la segunda se recomienda la administración de tres dosis, a los 2, 4, y 6 meses de edad.

7. PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

A pesar de los progresos considerables en el desarrollo de vacunas todavía mueren millones de niños por año de enfermedades infecciosas de origen viral en los países en vías de desarrollo (diarrea por rotavirus, infecciones por virus sincicial respiratorio y otros virus respiratorios, sarampión, HIV/SIDA, etc.).

Aunque existen vacunas efectivas para prevenir muchas enfermedades virales, la eficacia en la prevención depende de la extensión de la cobertura a toda la población en riesgo de enfermar. Son numerosos los factores que limitan la eficacia de los programas de vacunación, en especial en los países en vías de desarrollo:

- Muchas vacunas requieren ser administradas en varias dosis por inyección, lo que tiene un alto costo (personal, material estéril, etc.). Además, un alto porcentaje de niños no es llevado al centro de vacunación para completar la inmunización y, por lo tanto, no queda protegido totalmente.
- Algunas vacunas, en especial las que contienen virus *vivo* y atenuado son muy inestables a altas temperaturas y la conservación de la cadena de frío, que es de fundamental importancia, puede ser deficiente en muchos países en vías de desarrollo.

Además, existen numerosas enfermedades para las cuales no existe aún vacuna disponible, aunque están en desarrollo las de los virus sincicial respiratorio, parainfluenza, metapneumovirus, HIV, hepatitis C, virus productores de diarreas (norovirus), dengue, etc.

La OMS ha planificado desde hace muchos años un programa de investigación para mejorar las vacunas existentes y para desarrollar otras nuevas, así como para identificar nuevas formas de administración de vacunas que permitan aplicar una sola dosis capaz de inducir protección duradera, en vez de múltiples dosis, o bien vacunas que puedan ser administradas por vía oral o por vía mucosa, posiblemente mediante vectores vivos.

Por ejemplo, existen virus o bacterias no patógenas para el hombre que pueden usarse como vectores en los cuales, por medio de ingeniería genética, se insertan aquellos genes (aislados de los virus contra los que se desea proteger) que codifican epítopes inductores de anticuerpos neutralizantes. Se están ensayando como vectores los virus *vaccinia*, *canarypox* virus, ciertos serotipos de adenovirus no patógenos y cepas no patógenas de *Salmonella*.

Otro aspecto importante a desarrollar son las sustancias que aumentan la inmunogenicidad, es decir los adyuvantes, los que se agregan a las vacunas a virus inactivado, ya sea completo o a subunidades. Un ejemplo muy promisorio lo constituye el potencial uso futuro de adyuvantes basados en oligodesoxinucleótidos con islas CpG.

7.1 EL POTENCIAL USO DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS (ODN) CON ISLAS CpG

Éste es un nuevo horizonte vislumbrado a partir de investigaciones relacionadas con los receptores Toll-símil (en inglés, *Toll-like receptor* o TLR). El conocimiento de que algunos miembros de esta familia de moléculas residen en la superficie de determinadas células de la respuesta innata (TLR-2, -4, -5 y -6) mientras otros se encuentran en el interior de ellas (TLR-3, -7, -8 y -9) y que cada uno de dichos receptores se une a ligandos específicos, permitió descubrir el nexo imprescindible para vincular la respuesta inmune del hospedador con patógenos extracelulares o intracelulares, respectivamente. Así, los **TLR extracelulares están asociados al desarrollo de una respuesta T_{fh} (T follicular helper), mientras que los segundos lo hacen con una respuesta Th1** (Véase Cap.

7, Mecanismos de defensa). En esta sección sólo se hará énfasis en la relación existente entre TLR-9 y las moléculas de DNA oligonucleotídicas ricas en islas CpG. La denominación **CpG** indica que el dinucleótido exhibe una base **C próxima a G unida por un grupo fosfato (p)**, para distinguirlas de la nomenclatura de aquellas bases CG apareadas por complementariedad.

Existen tres tipos de ODNs: A, B y C. El tipo A estimula intensamente la actividad de las células NK y la producción de interferón- α por las células dendríticas plasmocitoides, y débilmente a los linfocitos B. El tipo B estimula intensamente la activación de linfocitos B y más débilmente a las NK y a las células dendríticas plasmocitoides en la producción de interferón- α . El tipo C comparte características de ambos estimulando la producción de interferón- α y la estimulación de los linfocitos B. La mayoría de los estudios realizados con ODNs como adyuvante de vacunas se ha realizado con el tipo B.

El TLR-9 sólo es expresado en células en reposo del sistema inmune humano, tales como los linfocitos B y las células plasmocitoides dendríticas, habiéndose observado también en neutrófilos activados y epitelio pulmonar.

Al igual que lo que ocurre con el DNA de un virus o de una bacteria intracelular, una vez que el ODN con CpG ingresa al endosoma, los TLR-9 migran desde el R.E. hasta allí e interactúan con motivos hexaméricos (en el humano es **GTCTGTT** [subrayado el motivo CpG]). Como resultado de ello, se reclutan un grupo de moléculas adaptadoras (MyD88, IRAQ-1, TRAF-6), lo cual conduce a la activación de MAP quinasas, y al complejo I κ B, cuyas vías de señalización convergen en el núcleo alterando la transcripción génica. Del fino balance entre estas vías se producirá o bien la síntesis de IL-10 (que limita la secreción de IL-12 y la respuesta Th1) o bien la secreción de interferón- α por las células dendríticas plasmocitoides. Esto último es estrictamente dependiente del factor regulatorio del interferón 7 (IRF-7) y de la interacción de dicho factor transcripcional con las moléculas adaptadoras arriba mencionadas. Si bien en general la respuesta inducida por TLR-9 es Th1, debe remarcar la actividad regulatoria ejercida por la IL-10 sintetizada por los linfocitos B.

La actividad estimuladora de los ODNs conteniendo islas CpG sobre la respuesta Th1 se sustenta en las siguientes actividades: a) sinergismo en la estimulación de linfocitos B mediado por la interacción del motivo CpG con TLR-9 y del ligando con el receptor de linfocitos B; b) inhibición de la apoptosis de los linfocitos B; c) aumento del cambio isotópico IgM \rightarrow IgG; y d) secreción de citoquinas y quimioquinas que promueven el perfil Th1. Estas actividades han promovido la postulación del uso de ODN con islas CpG como adyuvantes para vacunas profilácticas y terapéuticas. Sin embargo, es menester enfatizar, que en contraste con la importante estimulación para la formación de anticuerpos documentada *in vivo* en el mono rhesus, la inducción de la respuesta Th1 observada en este primate es débil.

El desarrollo de vacunas para HIV es un desafío de trascendental importancia que permitiría poder controlar la pandemia de HIV/SIDA si se lograra una vacuna efectiva (Ver Capítulo 22.6).

En los últimos años se han acumulado evidencias experimentales que sugieren un promisorio futuro a tres nuevas aproximaciones en el desarrollo de vacunas: las vacunas a DNA, las vacunas recombinantes que emplean un virus no patógeno como vector, y las plantas transgénicas.

7.2 VACUNAS A DNA

La inmunización mediante ácido nucleico consiste en la inducción de una respuesta inmune hacia una proteína expresada *de novo* e *in vivo* a partir de un gen introducido en el organismo bajo la forma de DNA puro (habitualmente plasmídico), que no se replica en la célula hospedadora. En los modelos animales ensayados (desde ratones hasta primates) se comprobó una respuesta inmune -mediada por linfocitos T citotóxicos y anticuerpos neutralizantes- para proteínas de influenza A, rabia, HIV-1 y virus hepatitis B.

Las ventajas de estas vacunas son: 1) ausencia de agentes infecciosos en la preparación; 2) relativa mayor estabilidad que otras vacunas; 3) inducción de una respuesta inmune humoral (anticuerpos

Vacunas a virus vivo y atenuado			
Enfermedad a prevenir / nombre de vacuna / Esquema	Indicaciones	Contraindicaciones	Efectos colaterales
Sarampión / Anti-sarampión / Dos dosis, SC	Adultos susceptibles	Embarazo; alergia al huevo o a la neomicina; inmunosupresión	Fiebre (5-15%) eritema local (5%)
Paperas / Anti-parotiditis / Una dosis, SC	Adultos susceptibles	Embarazo; alergia al huevo o a la neomicina; inmunosupresión	Raramente reacción alérgica, parotiditis
Polio / Anti-poliomielítica (vacuna Sabín) Una dosis, VO	Adultos previamente inmunizados	Inmunosupresión; no utilizar para inmunización primaria en mayores de 18 años	Muy infrecuente: reversión a la virulencia
Rubéola / Anti-rubeólica Una dosis, SC	Mujeres en edad de concebir sin vacunación previa o con serología negativa	Embarazo; alergia a la neomicina; inmunosupresión	Dolor articular (hasta 40%) Artritis (<2%)
Enfermedad respiratoria aguda febril por adenovirus (4 y 7) / Anti-adenovirus* VO	Personal militar solamente***	No aprobada por la FDA para niños susceptibles	Escasos; transmisión del virus vacunal a contactos cercanos no vacunados
Viruela / Vaccina**(anti-variólica) Una dosis por escarificación Refuerzo: cada 10 años	Individuos con alto riesgo de exposición al virus de la viruela humana***	Embarazo; inmunosupresión; lesiones cutáneas	Muchos: encefalitis, eczema, vacuna generalizada (véase el capítulo 28)
Fiebre amarilla / Anti-amarillíca cepa 17D. Una dosis SC Refuerzo cada 10 años	Viajeros zonas endémicas, 10 días antes de viajar	Embarazo, excepto que exista alto riesgo debido al viaje; alergia al huevo; inmunosupresión	Cefalea leve, mialgia, fiebre (<2%)
Fiebre hemorrágica argentina** / Anti-Junín	Adultos en riesgo, residentes en zona endémica; laboratoristas	Embarazo; inmunosupresión	No observados
Vacunas a virus inactivados o a subcomponentes			
Hepatitis B / Anti-hepatitis B Primario: tres dosis de HBs Ag [10 µg / dosis] IM en el deltoides a los 0, 30 y 180 días. Refuerzo: a los 10 años o cuando el título de anticuerpos disminuye	Personal de salud, internados en instituciones cerradas, promiscuos, serología positiva para HIV; pacientes en diálisis; niños; residentes en áreas endémicas	El embarazo no es contraindicación si hay alto riesgo	Reacción local leve (10-20%); ocasionalmente fiebre, cefaleas, náuseas
Hepatitis A / Anti-hepatitis A Vía IM, dos dosis con 6 meses de intervalo	Adolescentes y adultos, trabajadores de salud y docentes; manipuladores de alimentos; pacientes con hepatopatías crónicas, viajeros a zonas endémicas	Embarazo (contraindicación relativa)	Fiebre
Polio / Anti-poliomielítica (Salk). Trivalente SC, dos dosis con 4-8 semanas de intervalo; 3ra. dosis a los 6-12 meses	De elección para mayores de 18 años en inmunización primaria. Dosis de refuerzo para viajeros con inmunización previa	Alergia a estreptomocina o neomicina o polimixina B	Ninguno
Gripe / Anti-influenza (Trivalente) a virus entero o a sub-unidades Cada año durante el otoño, con las cepas prevalentes en circulación	Mayores de 60 años. Personal de salud; internados en geriátricos, hemodializados, trasplantados o con enfermedades cardíacas, pulmonares crónicas o malignas, embarazadas y púerperas	Primer trimestre del embarazo es contraindicación relativa; alergia al huevo	Reacción local leve (<30%) Raramente: mialgias
Rabia* / Anti-rábica. Post-exposición: 1 ml IM en deltoides a los 0, 3, 7, 14 y 28 días, ó 0,1 ml ID en dos sitios a los 0, 3, y 7 días y en un sitio a los 30 y 90 días. Pre-exposición: 1 ml IM a los 0, 7 y 21 ó 28 días. Refuerzo: cada 2 años o cuando los anticuerpos disminuyen	Viajeros a áreas endémicas de rabia; laboratoristas que manipulan el virus rabia; veterinarios	Alergia a dosis previas; puede ser aplicada durante el embarazo	Reacción local (25%) o sistémica (20%)
Cáncer de cuello uterino o vaginal o vulvar (HPV 16 ó 18), verruga anogenital (HPV 6 u 11) / Anti-HPV Profilácticas bivalentes (HPV 16 y 18) o tetravalentes (HPV 6, 11, 16, 18) IM, tres dosis a los 0, 2 y 6 meses. Se desconoce el tiempo máximo de protección	Adolescentes de sexo femenino (vacuna bivalente o tetravalente) y masculino (tetravalente). Las series de vacunas pueden iniciarse a partir de los 9 años***	Alergia a la levadura <i>S. cerevisiae</i> ; enfermedad aguda moderada o grave; no se recomienda su aplicación durante el embarazo	Reacción local (dolor, tumefacción, eritema: <2,9%), o sistémica; fiebre mayor a 38° C <4,9%)

Tabla 48.6. Vacunas virales para adultos. *Vacuna discontinuada / ** De uso limitado / ***Según las normas del CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, EE. UU.) / SC: subcutánea; IM: intramuscular; VO: vía oral. Pacientes inmunosuprimidos incluyen: inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, leucemia, linfomas, cáncer, SIDA, o pacientes que reciben terapias con corticoides, agentes alquilantes, anti-metabolitos o radiación. Todas las vacunas a virus vivo y atenuado están contraindicadas en la inmunosupresión.

Edad	BCG	Hepatitis B (HB)	Neumococo conjugada	Pentavalente (DTP-HB-Hib)	Cuádruple (DTP-Hib)	Sabin (OPV)	Triple viral (SRP)	Gripe	Hepatitis A (HA)	Triple bacteriana celular (DTP)	Triple bacteriana acelular (dTAp)	Doble bacteriana (dT)	HPV ¹¹	Doble viral (SR)	Fiebre amarilla (FA) ¹²	Fiebre hemorrágica argentina (FHA) ¹³
Recién nacido	Única dosis ¹	1ª dosis ²														
2 meses			1ª dosis	1ª dosis		1ª dosis										
4 meses			2ª dosis	2ª dosis		2ª dosis										
6 meses				3ª dosis		3ª dosis										
12 meses			Refuerzo				1ª dosis	Única dosis							1ª dosis	
18 meses					1º refuerzo	4ª dosis		Dosis anual ⁶								
24 meses																
5-6 años (ingreso escolar)						Refuerzo	2ª dosis			2º refuerzo						
11 años		Iniciar o completar esquema ³					Iniciar o completar esquema ⁴				Refuerzo		3 dosis			
A partir de los 15 años																Única dosis
16 años												Refuerzo ⁹				
c/10 años												Refuerzo		Refuerzo		
Embarazadas								Dosis anual ⁶				Refuerzo ¹⁰				
Puerperio								Dosis anual ⁷						Única dosis ⁴		
Personal de salud		3 dosis						Dosis anual			1 dosis ⁸					

Tabla 48.7. Calendario Nacional de Vacunación de la República Argentina (2012). 1. BCG: Antes de egresar de la maternidad. 2. Hepatitis B: en las primeras 12 h de vida. 3. Si no hubiera recibido el esquema completo, deberá completarlo. En caso de tener que iniciarlo, se aplicará la 1ª dosis, la 2ª dosis al mes de la primera y la 3ª dosis a los 6 meses de la primera. 4. Si no recibió previamente dos dosis de triple viral o bien 1 dosis de triple viral + 1 dosis de doble viral. 5. Deberán recibir en la primo-vacunación 2 dosis de vacuna, separadas por al menos 4 semanas. 6. En cualquier trimestre de la gestación. 7. En madres de niños menores de 6 meses que no se vacunaron durante el embarazo. 8. Personal de salud que atiende niños menores de 1 año. 9. Los que comenzaron el plan dTap deberán recibir este refuerzo a los 21 años. 10. Iniciar o completar el esquema. 11. Mujeres. 12. Residentes o viajeros a zonas de riesgo. 13. Residentes o trabajadores con riesgo ocupacional en zonas de riesgo. BCG: Bacilo de Calmette-Guérin; previene las formas invasivas de la tuberculosis. HB: anti-hepatitis B. Neumococo conjugada: vacuna anti-neumocócica; previene la meningitis, neumonía y sepsis por neumococo. DTP-HB-Hib: vacuna quintuple anti-diférica, anti-tetánica, anti-coqueluchosa, anti-hepatitis B y anti-*Hemophilus influenzae*. DTP-Hib: vacuna cuádruple anti-diférica, anti-tetánica, anti-coqueluchosa y anti-*Hemophilus influenzae*. OPV: vacuna anti-poliomielítica oral (Sabin). SRP: vacuna triple viral anti-sarampión, anti-rubéola, y anti-parotidítica. HA: vacuna anti-hepatitis A. DTP: vacuna triple bacteriana anti-diférica, anti-tetánica, anti-coqueluchosa. dTAp: vacuna triple bacteriana anti-diférica, anti-tetánica, anti-coqueluchosa acelular. dT: vacuna doble bacteriana anti-diférica y anti-tetánica. HPV: vacuna anti-HPV. SR: vacuna doble viral anti-sarampión y anti-rubéola. FA: vacuna anti-amarilla. FHA: vacuna anti-Junin.

neutralizantes) y celular (linfocitos T citotóxicos); 4) posibilidad de construcción de vacunas multivalentes con múltiples epítopes aun de diferentes agentes virales; 5) posibilidad de albergar en construcciones *a cassette* secuencias nucleotídicas de señalización nuclear, genes de citoquinas, quimioquinas y otros inmunomoduladores; y 6) posibilidad de ser desarrolladas más rápidamente ante la eventualidad de un patógeno emergente (SARS, influenza aviar, etc.) o de la utilización de un patógeno por el bioterrorismo.

El DNA inoculado por vía intramuscular es capturado por las células musculares y más gradualmente por mononucleares localizados entre las fibras musculares y en los ganglios linfáticos regionales, aunque la expresión transgénica de la proteína estaría restringida a los miocitos. La participación de las células presentadoras de antígeno sería posible merced mecanismos no totalmente definidos, como la captura de antígenos *secretados* por miocitos o liberados desde éstos debido a efectos citotóxicos, o el transporte célula-célula.

En un individuo, la neosíntesis de proteínas virales codificadas por el DNA, conlleva la posibilidad de *sobreponerse* a la eventual falta de respuesta ante el mismo antígeno (proteico) inerte, debido al procesamiento proteico por las vías endógena y exógena, lo que promueve la presentación adecuada en el contexto de moléculas del CMH-I y CMH-II, respectivamente. Este hecho, confiere a las vacunas genéticas a DNA la **posibilidad de ser muy útiles en el control de infecciones crónicas, ya sea como profilaxis o terapéutica** de las mismas. Por ello, se cree que **serán tan eficaces como las vacunas atenuadas** en uso, pero (por el hecho de no replicar) **sin el riesgo de su eventual reversión a la virulencia**.

Sin embargo, los promisorios resultados obtenidos en estudios preclínicos, no han sido aún observados en humanos, debido fundamentalmente a una inadecuada inmunogenicidad.

Los principales reparos para el uso de este tipo de vacunas residen en: los potenciales efectos genéticos adversos, aquellos mediados por el sistema inmune y el eventual impacto ambiental. Con respecto a los posibles efectos genéticos, se ha demostrado que el 90% del DNA administrado por vía IM. en preparaciones vacunales para animales,

desaparece al cabo de minutos-horas del sitio de la inoculación, aunque **puede persistir** en bajos pero significativos niveles hasta al menos dos años. Asimismo, múltiples experiencias han demostrado que el **riesgo de inserción en el genoma celular es muy bajo, aunque existe**.

Estas vacunas pueden administrarse en mucosas o por vía parenteral a través de un disparador genético (también denominado pistola génica) que envía cantidades ínfimas de DNA unido a partículas recubiertas con oro.

Si se emplea la vía intramuscular, las células musculares captarán el DNA y lo llevarán al núcleo. La expresión del gen en cuestión puede desencadenar una respuesta inmune contra la proteína codificada. Una de las ventajas es que, dado que la proteína se fabrica intracelularmente, se presentará en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y así se generará una respuesta adecuada de linfocitos T citotóxicos.

Estas vacunas a DNA podrían constituir una alternativa a las vacunas en uso. Sin embargo, a pesar de lo promisorio de esta metodología, al año 2012, estos inmunógenos continúan en etapa de experimentación y no existe vacuna alguna licenciada para uso humano.

Se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos vacunas a DNA, tanto profilácticas como terapéuticas para hepatitis B y para HIV.

7.3 VACUNAS A VIRUS RECOMBINANTES

Es posible emplear técnicas de biología molecular para -por medio de recombinación genética- introducir determinados genes que codifican para proteínas inmunogénicas en el genoma de otro virus, no patógeno para el ser humano. Los genes introducidos pueden reemplazar genes no esenciales para la replicación del virus portador (*carrier*), o pueden ser añadidos al genoma. Cuando se introduce este virus modificado -recombinante- en un individuo se generará una respuesta inmune contra la proteína en cuestión. Dado que el virus recombinante será capaz de replicar en el hospedador (como una vacuna a virus *vivo* y atenuado), se producirá una respuesta inmune completa contra él, que incluirá la respuesta contra la proteína cuyo gen se ha insertado.

Los vectores que se seleccionan para este tipo de vacunas deben ser avirulentos para el ser humano. Se han propuesto: los poxvirus (por ejemplo, el virus vaccinia, dado que es bien conocido, por lo que muchos estudios de virus recombinantes se han realizado con este virus); también se están empleando otros virus de la familia *Poxviridae*, como la cepa modificada Ankara, que es altamente atenuada para el humano, no replica en primates y es considerada muy segura. Asimismo, se han ensayado herpesvirus y adenovirus no patógenos. Recientemente, se ha elaborado una vacuna a virus recombinante atenuada para prevenir la enfermedad por virus del Nilo Occidental. La misma se ha logrado al insertar los genes de envoltura (E) y pre-membrana (preM) de dicho agente, en un contexto génico correspondiente a un clon de la cepa 17D de la vacuna utilizada para la prevención de la fiebre amarilla. Esta vacuna quimérica se encuentra en la fase de ensayos clínicos.

En modo análogo, se ha desarrollado una vacuna quimérica atenuada profiláctica para prevenir el dengue. La misma expresa los genes de envoltura y pre-M correspondientes a los 4 serotipos del virus homónimo, en un contexto génico de la cepa 17D anti-amarilla. Esta vacuna se encuentra en la fase III de ensayos clínicos, habiéndose previsto que hacia fines de 2012 estarán disponibles los datos preliminares de eficacia y seguridad a gran escala. La vacuna ha exhibido adecuada estabilidad genética (al analizarse el RNA vacunal a partir de humanos inmunizados), así como estabilidad fenotípica y antigenicidad en ensayos *in vitro* e *in vivo*. La respuesta inmune inducida en los vacunados se caracteriza por la ausencia de componentes Th2 y un desvío hacia la producción de interferón-gamma. El virus quimérico vacunal puede producir una viremia efímera y de

Vacunas profilácticas para:

Hepatitis C
HIV
Dengue
SARS
Sincicial respiratorio
Parainfluenza
Virus del Nilo Occidental
Citomegalovirus humano
Virus Epstein-Barr
Erythrovirus (parvovirus) B19
Hepatitis E

Vacunas terapéuticas para:

Hepatitis B
Hepatitis C
HIV
Papilomavirus humanos
Citomegalovirus humano

Nuevos desarrollos:

Incremento de epítopes (*epitope enhancement*)
Moléculas coestimuladoras
Inducción de citoquinas y quimioquinas
Agentes que bloqueen la respuesta inmune supresora

Tabla 48.8. Vacunas del futuro en experimentación.

Criterio de clasificación	Tipos	Ejemplos (seleccionados)
Según el objetivo de su aplicación	Profiláctica	Triple viral (anti-sarampionosa, anti-parotidítica, anti-rubeólica)
	Terapéutica	<i>En desarrollo, anti-hepatitis B (glicopéptidos de la envoltura o péptidos de la nucleocápside o a DNA)</i>
Según la vía de administración	Oral	Anti-poliomielítica tipo Sabin, anti-rotavirus pentavalente (humana-bovina)
	Parenteral: Intramuscular Subcutánea Intradérmica Intranasal (aerosolización)	Anti-rábica, anti-influenza (hemaglutinina y neuraminidasa) Triple viral, anti-encefalitis japonesa, anti-sarampionosa <i>En ensayo, anti-encefalitis japonesa</i> <i>En ensayo, anti-sarampionosa</i>
Según la constitución	Virus completo	Anti-hepatitis A inactivadas (con hidróxido de aluminio o virosomas, como adyuvantes)
	Virus recombinante	<i>En desarrollo / ensayo, vaccinia modificado cepa Ankara expresando epítopes del HIV</i>
	Virus con genoma reasociado	Anti-rotavirus multivalente atenuada (genes de rotavirus bovino y rotavirus humano); <i>en ensayo, anti-Lassa (reasociación de genes de los virus Lassa [virulento] y Mopeia [apatógeno para humanos])</i>
	Partículas subvirales (lipoglicoproteínas; proteínas)	Lipoglicoproteínas: anti-hepatitis B de 1ª, 2ª, y 3ª generación; Proteínas: partículas virus-símil (VLPs) anti-HPV
	Proteínas purificadas	Anti-influenza (hemaglutinina y neuraminidasa)
	Lipopéptidos	<i>En desarrollo / ensayo, anti-hepatitis B (péptidos de nucleocápside unidos a un epítipo de toxoide tetánico y a ácido palmítico)</i>
	DNA	<i>En desarrollo / ensayo, anti-hepatitis B (gen S)</i>
Según su capacidad de replicar (e infectar)	Viral inactivada (<i>no replica</i>)	Anti-rábica, anti-poliomielítica (tipo Salk)
	A subunidades (<i>no replica</i>)	Anti-hepatitis B (1ª, 2ª y 3ª generación)
	A DNA, proteínas, lipoglicoproteínas o lipopéptidos (<i>no replican</i>)	<i>Véanse ejemplos según la composición</i>
	Viral atenuada (homóloga, heteróloga, ya sea con reasociación o con recombinación génica (<i>replican e infectan</i>))	Anti-poliomielítica, tipo Sabin; homóloga: anti-rubeólica; heteróloga: vaccinia anti-viruela (uso muy restringido); con reasociación: anti-rotavirus multivalente; <i>en desarrollo, anti-influenza (gen de la hemaglutinina de influenza en un contexto génico de parainfluenza 5)</i>
Según la metodología para su preparación	Convencionales	Inactivada anti-poliomielítica (Salk) Atenuada anti-poliomielítica (Sabin)
	Ingeniería genética para producir proteínas (con o sin glicosilación)	HBs Ag anti-hepatitis B expresado en sistemas eucarióticos (2ª y 3ª generación); VLPs anti-HPV expresadas en sistemas eucarióticos
	Genéticas (a DNA)	<i>En desarrollo / ensayo: anti-HBV; anti-HIV</i>
Según el tipo de adyuvantes	Hidróxido de aluminio	Casi todas las vacunas virales humanas en uso
	Otros adyuvantes: Monofosforil lípido A (MPA)	<i>En ensayo: anti-hepatitis B</i>
	QS-21 (derivado de saponina)	<i>En ensayo: anti-hepatitis B (sólo o con MPA).</i> <i>En desarrollo / ensayo en rhesus, anti-HIV (DNA codificante de péptido de envoltura + proteína Gag)</i>
	Virosoma	Una de las vacunas anti-hepatitis A inactivadas, recubierta por una "cápsula" de hemaglutininas de influenza inmersas en los lípidos liposomales y virales.
	DNA con CpG	<i>En ensayo: vacunas a DNA (secuencias nucleotídicas en el plásmido)</i>
Virus vaccinia modificado cepa Ankara	<i>En ensayo pre-clínico.</i>	



(Continúa en la página siguiente)

Según la modulación de la respuesta inmune	Promoción de respuesta Tfh: Hidróxido de aluminio	Casi todas las vacunas humanas en uso
	Promoción de respuesta Th1: Oligodesoxinucleótidos (ODN) con CpG Con adición de IL-12 o del gen homónimo Conjugado de antígeno a agonistas de TLR-7 y -8	En desarrollo / ensayo: anti-virus del Nilo Occidental <i>En desarrollo / ensayo: anti-hepatitis B + IL-12 o gen homónimo</i> <i>En desarrollo: anti-HIV (Gag conjugada a agonistas de TLR-7 y -8)</i>
	Promoción de respuestas Th1 y Tfh: Copolímeros de polioxietileno y polioxipropileno (poloxámeros)	<i>En ensayo: anti -CMVh (pp65+ gB de envoltura en una formulación con poloxámeros)</i>

Tabla 48.9. Clasificación general de las vacunas virales.

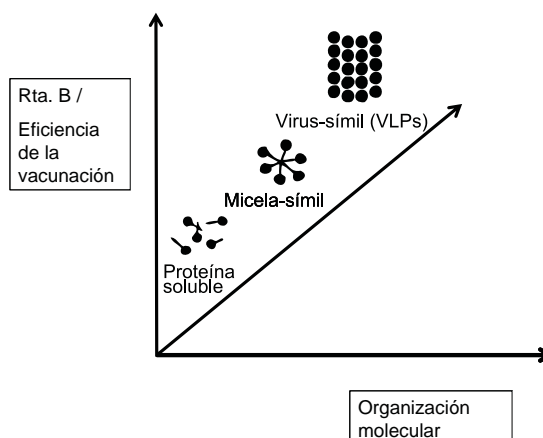


Figura 48.5. La inmunogenicidad vacunal es proporcional a la complejidad molecular.

baja cuantía, habiéndose establecido que no se transmite mediante los artrópodos vectores estudiados.

Otras vacunas utilizando vaccinia como vector están en estudio para prevenir la rabia en animales salvajes y en ensayo en vacunas anti-HIV (Capítulos 26 y 22.6).

7.4 PLANTAS TRANSGÉNICAS

Se están realizando esfuerzos para generar plantas transgénicas en las cuales se inserten genes de proteínas antigénicas para inmunizar contra determinados virus. La enorme ventaja de este método es su forma de conservación y de administración por vía oral, lo que facilitaría su administración, en especial en países en vías de desarrollo. Si bien esta idea parecería linda con la ciencia ficción y existen numerosos problemas técnicos, como por ejemplo el hecho de que el antígeno deberá resistir las enzimas digestivas para poder ser presentado intacto al sistema inmune, se está trabajando activamente en esta nueva y fascinante idea.

7.5 NUEVAS APROXIMACIONES PARA LA ATENUACIÓN VIRAL

Muy recientemente se han propuesto estrategias alternativas para obtener racionalmente –y no empíricamente– vacunas atenuadas para virus a RNA (como los picornavirus): incluyen la delección deletérea de genes o la replicación del virus vacunal mediada por una polimerasa viral con fidelidad aumentada. Asimismo, se propuso el control mediante miRNAs o motivos proteicos en "dedo de zinc" –con capacidad de reconocer codones específicos– asociados a nucleasas para controlar la expresión de genes de virus con genoma a DNA (como los herpes).

7.6 CONCLUSIONES

Una enumeración sucinta de algunas de las vacunas en desarrollo se exhibe en la Tabla 48.8, mientras que una visión general de las diferentes modalidades de abordaje de las distintas vacunas se observa en la Tabla 48.9. En la figura 48.5 se observa una comparación entre la inmunogenicidad de las formulaciones vacunales según su composición.

Pasteur afirmó: "Los griegos nos han dado una de las palabras más hermosas de nuestra lengua: entusiasmo, un dios interior. La grandeza de los actos de los hombres se mide por la inspiración de la cual surgen. Feliz aquel que tiene un dios interior".

Con ese espíritu, y mediante un genial experimento, Max Theiler desarrolló la vacuna anti-amarílica, que le valió el Premio Nobel de 1951. Esa inspiración en el pensamiento del gran científico francés parecería ser hoy más necesaria que nunca ante el desafío que significan ejemplos tales como la pandemia de HIV/SIDA o la asociación causal del hepatocarcinoma con el HCV, para los cuales aún no hay vacunas profilácticas. El mancomunado esfuerzo de entusiastas profesionales en áreas tales como la ingeniería genética o la genética inversa, además de la virología e inmunología molecular en conjunción con la investigación clínica, probablemente produzcan resultados que devendrán en beneficios tangibles para la humanidad mediante la prevención o el tratamiento de enfermedades virales de antigua data o reciente emergencia a través del uso de nuevas y eficaces formulaciones vacunales.

Bibliografía

- Berzofsky JA, Ahlers JD, Janik J, Morris J, Oh S, Terabe M, *et al.* "Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections". *J Clin Invest* 2004; 4: 450-62.
- Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, *et al.* "Strategies for the immunotherapy and prevention of cancer (review)". *J Clin Invest* 2004; 113: 1515-25.
- Center for Disease Control and prevention: CDC Daily Digest Bulletin cdc@service.govdelivery.com
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). "Prevención y control de la influenza con vacunas: recomendaciones del Comité Asesor sobre prácticas de Inmunización (ACIP)", 2011. *MMWR* 2011; 60: 1128-32.
- Collier B-AG, Clements DE. "Dengue vaccines: progress and challenges". *Curr Op Immunol* 2011; 23: 391-8.
- Dupont J, Altclas J, Lepetic A, Lombardo M, Vazquez V, Salgueira C, *et al.* "A controlled clinical trial comparing the safety and immunogenicity of a new adjuvanted hepatitis B vaccine with a standard hepatitis B vaccine". *Vaccine* 2006; 24:7167-74.
- Hanke T, McMichael AJ, Dorrell L. "Clinical experience with plasmid DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 clade A vaccine focusing on T-cell induction". *J Gen Virol* 2007; 88: 1-12.
- HIV Vaccine Trials Network. [http:// chi.wsf.edu.vaccines](http://chi.wsf.edu.vaccines).
- Huang DB, Wu JJ, Tying SK. "A review of licensed viral vaccines, some of their safety concerns, and the advances in the development of investigational viral vaccines". *J Infect* 2004; 49: 179-209.
- International AIDS Vaccine Initiative: [http:// www.iavi.Org/ trialsdb/basic search form asp](http://www.iavi.Org/trialsdb/basicsearchform.asp).
- Koutsky LA, Harper DM. "Chapter 13: current findings from prophylactic HPV vaccine trials". *Vaccine* 2006; 24 (Suppl 3: S114-21).
- Lauring AS, Jones JO, Andino R. "Rationalizing the development of live attenuated vaccines". *Nat Biotechnol* 28: 2010; 573-9.
- McCluskie MJ, Krieg AM. "Enhancement of infectious disease vaccines through TLR9-dependent recognition of CpG DNA". *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006; 3:59-82.
- Normas Nacionales de Vacunación <http://www.colfarma.org.ar/descargas/varios/08/VacunasNormas>
- Pol S, Michel M-L. "Therapeutic vaccination in chronic hepatitis B virus carriers". *Expert Res Vaccine* 2006; 707-16.
- Saslow D, Castle PE, Cox JT, Davey DD, Einstein MH, Ferris DG, *et al.* "American Cancer Society Guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors". *CA Cancer J Clin* 2007; 57:7-28.
- Schalk JAC, Mooi FR, Berbers GAM, van Aerts LAGJM, Ovelgöne H, Klimman TG. "Preclinical and Clinical safety studies on DNA vaccines". *Hum Vaccin* 2006; 2: 45-53.
- Vacunación Antigripal Argentina 2012 Ministerio de Salud de la Nación. [http://www.msal.gov.ar/gripe/5equipos/infoequipos/Guia lineamientos técnicos gripe 2012](http://www.msal.gov.ar/gripe/5equipos/infoequipos/Guia lineamientos tecnicos gripe 2012)

Agentes antivirales

Elsa B. Damonte - Susana E. Mersich

1. INTRODUCCIÓN

Los comienzos de la investigación antiviral como una disciplina datan de la década de 1960 cuando tomó cuerpo la posibilidad de desarrollar medicamentos seguros y efectivos para combatir las enfermedades virales. Sin embargo, a pesar del tiempo transcurrido, el desarrollo de la quimioterapia antiviral ha sido muy lento, y sólo en las dos últimas décadas el impacto del SIDA en la población mundial y la necesidad de disponer de herramientas terapéuticas para su control han producido un cambio sensible en esta tendencia.

Varias causas han sido determinantes de este fenómeno. La primera y principal razón es la propiedad conocida de los virus de ser parásitos genéticos intracelulares obligados; por lo tanto, la asociación íntima que se establece entre el ciclo de multiplicación viral y los diversos aspectos del metabolismo celular relacionados implican que haya un número muy limitado de potenciales blancos antivirales específicos, sin manifestación de efectos tóxicos secundarios. En segundo lugar, el tratamiento antiviral sólo es efectivo cuando es iniciado rápidamente luego de la infección, lo que conduce a la necesidad de un diagnóstico rápido para su aplicación. Por otra parte, muchas infecciones virales humanas presentan una fase latente, que resulta generalmente insensible a cualquier terapia. Todas estas dificultades han dado prioridad al desarrollo de vacunas muy efectivas para la prevención y posterior erradicación de importantes virus patógenos. Por último, pero no menos importante, debe tenerse en cuenta que la investigación para el desarrollo de la quimioterapia antiviral es una inversión de alto riesgo para la industria farmacéutica, lo que ha desalentado ostensiblemente por décadas su expansión.

Los inconvenientes mencionados han llevado -tanto en el ámbito de la industria privada como de los organismos oficiales- al establecimiento de prioridades clínicas para la terapia antiviral, es decir, la elección de ciertas enfermedades de origen viral como las más relevantes para el estudio de agentes antivirales. En general, los esfuerzos se concentran en aquellas infecciones virales que no son controlables por medio de vacunas, que son relativamente graves, que tienen una incidencia elevada en la población, que pueden ser diagnosticadas rápidamente, y que requieren un largo período de tratamiento. Dentro de estas características, se ubican el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), los herpesvirus humanos (incluyendo los dos serotipos del virus herpes simplex HSV-1 y HSV-2, el citomegalovirus humano [HCMV], el virus varicela-zóster [VZV], el virus Epstein-Barr [EBV] y los herpesvirus humanos tipos 6, 7 y 8), el virus hepatitis C (HCV), el virus dengue y varios virus con tropismo respiratorio como rinovirus, virus sincicial respiratorio y adenovirus.

Aunque existen vacunas contra hepatitis B (HBV) e influenza, su uso no ha eliminado la necesidad de agentes quimioterapéuticos efectivos contra estos dos agentes; en el primer caso por el gran número de portadores de infección crónica y en el caso de influenza por la gran variabilidad de este virus que produce las conocidas epidemias y pandemias de gripe. Asimismo, la emergencia en los últimos años de nuevas enfermedades virales de gran gravedad y el surgimiento de la amenaza del bioterrorismo han llevado a incluir dentro de las prioridades para el estudio de antivirales a nuevos agentes como el coronavirus causal del síndrome respiratorio agudo grave (SARS), el hantavirus, los virus que producen fiebres hemorrágicas fatales, como

los arenavirus Junín y Lassa, y, aun virus ya considerados erradicados de la población humana como el de la viruela.

2. ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO Y LA APROBACIÓN DE UNA DROGA ANTIVIRAL

Las estrategias utilizadas para descubrir nuevas drogas han evolucionado acompañando el avance en el conocimiento de las propiedades de los virus. En la actualidad pueden clasificarse dentro de tres principales tipos de abordajes experimentales:

a) Ensayo empírico de un gran número de compuestos. Se prueba en cultivos celulares el efecto inhibitorio selectivo de diferentes series de compuestos de síntesis o compuestos naturales contra un virus determinado. Dichos compuestos pueden haber sido elegidos al azar o por sus propiedades farmacológicas conocidas para otros sistemas. No se requiere conocer el ciclo de multiplicación viral en detalle y sólo después que se determina que un compuesto determinado tiene actividad antiviral, se trata de demostrar efectivamente cuál es el blanco de ataque en el ciclo viral.

b) Diseño racional de un compuesto antiviral dirigido contra un blanco predeterminado. A partir de la información obtenida a nivel molecular de las distintas etapas del ciclo de multiplicación viral y la estructura detallada de las proteínas virales intervinientes, se pueden elegir blancos adecuados para el ataque con un agente antiviral. Preferentemente, se seleccionan procesos indispensables para la propagación del virus, que permitan establecer un cierto grado de selectividad respecto del metabolismo celular y que se encuentren preservados dentro de las distintas especies o subtipos virales relacionados. El conocimiento de la estructura cristalina de la proteína viral elegida como blanco y, en el caso de una proteína enzimática, también las propiedades de su sustrato permitirán diseñar una molécula que pueda interferir la interacción entre ambos con el consecuente bloqueo de la etapa del ciclo viral en que están implicados.

c) Bloqueo de la expresión de un gen viral. Aquí el blanco terapéutico no es una proteína sino el RNA mensajero (RNAm) que codifica para dicha proteína. A partir de los datos actualmente disponibles de las secuencias de los genomas virales y sus correspondientes RNAm, y tomando en cuenta las reglas de apareamiento de las bases nucleotídicas, se diseñan pequeñas moléculas dirigidas a bloquear la expresión de un gen seleccionado, provocando la carencia de la correspondiente proteína viral y el bloqueo en la producción de virus.

El empleo de estas tres estrategias se ejemplificará más adelante con los antivirales en uso clínico que se han obtenido siguiendo cada una de ellas. En todos los casos, cualquiera sea la estrategia adoptada, el desarrollo de una droga antiviral a ser aprobada para uso clínico en seres humanos requiere el cumplimiento secuencial de tres etapas:

1) Ensayos *in vitro*. Comprenden mediciones de la citotoxicidad y la actividad antiviral de la sustancia para determinar la especificidad de su efecto inhibitorio. Los procedimientos están resumidos en la Figura 49.1. Inicialmente se evalúa la citotoxicidad mediante la incubación de cultivos celulares susceptibles al virus a ensayar frente

a concentraciones seriadas del compuesto y posterior medida de la viabilidad celular. A partir de las curvas dosis-respuesta de porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración del compuesto se obtiene por extrapolación el valor de la concentración citotóxica 50 (CC_{50}), es decir, la dosis del compuesto que reduce la viabilidad celular al 50%. A continuación se determina la actividad antiviral en el mismo tipo de células utilizadas para evaluar citotoxicidad, las que son infectadas con una dosis fija del virus a ensayar, en presencia de concentraciones variables de la droga, siempre por debajo de la CC_{50} . Luego de incubar en condiciones de tiempo y temperatura adecuadas para el virus en prueba, se cuantifica la presencia de virus midiendo algún parámetro indicador de la misma (infectividad, proteína o genoma viral, viabilidad celular, etc.), y luego se calcula la concentración efectiva 50 (CE_{50}), que es la requerida para reducir la detección de virus al 50% respecto del control infectado y no tratado con droga. La relación entre los valores de CC_{50} y CE_{50} es el llamado índice de selectividad (IS) o índice terapéutico, valor clave que indicará las perspectivas de uso del compuesto ensayado: cuanto mayor sea el IS, más específico es el efecto (inhibitorio) del compuesto sobre el virus respecto de la célula.

2) Prueba preclínica en animales. Si se dispone de un modelo animal, que preferentemente reproduzca la patología en el humano, la segunda etapa en el desarrollo de un agente antiviral es el ensayo en dicho modelo. Como ocurre en los ensayos *in vitro*, la evaluación también comprende los controles de toxicidad y actividad antiviral, considerando además en este sistema la influencia de diferentes vías de administración del compuesto, número de dosis, farmacocinética, biodisponibilidad, degradación, metabolismo, eliminación del compuesto o sus productos, respuesta inmune, relación entre la vía de entrada del virus y vía de administración de la droga, etc. Todas estas variables y parámetros que se agregan a las condiciones del ensayo *in vitro* son, en muchas ocasiones, determinantes de la falla en el modelo animal de drogas que pueden haberse mostrado como

muy efectivas inhibitorias de la infección viral en un sistema de células cultivadas *in vitro*.

3) Tres fases de ensayo clínico. Finalmente, cuando se han superado los ensayos *in vitro* y en el modelo animal, se encaran los ensayos clínicos en seres humanos, que comprenden tres fases de complejidad creciente.

Fase 1. Administración de la droga a 100-300 voluntarios sanos, hombres o mujeres posmenopáusicas. Aquí se implementan fundamentalmente ensayos para controlar farmacocinética, tolerancia, toxicidad y posibles vías de administración del compuesto.

Fase 2. Administración de la droga a 300-1 000 individuos infectados. Se realizan nuevamente controles de seguridad de la droga en un número mayor de individuos y se determina el efecto terapéutico sobre la infección, controlando los parámetros de evolución de la misma, primordialmente signos y síntomas clínicos y carga viral. Su duración oscila entre 1 y 2 años.

Fase 3. Se incrementa el número de pacientes infectados para administración de la droga a 1 000-3 000 individuos. Se repiten todas las determinaciones de la fase 2 y, además, en caso de tratarse de una infección para la que ya se dispone de un antiviral en uso clínico, se compara la eficiencia de la droga en estudio con la otra seleccionada como referencia.

3. PROBABLES BLANCOS DE ATAQUE POR ANTIVIRALES EN EL CICLO DE MULTIPLICACIÓN VIRAL

Ya se ha mencionado que a partir del conocimiento sobre las distintas etapas del ciclo de multiplicación viral y la estructura de las proteínas virales intervinientes, se pueden elegir blancos adecuados para el ataque con un agente antiviral. Dichos blancos pueden ser tanto moléculas codificadas por el virus, como otras, codificadas por la célula y especialmente inducidas por una infección viral. En la fase de adsorción se pueden proponer agentes que mimeticen



Ensayo de citotoxicidad

Cultivos de células en microplacas

↓

Incubación 2-7 días en medio de cultivo con diferentes concentraciones de la droga

↓

Cuantificación de viabilidad celular (recuento de células viables o técnica colorimétrica)

↓

Cálculo de la concentración citotóxica 50%

CC_{50} : dosis de droga que reduce al 50% la viabilidad celular respecto del control sin droga

Ensayo de actividad antiviral

Cultivos de células susceptibles en microplacas

↓

Infección con una dosis constante de virus

↓

Incubación en medio de cultivo con diferentes concentraciones de la droga en condiciones de tiempo y temperatura adecuadas para la multiplicación viral

↓

Cuantificación de la multiplicación viral (efecto citopático, número de placas, viabilidad celular, proteína viral, actividad de una enzima viral, genoma viral)

↓

Cálculo de la concentración efectiva 50%

CE_{50} : dosis de droga que reduce 50% el efecto del virus respecto del control sin droga

Determinación del índice de selectividad

Índice de selectividad (IS) = CC_{50}/CE_{50}

Figura 49.1. Esquema de los ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral *in vitro*.

la proteína de fijación y se unan al receptor o bien agentes que mimeticen al receptor. En este aspecto son muy promisorios los péptidos sintéticos, pero tienen un costo muy alto y baja eficiencia. En el paso de penetración, en el que participan una o más proteínas virales se han diseñado sustancias muy eficientes como antivirales (ver más adelante el uso de amantadina y rimantadina para el virus influenza). Cuando el virus entra por fusión de membranas y este mismo fenómeno lleva al desnudamiento es posible inhibir estos procesos específicamente, como se verá en el caso de los antirretrovirales. Asimismo, las enzimas virales propias, que replican los ácidos nucleicos virales a partir de moléculas presentes en la célula infectada, son un blanco importante para la aplicación de las drogas antivirales. El paso clave puede ser la transcripción, que usa como molde al ácido nucleico del genoma viral o bien el proceso de replicación, tal como se muestra en la Figura 49.2.

Un número muy importante de drogas en uso, funcionan como sustrato de las polimerasas virales (como se verá más adelante) para virus a RNA y DNA. Dado que las polimerasas de los virus a RNA (denominadas RNA polimerasas dependientes de RNA) carecen de contraparte en las células animales, son un blanco potencial altamente específico. También los pasos de ensamble y maduración son específicos, en la medida que en ellos participan proteínas virales; sin embargo, las sustancias a utilizar en cualquiera de estos procesos aún se encuentran en las primeras etapas de su estudio. En contraste, la salida o liberación de virus como el de influenza pueden ser bloqueadas por la acción de una sustancia inhibidora de la neuraminidasa viral, actualmente en uso. Como las distintas familias de virus multiplican de distinta forma, como se ha visto en el Capítulo 2, para cada una de ellas se estudian y diseñan drogas inhibidoras de estructuras y procesos muy disímiles, tal como se discute en este capítulo.

4. PRINCIPALES ANTIVIRALES EN USO CLÍNICO

Los compuestos antivirales actualmente en uso clínico para distintas infecciones virales, excluyendo HIV (Capítulo 50) se presentan en la Tabla 49.1. Dada la especificidad de espectro de acción de cada droga, se las ha agrupado por tipo de virus y se comentarán a continuación sus principales propiedades. A manera de comentario general, es notorio que -a pesar de la diversidad teórica comentada de blancos posibles para el ataque por agentes antivirales- la realidad muestra que la amplia mayoría de drogas en uso están dirigidas a una sola etapa, la síntesis del genoma viral.

4.1 INFECCIONES POR HERPESVIRUS

4.1.1 Análogos de nucleósidos

En 1960 cuando comenzaron las investigaciones formales en búsqueda de drogas antivirales efectivas, los esfuerzos estaban concentrados en el tratamiento de las infecciones herpéticas. Basándose en la experiencia acumulada en los estudios de agentes anticancerígenos que bloquearan la síntesis de DNA celular para evitar la proliferación tumoral, los trabajos iniciales en antivirales contra herpes también se enfocaron en el ensayo de análogos de nucleósidos dirigidos a inhibir específicamente la síntesis del DNA viral. El fundamento de esta estrategia es utilizar análogos de los nucleósidos que normalmente constituyen la cadena de DNA, es decir, moléculas con modificaciones en la base o en el azúcar que conforman la estructura química de alguno de los cuatro nucleósidos (correspondientes a las bases adenina, timidina, guanosina y citosina). El análogo es una prodroga que debe convertirse a una forma activa por trifosforilación. Luego el trifosfato del análogo de nucleósido es sustrato de la DNA polimerasa para incorporarse a la cadena de DNA en crecimiento en lugar de la molécula normal y originar un DNA defectuoso, bloqueando así el ciclo de multiplicación viral.

Es así como los primeros compuestos antivirales licenciados en EE.UU. para uso clínico fueron dos análogos de timidina, la 5-iodo-2-desoxiuridina o idoxiuridina y la trifluridina (Figura 49.3), efectivos inhibidores del crecimiento de HSV en células cultivadas *in vitro*. Pero el uso de estos compuestos en pacientes estuvo limitado a la aplicación tópica para la queratitis ocular herpética (Tabla 49.1), por sus efectos tóxicos colaterales, ya que ninguna de las dos drogas discriminaba efectivamente entre la DNA polimerasa viral y celular y, en consecuencia, afectaban tanto la síntesis de DNA viral como DNA celular. Por este motivo, en esos años parecía que todos los análogos de nucleósidos no iban a funcionar como antivirales selectivos, en especial en células que están en proceso de división activa.

El descubrimiento del aciclovir (ACV) a fines de los años 70 produjo un vuelco en la historia de la quimioterapia antiviral, ya que fue el primer ejemplo de una droga verdaderamente eficaz y selectiva, que hasta el presente continúa utilizándose tanto en forma local como sistémica para las infecciones por HSV-1, HSV-2 y VZV. (Tabla 49.1) El ACV es una acicloguanosina (Figura 49.3) que, a diferencia de los análogos antes descritos, tiene una estructura

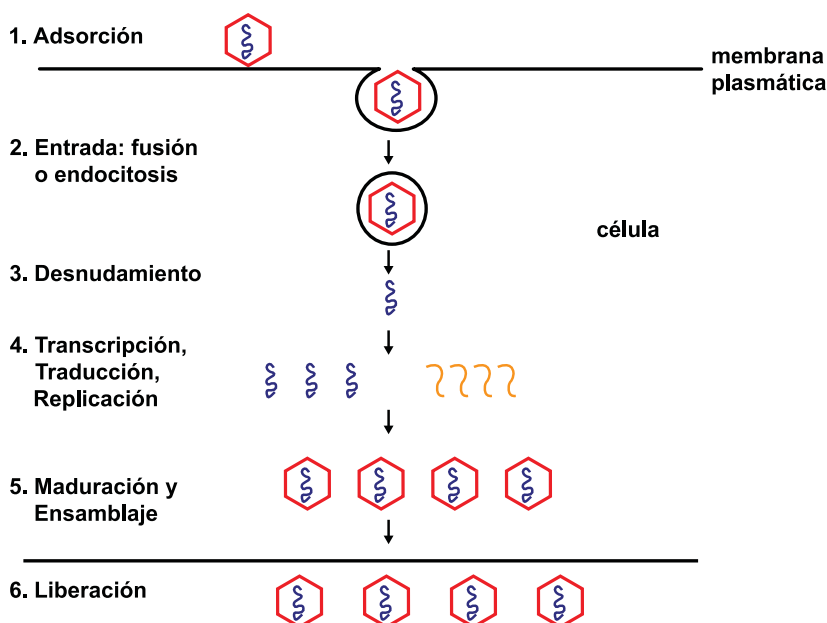


Figura 49.2. Pasos del ciclo viral que son potenciales blancos de drogas antivirales.

química sensiblemente diferente a la del nucleósido normal, lo que parece ser determinante de su probada selectividad.

El mecanismo de acción del ACV se presenta en la Figura 49.4 y, como sucede con todos los análogos, comprende dos etapas secuenciales: activación e inhibición. Primero, el aciclovir pasa a su forma activa, el ACV-trifosfato (ACV-TP), mediante tres fosforilaciones sucesivas; la primera fosforilación a ACV-MP es efectuada por una enzima timidino-quinasa (TK) viral y las dos siguientes por enzimas celulares. La primera fosforilación por la TK viral es uno de los principales factores determinantes de la gran selectividad del ACV, ya que la enzima viral tiene un rango de sustrato mucho más amplio que las quinasas celulares, por lo que fosforila el ACV a ACV-MP, reacción que no puede ser catalizada eficientemente por la enzima celular en células no infectadas. Por el contrario, la idoxiuridina y la trifluridina son fosforilados en las tres reacciones por enzimas celulares y es por ello que interfieren con la síntesis de DNA celular tanto en células infectadas como no infectadas. Una vez convertido a su forma activa, el ACV-TP interactúa con la DNA polimerasa viral para incorporarse a la cadena de DNA que se está replicando por inhibición competitiva con el nucleótido normal. Esta reacción de inhibición también justifica la selectividad de esta droga, ya que el ACV-TP posee mayor afinidad química por la DNA polimerasa viral respecto de la DNA polimerasa celular, por lo que va a afectar mucho más la síntesis de DNA viral que la síntesis de DNA celular. Por último, otra propiedad destacable del ACV es que es un terminador obligado

de cadena, es decir, su incorporación a la cadena de DNA implica la interrupción inmediata de la síntesis ya que en la molécula de ACV no queda un OH libre en el extremo 3' (Figura 49.4) para la formación de una unión fosfodiéster y la incorporación de otro nucleótido. La terminación irreversible de las cadenas de DNA en crecimiento confiere mayor seguridad a un análogo de nucleósido, ya que no habrá mutaciones somáticas o daños en la línea germinal como consecuencia de su utilización.

El conjunto de bases bioquímicas mencionadas para la selectividad y seguridad del ACV (fosforilación específica del ACV por la TK viral, potencia de inhibición del ACV-TP sobre la DNA polimerasa viral y terminación de la cadena de DNA) se ha visto correlacionado con los excelentes resultados obtenidos en la clínica por la administración oral, intravenosa o tópica del ACV (Tabla 49.1). Sólo se han descrito algunos efectos colaterales a nivel renal, por cristaluria de la droga que es eliminada en forma insoluble.

La principal desventaja en el uso del ACV es su muy baja biodisponibilidad oral, vía preferida de administración de un antiviral, ya que sólo se adsorbe un 15-20%. Para incrementar esta propiedad sin afectar el perfil de seguridad del compuesto, se han desarrollado prodrogas que *in vivo* puedan ser convertidas en ACV pero permitiendo la llegada de una mayor concentración en plasma. El valaciclovir, el éster de L-valina de ACV (Figura 49.3), es bien absorbido por vía oral (> 50%) y rápidamente convertido a ACV por una hidrolasa presente en hígado y estómago. A la fecha, los ensayos clínicos con valaciclovir muestran superioridad sobre ACV contra VZV y beneficios

Droga	Espectro de actividad	Principales indicaciones
Idoxiuridina	HSV-1, HSV-2, VZV	Uso tópico en queratitis ocular, 0,1%
Trifluridina	HSV-1, HSV-2, VZV	Uso tópico en queratitis ocular, 1%
Aciclovir	HSV-1, HSV-2, VZV	Uso tópico en queratitis y herpes labial; uso sistémico por vía oral 1000-4000 mg/ día, 4-5 dosis, en herpes genital y herpes zóster, o iv 30mg/kg/día, en infecciones severas
Valaciclovir	HSV-1, HSV-2, VZV	Tratamiento por vía oral de herpes genital y herpes zóster, 1000-3000 mg /día, 2-3 dosis
Famciclovir	HSV-1, HSV-2, VZV	Tratamiento por vía oral de herpes genital y herpes zóster, 750-1500 mg/día, 3 dosis
Ganciclovir	HCMV	Para tratamiento y prevención, por vía oral, 3g/día; iv, 10 mg/kg/día; intraocular, 4.5 mg
Valganciclovir	HCMV	Para tratamiento y prevención por vía oral, 900 mg/día
Cidofovir	HCMV, HSV-1, HSV-2, VZV	Retinitis por HCMV e infecciones por HSV y VZV ACV ^R en pacientes inmunocomprometidos, iv 5 mg/kg/ semana
Foscarnet	HSV-1, HSV-2, VZV, HCMV	Retinitis por HCMV e infecciones por HSV y VZV ACV ^R en pacientes inmunocomprometidos, iv 120-180 mg/kg/día, 3 dosis
Formivirsén	HCMV	Retinitis por HCMV en pacientes inmunocomprometidos, intraocular
Lamivudina	HBV	Tratamiento por vía oral, 100 mg/día, 1 dosis
Emtricitabina	HBV	Recientemente aprobado
Adefovir	HBV	Tratamiento por vía oral en HBV resistente a lamivudina, 10 mg/día, 1 dosis
Amantadina	Influenza A	Tratamiento por vía oral, 200 mg/día, 2 dosis
Rimantadina	Influenza A	Tratamiento por vía oral, 300 mg/día, 2 dosis
Oseltamivir	Influenza A y B	Tratamiento y prevención, por vía oral, 150 mg/día, 2 dosis
Zanamivir	Influenza A y B	Tratamiento y prevención, por inhalación intranasal, 20 mg/día, 2 dosis
Interferón α + Ribavirina	HCV	Por vía oral, 800-1200 mg/día
Ribavirina	RSV	Aerosol en gotas, 20 mg/día, para niños en alto riesgo

Tabla 49.1. Drogas aprobadas para uso clínico en infecciones virales, excluyendo HIV. HSV-1, HSV-2: virus herpes simplex tipo 1 y 2; **VZV:** virus varicela-zóster; **HCMV:** citomegalovirus humano; **HBV:** virus hepatitis B; **HCV:** virus hepatitis C; **RSV:** virus sincicial respiratorio.

equivalentes en las infecciones por HSV, pero con el requerimiento de un número menor de dosis diarias (Tabla 1). El famciclovir también tiene buena biodisponibilidad oral (> 70%) y es convertido *in vivo* en penciclovir, que actúa en forma similar al ACV aunque con menor potencia (Figura 49.3, Tabla 49.1).

La efectividad del ACV contra el citomegalovirus humano (HCMV) es muy inferior a la observada contra HSV y VZV, por lo que se ha desarrollado el ganciclovir (Figura 49.3) que permite una terapia satisfactoria para HCMV, especialmente en pacientes inmunocomprometidos que suelen presentar cuadros de retinitis, neumonía y problemas gastrointestinales. El ganciclovir actúa de manera similar al ACV. Dado que el virus no posee una TK propia, la primera fosforilación es realizada por una quinasa celular. Ganciclovir no es terminador de cadena, por tener un OH libre en el 3' y tiene un perfil de toxicidad sensiblemente superior al ACV produciendo neutropenia y trombocitopenia. También se ha licenciado recientemente el valganciclovir (Figura 49.3) que, como sucede con el valaciclovir y ACV, posee superior biodisponibilidad oral que el ganciclovir.

4.1.2 Resistencia antiviral: drogas alternativas

La aparición del SIDA así como el incremento en la realización de trasplantes con la consiguiente inmunosupresión del paciente han producido el resurgimiento en estos individuos de infecciones herpéticas, tanto por HSV como HCMV, con graves manifestaciones clínicas ante la falla del sistema inmunológico del hospedador para acelerar su control. Esto conlleva a la ne-

cesidad de un tratamiento prolongado con ACV o ganciclovir, según el virus, y la consecuente aparición de mutantes virales resistentes a la droga. El fenómeno de resistencia se da espontáneamente ante la presencia continua de una droga que no consigue eliminar totalmente a la población viral contra la que está dirigida. En esas condiciones, los virus sobrevivientes ante la presión selectiva ejercida por el tratamiento continuado con la droga generan mutaciones en el gen que codifica la proteína que es el blanco del compuesto antiviral.

En el campo de los herpesvirus no se produce, en general, aparición de mutantes resistentes en individuos inmunocompetentes, ya que las infecciones son controladas por la acción conjunta de la droga antiviral y la respuesta inmune del hospedador. Pero en los pacientes inmunocomprometidos se ha registrado en forma creciente la selección de variantes virales que no responden al tratamiento antiviral luego de una terapia prolongada. La presencia de mutantes resistentes a una droga en uso se comprueba haciendo la determinación de la CE_{50} del virus que se aísla del paciente que ha dejado de responder a la terapia, y comparando el valor que se obtiene con la CE_{50} del virus que originó la infección, si se dispone de la muestra, o en su defecto de una cepa de referencia. Un incremento significativo en la CE_{50} para el virus del paciente es indicativo de la presencia de mutantes resistentes y de la necesidad imprescindible de cambiar el antiviral utilizado en la terapia. El análisis molecular a nivel genómico de las variantes resistentes a ACV -ACV^R- ha mostrado que las mutaciones pueden estar en los genes correspondientes a las dos enzimas virales

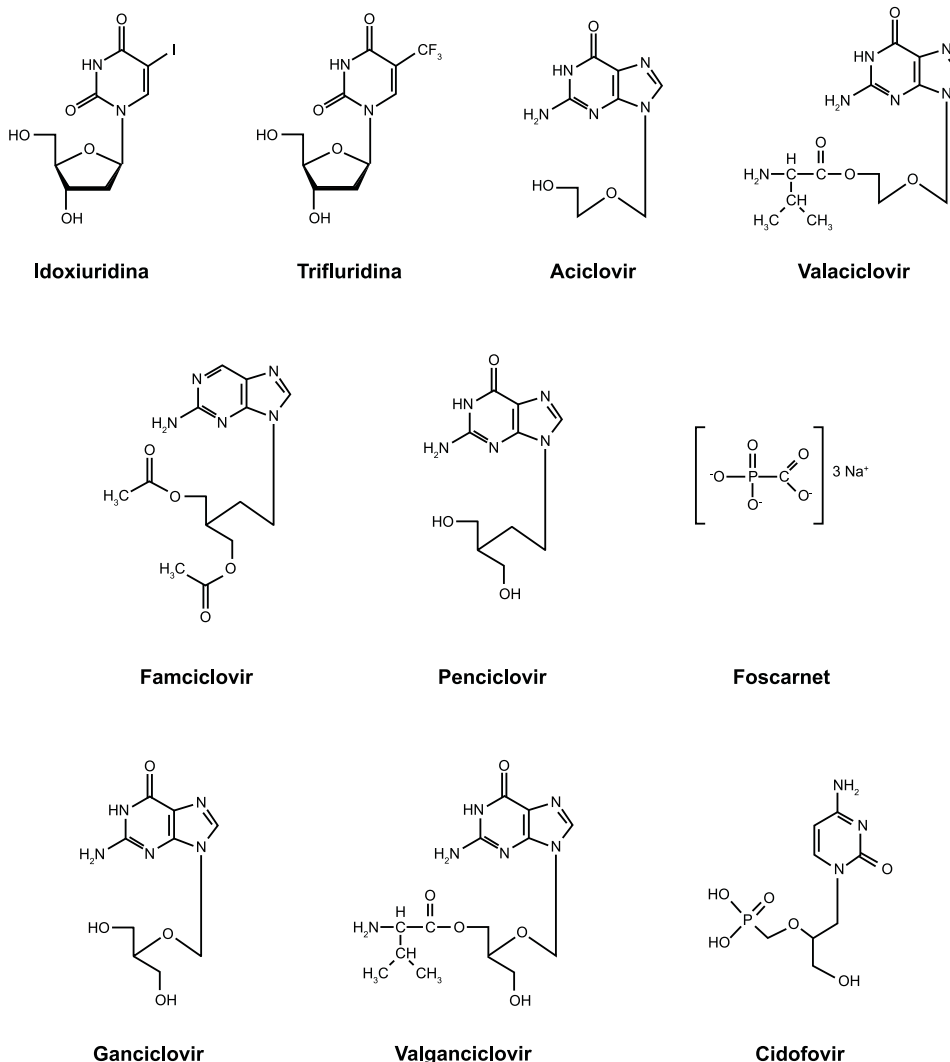


Figura 49.3. Drogas antivirales aprobadas para el tratamiento de las infecciones herpéticas.

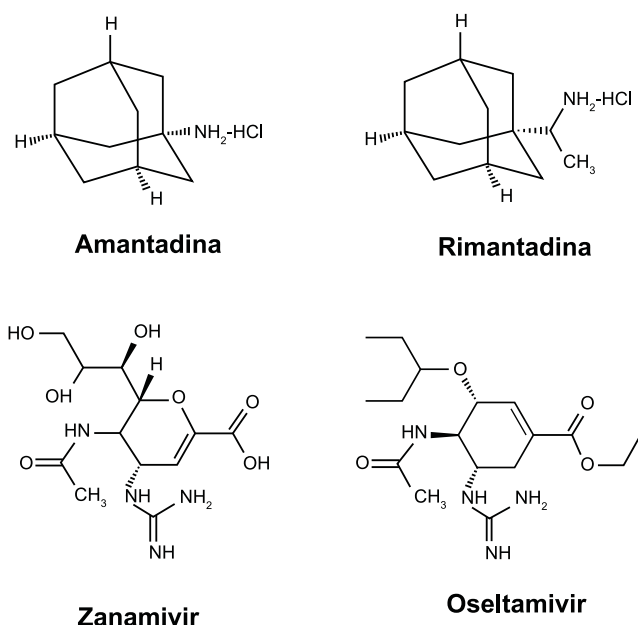


Figura 49.6. Drogas aprobadas para el tratamiento de las infecciones respiratorias por virus influenza.

compuestos licenciados para el tratamiento de las infecciones por HBV son análogos de nucleósidos desarrollados originalmente para HIV. Los compuestos lamivudina y emtricitabina (Figura 49.5) inhiben la actividad de transcriptasa inversa de la enzima, es decir, la elongación de la cadena negativa de DNA viral, por inhibición competitiva con el sustrato natural, dCTP, y son además terminadores de la cadena de DNA. Varios estudios mostraron que el descenso inicial de la viremia en los pacientes tratados con lamivudina se correlacionaba con la seroconversión a positividad para el antígeno e (HBe), indicador de la supresión de replicación viral. El compuesto adefovir (Figura 49.5) es un análogo fosfonado que requiere sólo dos fosforilaciones para activarse y bloquear también la síntesis de DNA viral.

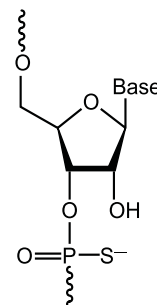
La efectividad de los análogos se ha visto limitada por la selección de variantes virales resistentes a estos compuestos que se produce en las terapias prolongadas que requiere la infección crónica con HBV para mantener bloqueada la multiplicación viral. Así, por ejemplo, la tasa de resistencia a lamivudina alcanza al 20% luego de un año de tratamiento y 60% a los 4 años. La resistencia se produce por selección de mutantes en la polimerasa viral y el análisis genómico de las mutantes aisladas ha mostrado que lamivudina y emtricitabina seleccionan el mismo tipo de mutantes, en tanto que adefovir selecciona mutaciones en otro dominio de la enzima. En base a estos datos, se recurre al adefovir para la terapia de HBV resistente a lamivudina.

4.2.2 Hepatitis C

En una situación similar a la descrita para HBV, alrededor de 200 millones de personas están crónicamente infectadas con HCV y, en algunos países, esta infección es la principal causa determinante de la necesidad de trasplantes de hígado. El tratamiento actual utiliza IFN- α con resultados precarios. Además de los conocidos efectos colaterales, sólo parte de la población infectada responde a esta terapia porque el IFN no es activo contra todos los tipos conocidos de HCV. En los últimos años se ha demostrado que la coadministración de IFN con ribavirina es una terapia más efectiva. La ribavirina (Figura 49.5) es un análogo de guanosina, de amplio espectro antiviral *in vitro* contra diferentes virus con genoma de RNA, cuyo principal modo de acción parece ser por inhibición de la enzima celular inosina monofosfato (IMP) dehidrogenasa, afectando la biosíntesis del nucleótido GTP. En años recientes, se

5'-d-[G*C*G*T*T*T*G*C*T*C*T*T*C*T*T*C*T*T*G*C*G]-3'

Secuencia nucleotídica del formiviren



Estructura de una unidad de ODN fosforotioato

Figura 49.7. Estructura química de formiviren, oligodeoxinucleótido antisentido aprobado para uso clínico en infecciones con HCMV.

ha demostrado que la ribavirina actúa, además, como un mutágeno en el RNA, forzando a los virus con genoma de RNA a una acumulación letal de mutaciones llamada catástrofe de errores, efecto que se complementaría con su actividad de inhibidor de la IMP dehidrogenasa. De todos modos, esta droga produce también efectos colaterales no deseados, por lo que la necesidad de agentes efectivos para HCV se mantiene como una demanda prioritaria en la quimioterapia antiviral.

HCV es un virus que posee varias enzimas que podrían ser blancos atractivos para la quimioterapia. Entre ellas, se hallan la RNA polimerasa viral (producto del gen NS5b), una proteasa (producto del gen NS3/4a) responsable de clivar la poliproteína que es el producto de traducción del genoma viral y una helicasa (producto de NS3) que participa en la síntesis de RNA viral. En 2011 y 2013 la FDA aprobó el uso humano de 2 drogas que inhiben la proteasa NS3/4a: boceprevir y telaprevir, respectivamente. Una variedad de compuestos contra NS3 y NS5b se encuentran en desarrollo y ensayo en la actualidad.

4.3 INFECCIONES RESPIRATORIAS

Los intentos de desarrollar drogas efectivas contra virus respiratorios se han centrado especialmente en los virus influenza, virus sincicial respiratorio y rinovirus. Las drogas actualmente licenciadas para uso contra virus respiratorios se presentan en la Tabla 49.1, donde puede observarse que los mayores logros se han conseguido para el virus de la gripe. Debido a las pandemias que produce este virus, con una muy elevada tasa de mortalidad por aparición de nuevos virus en la población humana, ya sea por adaptación al humano de cepas provenientes de su reservorio aviar o rearreglo entre genes de un virus humano y un virus aviar, el virus influenza ha sido un polo de atracción para la industria farmacéutica en la búsqueda de antivirales efectivos. Desde la década de 1960 se dispone de la amantadina, una amina primaria, y la rimantadina, derivada de la anterior (Figura 49.6), ambas efectivas para el tratamiento temprano de las infecciones con influenza A. Su mayor aplicación está en la profilaxis en pacientes inmunocomprometidos y alérgicos a la vacuna. Ambas drogas actúan por interacción con la proteína viral M2, que cumple funciones de canal iónico cuando el virus ha entrado al endosoma y permite el desnudamiento completo de la partícula viral, de modo que la nucleocápside sea liberada al citoplasma y pase al núcleo celular para su posterior transcripción y replicación. Este mecanismo se ha comprobado por aislamiento de mutantes de influenza resistentes a amantadina y rimantadina que presentan mutaciones en el gen que codifica por la proteína M2. Desde el punto de vista clínico, los mayores inconvenientes de estas drogas son su falta de actividad contra influenza B, los

efectos secundarios que suelen presentar y la rápida generación de resistencia viral.

Más recientemente se han aprobado dos drogas muy potentes para las infecciones con influenza, oseltamivir y zanamivir (Figura 49.6), que son inhibidores de la neuraminidasa de influenza A y B y parecen inducir menos resistencia que amantadina. La función de la neuraminidasa es vital para permitir la diseminación del virus a partir de la célula infectada hacia otras células y a través del tracto respiratorio, incrementando la infectividad viral, por lo que representa un blanco antiviral ideal. En la etapa final del ciclo de multiplicación de influenza, cuando se produce la brotación del virión a partir de la célula, la neuraminidasa cliva el ácido siálico terminal del receptor celular para el virus y de esa forma impide que el virus vuelva a adherirse a la célula infectada, por lo que se limita su propagación.

Todos los antivirales descritos en las secciones precedentes fueron descubiertos siguiendo el método tradicional de ensayo empírico de una gran cantidad de compuestos y sus derivados químicos, sin tener de antemano información detallada de los mecanismos moleculares de inhibición. Por el contrario, zanamivir y oseltamivir son un ejemplo paradigmático del diseño racional de una droga antiviral dirigida contra un blanco elegido previamente. El conocimiento de la estructura cristalina de la neuraminidasa, glicoproteína de la envoltura de influenza, y su sustrato el ácido neuramínico o siálico, permitió el diseño de ambas drogas. A través del diseño asistido por computadora se identificó el zanamivir como inhibidor específico que interactúa con residuos aminoácidos conservados en el sitio activo de la neuraminidasa. Esta droga tiene baja biodisponibilidad oral, por lo que se administra en forma tópica por inhalación (Tabla 49.1). En la búsqueda de inhibidores de la enzima con mejor biodisponibilidad oral, se diseñaron modificaciones químicas en la molécula de zanamivir, comprobándose por cristalografía que los grupos químicos modificados pudieran acomodarse en el sitio activo de la enzima. Así se logró el compuesto oseltamivir, efectivo en el tratamiento y prevención oral de las infecciones por influenza (Tabla 49.1).

A pesar de su efectividad, estos antivirales contra influenza no han tenido aún gran aplicación en la práctica clínica. Las razones se hallan en las características inherentes a la infección por influenza, que produce una enfermedad con un período relativamente corto de replicación viral, que prácticamente concluye cuando podría iniciarse la terapia. Es decir, para ser efectivo el compuesto debe administrarse dentro de las 48 horas de la aparición de signos clínicos, lo que resulta difícil de concretar para la mayoría de los pacientes y los profesionales médicos. Asimismo, en las etapas tempranas, los síntomas de la gripe son difíciles de diferenciar de otras infecciones respiratorias como el resfrío común por rinovirus o la infección por adenovirus. Por estas razones, la utilización de estos antivirales está centrada particularmente en la profilaxis en comunidades de mayor riesgo, como ancianos o niños, o frente a un brote de mayor virulencia o la perspectiva de una naciente pandemia, como la que emergió en 2009.

Las mismas dificultades mencionadas en el párrafo anterior se aplican para todas las infecciones respiratorias, donde se requeriría un diagnóstico rápido diferencial, para que el inicio del tratamiento específico para el virus sea lo más inmediato posible. En este campo, el virus sincicial respiratorio (RSV) produce bronquiolitis, siendo una causa frecuente de hospitalización en niños con cuadros graves. La única terapia actualmente disponible es la ribavirina en aerosol (Tabla 49.1), a pesar de las reacciones adversas a esta droga mencionadas anteriormente.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS: APLICACIÓN DE LA GENÓMICA PARA EL DISEÑO DE ANTIVIRALES

El uso de la información obtenida a partir del conocimiento de la secuenciación y organización de los genomas virales ha permitido encarar una estrategia antiviral dirigida directamente a bloquear la expresión de los diferentes genes virales, atacando los correspondientes RNAm. Para ello, hay dos opciones metodológicas aplicables: la estrategia antisentido con oligodeoxinucleótidos (ODN) y el silenciamiento con pequeños RNA interferentes (siRNA).

En el primer caso, la idea es utilizar pequeños oligodeoxinucleótidos antisentido, es decir, una cadena simple de DNA complementaria a una secuencia determinada del RNAm viral, de modo que el ODN se aparee al RNAm e impide la expresión de la proteína. Para que sea específico, es decir, que reaccione exclusivamente con la secuencia blanco, se ha establecido que el ODN debe tener por lo menos 15 nucleótidos. Las principales dificultades en el uso de ODN como agente terapéutico son su entrada a la célula y su estabilidad frente a la acción degradativa de las nucleasas. Para asegurar una mayor estabilidad, los nucleótidos del ODN son modificados por agregado de sustituyentes químicos, como por ejemplo -S o -CH₃ en el fosfodiéster. Como son polianiones, en general no entran por difusión pasiva a través de la membrana celular; en algunas células se ha descrito la presencia de receptores que se unen a polianiones, si no deben ser vehiculizados con un medio lipídico o insertados en un vector viral o plasmídico. También hay que asegurar que sean retenidos en la célula, ya que en ocasiones sufren exocitosis a una velocidad mayor a la velocidad de apareamiento con su RNAm blanco. Todas estas dificultades han desalentado las posibilidades de éxito en su aplicación terapéutica. Al presente hay un único agente antiviral antisentido aprobado para uso clínico. Es un ODN fosforotioato, es decir, con un sustituyente de S en el grupo fosfato (Figura 49.7) llamado formivirsen, aprobado para el tratamiento intraocular en la retinitis por HCMV (Tabla 49.1). Es un ODN formado por 21 nucleótidos (Figura 49.7), reactivo con el RNAm de una proteína temprana inmediata de HCMV, la proteína IE2. Se recomienda su uso especialmente en pacientes con SIDA donde el tratamiento contra HCMV debe ser prolongado, por su total carencia de toxicidad en comparación con ganciclovir.

La interferencia por pequeños RNA es la más novedosa herramienta en el campo de las estrategias antivirales, basada en un mecanismo enzimático que se ha descubierto en células animales en el año 2001. Consiste en el bloqueo de los RNAm con pequeñas moléculas de RNA doble cadena, de alrededor de 20 nucleótidos de longitud, llamadas siRNA. El siRNA se acopla a un sistema enzimático celular llamado RISC (del inglés, *RNA induced silencing complex*, es decir, complejo de silenciamiento inducido por RNA), que consiste básicamente en una helicasa y una endonucleasa; la primera abre la doble cadena del siRNA, la hebra antisentido se aparee con la secuencia homóloga blanco en el RNAm, y luego la endonucleasa corta el RNAm en la región apareada y lo degrada. Esta metodología presenta algunos de los problemas mencionados para los ODN, en cuanto a la entrada en la célula, pero el siRNA no modificado es más estable y ha ganado en un par de años más aceptación que los ODN antisentido en dos décadas, por su mayor facilidad aparente desde el punto de vista de la implementación tecnológica. La utilidad de los siRNA en animales y en el desarrollo preclínico aún no se ha establecido, pero ha despertado grandes expectativas como una nueva plataforma terapéutica como lo indican la gran cantidad de ensayos realizados en los últimos dos años con numerosos virus de importancia sanitaria humana.

NOTA

Este capítulo se finalizó en el año 2008.



Bibliografía

- Brady RC, Bernstein DI. "Treatment of herpes simplex virus infections". *Antiviral Res* 2004;61:73-81.
- De Clercq E. "Antiviral drugs in current clinical use". *J Clin Virol* 2004;30:115-33.
- De Clercq E. "Strategies in the design of antiviral drugs". *Nature Rev* 2002;1:13-25.
- Littler E, Oberg B. "Achievements and challenges in antiviral drug discovery". *Antiviral Chem Chemother* 2005;16:155-68.
- Paroo Z, Corey DR. "Challenges for RNAi in vivo". *Trends Biotechnol* 2004;22:390-394.
- Torrence PF (editor) *Antiviral drug discovery for emerging diseases and bioterrorism threats*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2005.
- Zoulim F. "Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic Hepatitis virus infection". *Antiviral Res* 2004;64:1-15.

Introducción al tratamiento antirretroviral y resistencia en la infección por HIV-1

Mauricio G. Carobene - Horacio Salomón

1. TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

La historia natural de la infección por HIV-1 en países industrializados ha sido modificada luego de la implementación de esquemas terapéuticos antirretrovirales. Especialmente las terapias antirretrovirales combinadas (HAART, *highly active antiretroviral therapy*) han redundado en una sustancial mejora de la calidad de vida de los individuos infectados, así como en la reducción de la morbilidad asociada con la infección por el HIV-1. El objetivo principal de las terapias antirretrovirales combinadas es suprimir la replicación del HIV-1 tanto como sea posible, manteniendo la carga viral plasmática a niveles indetectables, retrasando la progresión a la enfermedad y reduciendo la posibilidad de aparición de resistencia a las drogas utilizadas.

1.1 INHIBIDORES DE LA ENTRADA Y LA FUSIÓN (FIs)

Una clase de drogas recientemente desarrollada es la que inhibe la fusión de membranas del HIV-1 (o de una célula infectada con HIV-1) y de una célula no infectada, reduciendo la replicación viral. Los estudios de proteínas virales de fusión de membranas muestran un motivo de horquilla común que facilita la aposición de las membranas viral y celular durante la entrada del virus a la célula. En el caso del HIV-1, un intermediario transitorio de pre-horquilla es un blanco atractivo para potentes péptidos antivirales derivados de gp41. Dos de estos péptidos han sido desarrollados (T20 y T1249) para unirse a la gp41, bloqueando la fusión del HIV-1 por interferencia con determinados cambios conformacionales requeridos para el ingreso del HIV-1 a la célula blanco.

1.2 INHIBIDORES NUCLEOSÍDICOS DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA -RT- (NRTIs, NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS)

Los inhibidores nucleosídicos de la RT (NRTIs) actúan imitando a los desoxinucleósidos, precursores de los sustratos naturales de la RT del HIV-1. Los NRTIs inhiben la replicación del HIV-1 fundamentalmente por dos mecanismos:

- Luego de la conversión a la forma trifosfato, compiten con los desoxinucleótidos trifostato (dNTPs) naturales por la unión a la RT, enzima viral necesaria para la replicación del HIV-1.
- Al ser incorporados en la cadena naciente de DNA, inducen la terminación de su síntesis por carecer de grupos hidroxilo en posición 3' del anillo de desoxirribosa o de estructuras análogas.

Los NRTIs pueden ser clasificados en dos subgrupos: análogos de la timidina y no análogos de la timidina. La zidovudina (AZT) y estavudina (d4T), que pertenecen al primer subgrupo, serían preferentemente activos contra el HIV-1 presente en células CD4⁺ activadas. Los no análogos de la timidina, dentro de los que se encuentran la didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC) y abacavir (ABC), tendrían una actividad equivalente en células CD4⁺ activadas y en reposo. El conocimiento actual sobre los mecanismos de metabolización hacia la forma activa de estos inhibidores apoya el uso racional de drogas de ambos subgrupos en conjunto para potenciar la efectividad en diferentes tipos celulares.

Familia	Droga (nombre y abreviatura)
Inhibidores de entrada y fusión (FIs)	Enfurvitida (T20)
Inhibidores nucleosídicos de transcriptasa inversa (NRTIs)	Abacavir (ABC) Didanosina (ddI) Lamivudina (3TC) Emtricitabina (FTC) Stavudina (d4T) Zalcitabina (ddC) Zidovudina (AZT)
Inhibidores no nucleosídicos de transcriptasa inversa (NNRTIs)	Efavirenz (EFV) Nevirapina (NVP) Delavirdina (DLV)
Inhibidores nucleotídicos de transcriptasa inversa	Tenofovir (TDF)
Inhibidores de proteasa (IPs)	Amprenavir (APV) Atazanavir (ATZ) Indinavir (IDV) Lopinavir/r (LPV) Nelfinavir (NFV) Ritonavir (RTV) Saquinavir (SQV)
Inhibidores de integración (STIs)	Raltegravir (RAL)
Inhibidores de entrada (EIs)	Enfurvitida (T20) Maraviroc (MVC)

Tabla 50.1. Principales agentes antirretrovirales en uso.

1.3 INHIBIDORES NUCLEOTÍDICOS DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA

Los inhibidores nucleotídicos de la RT funcionan de la misma manera que los NRTIs, con la diferencia que los primeros se encuentran previamente monofosforilados, facilitando así la activación intracelular por medio de la fosforilación. En consecuencia, el análogo de nucleótido es activo en un amplio espectro de tipos celulares, incluyendo linfocitos y macrófagos en reposo. Dentro de esta familia se encuentran el adefovir (que debió ser retirado del mercado por su toxicidad) y el tenofovir (TFV), recientemente incorporado a la práctica clínica.

1.4 INHIBIDORES NO NUCLEOSÍDICOS DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA (NNRTIs, NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS)

Esta clase de antirretrovirales también inhibe la replicación del HIV-1 mediante la interferencia con la transcripción inversa. Sin embargo, los NNRTIs poseen una estructura diferente a la de los NRTIs e inhiben la RT del HIV-1 por mecanismos no competitivos:

se unen a un bolsillo hidrofóbico cercano al sitio catalítico de la enzima. La principal limitación de los NNRTIs ha sido el rápido desarrollo de resistencia, demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* con regímenes no supresivos de la replicación. Este fenómeno puede ser retrasado con el uso de combinaciones potentes que disminuyen los niveles plasmáticos de RNA viral por debajo del límite de detección. Dentro de esta familia se encuentran: nevirapina (NVP), efavirenz (EFV) y delavirdina (DLV).

1.5 INHIBIDORES DE LA INTEGRASA VIRAL (INs, INTEGRASE INHIBITORS)

El raltegravir (RAL) pertenece a una clase de drogas llamadas inhibidores de la integrasa del HIV, aprobado por la FDA para su uso en el tratamiento de la infección en 2007. Estos compuestos inhiben el proceso de transferencia de cadena (*strand transfer inhibitors*, STIs) entre el DNA proviral y el DNA cromosómico del hospedador, paso fundamental para la replicación viral. Raltegravir ha demostrado ser efectivo tanto en individuos infectados vírgenes de tratamiento como en aquellos que ya han recibido tratamiento antirretroviral previamente.

1.6 INHIBIDORES DE LA ENTRADA VIRAL (EIs, ENTRY INHIBITORS)

La entrada viral representa actualmente uno de los blancos terapéuticos más atractivos a la hora de buscar nuevas drogas para el tratamiento de la infección por HIV-1. Como resultado del avance del estudio de los mecanismos de entrada viral, esta etapa ha sido dividida en: (i) unión de la proteína viral gp120 al receptor celular CD4, (ii) unión de gp120 a un correceptor CCR5 o CXCR4 y (iii) fusión de la envoltura viral con la membrana celular.

Para cada una de estas instancias se han identificado compuestos capaces de inhibirlas, sin embargo sólo dos han sido aprobados para el tratamiento: enfurvitida o T20 y maraviroc. El primero es un péptido sintético capaz de unirse a una región (HR1) de la gp41 viral e interferir con el cambio conformacional requerido para el acercamiento de la envoltura viral y la membrana celular que permite la fusión de ambas, mientras que el segundo es un antagonista de CCR5 capaz de bloquear la unión de gp120 a dicho correceptor. Enfurvitida es efectivo como inhibidor tanto para cepas virales que utilizan CCR5 como para aquellas que utilizan CXCR4, mientras que maraviroc sólo es efectivo para las primeras.

Tanto enfurvitida como maraviroc son consideradas drogas de rescate, es decir que son utilizadas en aquellos casos en que las opciones terapéuticas son limitadas. Sin embargo, maraviroc está siendo incorporado en tratamientos de primera y segunda línea debido a características tales como su vía de administración (oral), buena tolerancia y pocos efectos adversos. En Argentina, sin embargo, se mantiene como droga restringida a pacientes con antecedentes de múltiples fallos al tratamiento, en gran medida por su costo elevado.

1.7 INHIBIDORES DE LA MADURACIÓN VIRAL (MIs, MATURATION INHIBITORS)

La maduración es el último estadio en el ciclo replicativo del HIV. Este implica el correcto procesamiento proteolítico de los precursores de las proteínas virales, su ensamblado en viriones y la liberación de los mismos desde la membrana plasmática de la célula infectada. Una clase de moléculas en desarrollo, clasificadas como inhibidores de la maduración, inhiben la correcta maduración de los viriones dando lugar a partículas incapaces de infectar productivamente nuevas células. MPC-4326, también conocido como bevirimat, es el primer inhibidor de esta clase producido y que se encuentra en fase 2 de ensayo clínico. Otros compuestos de la misma clase (MPC-9055, MPI-461359 y MPC-9528) se encuentran actualmente en etapas tempranas de distintos ensayos clínicos y pre-clínicos.

1.8 INHIBIDORES DE LA PROTEASA VIRAL (PIs, PROTEASE INHIBITORS)

A diferencia de los inhibidores de la RT, que actúan en la fase temprana del ciclo replicativo del HIV-1 impidiendo la nueva infección

de células, los inhibidores de la proteasa (PIs) actúan en fases tardías del ciclo replicativo, impidiendo la producción de virus infeccioso. Los PIs bloquean la PR del HIV-1, enzima necesaria para la producción de viriones maduros. En presencia del PI, las partículas virales nuevas que se crean son defectivas, no siendo capaces de infectar una nueva célula. Dentro de esta familia se encuentran: indinavir (IDV), ritonavir (RTV, nelfinavir (NFV), saquinavir (SQV), amprenavir (APV), y el recientemente incorporado lopinavir (LPV).

1.9 TRATAMIENTOS COMBINADOS

Dado que los NRTIs, los inhibidores nucleotídicos de la RT, los NNRTIs y los PIs actúan mediante mecanismos distintos y/o en etapas diferentes de la replicación viral, existe una base racional para el uso de estas clases de drogas en forma conjunta con el fin de alcanzar un efecto inhibitorio incrementado contra la replicación del HIV-1. Alternativamente, también existe una fuerte base racional para el uso de terapias altamente potentes dirigidas hacia un blanco, dejando al otro blanco virgen para eventuales terapias de rescate.

2. VARIABILIDAD DEL HIV

Con el objetivo de lograr una mejor comprensión sobre el fenómeno de resistencia a las drogas antivirales, en este capítulo se detallan las principales fuentes de variación genética involucradas en la evolución y patogenia viral y en el fenómeno de resistencia.

El HIV es uno de los virus conocidos más variables. Posee una gran plasticidad genética con consecuencias importantes para el hospedador a nivel inmunológico y patogénico, así como también tiene implicancias epidemiológicas y evolutivas.

Una característica fundamental de la replicación continua del HIV-1 es la baja fidelidad de la enzima transcriptasa inversa (RT, *reverse transcriptase*). Por ello se generan mutaciones puntuales en el genoma del virus, sustituciones de una base por otra y la inserción o delección de bases. Otra fuente importante de variabilidad está dada por mecanismos de recombinación.

2.1 MUTACIÓN

Las sustituciones de bases corresponden al reemplazo de un nucleótido por otro diferente durante la formación del DNA viral. Estas mutaciones pueden clasificarse en tres grupos:

Sinonímicas. El aminoácido codificado por el codón resultante es el mismo que en la proteína de cepa salvaje (*wild-type*)

Con cambio de sentido. El aminoácido codificado por el codón resultante difiere del presente en la proteína de la cepa salvaje.

Sin sentido. El nuevo codón codifica para una señal de terminación de la traducción.

En las mutaciones sinonímicas, ni la estructura de la proteína codificada por el gen ni su actividad se verá afectada. Por otra parte, cambios en la secuencia de aminoácidos pueden llevar o no a cambios estructurales y funcionales en las proteínas según la importancia que tenga el residuo afectado dentro del polipéptido. Finalmente, cambios sin sentido generarán proteínas truncadas; según el lugar donde ocurra la interrupción, se podrán ver o no afectadas la estructura y actividad proteicas.

2.2 INSERCIONES Y DELECCIONES

Son adiciones o pérdidas de una o más bases, lo que puede alterar el marco de lectura del código genético si el resultante de la adición o delección no es múltiplo de tres. El cambio de marco de lectura lleva a cambios de sentido en los codones corriente abajo (*downstream*) y a la aparición prematura de codones de terminación, por lo que

generalmente se verán alteradas la estructura y actividad proteica de la zona afectada.

2.3 RECOMBINACIÓN

La recombinación ocurre frecuentemente durante la transcripción inversa como consecuencia del empaquetamiento de dos hebras de RNA genómico dentro de cada virión y de la capacidad de la RT del HIV-1 de transferir una cadena naciente de DNA de un molde a otro, dando origen a una nueva cadena de DNA de origen mixto.

3. CUASIESPECIES Y RESISTENCIA A DROGAS. CONCEPTO DE FITNESS VIRAL

El HIV posee distintos mecanismos que le permiten escapar tanto de la presión del sistema inmunológico como de la presión farmacológica. Como se mencionara anteriormente, la escasa fidelidad de la RT en la replicación del RNA viral, sumada al gran número de viriones existentes en la población viral infectante (cerca de 10^{12}) y a la extraordinaria cinética de replicación viral (con una vida media plasmática inferior a 6 horas), favorecen la aparición espontánea de múltiples variantes denominadas **cuasiespecies**. La continua producción de estas variantes proporciona al virus una gran capacidad de adaptación a los cambios en el ambiente.

Fitness es un parámetro que se define como la capacidad de adaptación replicativa de un organismo a un ambiente determinado. Dentro de la población viral cada cuasiespecie tiene un *fitness* característico, representativo de aquellas propiedades virales que se encuentran bajo selección en un ambiente en particular.

La evaluación de la capacidad replicativa relativa de las diferentes variantes virales presentes en la población infectante es uno de los temas cuya importancia viene en aumento desde hace unos años debido a que permiten profundizar el conocimiento acerca del efecto de la presencia de mutaciones asociadas a resistencia sobre la replicación viral. Los resultados obtenidos permiten entender el comportamiento de una población viral sometida a presión selectiva por drogas y, en un futuro, permitirían tomar decisiones terapéuticas que faciliten el control de la infección, y hacer predicciones en lo que a progresión a enfermedad respecta.

En ausencia de terapia antirretroviral, las variantes virales portadoras de mutaciones asociadas a resistencia tienen un *fitness* reducido en comparación con las variantes tipo salvaje (WT, *wild-type*) presentes en la población. Con la implementación del tratamiento, la presión selectiva ejercida sobre la población viral provoca un cambio drástico en la distribución de cuasiespecies. La población viral atravesará una *cuello de botella* poblacional inducido por las drogas y esto dará origen a una nueva población en la cual la distribución de cuasiespecies estará gobernada nuevamente por la eficacia replicativa.

La resistencia del HIV-1 a drogas antirretrovirales puede ser definida en sentido amplio como cualquier cambio en la biología viral que mejore su capacidad replicativa en presencia del inhibidor, mejora expresada siempre en relación a cepas tipo salvaje. La misma constituye, por tanto, no el único, pero sí un factor de gran importancia para explicar el fracaso virológico de un determinado tratamiento antirretroviral.

La falla del tratamiento antirretroviral se evidencia como la disminución de la calidad de vida del paciente, y puede monitorearse con marcadores inmunológicos (recuento de células CD4⁺) y virales (carga viral plasmática). La aparición de variantes del HIV resistentes a drogas es un factor importante en la falla terapéutica ocurrida en pacientes bajo terapia antirretroviral.

El fenotipo resistente a drogas fue reportado inicialmente durante el tratamiento con AZT; sin embargo, la selección de variantes resistentes ha sido observada para todos los compuestos antirretrovirales aprobados para el tratamiento de la infección. Los datos provenientes del análisis de secuencias nucleotídicas de virus resistentes ha permitido identificar mutaciones puntuales en los genes que codifican para los principales blancos de las drogas antirretrovirales, RT y PR,

que resultan en sustituciones aminoacídicas simples y que se han asociado a distintos fenotipos resistentes. Las mutaciones que confieren resistencia pueden transmitirse durante las infecciones de *novo*, provocando su diseminación en la población.

4. RESISTENCIA A DROGAS ANTIRRETROVIRALES

4.1 GENOTIPO Y FENOTIPO

Para comprender en profundidad los detalles del fenómeno de la resistencia del HIV-1 a drogas antirretrovirales es imprescindible definir dos conceptos: genotipo y fenotipo.

Genotipo. El genotipo se define como la secuencia nucleotídica de la cual se puede deducir la secuencia aminoacídica de las proteínas de interés. Esta secuencia puede ser comparada con un genotipo de una cepa salvaje de referencia. Los cambios observados a nivel nucleotídico pueden o no reflejarse en cambios en la secuencia aminoacídica deducida. La nomenclatura utilizada para expresar los cambios de aminoácido consiste en indicar el código del aminoácido presente en la variante salvaje, la posición dentro de la molécula donde ocurrió el cambio y el código del nuevo aminoácido. Por ejemplo, la mutación M184V indica que el residuo metionina presente en la cepa de referencia en la posición 184 de la RT ha sido sustituido por el residuo valina.

Fenotipo. Se define como el conjunto de propiedades biofísicas evaluables de un organismo, resultante de la interacción de su genotipo con el entorno.

El fenotipo *resistente in vitro* se define como la capacidad del virus de replicar en presencia de un inhibidor, comparada con un virus susceptible control (cepa salvaje).

La susceptibilidad *in vitro* se expresa ya sea como la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) o concentración inhibitoria 90 (IC₉₀), y corresponde a la concentración requerida para inhibir la replicación viral en un 50 ó 90%, respectivamente. Por lo tanto, si un virus de cepa salvaje tiene una IC₅₀ de 100 nM para una droga en particular y la cepa ensayada posee una IC₅₀ de 800 nM, ésta última presenta un fenotipo resistente con una disminución de la susceptibilidad hacia la droga de 8 veces.

4.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL HIV-1 A DROGAS ANTIRRETROVIRALES

El mecanismo por el cual el HIV-1 se torna resistente a las drogas antirretrovirales varía con el tipo de droga, dado que cada fármaco actúa mediante un mecanismo de acción diferente. En general, los cambios asociados a resistencia se localizan en las regiones codificantes para las enzimas blanco de la acción de la droga, por ejemplo, mutaciones en la RT para los NRTIs y NNRTIs, y cambios en la PR para los PIs. Sin embargo, se han evidenciado también cambios co-evolutivos en los sustratos virales de las enzimas del HIV-1 afectadas; en particular, en los sitios de clivaje de la PR sobre la poliproteínas Gag y Gag-Pol.

4.2.1 Resistencia a NRTIs

Se han caracterizado tres mecanismos de resistencia a las drogas de la familia de los NRTIs. El primer mecanismo es mediado por mutaciones en la RT que permiten discriminar entre el sustrato natural (desoxinucleótido trifosfato) y el NRTI, impidiendo la adición del inhibidor a la cadena de DNA en elongación. Éste sería el caso de las mutaciones en la RT asociadas a resistencia a ddI, ddC, d4T, 3TC, ABC y algunos de los cambios asociados con resistencia a AZT. El segundo mecanismo es el reposicionamiento del complejo molde-cebador, que sería observado en variantes del HIV-1 resistentes a 3TC. El tercer mecanismo es mediado por mutaciones que aumentan la tasa de remoción del NRTI terminador de cadena por pirofosforólisis (mediada por pirofosfato o ATP); esta reacción es llevada a cabo por la RT y permite la continuación de la síntesis de DNA. Este mecanismo está involucrado en la resistencia a AZT y d4T.

4.2.2 Resistencia a NNRTIs

La resistencia a los NNRTIs puede desarrollarse con rapidez cuando se administran en forma de monoterapia, fundamentalmente por la selección de mutaciones alrededor del sitio de unión del sustrato en la enzima. Estos cambios están asociados con una menor afinidad de la droga por la RT.

4.2.3 Resistencia a PIs

La resistencia a PIs está mediada por cambios estructurales en el sitio de unión al sustrato que resultan en una reducción de la afinidad por el sustrato. También pueden ocurrir cambios fuera del sitio de unión al sustrato, e involucrarían distintos mecanismos como la alteración de la catálisis enzimática, efectos en la estabilidad del dímero, alteraciones en la cinética de unión del inhibidor o cambio de la estructura del sitio activo a través de perturbaciones estructurales en *trans*.

4.2.4 Resistencia a STIs

La resistencia a RAL (el único STI aprobado para su uso terapéutico) involucra la selección de mutaciones primarias en el sitio catalítico implicando tres vías genéticas independientes y no solapadas: la mutación N155H, las mutaciones Q148H/R/K y las menos frecuentes Y143R/C/H. Estas mutaciones no sólo afectan la capacidad de la enzima de realizar la reacción de transferencia de cadenas en presencia del inhibidor sino que también pueden tener impacto en otros procesos de la replicación. Por ejemplo, la selección de Y143G ha sido relacionada con cambios en el proceso de transcripción inversa.

Al igual que para inhibidores de otras clases, numerosas mutaciones secundarias son seleccionadas, todas fundamentalmente relacionadas a mecanismos compensatorios de la actividad enzimática.

4.3 FENÓMENOS ASOCIADOS A LA RESISTENCIA

El fenómeno de resistencia en el contexto de la infección por el HIV-1 es muy complejo, y se complica aún más por la existencia de factores tales como la resistencia cruzada, la reversión de la resistencia y la resistencia a múltiples drogas:

Resistencia cruzada. Ocurre cuando la resistencia a una droga causa resistencia a otro u otros fármacos dentro de la misma clase de drogas. En el marco de las opciones terapéuticas actuales, es de sumo interés considerar que cualquier tratamiento elegido debe proveer un beneficio clínico máximo en el presente y flexibilidad en el futuro, en caso de que el esquema inicial fallara. La resistencia cruzada se puede encontrar en las tres principales familias de drogas.

Reversión de resistencia. Tiene lugar cuando las mutaciones asociadas a resistencia a una droga revierten el efecto de las mutaciones asociadas a resistencia a otra droga. Son numerosos los intentos de utilizar este fenómeno para la identificación de combinaciones de antirretrovirales más efectivos en el uso clínico. El ejemplo clásico, pero con consecuencias aún no bien definidas en el ámbito clínico, es el efecto supresivo de la mutación M184V en la RT (asociada a resistencia a 3TC) sobre la mutación en el codón 215 de la RT (asociada a resistencia a AZT).

Resistencia a múltiples agentes. Es el fenómeno de resistencia asociado a drogas que actúan mediante mecanismos distintos. Este es un problema emergente en el tratamiento del HIV dado el creciente uso de los esquemas terapéuticos combinados, así como el vasto empleo secuencial de los agentes. Se postula que la recombinación es uno de los factores más importantes relacionado al rápido desarrollo de variantes del HIV-1 con alto grado de resistencia a múltiples drogas.

4.4 MUTACIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES

Por consenso, las mutaciones asociadas a resistencia se clasifican en dos grandes categorías:

Mutaciones primarias. Están asociadas directamente a un grado mensurable de resistencia fenotípica a los agentes antirretrovirales; y

Mutaciones secundarias. Por sí solas confieren un muy bajo o nulo nivel de resistencia, pero al interactuar con las mutaciones primarias aumentan o restituyen la capacidad replicativa viral y/o aumentan el nivel de la resistencia a los agentes (Tabla 50.2).

5. ENSAYOS DE RESISTENCIA DEL HIV-1 A DROGAS ANTIRRETROVIRALES

En los últimos años, ha existido un interés considerable en el uso de ensayos que puedan determinar si un individuo posee variantes del HIV-1 resistentes a drogas antirretrovirales específicas. Los estudios empleados en la evaluación de la resistencia del HIV-1 han sido clasificados en dos categorías:

Los *ensayos genotípicos* permiten la detección de mutaciones características en el genoma del HIV-1 que han sido descritas como asociadas a resistencia a agentes antirretrovirales. Estos ensayos son altamente sensibles (detectan poblaciones virales presentes en un porcentaje mayor del 25%) y proveen una secuencia nucleotídica de la PR y RT (o información aislada sobre el estado de codones particulares) indicando las mutaciones presentes que fueron previamente asociadas a resistencia. Como se verá más adelante, las aplicaciones clínicas de los ensayos genotípicos se encuentran limitadas por discrepancias en la interpretación de los resultados.

Los *ensayos fenotípicos* permiten evaluar la capacidad del virus, presente en una muestra, de replicar en presencia de agentes antirretrovirales *in vitro*. Estos ensayos son una medida directa del grado de resistencia o susceptibilidad viral a agentes específicos. Como una medida directa de la resistencia, los ensayos fenotípicos tienen en cuenta el efecto neto de los cambios genotípicos y sus interacciones. Sin embargo, son complejos y demandan mucho tiempo, siendo su interpretación dificultosa. Además, no proveen información sobre la base subyacente de la resistencia, por lo que su uso no se encuentra ampliamente difundido.

5.1 ENSAYOS FENOTÍPICOS

Los ensayos fenotípicos para la caracterización de variantes virales resistentes a drogas pueden clasificarse en ensayos fenotípicos clásicos y ensayos fenotípicos recombinantes.

Ensayos fenotípicos clásicos: se basan en la cuantificación de la replicación viral en presencia de diversos fármacos.

Constan básicamente de los siguientes pasos:

1. Aislamiento viral.
2. Cultivo viral en presencia de inhibidores: se infectan células susceptibles y se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de la droga en estudio.
3. Medición del grado de replicación viral: la replicación en presencia de inhibidores se cuantifica por la medición de productos virales (antígeno p24) o la actividad de enzimas virales (ensayos de actividad de la RT) en el sobrenadante de cultivo.

Este tipo de ensayos fueron estandarizados por el *AIDS Clinical Trials Group* (ACTG) en 1993. Presenta varias desventajas como son su laboriosidad, el tiempo que insumen (4 a 6 semanas), su alto precio y el hecho de que deben ser realizados en estrictas condiciones de bioseguridad. Por otro lado, pueden conducir a errores debido a la selección de determinadas subpoblaciones del HIV-1 durante los sucesivos ciclos replicativos virales.

Ensayos fenotípicos recombinantes: utilizan la recombinación genética para producir lotes virales que serán sometidos a pruebas de susceptibilidad. Estos ensayos, llamados de virus recombinantes, se basan en el mismo principio que los ensayos clásicos, pero los pasos de aislamiento del virus del paciente son reemplazados por variantes virales generadas en laboratorio por medio de herramientas de biología molecular.



Abacavir	K65R , L74V, Y115F, M184V
Didanosina	K65R , L74V
Emtricitabina	K65R, M184V/I
Lamivudina	K65R, M184V/I
Stavudina	M41L , E44D, K65R, D67N, K70R, V118I, L210W , T215Y/F , K219Q/E
Tenofovir	K65R
Zidovudina	M41L, E44D, D67N, K70R, V118I, L210W, T215Y/F , K219Q/E
Delavirdina	K103N , V106M, Y181C , Y188L , P236L
Efavirenz	L100I, K103N , V106M, V108I, Y181C/I , Y188L , G190S/A , P225H
Nevirapina	L100I, K103N , V106A/M, V108I, Y181C/I , Y188C/L/H , G190A
Enfurvitida (gp41)	G36V, I37V, V38A , Q39R, N42D/T , N43D , L44M, L45M
Atazanavir	L10I/F/V, G16E, K20R/M/I, L24I, V32I, L33I/F/V, M36I/L/V, M46I/L, G48V, I50L , I54L/V/M/T, D60E, I62V, A71V/I/T/L, G73C/S/T/A, V82A/T, I84V , I85V, N88S , L90M, I93L
Indinavir	L10I/R/V, K20M/R, L24I, V32I, M36I, M46I/L , I54V, A71V/T, G73S/A, V77I, V82A/F/T , I84V , L90M
Lopinavir/ r	L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, V32I , L33F, M46I/L, I47V/A , I50V, F53L, I54V/L/A/M/T/S, L63P, A71V/T, G73S, V82A/F/T/S , I84V, L90M
Nelfinavir	L10F/I, D30N , M36I, M46I/L, A71V/T, V77I, V82A/F/T/S, I84V, N88D/S, L90M
Fosamprenavir	L10F/I/R/V, V32I, M46I/L, I47V, I50V , I54L/V/M, G73S, V82A/F/T/S, I84V , L90M
Ritonavir	L10F/I/R/V, K20M/R, V32I, L33F, M36I, M46I/L, I50V, I54V/L, A71V/T, V77I, V82A/F/T/S , I84V , L90M
Saquinavir	L10I/R/V, G48V , I54V/L, A71V/T, G73S, V77I, V82A, I84V, L90M
Raltegravir	E92Q, F121Y, E138AK, G140AS, Y143CHR, S147G, Q148HRK, N155HS, E157Q
Maraviroc	(*)
Enfurvitida	G36DEVs, I37V, V38EAMG, Q40H, N42T, N43DKS, L44 M, L45M
Bevirimat	(**)

Tabla 50.2. Mutaciones asociadas a resistencia a drogas utilizadas para el tratamiento de la infección por HIV-1. Las mutaciones determinantes de niveles elevados de resistencia para cada una de las drogas se detallan en negrita. (*) No existe consenso sobre el perfil de mutaciones asociadas a resistencia. (**) Compuesto en ensayo clínico, no existe información completa sobre mutaciones asociadas a resistencia.

5.2 ENSAYOS GENOTÍPICOS

Se basan fundamentalmente en dos principios distintos: la determinación de mutaciones puntuales y la determinación de la secuencia completa de la región de interés. En ambos casos se pueden usar diversos tipos de muestra, siendo los empleados con mayor frecuencia plasma y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), pudiéndose usar también LCR, biopsias de ganglios linfáticos, semen, etc.

A continuación se detallan algunos ensayos genotípicos:

Ensayos de secuenciación de DNA: estos ensayos proveen información de todos los nucleótidos en la región genómica secuenciada. Se basan en la reacción de terminación de cadena mediante didesoxinucleótidos (ddNTPs), diseñada por Sanger en la década de 1970. En la actualidad, el uso de la tecnología de secuenciación automática permite procesar un gran número de muestras en un breve tiempo.

En nuestro país, se utilizan protocolos desarrollados en los propios laboratorios o basados en información publicada por otros grupos de trabajo, así como equipos comerciales, entre los que se encuentran *HIV Genotyping System* (Applied Biosystems) y *TRU-GENE® HIV-1 Genotyping Assay* (Siemens).

Ensayos de mutaciones puntuales: estos ensayos sólo dan información sobre la naturaleza de un número limitado de codones en la región estudiada por cada reacción. La ventaja del ensayo es que permite ensayar un gran número de muestras simultáneamente, pero demostró tener poca utilidad a partir de la implementación de nuevos agentes antirretrovirales en la práctica clínica.

A partir de 1997 estuvo disponible una metodología basada en la detección de mutaciones puntuales, el ensayo de sondas alineadas (*Line Probe Assay* o LiPA, Innogenetics). Se trata de una hibridación diferencial de amplicones con sondas alelo-específicas para las diversas mutaciones.

El LiPA tiene la ventaja sobre los ensayos de secuenciación nucleotídica de ser más sencillo, requerir equipamiento menos complejo y permitir la detección de subpoblaciones virales poco prevalentes (aunque se desconocen las implicancias clínicas de estas últimas). Como desventaja, LiPA sólo da información sobre la presencia de determinados residuos aminoacídicos en los codones analizados, y no permite conocer el estado de otras posiciones de la PR y de la RT que tienen relevancia clínica.

5.3 PROBLEMAS INHERENTES A LOS SISTEMAS DE GENOTIPIFICACIÓN

5.3.1 Diversidad genética del HIV-1

Todo sistema que se base en reacciones de hibridación, ya sea para la amplificación o para la detección de alelos específicos, debe enfrentar la alta variabilidad que se asocia al HIV-1. En la mayoría de los casos, tanto los cebadores de amplificación y secuenciación como las sondas de hibridación alelo-específicas han sido diseñados tomando como base los motivos circulantes más prevalentes en América del Norte y Europa occidental, pertenecientes al subtipo B. Sin embargo, es muy poco lo que se conoce hasta el momento sobre la funcionalidad de los ensayos genotípicos en regiones donde otros subtipos y/o formas recombinantes entre subtipos son muy frecuentes.

5.3.2 Interpretación del genotipo

Antes de que pueda ser transferida al médico, la información genotípica cruda debe ser procesada. Es importante notar que esta información suele ser muy compleja, y más aún su interpretación, dado que el fenotipo del virus estudiado resultará de la interacción de las distintas mutaciones detectadas. Para que los sistemas de genotipificación puedan ser empleados en la práctica clínica han sido diseñados diversos algoritmos de interpretación de genotipo e inferencia de fenotipo. Algunos de ellos se basan en reglas propuestas por diversas instituciones o paneles de expertos. Éste es

el caso de los sistemas de la Universidad de Stanford (California, EE.UU.), y de *Visible Genetics* (Toronto, Canadá), que aceptan secuencias correspondientes al gen *pol*, monitorean el estado de las posiciones asociadas a resistencia y finalmente proveen un informe donde se indica la susceptibilidad deducida en base a las reglas antes mencionadas. Dado que el conocimiento actual sobre el efecto resultante de la interacción entre las mutaciones asociadas a resistencia dista mucho de estar completo, la utilidad de la interpretación basada en reglas puede ser limitada en el caso de genotipos complejos.

De amplio uso es también el sistema del Fenotipo Virtual (*VirtualPhenotype*, Virco, Bélgica). Éste se fundamenta en bases de datos relacionales con información genotípica y fenotípica de miles de aislamientos. Cuando se ingresa una secuencia, el sistema recorre su base de datos en busca de aislamientos con genotipos de características similares y para los que existen datos del fenotipo *in vitro*. Luego, reporta la IC₅₀ promedio de dichos aislamientos y clasifica a la muestra como sensible o resistente a los diversos antirretrovirales en base a valores de corte arbitrarios.

5.4 ENSAYOS GENOTÍPICOS VERSUS FENOTÍPICOS

PARA EL ESTUDIO DE LA RESISTENCIA

Tanto los ensayos de genotipificación como los de fenotipificación ofrecen información sobre la susceptibilidad del virus circulante en un paciente, pero cada uno de estos ensayos presenta sus ventajas y desventajas, por ello deben tenerse en cuenta factores como:

Complejidad/Tiempo/Costo. Los ensayos de genotipificación son más sencillos que los fenotípicos, menos laboriosos, requieren menos tiempo para la obtención de un resultado y son de menor costo. Dada la complejidad de los ensayos fenotípicos, sólo pueden ser llevados a cabo en un número limitado de laboratorios.

Interpretación. Dado que los ensayos fenotípicos proveen directamente el valor de IC₅₀ son de más fácil interpretación que los genotípicos, ya que éstos ofrecen una compleja lista de las mutaciones detectadas. Para facilitar el análisis de los resultados de genotipo se están perfeccionando los sistemas de interpretación, incluyendo el fenotipo virtual, pero aún resulta complicada la interpretación del genotipo. A esto contribuye el desconocimiento del efecto fenotípico de las combinaciones de mutaciones.

Detección de poblaciones virales minoritarias. Ninguno de los dos tipos de ensayo es capaz de resolver adecuadamente mezclas en las que subpoblaciones del HIV-1 se encuentren en proporciones menores al 20-25%.

Existen diversos estudios que tratan de evaluar el grado de correlación de diversos sistemas genotípicos con los de estudios fenotípicos. Sin embargo, hasta el momento no está claro si cada tipo de ensayo dará información complementaria al otro, si deben usarse en forma combinada o si su utilización pudiese ser de forma indistinta. Posiblemente, en el caso de pacientes con complejos patrones de mutaciones, los ensayos de fenotipo podrían proveer una información más útil.

6. LA RESISTENCIA DEL HIV-1 A ANTIRRETROVIRALES COMO CAUSA DE FALLA DEL TRATAMIENTO

El fin de los tratamientos antirretrovirales es mejorar la calidad de vida de los individuos infectados con el HIV-1. Desde el punto de vista virológico el objetivo es suprimir completamente la replicación viral, evitando la infección de nuevas células, previniendo el deterioro inmunológico y, eventualmente, llevando a la erradicación del HIV-1 del organismo. Los esquemas terapéuticos disponibles actualmente aún no son capaces de lograr este fin, sin embargo, se persigue alcanzar niveles no detectables de carga viral plasmática y recuentos de células CD4⁺ que garanticen un estado inmunológico aceptable.

La prevalencia de variantes del HIV-1 resistentes a una droga antirretroviral en una determinada población con falla terapéutica es función de numerosas variables. Entre otras podemos mencionar:

Frecuencia del uso actual de la droga en cuestión. A mayor empleo de un agente es de esperarse una mayor prevalencia de virus resistentes a dicha droga.

Empleo en el pasado de la droga en cuestión. Dada la cinética de replicación del HIV-1, variantes resistentes seleccionadas durante tratamientos anteriores pueden permanecer en las poblaciones de virus replicantes o en provirus quiescentes dentro del individuo. Este fenómeno tiene más importancia para las primeras drogas que aparecieron en el mercado cuando eran utilizadas en esquemas de monoterapia o de terapia dual (hoy en día considerados como regímenes sub-óptimos, pero en el pasado constituían las únicas opciones terapéuticas).

Frecuencia de resistencia natural. Se han descrito variantes virales presentes en individuos vírgenes de tratamiento que portaban mutaciones asociadas a resistencia a determinados agentes previa al uso de los mismos.

Barrera genética. Se refiere a la cantidad y tipo de mutaciones necesarias para alcanzar un genotipo resistente. Aquellas drogas en las que basten pocas mutaciones para que la variante se torne resistente a un antirretroviral seleccionarán más rápidamente mutantes resistentes.

Farmacocinética / farmacodinamia. Dado que la variabilidad del HIV-1 se incrementa durante la replicación viral, el grado de supresión de la replicación por parte de la/s droga/s (potencia de la droga o esquema terapéutico) condicionará la emergencia de mutaciones primarias y secundarias asociadas a resistencia. En algunos casos, la concentración de un antirretroviral administrado es la correcta pero, debido a interacciones medicamentosas, se alcanzan concentraciones subóptimas del agente observándose el fenómeno antedicho. Por otro lado, drogas con vida media corta permitirán la selección de variantes resistentes en los valles de concentración. Además, es de suma importancia la distribución de la droga, ya que los sitios donde replique el virus y donde no se alcancen concentraciones adecuadas de los agentes como para suprimir la replicación constituirán *santuarios* donde se podrían seleccionar variantes resistentes.

Complejidad posológica. Agentes antirretrovirales que deban ser administrados en esquemas posológicos complejos harán más propicia la falta de adherencia completa al régimen y expondrán al virus a concentraciones subóptimas de droga durante períodos variables de tiempo.

Resistencia cruzada. Ocurre cuando un genotipo resistente seleccionado por una droga confiere, también, baja susceptibilidad a otras drogas. Esto lleva a la falta de efectividad de drogas antirretrovirales nunca antes empleadas en el paciente, reduciendo más las alternativas terapéuticas para el tratamiento de rescate.

Interacción entre las mutaciones. En el caso de genotipos complejos, la interacción de las distintas mutaciones puede llevar a una disminución del nivel de resistencia a otras drogas o, incluso, a una hipersusceptibilidad a algunos agentes terapéuticos.

7. GENOTIPO/FENOTIPO VIRAL E IMPLEMENTACIÓN DE TRATAMIENTO

El desarrollo e implementación de drogas inhibitoras de la entrada viral, a nivel de la unión de la gp120 viral y el correceptor CCR5 (maraviroc) para el tratamiento de la infección por HIV exige actualmente el desarrollo y uso de ensayos efectivos y sensibles que permitan caracterizar el tropismo del virus infectante. Como se des-

cribera anteriormente, sólo la replicación de cepas que utilicen el correceptor CCR5 resulta inhibida por maraviroc, por lo tanto es necesario contar previamente con la información referida al tropismo viral en cada caso particular a tratar. A la fecha se encuentran disponibles ensayos fenotípicos (Trofile™, HIV-1 Phenoscript® Env) y genotípicos para determinar tropismo viral.

Los ensayos fenotípicos son laboriosos y costosos y consisten básicamente en la generación de virus quiméricos en los que se introduce la secuencia codificante para la envoltura viral (env), y que son sometidos a evaluación *in vitro* de uso de correceptores en cultivos celulares. La sensibilidad alcanzada por estos ensayos permite la detección de variantes dentro de la población viral total cuya frecuencia sea hasta de un 0,3% (Trofile™ES).

Los ensayos genotípicos hacen uso de las técnicas de secuenciación genómica para obtener información sobre la región codificante para envoltura y luego realizar un interpretación algorítmica (Geno2pheno^{coreceptor}, PSSM, WetCat, SVM, C4.5) de la secuencia obtenida que permite predecir el uso de correceptores con elevada precisión.

La detección de variantes que utilicen el correceptor CXCR4 invalida el uso de estos inhibidores.

8. CONCLUSIONES

Como se ha mencionado previamente, la variabilidad genética es uno de los caracteres distintivos del HIV-1. En cada ciclo replicativo se generan variantes virales similares pero no idénticas a las parentales, de las que pueden distinguirse por distintos atributos. Entre estas diferencias podrían encontrarse cambios en las secuencias de la PR y de la RT que podrían conducir a la disminución de los efectos inhibitorios de las drogas sobre la replicación viral. Para que estas cuasiespecies resistentes a antirretrovirales emerjan deben darse dos hechos críticos. Por un lado, deben existir niveles

suficientes de replicación viral, fuente de la variabilidad del HIV-1. Por otro lado, debe existir una presión selectiva que favorezca a las variantes resistentes sobre las de cepa salvaje. Queda claro que los regímenes terapéuticos que no supriman la replicación viral favorecerán la selección de variantes resistentes, según modelos *darwinianos*. Asimismo, las variantes resistentes al replicar en presencia del inhibidor podrán seguir mutando, generando diversidad y serán sustrato de la selección, incrementándose el grado de resistencia por mutaciones secundarias.

En los casos de pobre adherencia al tratamiento, se somete al virus durante períodos variables, a niveles no supresores de la replicación pero sí capaces de seleccionar variantes resistentes. Allí se encuentra una de las principales razones por las que se insiste en el cumplimiento de la posología, siendo también de gran interés el desarrollo de esquemas de dosificación más sencillos, con menor número de toma diaria y limitados efectos no deseables.

Efectos similares a los de la pobre adherencia podrán también ser observados en caso de una absorción incompleta del fármaco o en aquellos casos en que existan interacciones entre drogas que lleven a la falta de supresión de la replicación viral en presencia de las drogas antirretrovirales.

Sin embargo, no están completamente aclaradas las consecuencias que las mutaciones asociadas a resistencia podrían tener sobre la capacidad replicativa del HIV-1. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que el avance del conocimiento en este área (introducción de nuevos fármacos, estudios de eficacia sobre combinaciones de drogas, conocimiento de la dinámica y evolución de las poblaciones virales, mecanismos de acción, etc.) ha determinado que las sociedades científicas relacionadas a este tema y las autoridades de salud desarrollen guías donde se establecen recomendaciones sobre tratamiento y evaluación de resistencia.

Bibliografía

- Baldwin CE, Sanders RW, Berkhout B. "Inhibiting HIV-1 entry with fusion inhibitors". *Curr Med Chem* Sep 2003; 10: 1633-42.
- Broder S. "The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic". *Antiviral Res* 2010; 85:1-18. Review.
- Carobene MG, Rubio AE, Carrillo MG, Maligne GE, Kijak GH, Quarleri JF, et al. "Differences in frequencies of drug resistance-associated mutations in the HIV-1 pol gene of B subtype and BF intersubtype recombinant samples". *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 1; 35:207-9.
- Clotet B. "Strategies for overcoming resistance in HIV-1 infected patients receiving HAART". *AIDS Rev* 2004; 6: 123-30. Review.
- Geretti AM. "HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management". *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 1-7. Review.
- Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, Pillay D, et al. "Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: 2005". *Top HIV Med* 2005; 13: 51-7. Review.
- Marchand C, Maddali K, Métifiot M, Pommier Y. "HIV-1 IN inhibitors: 2010 update and perspectives". *Curr Top Med Chem* 2009; 9:1016-37. Review.
- Kijak GH, Simon V, Balfe P, Vanderhoeven J, Pampuro SE, Zala C, et al. "Origin of human immunodeficiency virus type 1 quaspecies emerging after antiretroviral treatment interruption in patients with therapeutic failure". *J Virol* 2002; 76: 7000-9.
- Recomendaciones sobre el tratamiento antirretroviral en adultos. Programa Nacional de lucha contra los retrovirus del humano, SIDA y ETS. Ministerio de Salud y Medio Ambiente de la Nación. 2007 (disponible en <http://www.msal.gov.ar/sida/rterap.asp>).
- Recomendaciones sobre el tratamiento antirretroviral. Sociedad Argentina de Infectología. 2010 (disponible en <http://www.sadi.org.ar>)
- Rose JD, Rhea AM, Weber J, Quiñones-Mateu ME. "Current tests to evaluate HIV-1 coreceptor tropism". *Curr Opin HIV AIDS*. 2009;4:136-42. Review.
- Van Opijnen T, Berkhout B. "The host environment drives HIV-1 fitness". *Rev Med Virol* 2005; 15: 219-33. Review.
- Wainberg MA, Brenner BG, Turner D. "Changing patterns in the selection of viral mutations among patients receiving nucleoside and nucleotide drug combinations directed against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase". *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1671-8. Review.

Virología ambiental: virus transmitidos por agua y alimentos

María Susana López de Cailou

1. AGUA: RECURSO ESTRATÉGICO DEL SIGLO XXI

En la mayoría de los países todavía predominan los peligros para la Salud Pública que guardan relación con el medio ambiente, como alimentos y agua insalubres, contaminación microbiana del ambiente y en general, saneamiento deficiente. El aumento de la población y su concentración en las ciudades se han traducido en la proliferación de zonas urbanas marginales que ejercen una presión cada vez mayor sobre una infraestructura ya precaria, lo cual exacerba el déficit de viviendas y el insuficiente abastecimiento de agua potable a la población, además de dificultar la evacuación apropiada de aguas residuales, excretas y residuos sólidos. Estas condiciones favorecen la alta incidencia de enfermedades diarreicas y epidemias como por ejemplo las de hepatitis A.

La salud y el ambiente son los componentes principales del desarrollo sostenible de los pueblos. La meta "gente sana en un ambiente sano" requiere más que la aplicación de la tecnología médica o incluso que el esfuerzo pleno del sector de la salud trabajando aisladamente. Es necesario que todos los sectores, organizaciones e individuos aúnen esfuerzos para que el desarrollo socioeconómico sea humano y sostenible y constituya una base ambiental adecuada para la salud. Una estrategia imprescindible para alcanzar estos objetivos es la formación de profesionales de la salud preparados para prevenir y controlar los problemas ambientales.

El agua como primer recurso de supervivencia y salud debe gestionarse adecuadamente y es fundamental recuperar las fuentes de aguas contaminadas. Los estudios de rutina de calidad microbiológica de agua se limitan al control bacteriológico sin tener en cuenta el protagonismo de los virus transmitidos por agua como causa de enfermedad esporádica o epidémica, la resistencia viral a la mayoría de los tratamientos convencionales usados en aguas para consumo o en aguas residuales y su persistencia en condiciones extremas en el medio ambiente.

Existe consenso en la comunidad científica que la microbiología del agua en el tercer milenio es mucho más que el recuento de coliformes fecales y otros indicadores bacterianos, que tienen desventajas que los hacen poco fiables para predecir contaminación fecal o la ocurrencia de otros patógenos transmitidos por agua. En la actualidad, se debe considerar el rol de los virus para lograr el saneamiento del agua y la protección de la salud y en el futuro cercano, será la importancia de los virus (*virio-plankton*) en la estructura de una comunidad acuática. La Virología Ambiental es una ciencia aplicada que a través de la detección de virus en muestras ambientales tiene mucho que ofrecer y proponer para la salud pública: prevención de la transmisión de enfermedades y mantenimiento o restauración de la calidad del medio ambiente.

2. VIRUS TRANSMITIDOS POR AGUA Y ALIMENTOS

Más de 100 especies virales humanas y animales se han detectado en ambientes acuáticos. Colectivamente se los denomina virus entéricos, ya que infectan y replican en el tracto gastrointestinal y se transmiten por vía fecal oral. Pueden causar enfermedad en un hospedador susceptible que ingiere agua o alimentos contaminados, quien a su vez actuará como diseminador. Los virus de transmisión hídrica son responsables de manifestaciones clínicas diversas, desde infecciones asintomáticas a gastroenteritis, conjuntivitis, cardiopatías, hepatitis,

meningitis y encefalitis. Pertenecen a grupos taxonómicos diferentes: RNA de cadena simple: enterovirus, calicivirus, hepatitis A y E, astrovirus; RNA segmentado de doble cadena: rotavirus; y DNA de doble cadena: adenovirus.

Enterovirus. Pueden recuperarse de orofaringe e intestino de individuos infectados clínicamente o subclínicamente. Se eliminan durante un mes o más por heces y la contaminación fecal oral es la causa usual de infección; Sin embargo, gotas o aerosoles originados por estornudos o tos también son fuente directa o indirecta de algunos enterovirus. Son estables en aguas naturales y residuales.

Hepatitis A. Es extremadamente resistente a la degradación bajo condiciones ambientales. Se ha demostrado su recuperación de agua dulce y salada, aguas residuales, suelo, sedimentos marinos y mariscos, y puede persistir hasta seis meses en aguas subterráneas contaminadas con residuos cloacales. El mayor brote documentado por hepatitis A ocurrió en Shangai en 1988 y afectó a 300.000 personas que consumieron almejas contaminadas.

Hepatitis E. Es causa de enfermedad esporádica y brotes epidémicos en regiones con saneamiento inadecuado, más frecuentes en climas cálidos que templados. La mayoría de las epidemias ocurren por agua de bebida contaminada fecalmente y la transmisión de persona a persona parece ser no tan frecuente, quizás por el bajo nivel de virus en heces, a diferencia de hepatitis A. Hay evidencias que indican una transmisión zoonótica por ingestión de alimentos poco cocidos (cerdo, ciervo).

Calicivirus. Los norovirus junto a otros calicivirus son una de las principales causas de gastroenteritis en adultos en todo el mundo. Son relativamente estables y su persistencia en agua, aguas residuales y suelo es similar a la de otros virus entéricos como poliovirus. La eliminación de virus por heces declina luego del inicio de los síntomas y puede persistir de una a dos semanas. Las fuentes de los brotes son la contaminación fecal de agua, alimentos, mariscos, ensaladas o frutas y ocurren frecuentemente en campamentos, escuelas, guarderías y cruceros.

Rotavirus. Son la principal causa de gastroenteritis infantil. Se eliminan por heces hasta diez días del inicio de los síntomas y los títulos pueden ser tan altos como 10^{12} partículas virales/gramo de materia fecal. Son estables a pH ácido y sobreviven meses a temperaturas entre 4 y 20°C. Se transmiten por agua o alimentos contaminados o por contacto con superficies contaminadas.

Astrovirus. Se asocian con gastroenteritis en niños y adultos jóvenes, también afecta a mayores inmunocomprometidos. La excreción viral puede comenzar un día antes de los síntomas y continuar varios días después que se ha detenido la diarrea. La vía de transmisión es fecal-oral, de persona a persona. Los brotes ocurren por estrecho contacto en guarderías, escuelas y geriátricos.

Adenovirus. Los patrones epidemiológicos varían entre las diferentes especies y, aunque algunos causan gastroenteritis, la mayoría es responsable de infecciones respiratorias y oculares. Las infecciones asintomáticas son frecuentes e implican una prolongada eliminación viral por el tracto respiratorio e intestinal. Son muy estables a agentes físico-químicos y a condiciones extremas de pH (5 a 9,5) y temperatura (4 a 36°C). Estas propiedades les confieren la capacidad de sobrevivir fuera de las células hospedadoras por largos períodos y resistir a los tratamientos de aguas cloacales. Se han descrito brotes de fiebre faríngea-conjuntival por aguas recreacionales contaminadas y, aunque no hay evidencia

de epidemias por contaminación por agua de bebida o alimentos, se atribuye a los adenovirus un alto porcentaje de los brotes de origen hídrico.

Coronavirus, torovirus, picobirnavirus y pestivirus. Se consideran virus entéricos pero no hay evidencia sobre transmisión por agua o alimentos contaminados.

3. CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS EN MUESTRAS AMBIENTALES

Cantidad. Los virus no se multiplican en el ambiente y por lo tanto el contenido viral sólo puede mantenerse o disminuir. Potencialmente, casi todos los virus se pueden encontrar en aire, suelo, agua, alimentos o fomites pero en muestras ambientales, a diferencia de las clínicas, el número de partículas virales es escaso por efecto de la dilución o dispersión. Los virus deben ser extraídos y/o concentrados de muestras tan grandes como cientos de litros de agua, aire o gramos de suelo, barros cloacales o alimentos.

Tamaño. En la naturaleza los virus tienden a asociarse a materia orgánica y debido a su pequeño tamaño, quedan incluidos rápidamente a partículas sólidas en suspensión presentes en las aguas ambientales. Este fenómeno los protege de factores de inactivación y contribuye a su viabilidad.

Agregación. Hay una tendencia inherente de los virus a la agregación, fenómeno natural que se produce cuando los virus son liberados de células que infectan y numerosas partículas se agrupan en estructuras pseudocristalinas que no se rompen espontáneamente. El proceso es reversible dependiendo del pH y de la salinidad del ambiente. Esta agregación protege a los virus y puede ser la razón de su fuerte resistencia a los agentes desinfectantes o a la presión selectiva ambiental.

4. VIABILIDAD DE LOS VIRUS ENTÉRICOS

Las personas con infecciones entéricas excretan altas concentraciones de patógenos, hasta 10^{11} partículas virales/gr. de materia fecal durante días, semanas e incluso meses. Los virus entéricos tienden a ser más persistentes en ambientes acuáticos que la mayoría de las bacterias entéricas y su viabilidad depende de las características físico-químicas del agua así como del tipo viral. Pueden resistir a pH extremos, a la acción de enzimas y se recuperan de aguas residuales aún después de desinfección. Ejemplos: en los tratamientos de aguas cloacales, son termolábiles y quimiorresistentes, los rotavirus y la mayoría de los enterovirus; son termoestables y quimiolábiles, los parvovirus y hepatitis A. Otros ejemplos: hepatitis A, poliovirus 1 y echovirus 1 pueden persistir 12 semanas a 5° C (con diferentes % de inactivación) en aguas subterráneas, residuales y suelos.

Su incapacidad para reproducirse en agua o alimentos no certifica la seguridad del producto.

5. MÉTODOS PARA CONCENTRAR VIRUS ENTÉRICOS

Existen más de treinta métodos de concentración, lo que indica que no hay una técnica universal. Deben reunir los siguientes criterios: simplicidad, sensibilidad, alto rendimiento, que sea aplicable a diferentes tipos de virus, que el concentrado producido pueda utilizarse en sistemas de detección viral y del menor costo posible.

Aguas. Los métodos de adsorción - elución son los más utilizados para recuperar virus de grandes volúmenes de agua; tienen en cuenta las características de macromoléculas proteicas de los virus, es decir que actúan como coloides hidrofílicos de naturaleza anfotérica cuya carga eléctrica varía de acuerdo al pH y a la fuerza iónica del ambiente. En primer término, los virus adsorbidos sobre sustratos que tengan carga positiva o negativa según el pH y luego eluidos (separados) con soluciones proteináceas alcalinas. Las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que intervienen en el proceso predominan a pH bajo y a pH alto, respectivamente. Los sustratos de adsorción pueden ser sustancias granulares, membranas o filtros de cartucho.

Aguas residuales. Es imprescindible monitorear la presencia de virus si los efluentes y los barros cloacales (biosólidos) de las plantas de tratamientos se utilizarán en agricultura con propósitos definidos: riego, relleno y abono de suelos e incluso cuando los barros solamente se enterrarán en escombreras. Para liberar los virus asociados a sólidos se puede utilizar sonicación, hidroxietilación o agitación mecánica prolongada y luego centrifugación. Los sobrenadantes se pueden inocular directamente o concentrar por las técnicas antes mencionadas.

En el Laboratorio de la Cátedra de Virología de la Universidad Nacional de Tucumán hemos adaptado lana de vidrio como sustrato de adsorción para concentrar virus de aguas ambientales. Para recuperar virus de barros cloacales de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de San Miguel de Tucumán se utilizó agitación durante 20 h. a 4° C, centrifugación e inoculación en cultivos celulares.

Mariscos, frutas, vegetales y otros alimentos. Todos los virus entéricos se asocian a enfermedades transmitidas por alimentos en forma esporádica o de brotes epidémicos, aunque norovirus y hepatitis A son los más frecuentes. Hay dos esquemas generales para recuperar virus: extracción - concentración y adsorción - elución - concentración. El objetivo, en ambos casos, es separar los virus de la matriz del alimento, obtener un volumen pequeño de solución acuosa, libre de material citotóxico y recuperar la mayoría de los virus presentes para su detección por técnicas de aislamiento en cultivos celulares, o moleculares.

6. EPIDEMIOLOGÍA DE ENFERMEDADES VIRALES TRANSMITIDAS POR AGUA Y ALIMENTOS

Los avances en métodos epidemiológicos y de detección han colocado a los virus entéricos humanos en la categoría de enfermedades emergentes. Son transmitidos por vía fecal-oral y, como consecuencia, la principal fuente de contaminación de alimentos y agua es por contacto con heces humanas. Los patógenos virales difieren de las bacterias transmitidas por agua o alimentos: son inertes en el ambiente, no replican en el agua, alimentos o medio ambiente, son estables y resistentes a la mayoría de los métodos tradicionales utilizados para el control bacteriano y, además, tienen dosis infecciosas notablemente bajas. El rol de los virus en este tipo de patologías se confirma con el permanente aumento de citas en la bibliografía.

Cuando se analizan las estadísticas de epidemias producidas por agua o alimentos contaminados se encuentran altos porcentajes de "etiología viral", sin identificar el patógeno. La falla aparente para confirmar la etiología viral se debe principalmente a: falta de métodos adecuados, renuencia de autoridades de Salud Pública a utilizar criterios epidemiológicos para clasificar enfermedades transmitidas por agua y alimentos, falta de disponibilidad de muestras ambientales y fallas en el reporte de enfermedades gastrointestinales leves (no son de notificación obligatoria). Estos factores resultan en una subestimación del panorama y la importancia de la infección viral transmitida por alimentos. Asimismo, está poco claro el papel de la transmisión por alimentos contaminados como causa de enfermedad esporádica y la importancia del estado de portador y enfermedad secundaria después de un brote.

Para mejorar el conocimiento sobre la etiología viral de brotes provocados por agua y alimentos contaminados y la importancia clínica y económica de enfermedades debidas a estos agentes, es necesario intensificar la vigilancia epidemiológica, mediante la creación de centros de referencia basados en el número de habitantes y que focalice la prevención de enfermedades transmitidas por agua o alimentos.

El análisis de riesgo microbiano se complica por la carencia de datos sobre prevalencia, transmisión, dosis infecciosa y comportamiento de los virus en los alimentos. El empleo de datos de epidemiología emergente junto con modelos epidemiológicos, análisis estadísticos y sistemas de información geográfica, se podrán mejorar y así suministrar un cuadro más claro de los patrones de transmisión. La disponibilidad de métodos de detección rápidos y

seguros permitirá determinar prevalencia de enfermedad y conocer la relación de la tasa dosis-respuesta.

7. CONTROL DE VIRUS ENTÉRICOS EN AGUA Y ALIMENTOS

En el marco del objetivo N° 7 de los Objetivos de Desarrollo del Milenio de las Naciones Unidas, la meta 10 tiene como finalidad reducir el porcentaje de personas que carecen de acceso sostenible al agua potable y al saneamiento básico. Para el abastecimiento continuo de agua segura para consumo humano, la OMS considera prioritario: utilizar un recurso hídrico de la mejor calidad posible; proteger las fuentes y garantizar en forma permanente la desinfección del agua. Este enfoque se conoce como barrera múltiple: selección, protección y tratamiento.

La desinfección del agua de bebida por cloración, desde su comienzo en los años 1900, ha desempeñado un papel fundamental en Salud Pública, especialmente en la reducción de riesgos para enfermedades de transmisión hídrica y, junto con la filtración resultó en una impactante declinación de epidemias. La clave del cloro es su accesibilidad, su razonable costo, su alta capacidad oxidante, que es el mecanismo de destrucción de la materia orgánica, y su efecto residual. Todo ello permite asegurar la inocuidad del agua desde que se capta hasta que se usa, tanto en sistemas pequeños como en redes de distribución extendidas. El cloro en cualquiera de sus formas (gaseoso o compuestos de cloro) se hidroliza en contacto con el agua y forma ácido hipocloroso, que se disocia en iones hidrógenos e hipoclorito y adquiere sus propiedades oxidantes. El ácido hipocloroso y el ión hipoclorito están presentes cuando el pH varía entre 6 y 9, por lo que la OMS recomienda para una desinfección adecuada un pH < 8. Ambas fracciones son microbicidas y actúan inhibiendo la actividad enzimática de las bacterias y virus y produciendo su inactivación.

Para el tratamiento del agua es necesario exponer adecuadamente el desinfectante y dosificarlo suficientemente por un determinado período: concentración de desinfectante final en mg/l y tiempo mínimo de exposición en minutos, producto que se expresa como TC. Para virus entéricos se debe alcanzar una reducción de 4 log (99,99%) y la OMS para agua de bebida indica valores de 12 mg-min./litro 0–5°C; 8 mg-min./litro a 10° C, a pH 7- 7,5.

Otros factores importantes en la desinfección son la temperatura ($a > T^{\circ} > TC$) y la turbidez. Si ésta es excesiva reduce la efectividad por absorción del cloro y protege a los microorganismos de su efecto oxidante. La OMS recomienda una turbiedad < 5 Unidades Nefelométricas de Turbidez.

Todos los desinfectantes (excepto la luz UV) producen subproductos de desinfección (SPD) y en el caso del cloro muchos son cancerígenos. Se estima que tomar agua sin desinfectar implica que una persona corre un riesgo 1.000 veces mayor de morir por una enfermedad diarreica, que morir por un cáncer asociado a

la ingesta de aguas. Estos riesgos se deben tener en cuenta, pero en ningún caso en detrimento de la protección contra el riesgo a corto plazo.

En el caso de aguas residuales, es imprescindible tratar los efluentes si los barros cloacales originados se utilizarán en agricultura o incluso cuando los barros se enterrarán en escombreras. La mayoría de los tratamientos convencionales de aguas residuales sólo transfieren los virus a los barros. Actualmente, se considera apropiado un criterio integrado para minimizar los riesgos para la salud y el tratamiento de aguas residuales debe ser sólo una de las medidas consideradas al planificar proyectos de aprovechamiento, junto con la restricción de cultivos, el control de la utilización de aguas residuales, el control de la exposición y el fomento de la higiene.

El gran desafío para el siglo XXI es el reuso controlado de aguas residuales que reducirá la contaminación ambiental de aguas subterráneas y superficiales.

Los alimentos pueden entrar en contacto con microorganismos patógenos en cualquier punto de su trayectoria de la granja a la mesa. Las estrategias de intervención incluyen: buenas prácticas manufactureras y agrícolas (por ejemplo: calidad del agua), instalaciones sanitarias adecuadas, salud e higiene de los trabajadores que manejan alimentos (vacunación), educación del público (la mayoría de los brotes están asociados con manipulación incorrecta de alimentos en la vivienda) y, especialmente, el desarrollo y la aplicación de herramientas que faciliten la detección y reducción del riesgo microbiano.

8. PERSPECTIVAS

Para mejorar el conocimiento sobre la etiología viral de enfermedades por agua y alimentos contaminados, la importancia clínica y económica de enfermedades debidas a estos agentes es necesario:

- Estandarizar técnicas de concentración y detección de virus en muestras ambientales.
- Intensificar la vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por agua y alimentos.
- Crear Laboratorios de Referencia en el país para monitorear virus en aguas.
- Legislar sobre el tema, estableciendo valores estándares de virus.

La combinación de mayor vigilancia, el desarrollo de métodos de detección y la exigencia de controles implicará mejorar la detección, investigación y control de los virus entéricos transmitidos por alimentos y agua.

Es imprescindible incorporar tópicos ambientales en la investigación y diagnóstico de las infecciones virales, para contribuir al equilibrio entre la salud de los ecosistemas y de la población que los habita.

Bibliografía

- APHA, AWWA, WPCF. "Detección de virus entéricos". En: Díaz de Santos editor. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales., 17ª Edición 1992, 9: 179-210.
- Caillou S, Castagnaro N, Naval M. "Barros cloacales: adaptación de una técnica para recuperación de enterovirus". *Rev Arg Microbiol*, 1998; 30: 96-9.
- Caillou, M. S. L. "Teaching Environmental Virology. Primer Simposio Latinoamericano de Virología Ambiental. Río de Janeiro, Brasil. Mayo 2010". <http://www.ioc.fiocruz.br/Virolambiental/site/ing/index.html>
- Fong TT, Lipp EK. "Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools". *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69:357-71
- Hurst C. "Detection of viruses in environmental waters, sewage and sewage sludges". En: Hurst, CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV. Editors. "Manual of environmental Microbiology". Washington DC, ASM Press, 2001; p 168-175.
- Schwartzbrod, L. Section 2: "Viral ecology in aquatic environments". En: Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sewage sludge in agriculture and aquaculture. World Health Organization, Series WHO Report No. WHO/EOS/95.19. http://whqlibdoc.who.int/hq/1995/WHO_EOS_95.19.pdf.
- Vilaginés, Ph; Sarrette, B and Vilaginés, R. "Glass wool for virus concentration from water at ambient pH levels". *Wat Sci Tech* 1993; 27: 299-306.
- Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]:incorporating 1st and 2nd addenda, Vol.1, Recommendations. – 3rd ed. World Health Organization. ISBN 978 92 4 154761 1 (WEB version) (NLM classification: WA 675)

PARTE 6

Epidemiología molecular de algunas Infecciones Virales en Argentina

Evolución viral

Rodolfo H. Campos - Viviana Mbayed

1. INTRODUCCIÓN

En el proceso evolutivo, la dotación genética de la población de un organismo cambia a través del tiempo, es decir, a lo largo de varias generaciones.

Este cambio resulta de un proceso que se cumple en dos etapas independientes: a) la generación de heterogeneidad genética (por mutación, recombinación o reasociación), y b) el enriquecimiento de una determinada variante genética dentro de la población (resultado de un proceso de selección o deriva genética). Mientras la generación de heterogeneidad es un proceso guiado fundamentalmente por el azar, el enriquecimiento de una determinada variante es el resultado de la reproducción diferencial de los distintos genomas integrantes de la población bajo determinadas modificaciones en el ambiente: aquellas variantes genéticas con mayor éxito replicativo y supervivencia darán una descendencia más numerosa y por lo tanto estarán sobre-representados en la siguiente generación. La medida de esa capacidad reproductiva se denomina *aptitud*. Este enriquecimiento puede ser también consecuencia de un proceso de deriva genética en el que la frecuencia de las diversas variantes fluctúa azarosamente. Las variantes que devienen mayoritarias en las nuevas poblaciones no son necesariamente las de mayor aptitud (*fitness*). Los ejemplos más frecuentes de este mecanismo resultan de eventos de cuello de botella (*bottleneck*).

Se ha asociado acertadamente a la evolución con el estudio del pasado, de los orígenes. El conocimiento del proceso evolutivo de una determinada población viral (desde sus orígenes hasta el presente) estimula la elaboración de hipótesis respecto al porvenir. El análisis evolutivo tiene además, al correlacionar el conocimiento genético molecular con sus implicancias biológicas, una importante transferencia hacia otras áreas del conocimiento como la epidemiología (origen y descripción de brotes), la ecología (virus emergentes, origen de virus), la patología (prognosis de enfermedades virales).

Desde principios de la década de los cincuenta del siglo XX, los virólogos observaron la importancia de los estudios evolutivos, en particular del análisis de la variación viral (diferentes características fenotípicas como tamaño de placa de lisis, sensibilidad a la temperatura de propagación, rango de hospedadores) y su asociación con virulencia y patogenicidad. Pero la limitada calidad y cantidad de información útil que se tenía por entonces restringía el estudio de la evolución ya que en Virología, además de la ausencia de fósiles virales, las características fenotípicas antes mencionadas tienen una utilidad muy limitada.

Sin embargo, éste es un tiempo promisorio para el estudio de la evolución viral. Este cambio se debe al incremento significativo de la información disponible como resultado de las continuas mejoras en las técnicas moleculares (fundamentalmente secuenciamiento de nucleótidos) y en el desarrollo de instrumentos para el análisis filogenético (bioinformática).

2. MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE LOS VIRUS

Los elementos más empleados para este tipo de estudio son secuencias de nucleótidos, fragmentos de restricción y secuencias de aminoácidos, ya que el proceso básico de la evolución del DNA

consiste en cambios en la secuencia de nucleótidos a través del tiempo.

A partir de esta información se establecen las relaciones filogenéticas entre individuos y su vinculación con el proceso evolutivo que han seguido. El análisis filogenético molecular ha sido aplicado por distintas ramas de las ciencias biológicas ya que permite reconstruir historias evolutivas a partir de información contemporánea. El conocimiento de las conexiones evolutivas entre distintos virus ha permitido, por ejemplo, obtener información acerca de su origen. En este sentido, se ha podido establecer la existencia de un ancestro común único entre distintos individuos (origen monofilético) y el tiempo estimado de divergencia desde ese ancestro. La identificación de relaciones filogenéticas estrechas entre virus ha contribuido al conocimiento de la distribución geográfica de cepas virales particulares. La clasificación taxonómica de algunos microorganismos ha experimentado modificaciones luego de la introducción de métodos de filogenia molecular en el análisis. La epidemiología también se vio beneficiada con la aplicación de estas metodologías para el estudio de brotes epidémicos y rutas de transmisión de agentes virales. Finalmente, el desarrollo de vacunas también contó con la contribución del conocimiento de las relaciones filogenéticas entre distintas cepas virales.

Las genealogías de los virus podrán ser correctamente reconstruidas si se utilizan para el análisis elementos homólogos, es decir, derivados de un ancestro común. Así entendido, el estudio de las relaciones filogenéticas permitirá reconstruir historias evolutivas y analizar la velocidad de evolución viral.

Convencionalmente, las relaciones evolutivas se describen en términos de árboles filogenéticos bifurcantes. Los árboles se componen de nodos y ramas. Los nodos pueden ser internos, representantes de secuencias ancestrales, o externos, representantes de las secuencias analizadas, también denominadas unidades taxonómicas operacionales (en inglés se utiliza el acrónimo OTUs). Las ramas muestran cuáles son las relaciones entre las unidades taxonómicas. Si el árbol está representado a escala (filograma) la longitud de las ramas horizontales es proporcional a la divergencia entre las unidades. La topología del árbol representa su patrón de ramificación. Se puede explicitar la dirección de la evolución, imponiéndole una raíz al árbol, que representa al posible ancestro común a todas las taxas analizadas. Para un número dado de unidades taxonómicas, la cantidad de topologías posibles de árboles con raíz es mucho mayor que las que no exhiben raíz (Figura 52.1).

Para la reconstrucción de estos árboles filogenéticos se cuenta actualmente con diversos métodos de filogenia molecular. Pero, de manera global existen ciertos pasos generales que deben seguirse para el análisis filogenético del DNA.

Primero, las secuencias deben alinearse, para permitir el análisis de los homólogos posicionales.

Una vez alineadas, se podrá establecer la presencia o no de señal filogenética entre ellas. Si todas las secuencias fueran idénticas o, por el contrario, si fueran tan divergentes que pudieran haber sido generadas exclusivamente por azar, ningún análisis filogenético sería pertinente.

El tercer paso es seleccionar un método de inferencia de filogenia y un modelo evolutivo.

Existen distintos métodos de inferencia, pero una primera clasificación permitiría diferenciarlos entre aquellos que trabajan sobre

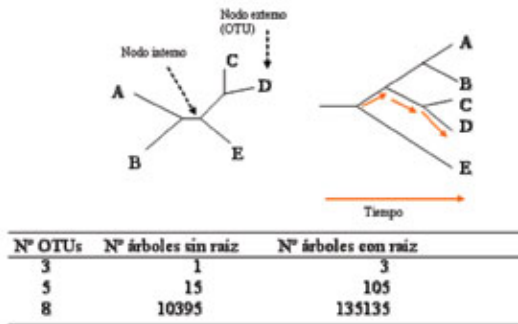


Figura 52.1. Árboles filogenéticos. Representación de un árbol filogenético, con sus ramas y nodos internos y externos. Se señalan las modificaciones producidas por la imposición de una raíz (origen común a todas las unidades taxonómicas).

matrices de distancia y aquellos que comparan directamente los caracteres de las secuencias, sean éstos nucleótidos o aminoácidos.

Las matrices de distancias surgen de la comparación de a pares de todas las secuencias y ponen en evidencia cuántos caracteres son compartidos o, por el contrario, en cuántos difieren, sobre el total de caracteres comparados. Es decir, estiman la similitud o la divergencia de las secuencias. Sobre estas matrices se aplican luego algoritmos de agrupamiento, que son los que generan los árboles filogenéticos.

Por otra parte están los métodos que retienen la información de los caracteres de las secuencias a través de todo el análisis, lo que permite estudiar cada sustitución de manera separada.

Algunos de los métodos de inferencia filogenética producen como resultado una única topología, es decir, un único árbol. En cambio otros métodos, que siguen otros algoritmos para la reconstrucción filogenética, van evaluando distintas topologías posibles que vinculan a la información genética de los genomas analizados. Para realizar esa evaluación, se adjudica una *score* a cada uno de los árboles analizados y se retienen sólo aquellos árboles con mejor

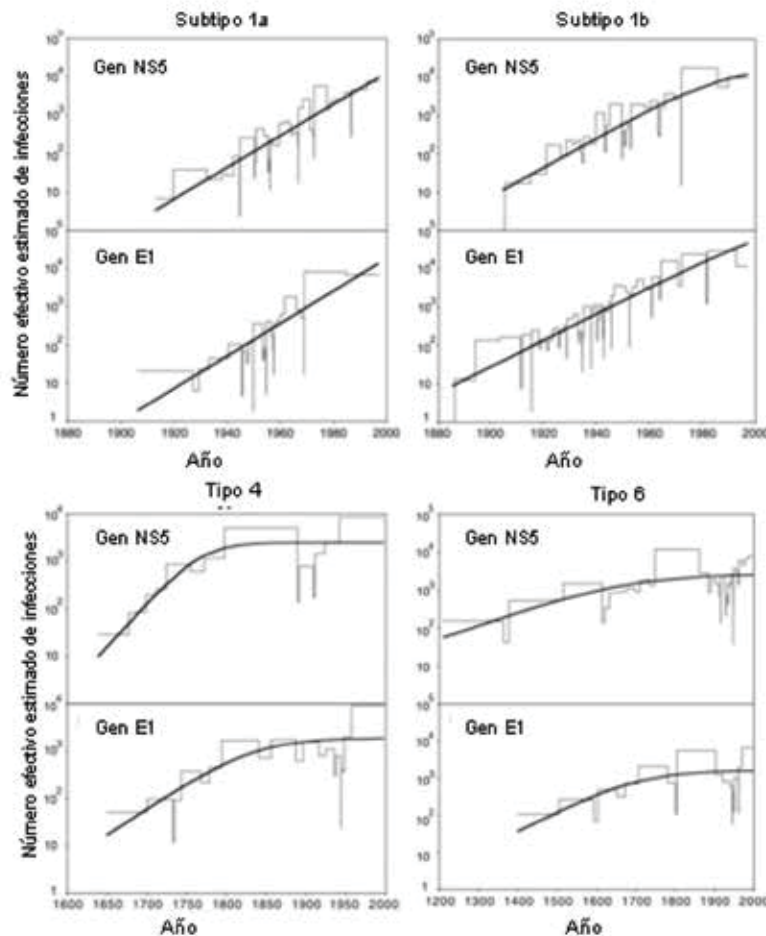


Figura 52.2. Historia demográfica de las infecciones por el virus hepatitis C (HCV). Se muestra el resultado de la aplicación de la teoría de la coalescencia al estudio de la epidemiología del HCV. En la figura pueden observarse diferencias en las historias epidémicas de los distintos tipos/subtipos de HCV. Los subtipos 1a y 1b, que parecen haberse originado 100 años atrás, muestran una velocidad de crecimiento mayor que la de los tipos 4 y 6, que se habrían originado hace 350 y 700 años, respectivamente. Esto estaría reflejando una rápida diseminación alcanzada por los subtipos 1a y 1b, que contrasta con el largo período de infección endémica de los tipos 4 y 6. Estas observaciones reflejan también las diferentes formas de transmisión que han seguido estos virus, ya que los subtipos 1a y 1b están vinculados a las prácticas modernas de las transfusiones de hemoderivados y uso de drogas inyectables, mientras que los tipos 4 y 6 estarían asociados a rutas de transmisión domésticas y/o sociales no muy bien caracterizadas, cuyas prácticas se remontarían a tiempos más lejanos. Modificado de *The Epidemic Behavior of the Hepatitis C Virus*. Pybus OG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. *Science* 2001; 292: 2323-25.

score. Es decir, se procede a escoger el mejor árbol entre las diversas topologías posibles.

El paso final es poder estimar el nivel de confiabilidad que tienen los resultados logrados.

Hay distintos métodos para evaluar la robustez de un árbol: analíticos y de remuestreo. Uno de los utilizados con mayor frecuencia es el *bootstrapping*. Es un método de remuestreo que se basa en la generación de nuevos conjuntos de datos a partir de los datos originales que trata de reproducir un mayor muestreo desde el universo original.

El modelo evolutivo de coalescencia, basado en la genética de poblaciones, permite reconstruir la genealogía de una población. A partir de la información genética actual se reconstruyen los ancestros comunes entre las secuencias actuales y se continúa la reconstrucción hasta alcanzar el ancestro común a todas las secuencias analizadas. Este modelo, al construir las genealogías tiene en cuenta la interacción entre distintas fuerzas evolutivas tales como los procesos mutacionales y de selección, recombinación y también factores demográficos como el tamaño y la estructuración geográfica de una población. Los árboles filogenéticos construidos durante el procesamiento no son un fin en sí mismo, sino que contribuyen al conocimiento de la población sobre la que se harán otras inferencias, sobre todo de tipo demográfico. La utilización de este modelo genera información fundamental para el estudio de la historia natural de virus de alto impacto en salud humana. En particular el estudio de la diversificación del virus de la hepatitis C (HCV) ha permitido definir las características epidemiológicas (diseminación con características endémicas o epidémicas de acuerdo a las distintas etapas) de los distintos genotipos (Figura 52.2).

3. EL PROCESO EVOLUTIVO

Como ha sido mencionado con anterioridad, el mecanismo evolutivo es considerado a la luz de la teoría sintética de la evolución como un proceso de dos etapas: generación de heterogeneidad genómica y posterior enriquecimiento de determinados genomas

dentro de la población por selección o deriva genética. Este proceso unificador en biología tiene para los virus características particulares, relacionadas fundamentalmente con la velocidad de evolución. La extraordinaria plasticidad genotípica y fenotípica de las poblaciones virales es consecuencia no sólo de la elevada capacidad de generar variantes genéticas sino también del elevado número de individuos que componen la población viral y de su velocidad de recambio.

El caso del HIV (virus de inmunodeficiencia humana) es paradigmático. El elevadísimo tamaño de la población viral presente en cada individuo infectado ($> 10^9$) y el número de individuos infectados en el mundo ($> 10^8$) permite estimar una población mundial de virus superior a los 10^{17} genomas virales con un altísimo recambio diario (90%). Además, cada genoma viral difiere en al menos un nucleótido al ser comparado con cualquier otro genoma de la población viral.

El modelo de cuasiespecies explica el impacto de esa elevadísima oferta de variantes en el proceso de evolución viral. Según dicho modelo, una población viral presente en un determinado individuo infectado, o aun en distintos focos de infección en un mismo órgano (o distintos) de dicho individuo infectado, resulta de la conjunción de múltiples variantes genéticas que aún siendo muy parecidas entre sí no son iguales, ya que sus genomas presentan al menos un nucleótido de diferencia. Esta estructura de cuasiespecies sumada al elevado tamaño y recambio de individuo de las poblaciones virales constituye una formidable oferta de diversidad genómica y, por lo tanto, un campo sumamente propicio para la selección de genomas aptos para replicarse eficientemente (Figura 52.3).

Se debe considerar a las poblaciones virales como un conjunto altamente heterogéneo de genomas. Al aplicarse una presión selectiva sobre dicho conjunto, aquellos genomas con mayor *aptitud* serán seleccionados.

Las poblaciones virales están sujetas a presiones que dirigen su evolución, pudiéndose alternar periodos de rápida evolución con otros de relativa estabilidad, cuando las presiones permanecen constantes. Es un proceso de adaptación continua a nuevas situaciones que se estabiliza cuando el entorno no se modifica.

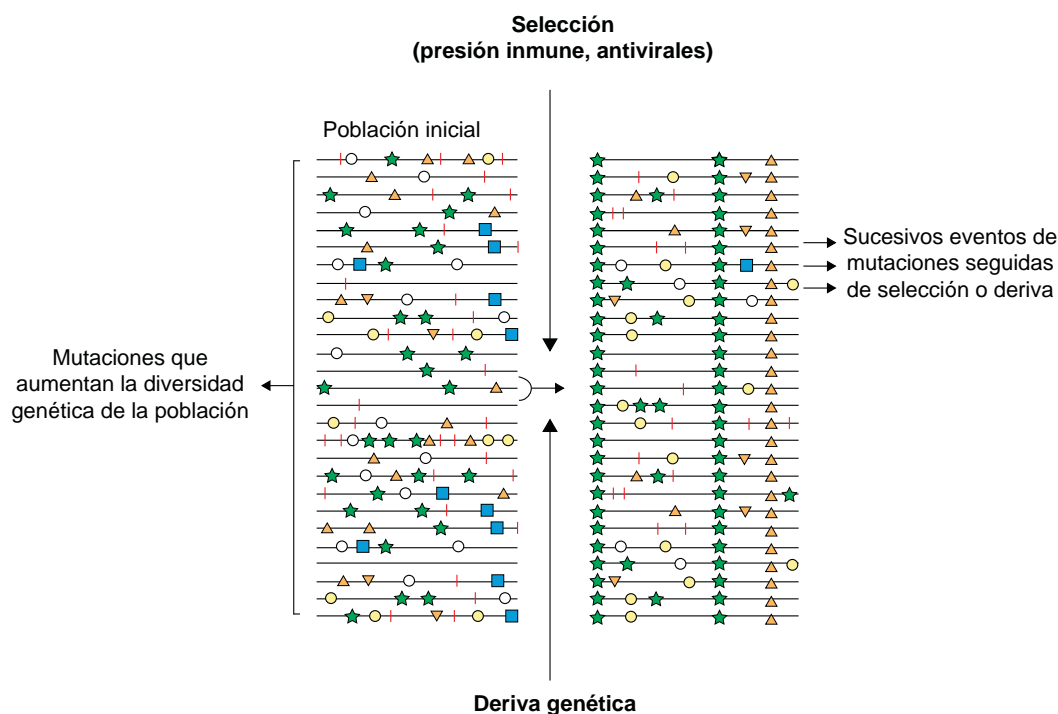


Figura 52.3. Cuasiespecies virales. Representación de los procesos de mutación, selección y deriva genética en una población de virus con genoma RNA. Modificado de *Principles of Virology*; Flint, Enquist, Racaniello y Skalka. Ed.: ASM Press. 2004. 2da. Edición.

4. LOS VIRUS Y SU ENTORNO. PRESIONES SELECTIVAS

Como ha sido desarrollado en capítulos previos, los virus son parásitos intracelulares obligados. Por ello necesitan infectar células, que forman parte de individuos, que a su vez integran poblaciones. Todos ellos pueden ser considerados sistemas vivos y por lo tanto sujetos a la evolución. Luego, podemos considerar a las poblaciones virales en continuo equilibrio (coevolucionando) con el resto del entorno. Virus y hospedadores son seleccionados mutuamente en un proceso permanente.

Esta coevolución es el producto de la necesidad de los virus y sus hospedadores de perpetuar su existencia. En este esfuerzo, los virus tratan de mantener infectados a sus hospedadores y éstos, por el contrario, intentan evitar la infección o su progreso, lo que genera presiones sobre los virus.

Estas presiones selectivas se ejercen a distintos niveles: de la célula, del individuo y de la población.

La célula es el entorno esencial en el que los virus se multiplican. Deben internalizarse (adsorberse, penetrar y desnudarse) para luego replicarse en ella. Debido al carácter de parásitos intracelulares obligados y a sus limitadísimas capacidades genómicas, los virus utilizan para su replicación un número mayoritario de mecanismos bioquímicos del hospedador. Las proteínas y los genomas virales deben ser reconocidos por las moléculas del hospedador y de esta necesidad de reconocimiento surge la selección que las células ejercen sobre los virus que las infectan.

Pero las células forman parte de individuos y éstos, a su vez, han desarrollado evolutivamente mecanismos cuyos objetivos son evitar la infección. El sistema inmune constituye, a nivel del individuo, el mayor obstáculo (presión) y los virus, en su necesidad de persistir, deben evolucionar (adaptarse) continuamente para evadir dicha presión. Para ello han desarrollado una diversidad de mecanismos tales como la variación antigénica que impide el reconocimiento de los efectores de la respuesta inmune humoral y celular, la modulación de moléculas que participan del reconocimiento celular –disminución de síntesis de CMH (complejo mayor de histocompatibilidad), de LFA (antígeno asociado a la función leucocitaria), de ICAM (moléculas de adhesión), etc.– y la interacción directa con las células del sistema inmune (como ejemplo, la infección de linfocitos CD4⁺ por HIV).

Finalmente, la infección y persistencia viral en una población de hospedadores también imponen presiones a los virus. Para la infección continua de una población los virus deberán contar con un determinado número de hospedadores susceptibles y también con mecanismos apropiados para una eficiente transmisión. Una estrategia que utilizan los virus para contrarrestar ambos tipos de obstáculos es la de disminuir su virulencia para lograr una infección más prolongada de sus hospedadores. De esta manera, el evento de transmisión hacia hospedadores susceptibles tendrá mayores oportunidades de ocurrencia.

5. RESPUESTA DE LOS VIRUS A LAS PRESIONES DEL ENTORNO

Los virus, especialmente aquellos con genoma RNA, evolucionan muy rápidamente, tanto que en ocasiones el proceso evolutivo puede ser estudiado mientras éste ocurre. La inusual velocidad evolutiva que manifiestan representa una máxima capacidad de adaptación y, como ha sido anteriormente mencionado, está basada en la heterogeneidad y el tamaño de las poblaciones virales asociado al tiempo de generación y al carácter exponencial de su replicación.

El hecho central del proceso evolutivo viral es la prácticamente infinita oferta de variantes (heterogeneidad de la población) que se presenta como sujeto de selección. Esas variantes estarán en equilibrio mientras el entorno sea estable, pero si éste se modifica, aquéllas con mayor aptitud para esta nueva situación estarán más representadas en las próximas generaciones. Esto le permite al virus adaptarse a diferentes presiones del entorno con una plasticidad que ningún otro microorganismo es capaz de exhibir.

6. GENERACIÓN DE HETEROGENEIDAD VIRAL

La heterogeneidad de las poblaciones virales resulta fundamentalmente de los procesos de mutación, recombinación o reasociación.

6.1. MUTACIÓN

El proceso de mutación es particularmente relevante para los virus cuyos genomas son RNA y para los miembros de la familia *Hepadnaviridae*. En todos ellos, la polimerización del genoma se lleva a cabo por RNA polimerasas-RNA dependientes o DNA polimerasas-RNA dependientes (transcriptasas inversas) que no poseen sistemas de edición. Por lo tanto, los errores que se cometen durante el proceso de polimerización no se corrigen posteriormente. La velocidad de mutación de los virus con genoma RNA cuyos tamaños oscilan entre 3×10^3 y 3×10^4 nucleótidos es de 10^{-3} a 10^{-5} sustituciones/nucleótido, mientras que para el DNA genómico del hospedador es del orden 10^{-10} a 10^{-11} sustituciones/nucleótido con tamaños genómicos de aproximadamente 3×10^9 pares de bases.

Imagine el lector una población viral altamente heterogénea en su capacidad de ser neutralizada por anticuerpos específicos. Si la población es sometida a una fuerte presión selectiva por la presencia de estos anticuerpos, esta presión actuará seleccionando aquellas variantes parcial o totalmente resistentes a dichos anticuerpos. Estas variantes tendrán una ventaja comparativa y se establecerán como mayoritarias dentro de la población.

Son ejemplos importantes de este proceso de selección, los virus resistentes a la protección generada por vacunación, los resistentes a drogas antivirales, y los capaces de replicarse en hospedadores no habituales.

Quizás el ejemplo más claro del proceso de selección continua de virus capaces de evadir la presión inmune lo constituye el virus de la influenza tipo A cuyo genoma está compuesto por ocho fragmentos que codifican para proteínas para diversas funciones. Este virus es altamente variable y su heterogeneidad poblacional se genera tanto por mutación (cambio menor o *drift*) como por reasociación de sus fragmentos genómicos (cambio mayor o *shift*) siendo relevantes ambos mecanismos. En la población de hospedadores humanos se mantiene de manera constante un nivel de anticuerpos contra el virus adquirido, ya sea por infección previa o por vacunación. Aún así, la infección con el virus puede ocurrir porque variantes genéticas minoritarias tienen la habilidad de replicarse total o parcialmente en presencia de esos anticuerpos, quizás debido a que el reconocimiento antigénico es de menor afinidad. Se seleccionan así las variantes resistentes a la neutralización (mayor *aptitud*) frente a las que los hospedadores, aunque parcialmente inmunizados, son susceptibles. Este mecanismo explica la continua microevolución del virus de la influenza en la naturaleza y justifica la necesidad de actualización permanente de las cepas vacunales.

Un mecanismo similar es aplicable a la selección de variantes resistentes a antivirales. Dada la inmensa cantidad de variantes virales presentes en el momento de la administración del antiviral, la probabilidad de que alguna de ellas sea capaz de replicarse aun en presencia de la droga es muy elevada. En esa instancia, esa variante particular tendrá una clara ventaja comparativa, será seleccionada y devendrá mayoritaria, generándose un nuevo equilibrio en el que las variantes mayoritarias serán resistentes al antiviral. Este hecho justifica la utilización de terapias combinadas de dos o más fármacos antivirales con blancos de acción diferentes. En este caso, la probabilidad de la presencia de variantes resistentes o de su generación durante el tratamiento disminuye significativamente ya que deben ocurrir mutaciones simultáneas en distintas regiones genómicas.

Es importante tener presente que la aptitud se define para cada situación en particular en la que las variantes de mayor aptitud son las más abundantes. Cuando esa situación se modifica (por presión inmunológica, presencia de antivirales, etc.), las variantes seleccionadas (resistentes) tienen una nueva aptitud que es máxima para esta nueva situación pero que es menor para la situación anterior



(ausencia de presión). Es por esta razón que cuando se retira la presión la variante resistente no presenta la mayor aptitud para esas condiciones y, por lo tanto, en muchas ocasiones se recupera el fenotipo sensible.

6.2. REASOCIACIÓN EN GENOMAS FRAGMENTADOS

El mecanismo de reasociación genética puede producirse entre distintas cepas o aislamientos de un virus con genoma fragmentado que coinfecten una misma célula. El proceso consiste en el intercambio de fragmentos genéticos entre los distintos virus y deviene en la generación de individuos con una dotación genética considerablemente diferente respecto a la de los virus parentales. Es responsable, al igual que el proceso de recombinación de eventos macro evolutivos siendo paradigmático el ejemplo de las pandemias de influenza. Los mecanismos por los que se han generado los virus de la influenza causantes de las pandemias son diferentes a los descritos en el punto anterior. Los virus de influenza se caracterizan por sus glicoproteínas de superficie NA (neuraminidasa) y HA (hemaglutinina). Se han descrito 15 subtipos de HA y 9 subtipos de NA; los distintos subtipos difieren en el 30% o más de sus secuencias de aminoácidos. En cada pandemia se identificaron virus con nuevas combinaciones de HA y NA. Por ejemplo, la pandemia de 1918 fue causada por virus que exhibían H1N1; la de 1957, H2N2; la de 1968, H1N2 y la de 1977 (una reintroducción de una cepa) H1N1 (Figura 52.4).

Muchos de estos dramáticos cambios mayores de HA y NA son el resultado de la reasociación de los fragmentos genómicos entre virus influenza de mamíferos con otros de origen aviar. Para que la reasociación (al igual que la recombinación) tenga lugar debe produ-

cirse una coinfección por dos virus: uno con capacidad de replicarse en humanos y otro en aves. Una observación importante es que tanto los virus humanos como los aviares se replican efectivamente en porcinos, por lo tanto, estos animales podrían ser hospedadores no selectivos adecuados para ser coinfectados y permitir la reasociación. Cuando de la reasociación se generen virus donde al menos la HA sea de origen aviar (no serán reconocidos por el sistema inmunológico humano) y el resto de la dotación genética confiera capacidad para replicarse en humanos, este reasociante viral será totalmente nuevo (emergente) para la población humana mundial. Entonces, todos los seres humanos vendrán en susceptibles ya que estos virus no serán reconocidos por el sistema inmunológico. En el sudeste asiático se han originado diversas pandemias (por ejemplo en 1957 y 1968). Cabe destacar que allí el contacto cotidiano de aves domésticas y porcinos con densas poblaciones humanas es frecuente. Es decir, que allí se reúnen todos los elementos necesarios para que la coinfección ocurra.

6.3. RECOMBINACIÓN

Los eventos de recombinación pueden ocurrir tanto entre genomas virales como entre genomas virales y el de sus hospedadores, permitiendo en este último caso la incorporación de funciones celulares (proteasas, helicasas, interleuquinas, oncogenes, etc.). El proceso de recombinación viral es de gran significación y entre sus evidencias más claras se pueden mencionar la llamada evolución modular con la conformación de superfamilias y también la importante presencia de genes de origen celular en el genoma viral (herpesvirus con aproximadamente el 50% del genoma de origen celular, otros oncogenes).

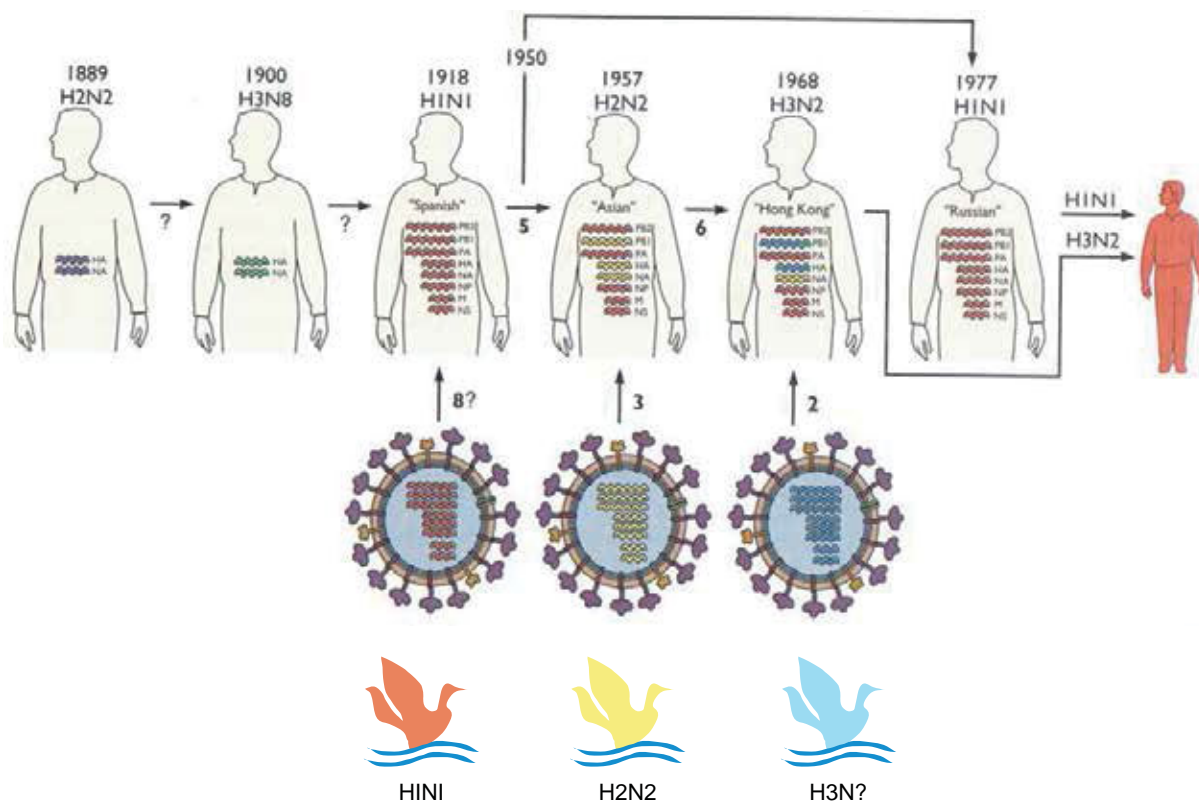


Figura 52.4. Evolución del virus de influenza A humana. Se describe la aparición y transmisión del virus de influenza A humana desde 1889 hasta 1977, si bien la información genética viral más detallada se posee sólo a partir de 1918. En la parte inferior de la figura se señala (con distintos colores) el origen aviar de virus que reasociaron con virus humanos o que se transmitieron de manera directa al hombre. El número junto a las flechas ascendentes indica cuántos segmentos virales fueron transmitidos desde las aves. Modificado de *Principles of Virology*, Flint, Enquist, Racaniello y Skalka. Ed.: ASM Press. 2004. 2da Edición.

El análisis de las secuencias de nucleótidos de la mayoría de los RNA virus con polaridad positiva (+) y negativa (-) revela claramente la existencia de *superfamilias* que se definen según su estructura genómica (ordenamiento de genes homólogos) y de sus estrategias replicativas.

Los RNA virus (+) codifican para 3 a 12 proteínas que cumplen tres tipos de funciones: replicación del RNA, encapsidación y funciones accesorias. El análisis filogenético de las secuencias de sus polimerasas sugiere un origen monofilético y permite agruparlos en tres superfamilias. Además, cada superfamilia contiene miembros que infectan una amplia variedad de plantas, animales o bacterias, lo que sugiere que el gen de la RNA polimerasa primordial podría provenir de un ancestro presente aún antes de la separación de los reinos. Alternativamente, el virus ancestral podría haberse irradiado de forma horizontal entre plantas, animales y bacterias. Del análisis filogenético de proteínas accesorias de la polimerización del RNA viral (proteasas, helicasas) surgieron árboles que no pudieron superponerse a los generados con la polimerasa. En otros términos, el origen de estos genes accesorios es distinto al del gen primordial (polimerasa). La hipótesis más aceptada sostiene que los virus habrían incorporado dichos genes de sus células hospedadoras de forma tal que miembros de una superfamilia (clasificados de acuerdo con la filogenia de su polimerasa) podrían haber incorporado estos genes desde distintos hospedadores, en distintos tiempos e historias evolutivas.

Al estudiar las relaciones filogenéticas entre virus con genoma a DNA se observan características diferentes.

En los casos en los que es aplicable un reloj molecular (acumulación lineal de mutaciones sobre el genoma con una velocidad constante) es posible poner a la evolución del genoma viral en una escala temporal y relacionarla con la establecida para el hospedador.

Ha sido demostrado que para la mayoría de los herpesvirus, los puntos de divergencia filogenética coinciden con los de los hospedadores vertebrados. Esto puede ser visualizado por la superposición de los árboles filogenéticos de virus y hospedadores. Se asume que los primitivos herpesvirus infectaron a un progenitor muy anciano y luego evolucionaron por coespeciación con sus hospedadores. Conociendo el tiempo de divergencia de los hospedadores sobre la base de estudios clásicos sobre fósiles y considerando un reloj molecular constante puede asumirse que los tres grupos mayores de los herpesvirus (alfa, beta y gama) se originaron hace aproximadamente $180 \text{ a } 220 \times 10^6$ años.

7. LIMITACIONES DEL PROCESO EVOLUTIVO VIRAL

Las posibilidades de variación de los genomas virales son inmensas y, sin embargo, es posible reconocer y agrupar con certeza a los virus en entidades definidas. El nivel de heterogeneidad de las poblaciones virales tiene un límite cuyo sobrepaso resulta incompatible con la viabilidad viral (error catástrofe). Las poblaciones virales (para virus con genoma a RNA) tienden a aumentar su heterogeneidad hasta alcanzar dicho límite. De esta forma alcanzan un equilibrio cuando la diversidad de genomas es la mayor compatible con su viabilidad y, de esta forma, la oferta de variantes que puedan ser seleccionadas (y por lo tanto su capacidad de adaptación) es máxima. Actualmente se analiza el desarrollo de antivirales sobre la base de compuestos capaces de llevar más allá del error catástrofe a las poblaciones virales procurando así su eliminación del individuo.

Por otra parte, los herpesvirus, hepadnavirus, retrovirus o los virus de la influenza se reconocen como tales a pesar de su heterogeneidad genética y de su velocidad de mutación.

Sucede que, con independencia de su diversidad (necesaria para su *sobrevida*) los virus comparten características que los definen. Por lo tanto, existen limitaciones para la variación que se vinculan con el mantenimiento de la identidad de los virus.

Una de las propiedades fundamentales que caracteriza a los virus es su estructura. El genoma está incluido en partículas ensambladas de acuerdo con patrones de simetría definida. Cuando la simetría de la cápside se fija evolutivamente, el tamaño del ge-

noma también queda determinado. Esto explica la dificultad para incorporar nuevas funciones o para duplicar genes y la estupenda utilización que los virus hacen de sus genomas (distintos marcos de lectura, corte y empalme [*splicing*] alternativos, señales comunes que regulan la expresión de distintos genes).

Otra de las limitaciones para el cambio se vincula con los procesos de multiplicación viral. Tanto la decodificación como la replicación de los genomas virales tienen mecanismos que están estrechamente relacionados con la maquinaria de la célula hospedadora. Cambios ocasionales en los ácidos nucleicos virales (en regiones que interactúan con elementos celulares) requieren cambios compensatorios en la célula hospedadora, un evento poco probable si se considera su muy baja velocidad de evolución.

Finalmente, el nivel de virulencia del virus relacionado con la posibilidad de perpetuarse también constituye limitaciones para su evolución. Cuando un virus es tan letal como para exterminar a su hospedador, el resultado es equivalente a haber perdido su capacidad de replicación. Desde la perspectiva del hospedador, los virus pueden ser fuerzas selectivas de gran impacto.

8. COEVOLUCIÓN HOSPEDADOR-PARÁSITO

Como se ha descrito previamente, nuestra relación con los virus debe analizarse considerando a la interacción virus-hospedador como un equilibrio delicado entre la evolución del virus (en particular su variación genética) y la evolución del hospedador (el ser humano y su respuesta inmune a nivel individual y aspectos socioculturales a nivel poblacional). Esta coevolución es interdependiente y por lo tanto afecta de modo significativo el futuro del hospedador. En la competencia parásito-hospedador, los virus poseen una capacidad adaptativa mucho mayor que la de sus hospedadores. Pero muy rara vez estas ventajas conducen a la desaparición de sus hospedadores, ya que, como se expresó antes, en pos de su propia perpetuación a los virus les resultará beneficiosa la sobrevida de sus hospedadores. Históricamente, cuando la interacción patógeno-hospedador es muy severa el resultado es la eliminación de ambas especies. Pero, en cambio, el proceso que habitualmente ocurre es el de coadaptación, que se evidencia a través de una mayor resistencia del hospedador a la infección viral y de una menor virulencia del virus.

El entendimiento de esta coevolución, no sólo desde el punto de vista individual (virus-hospedador) sino también poblacional (virus-hospedador-entorno) es fundamental porque está en la base del problema de la emergencia. Los virus (o las infecciones) emergentes son los que han aparecido repentinamente y van incrementando su incidencia. La fuente de los *nuevos* virus incluye tanto a nuevas variantes virales (hasta ese momento no descritas) como a virus conocidos que fueron capaces de infectar nuevas especies hospedadoras o nuevas poblaciones. Modificaciones de las condiciones de la relación virus-hospedador desarticulan el equilibrio existente y generan un nuevo estado de equilibrio. La emergencia de las enfermedades infecciosas es producto de este nuevo equilibrio. El caso de la emergencia del HIV puede ejemplificar esta hipótesis, detallándose a continuación lo ocurrido con HIV-2. El virus SIV (virus de la inmunodeficiencia simiana) estuvo en equilibrio con su reservorio, el *Sooty mangabey*. En alguna instancia, este virus fue capaz de infectar a un humano. Este evento es muy probable porque estos simios son mascotas de los habitantes de la costa oeste de África donde se asume se originó esta epidemia. Se crea entonces un nuevo equilibrio ahora entre un virus de origen simiano (SIV) adaptado al humano (HIV-2) y un nuevo hospedador (humano). Habitualmente, los virus son atenuados, no patógenos, en sus reservorios naturales pero cuando *saltan* de especie, el resultado es la generación de algún tipo de patología (virus emergente, HIV-2 y enfermedad emergente (síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA). Sin embargo, este evento no aparece como emergente hasta que no se modifiquen aspectos sanitarios (incremento en la factibilidad de contactos enfermo portador-individuo susceptible por instrumentación médico-sanitaria,

vacunaciones, transfusiones) y/o culturales (densidad de población por migraciones, drogadicción, sexualidad) que hagan a la enfermedad relevante (emergente) para la Salud Pública mundial.

9. ORIGEN DE LOS VIRUS: TEORÍAS

El conocimiento del origen de los virus presenta aspectos controversiales y, por lo tanto, existen diversas hipótesis que tratan de explicarlo.

La idea de que los virus son entidades que devienen de los tiempos primordiales de un *mundo de RNA* es más fácil de ser asimilada para los virus con genoma RNA. Los árboles filogenéticos contruidos a partir de las RNA polimerasas-RNA dependientes de los diferentes virus con este tipo de genoma muestran un origen monofilético, sosteniendo por lo tanto su origen común.

La transición que acoplaría al DNA con el RNA preexistente estaría representada por los retrovirus (con transcriptasas reversas o también denominadas transcriptasas inversas). En esta teoría se especula con la aparición de los DNA virus como derivados de los RNA, aunque otras visiones consideran que los DNA virus podrían haberse originado independientemente.

La existencia de virus infectando individuos de los distintos reinos de la naturaleza, con características comunes entre sí a pesar de los distintos hospedadores, impulsó la hipótesis de la aparición de los virus en la época del *último ancestro celular universal* (que habría sido el punto de partida de las formas celulares existentes).

Existen tres teorías que tratan de explicar el origen de los virus considerando su aparición en los tiempos del *último ancestro celular universal*.

- 1) La primera de ellas sostiene que los virus son reliquias de formas de vida precelulares. La principal oposición que esta teoría genera está vinculada con la naturaleza de los virus, que son parásitos intracelulares obligados, requiriendo por lo tanto de un medio celular en el que puedan reproducirse.
- 2) Existe una segunda hipótesis que visualiza a los virus como elementos del genoma de la célula que se escaparon del entorno celular y adquirieron capacidades infectivas propias. Debido a la evolución separada que siguieron estos *virus primordiales* y las células (que difieren significativamente de lo que puede haber sido el *último ancestro celular universal*) podemos obser-

var hoy, por ejemplo, una falta de conexión filogenética entre proteínas celulares y virales.

- 3) La tercera explicación del origen de los virus considera que éstos pudieron surgir por la pérdida de elementos y funciones celulares, es decir, por la reducción desde un organismo celular. Pero para su perpetuación requerirían de la infección de un organismo con sus capacidades completas, convirtiéndose entonces en parásitos.

Para el análisis de cualquiera de estas teorías no debe perderse la noción de que estos procesos ocurrieron en un entorno completamente diferente al actual, donde las características del medio ambiente y de los organismos celulares diferían significativamente de las actuales, lo que hace muy difícil que esos eventos puedan ser reproducidos hoy.

10. CONCLUSIONES FINALES

Se ha asociado acertadamente a la evolución con el estudio del pasado, de los orígenes. El conocimiento del proceso evolutivo de una determinada población viral (desde sus orígenes hasta el presente) estimula la elaboración de hipótesis respecto del porvenir.

El estudio de la evolución viral se ha potenciado debido al incremento significativo de la información disponible como resultado de las continuas mejoras en las técnicas moleculares (fundamentalmente secuenciamiento de nucleótidos) y en el desarrollo de instrumentos para el análisis filogenético (bioinformática).

El proceso evolutivo tiene para los virus características particulares relacionadas con la velocidad de evolución. La extraordinaria plasticidad genotípica y fenotípica de las poblaciones virales es consecuencia no sólo de la elevada capacidad de generar variaciones genéticas sino también y sobre todo del elevado número de individuos que componen la población viral y de su velocidad de recambio.

El análisis evolutivo tiene, además, al correlacionar el conocimiento genético molecular con sus implicancias biológicas, una importante transferencia hacia otras áreas del conocimiento como la epidemiología (origen y descripción de brotes), la ecología (virus emergentes, origen de virus) y la patología (prognosis de enfermedades virales).

Bibliografía

- De Filippis VR, LP Villarreal. "Virus Evolution". En: Knipe D, Howley P, Griffin D, Lamb R, Martin M, Roizman B, Straus S. *Fields Virology*. 4ª ed. Chapter 13. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2001
- Domingo E, Webster R, Holland J (Editores). *Origin and evolution of viruses*. Academic Press, London, UK, 1999
- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. *Principles of Virology*. 2ª ed. ASM Press, Washington, USA, 2004
- Forterre, P. "The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions". *Virus Res* 2006;117:5-16
- Graur D, W-H Li (Editores). *Fundamentals of Molecular Evolution*. 2ª ed. Sinauer Assoc, Sunderland, USA, 2000
- Hein J, Schierup MH, Wiuf C. *Gene genealogies, variation and evolution. A primer in coalescent theory*. 1ª ed. Oxford University Press, New York, USA, 2005
- Hillis D, Allard M, Miyamoto M. "Analysis of DNA sequence data: Phylogenetic inference". *Methods in enzymology* 1993;224:456-487
- Pybus OG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. "The epidemic behavior of the Hepatitis C Virus". *Science* 2001;292:2323-25
- Rosenberg NA, Nordborg M. "Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms". *Nat Rev Genet* 2002;3:380-90
- Swofford D, Olsen G, Waddell P, Hillis D. "Phylogenetic inference". En: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (Editores). *Molecular Systematics*. 2ª ed. Sinauer Assoc., Sunderland, USA, 1996

Epidemiología molecular del virus sincicial respiratorio en Argentina

Mónica Galiano - Alfonsina Trento - Cristina Videla

El virus sincicial respiratorio (*Respiratory Syncytial Virus* –RSV) es la principal causa de infección aguda del tracto respiratorio inferior en niños, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Dado que la respuesta inmune producida por la infección no confiere protección duradera, las reinfecciones son frecuentes a lo largo de la vida. La variación antigénica puede desempeñar un papel importante en la capacidad del virus de evadir a la respuesta inmune.

Los primeros estudios con anticuerpos monoclonales permitieron identificar dos grupos antigénicos, A y B. Las principales diferencias se hallaron en la glicoproteína G, una de las tres proteínas de la envoltura viral. La variabilidad de la proteína G se localiza en el ectodominio que contiene dos regiones hipervariables, separadas por una porción altamente conservada en todos los aislamientos de RSV.

Otros estudios demostraron las bases genéticas de dichas variaciones, como los ensayos de digestión con RNasa A de heterohíbridos, el análisis de fragmentos de restricción en productos de RT-PCR y la determinación de la secuencia nucleotídica. Estos estudios confirmaron aquellos primeros hallazgos y demostraron la existencia de diferentes linajes dentro de los grupos A y B del RSV. Se observó la cocirculación de ambos grupos con prevalencia

alternativa de uno de ellos durante períodos consecutivos, aunque el grupo A predominó en la mayoría de las epidemias.

Con el objetivo de conocer la epidemiología molecular del RSV en nuestro país, se estudiaron 603 muestras de niños menores de 5 años con infección respiratoria aguda del tracto inferior atendidos en hospitales de Buenos Aires (1995-2001). El RSV fue el patógeno responsable del 30,2% de esas infecciones. La frecuencia de RSV varió durante el período estudiado del 13,2 al 40% y fue notoriamente mayor durante los meses más fríos del año. Los grupos A y B de RSV cocircularon durante la mayoría de las epidemias, con predominio del grupo A.

Sobre 129 cepas de RSV aisladas se realizó la caracterización antigénica mediante un ELISA con 14 anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glicoproteína G y 2 anticuerpos monoclonales contra la proteína F. De las 129 cepas analizadas, el 74,4% perteneció al grupo A y el 25,6% al B. Dentro del grupo A se observaron 17 patrones antigénicos diferentes: ninguno predominó durante los 7 años de estudio; algunos aparecieron cíclicamente y otros sólo durante uno o dos años, siendo luego reemplazados por nuevos patrones. Los anticuerpos monoclonales empleados no evidenciaron patrones antigénicos diferentes para las cepas del grupo B.

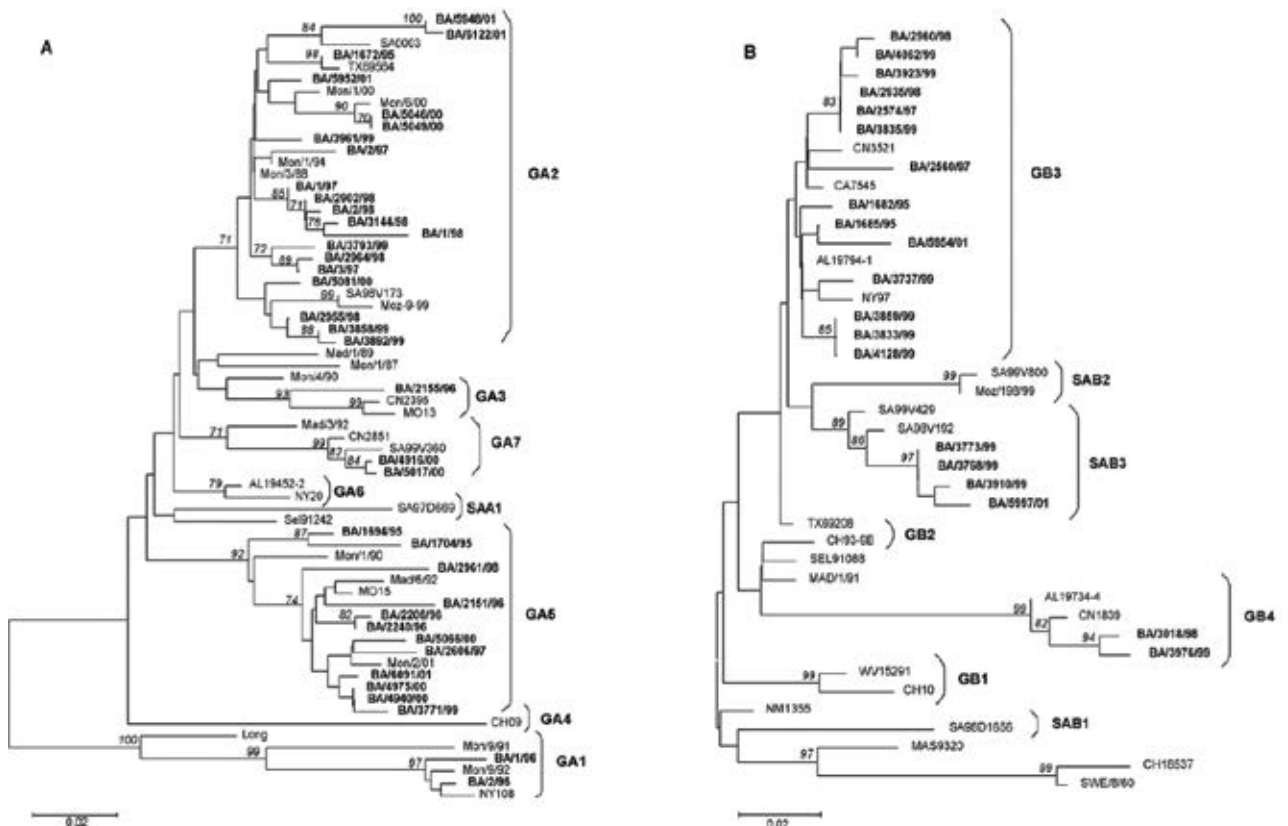


Figura 53.1. Árboles filogenéticos de cepas de RSV de grupos A (A) y B (B). Las cepas prototipo A/Long y B/CH18537 se incluyeron en el análisis, así como cepas representantes de genotipos previamente descritos. Las cepas BA se muestran en negrita. Galiano M. y col. *J. Clin Microbiol*, 2005.

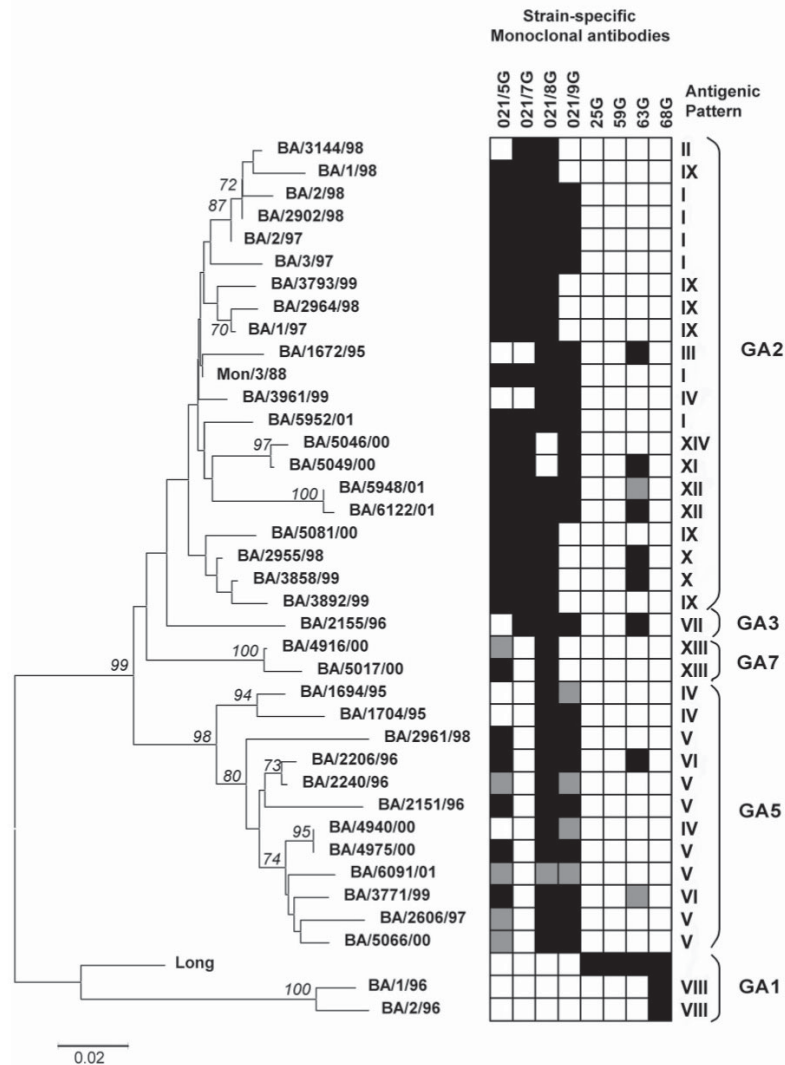


Figura 53.2. Correlación entre patrones antigénicos y genotipos de cepas de RSV grupo A. Los patrones antigénicos se definieron por la combinación de las reactividades de 8 anticuerpos monoclonales dirigidos contra las porciones variables de la glicoproteína G. Galiano M. y col. *J. Med Virol*, 2005. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, UBA, 2003. Realizado en el Laboratorio de Virología, CEMIC.

A partir de la caracterización antigénica se seleccionaron 57 virus de ambos grupos para su secuenciación. El fragmento secuenciado comprendió los últimos 360 nucleótidos del extremo 3' del gen de la proteína G. La clasificación en genotipos se realizó por comparación con otros virus ya genotificados, provenientes de diferentes sitios geográficos y obtenidos del GenBank.

Los árboles filogenéticos realizados con los virus aislados en Buenos Aires (BA) mostraron que 37 cepas BA del grupo A se agruparon en 5 genotipos (GA1, GA2, GA3, GA5 y GA7). Los genotipos que agruparon la mayor cantidad de virus BA fueron GA2 y GA5. Veinte cepas BA del grupo B se agruparon en 3 genotipos (GB3, GB4 y SAB3). El genotipo GB3 comprendió 14 de dichas cepas (70%) (Figura 53.1).

La identidad a nivel nucleotídico para el grupo A fue de 93,3% y para el grupo B de 96,4% mientras que a nivel aminoácido para el grupo A fue de 86,9% y para B de 93,4%. Estos datos indican que la identidad a nivel aminoácido fue menor que a nivel nucleotídico y que las cepas BA del grupo A presentan mayor variabilidad entre sí que las del grupo B, tanto en su secuencia de nucleótidos como en la secuencia de aminoácidos deducida.

La correlación entre los genotipos y patrones antigénicos de los virus del grupo A mostró un alto grado de especificidad genotipo-patrón antigénico, ya que la mayoría de los patrones antigénicos asociados con un genotipo no se asociaron con otro (Figura 53.2).

El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de las cepas BA de ambos grupos mostró que los cambios principales hallados fueron: a) sustituciones de aminoácidos, en algunos casos genotipo-específicas; b) diferentes longitudes de la proteína G, debidos al uso alternativo de codones de terminación o a duplicaciones de nucleótidos en el gen G que se tradujeron en inserciones de aminoácidos. Los cambios en los codones de terminación produjeron proteínas G de 297 ó 298 aminoácidos en las cepas del grupo A, mientras que en las del grupo B dichos cambios produjeron proteínas de 292, 295 ó 299 aminoácidos. Dichos cambios fueron en algunos casos genotipo-específicos.

Las inserciones de aminoácidos en la proteína G se detectaron sólo en algunas cepas del grupo B. Tres virus aislados en 1999 mostraron una proteína de 315 aminoácidos como consecuencia de la duplicación de 60 nucleótidos en el gen G. Dicha duplicación se confirmó con nuevas secuencias y mediante estudios de *immunoblot*

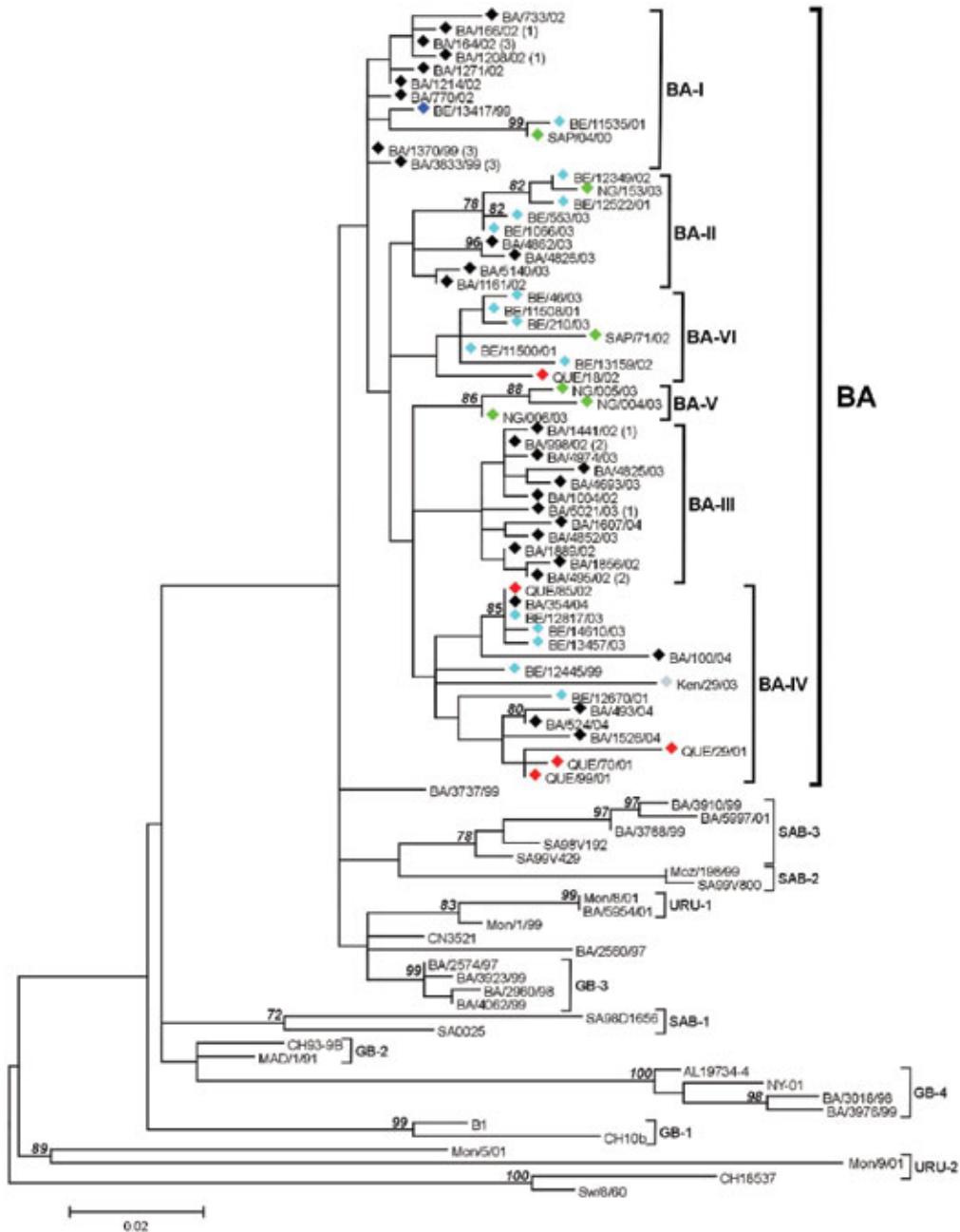


Figura 53.3. Árbol filogenético de la secuencia de la proteína G del RSV grupo B. Las secuencias marcadas con diamantes corresponden a virus con la duplicación de 60 nucleótidos aisladas en Québec (QUE), Sapporo (SAP), Kenia (KEN), Niigata (NG), Buenos Aires (BA) y Bélgica (BE). La cepa prototipo del grupo B/CH18537 y las cepas representativas de los genotipos descritos previamente se incluyeron en el análisis. Trento A. y col. *J. Gen Virol*, 2003.

y se observó que efectivamente tal duplicación se tradujo en la inserción de 20 nuevos aminoácidos en la proteína.

Otro estudio realizado sobre 19 393 muestras respiratorias de niños menores de 2 años obtenidas en el Hospital "Ricardo Gutiérrez" (1999-2004) determinó que el 37% de las muestras fueron positivas para RSV por inmunofluorescencia. De las 353 cepas de RSV seleccionadas para su caracterización por RT-PCR, 65,7% se clasificaron en el grupo A y 43,3% en grupo B. De las cepas del grupo A, se seleccionaron 78 que fueron caracterizadas por enzimas de restricción y secuenciación. Se observaron 2 patrones principales de restricción, PA1 y PA2, que agruparon el 44,9% y el 35,9%, respectivamente de las cepas estudiadas, y 2 genotipos, GA2 y GA5 que cocircularon en Buenos Aires durante el período estudiado, con ligero predominio de este último.

En el año 2003, Trento A. y col. realizaron un estudio filogenético de RSV grupo B con la duplicación de 60 nucleótidos mencionada anteriormente, incluyendo virus aislados en Argentina y en otros países en fechas posteriores a los tres virus reportados en Buenos Aires en 1999. Tomando ventaja del marcador natural que representa esta duplicación, se reevaluó en una forma sin precedentes la evolución del RSV durante la propagación en su hospedador natural.

Las Figuras 53.3 y 53.4 representan un claro ejemplo de la historia natural del RSV durante 6 años consecutivos. Un nuevo genotipo, denominado BA, en referencia a los tres primeros virus reportados, agrupa exclusivamente a todas las secuencias de la proteína G, que presentaron la duplicación de 60 nucleótidos, lo que demuestra, además, un ancestro común para estos virus, pro-

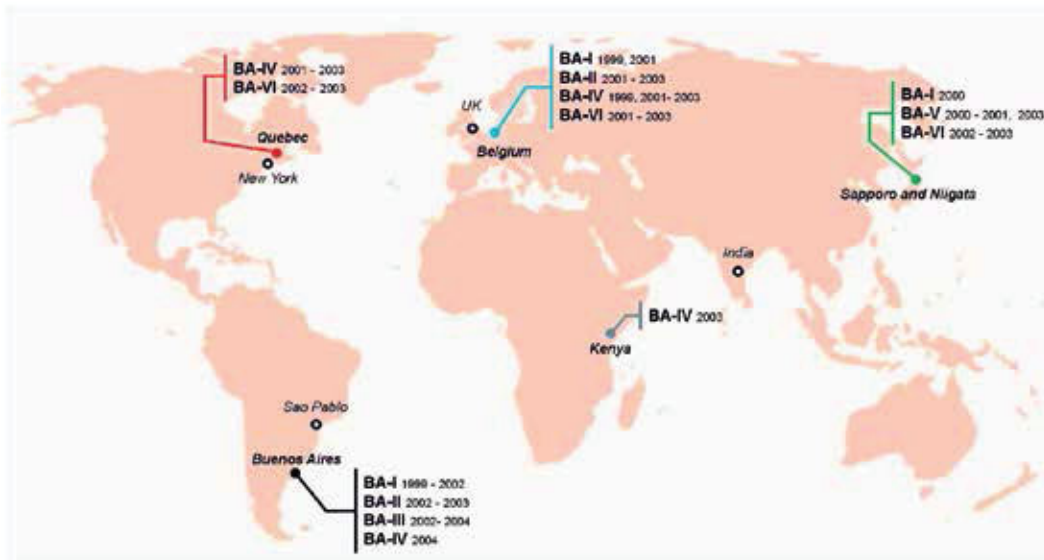


Figura 53.4. Distribución geográfica del genotipo BA. Se indican los sitios en donde se han reportado secuencias de la proteína G del RSV con la duplicación de 60 nucleótidos, la rama a la que corresponden y el año de aislamiento. Trento A. y col. *J. Virol*, 2006

bablemente originado entre 1998 y 1999. Entre junio y agosto del año 1999 se aislaron los primeros virus con duplicación en Buenos Aires (rama BA-I); en diciembre del mismo año se aisló otro virus de la misma rama en Bélgica, por lo que los virus de la rama BA-I *cruzaron* el Atlántico en un período de pocos meses. En años posteriores, virus que acumularon un número limitado de cambios en el segmento duplicado circularon en países muy distantes, aportando una directa evidencia de la rápida diseminación del RSV y la generación de variabilidad genética. No se conocen las rutas seguidas por el RSV para alcanzar los diferentes sitios geográficos, pero podrían ejercer un efecto *cuello de botella*, contribuyendo evolutivamente a la diseminación de ciertas ramas en áreas restringidas, por ejemplo virus de la rama BA-III se reportaron sólo en Buenos Aires y virus de la rama BA-V sólo en Niigata (Japón). Al tener la evidencia del origen de un ancestro común, se pudieron distinguir dos tipos de virus con la duplicación circulando en el año 2004 en Buenos Aires; los de la rama BA-III que evolucionaron a partir de virus locales y aquellos de la rama BA-IV que fueron importados, probablemente de Québec.

Es destacable el hecho de que virus con la duplicación más larga reportada hasta la fecha han estado circulando por al menos 6 años e incluso han desplazado en algunos países a otros RSV grupo B de diversos genotipos. Se desconocen las ventajas selectivas de

los virus BA frente a otros genotipos. Una de ellas podría ser la condición inmunológica *naïve* de la población frente a estos virus.

En síntesis, estos hallazgos confirmaron observaciones realizadas en estudios en otros sitios del mundo, pero también evidenciaron posibles nuevos mecanismos no descritos anteriormente. Se observó que las epidemias son producidas por virus pertenecientes a diferentes genotipos dentro de un mismo grupo, que cocirculan en cada epidemia. Los genotipos predominantes se vieron reemplazados por otros nuevos a lo largo de períodos consecutivos. Los genotipos mostraron amplia distribución mundial. Virus aislados en lugares geográficamente distantes y en años diferentes se mostraron más estrechamente relacionados entre sí que cepas circulantes en un mismo sitio durante la misma epidemia. Se observó extensa variabilidad dentro de ambos grupos A y B. La diversidad genética de los virus del grupo A se asoció estrechamente con los cambios antigénicos en la proteína G. Los cambios producidos en la longitud de la proteína G de cepas B como consecuencia de la inserción de 20 nuevos aminoácidos constituyen el cambio más drástico descrito hasta el presente en la proteína G de aislamientos naturales de RSV. Es probable que representen un nuevo mecanismo de generación de diversidad y ofrecen una oportunidad única para estudiar la historia natural de este virus y las fuerzas selectivas que conducen su evolución.

Bibliografía

- Galiano MC, Luchsinger V, Videla CM, De SL, Puch SS, Palomo C *et al.* "Intragroup antigenic diversity of human respiratory syncytial virus (group A) isolated in Argentina and Chile". *J Med Virol* 2005;77:311-16.
- Galiano MC, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. "Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001)". *J Clin Microbiol* 2005;43:66-2273.
- Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, Garcia-Barreno B, Melero JA *et al.* "Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides". *J Gen Virol* 2003;84:3115-20.
- Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS *et al.* "Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (g) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication". *J Virol* 2006;80:975-84.
- Trento A, Casas I, Calderon A, Garcia-Garcia ML, Calvo C, Perez-Breña P, *et al.* "Ten years of global evolution of the human respiratory syncytial virus BA genotype with a 60 nucleotide duplication in the G protein gene". *J Virol* 2010; 84: 7500-12.
- Viegas M, Mistchenko AS. "Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999-2004) in Argentina". *J Med Virol* 2005;77:302-10.

Epidemiología molecular del metapneumovirus humano

Mónica Galiano - Alfonsina Trento - Cristina Videla

El metapneumovirus humano (hMPV) es un paramixovirus identificado en 2001 y el único miembro del género metapneumovirus que infecta al ser humano. Su pariente más cercano (quizás su antecesor) es el pneumovirus aviar y con él comparte la misma organización de genes y una gran similitud en la secuencia de éstos. Además, el hMPV está estrechamente relacionado con el virus sincicial respiratorio (RSV) humano; presentan características epidemiológicas similares: a) producen enfermedad respiratoria en niños, adultos y pacientes inmunocomprometidos; b) tienen distribución mundial y las epidemias ocurren en invierno y comienzos de primavera; c) pueden causar infecciones reiteradas a lo largo de la vida; d) al igual que para el RSV, se han identificado dos grupos genéticos de hMPV y las diferencias mayores se hallan en la proteína G.

En el caso del RSV, los determinantes antigénicos principales son las proteínas de membrana F y G. La proteína F media la fusión de las membranas viral y celular durante la infección y la proteína G une al virus con el receptor celular. Mientras F es altamente conservada, G es la proteína más variable (véase el Capítulo 53).

Dada la similitud entre el RSV y el hMPV, se analizaron las secuencias nucleotídicas de los genes F y G de 11 cepas de hMPV aisladas de niños con enfermedad respiratoria, obtenidas durante el período 1998-2003 en Buenos Aires, Argentina. Este estudio se realizó con el objeto de evaluar la diversidad genética de las cepas argentinas de hMPV y clasificarlas en alguno de los dos principales linajes genéticos, descritos previamente en estudios realizados en otros países. Para poder clasificar dichas cepas en alguno de los grupos genéticos ya descritos, en los árboles filogenéticos se incluyeron secuencias de los genes F y G de cepas representativas de cada grupo y aisladas en otros países, cuyas secuencias fueron obtenidas del GenBank.

El análisis filogenético mostró que las 11 cepas de hMPV argentinas se clasificaron en ambos grupos genéticos, A y B. Dentro de dichos grupos se habían descrito cuatro subgrupos, A1, A2, B1 y B2. Las cepas argentinas se agruparon dentro de A1, A2 y B1, pero ninguna cepa perteneció al sublinaje B2 (Figura 54.1).

Las secuencias del gen F de cepas A y B presentaron una elevada similitud, tanto a nivel de nucleótidos (84%) como a nivel de aminoácidos (95%). Además, los hallazgos característicos de la proteína F, tales como el dominio de fusión, región de transmembrana y sitios de N-glicosilación estaban conservados en todas las cepas, confirmando que esta proteína es altamente conservada. Por el contrario, las secuencias del gen G mostraron una considerable variabilidad y, al igual que para la proteína G del RSV, la variabilidad a nivel de aminoácidos (30%) fue mayor que a nivel de nucleótidos (55%) entre cepas de distinto grupo.

La secuencia de aminoácidos de la proteína G mostró que las regiones intracelular y de transmembrana son las más conservadas. De manera análoga al RSV, la mayoría de las mutaciones observadas se localizaron en el dominio extracelular y consistieron en: a) sustituciones de aminoácidos; b) cambios en el uso de codones de terminación y, como consecuencia, diferentes longitudes en la proteína G de cepas pertenecientes a distintos subgrupos; c) en una cepa se observó una delección de un nucleótido que provocó un cambio en el marco de lectura del gen y, por consiguiente, cambios drásticos en los últimos 80 aminoácidos y una proteína G de distinta longitud que el resto de las cepas del mismo subgrupo.

Otro hallazgo característico fue un alto contenido de serina y treonina, aceptores potenciales de O-glicosilación, que contribuirían al alto grado de glicosilación que presenta la proteína G. También se hallaron 4-5 sitios potenciales de N-glicosilación y un contenido rico en prolina, un hallazgo típico de las glicoproteínas similares a

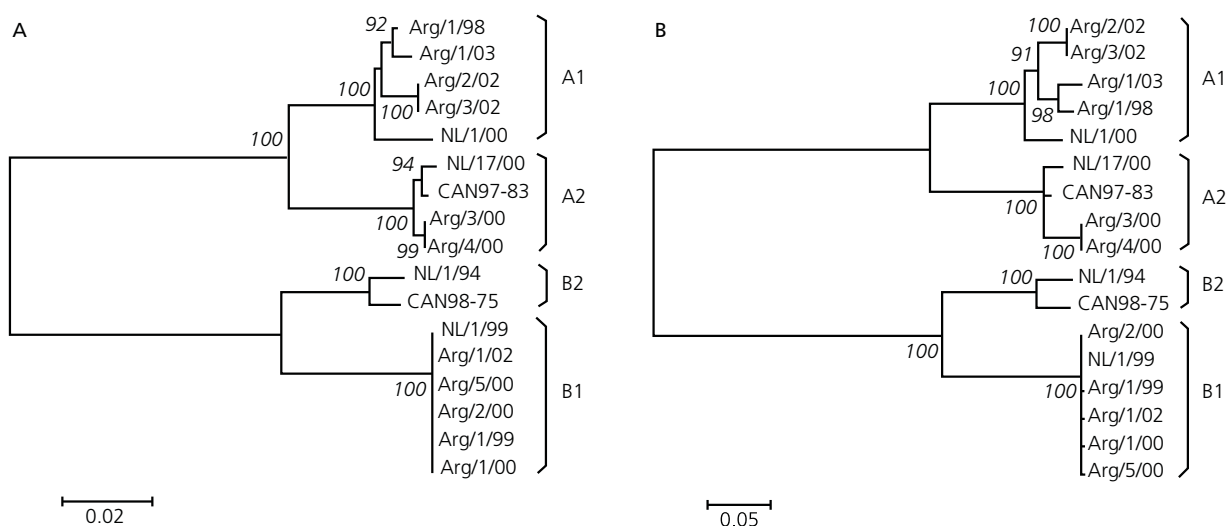


Figura 54.1. Análisis filogenético de las secuencias completas de los genes F (A) y G (B) de cepas argentinas de MPVh. Las cepas argentinas se denominaron Arg y las cepas incluidas como prototipos de cada sublinaje provienen de Holanda (NL) y de Canadá (CAN).

la mucina. Al igual que para el RSV, se ha sugerido que cambios en la glicosilación, junto con el alto número de sustituciones aminoácídicas, contribuirían a la diversidad antigénica de la proteína G, lo que ayudaría al virus a evadir a la respuesta inmune específica del hospedador.

En síntesis, la proteína G del hMPV mostró características similares a la proteína G del pneumovirus aviar y a la del RSV.

Aunque este estudio incluyó un restringido número de cepas, los hallazgos son consistentes con otros estudios previos. Al igual que lo observado en la epidemiología molecular del RSV, habría un reemplazo temporal de los grupos genéticos del hMPV y esto sugiere que las diferencias antigénicas en la proteína G, que evoluciona en respuesta a la presión inmune, pueden influenciar los patrones de circulación de las cepas de hMPV.

Bibliografía

- Bastien N, Liu L, Ward D, Taylor T, Li Y. "Genetic variability of the G glycoprotein gene of human metapneumovirus". *J Clin Microbiol* 2004;42:3532-3537.
- De Graaf M, Osterhaus AD, Fouchier RA, Holmes ER. "Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses". *J Gen Virol* 2009; 89: 2933-42.
- Galiano M, Trento A, Ver L, Carballal G, Videla C. "Genetic heterogeneity of G and F protein genes from Argentinean human metapneumovirus strains". *J Med Virol* 2006;78:631-37.
- Kand JS. "Epidemiology of human metapneumovirus". *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 546-7.
- Oliveira DB, Durigon EI, Carvalho AC, Leal AL, Souza TZ, Thomazelli LM, *et al.* "Epidemiology and genetic variability of human metapneumovirus during a 4 year-long study in Southeastern Brazil". *J Med Virol* 2009; 81: 915-21.
- Peret TC, Abed Y, Anderson LJ, Erdmann DD; Boivin G. "Sequence polymorphism of the predicted human metapneumovirus G glycoprotein". *J Gen Virol* 2004; 85: 679-86.
- Van Den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, de Swart RL, *et al.* "Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses". *Emerg Infect Dis* 2004; 10:658-66.

Epidemiología molecular de las infecciones respiratorias agudas por adenovirus

Adriana E. Kajon

1. INTRODUCCIÓN

Como para tantos otros virus animales, la gran variabilidad genética existente dentro del grupo de adenovirus humanos se ha manifestado claramente a través de la existencia de múltiples serotipos (54 hasta el momento) que reflejan variación a nivel del gen del hexón. Desde los primeros trabajos de Goran Wadell y col. para adenovirus tipo 7 (hAd7) varios autores han demostrado la existencia de cepas variantes de adenovirus con alteraciones a nivel del DNA genómico no reflejadas en cambios en las propiedades serológicas. Se utiliza así el término "**genotipo**" o "**variante genómica**" para definir a una entidad viral distinta dentro de un serotipo determinado a la que puede identificarse por análisis del DNA viral con distintas endonucleasas de restricción. La variación genómica ha sido demostrada para la mayoría de los serotipos de adenovirus de importancia biomédica.

La epidemiología molecular se basa en el análisis del DNA viral con enzimas de restricción y/o en otros ensayos bioquímicos que permiten estudiar aislamientos individuales de virus u otros agentes infecciosos a nivel molecular. Este enfoque aplicado al estudio de los adenovirus humanos aporta una nueva dimensión al análisis de la distribución geográfica de estos virus, su asociación a distintas patologías y permite, entre otras cosas, el esclarecimiento de cadenas de infección, caracterización de brotes epidémicos y la comparación de cepas aisladas en distintas áreas geográficas o en distintas épocas aportando información valiosa para estudios de evolución molecular. La importancia de la variación genética intra-serotípica en la patogenia de las infecciones por adenovirus aún no ha sido elucidada pero se ha sugerido que existirían variantes genómicas más virulentas (Wadell y col., 1980).

2. GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Basado en los trabajos originales de Goran Wadell y col., el análisis genómico con enzimas de restricción es hoy en día uno de los ensayos utilizados para la caracterización de aislamientos de adenovirus. La comparación de mapas de restricción entre dos o más genomas virales es una aproximación cualitativamente adecuada para la determinación de homologías entre dos o más secuencias de DNA y, dada la relativa simplicidad del ensayo de análisis, el procedimiento de elección para la caracterización de números considerables de aislamientos para estudios epidemiológicos.

El ensayo desarrollado por Li y Wadell, discrimina y denomina variantes genómicas o tipos genómicos en base al perfil de restricción generado con la endonucleasa *Bam*HI. Los distintos perfiles se denominan "p" (para la cepa prototipo), o a, b, c, etc. (para otras variantes en orden cronológico de su identificación). La utilización de enzimas adicionales como *Bgl*III, *Hind*III, *Sma*I, etc. permite la discriminación de subtipos a1, a2, etc. En 1985, Adrian y col. propusieron un sistema de denominación alternativo para tipos genómicos de adenovirus basado en un código numérico (Adrian *et al.*, 1985). Según el mismo, se listan en orden alfabético la enzimas de restricción utilizadas para el análisis (*Bam*HI, *Bgl*III, *Eco*RI, *Hind*II, *Sma*I, etc.) y los patrones de restricción para cada enzima se denominan 1 (para la cepa prototipo) y 2, 3, 4, etc. para las variantes. Los perfiles de restricción con *Bam*HI permiten además una primera aproxima-

ción a la distinción de especie. Como se muestra en la Figura 55.1, las características generales de los perfiles de restricción *Bam*HI de serotipos de las especies B, C y E son claramente distinguibles. Asimismo, el porcentaje de fragmentos co-migrantes entre variantes genómicas de un mismo serotipo o especies es evidente.

Las enzimas de restricción con sitios de reconocimiento determinados por 4 pares de bases como *Hae*III, *Rsa*I, *Mse*I, etc. generan perfiles de mayor complejidad con un número más alto de fragmentos lo que permite una comparación más rigurosa de dos o más variantes genómicas relacionadas a través del análisis electroforético en geles de agarosa y determinación del porcentaje de fragmentos co-migrantes (Kajon y Wadell, 1992).

3. ENSAYOS MOLECULARES PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIE Y SEROTIPO DE CEPAS DE ADENOVIRUS

La metodología tradicional para la determinación del serotipo de una cepa dada de adenovirus es la seroneutralización con antiseros de referencia. La identidad serológica de la fibra puede ser determinada independientemente en ensayos inhibición de la hemaglutinación. La rápida acumulación de datos de secuencia de genomas de adenovirus ha permitido el desarrollo de ensayos rápidos de detección y tipificación basados en ensayos PCR. Las regiones del genoma más utilizadas para la determinación de especie (o subgrupo/subgénero) son la fibra y la región codificante de VA RNA. La amplificación y secuenciación de la región hipervariable 7 del gen del hexón permite el diagnóstico de certeza del serotipo (Sarantis *et al.*, 2004). Por otro lado, la determinación del serotipo a nivel del gen del hexón y el gen de la fibra hace posible la identificación de variantes intermedias resultantes de eventos de recombinación entre dos serotipos de una misma especie. La circulación de variantes intermedias de la especie B en asociación con patología respiratoria ha sido documentada por numerosos autores.

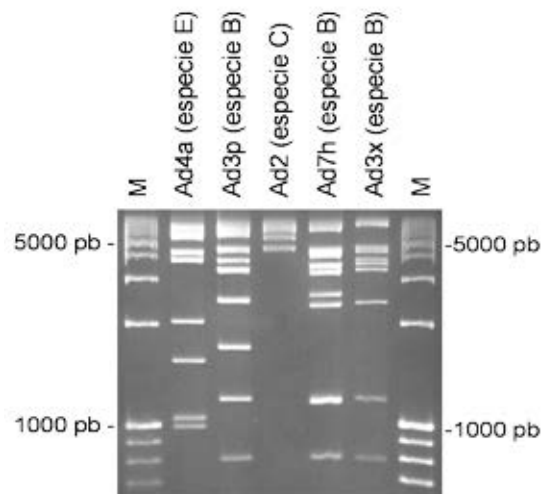


Figura 55.1. Perfiles de restricción *Bam*HI de variantes genómicas de los serotipos 3, 7 (especie B), 2 (especie C) y 4 (especie E) visualizados en un gel horizontal de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio.

4. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA BAJA EN HOSPITALES DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES Y ALREDEDORES

Desde mediados de la década de los años 1980, la vigilancia epidemiológica y el acceso al diagnóstico virológico rápido en un número considerable de hospitales de la ciudad de Buenos Aires han permitido establecer el importante rol de los adenovirus en la etiología de la infección respiratoria aguda baja en la población pediátrica argentina menor de 5 años de edad. La caracterización de cepas de adenovirus aisladas de pacientes hospitalizados con patología respiratoria aguda baja en los hospitales pediátricos "Ricardo Gutiérrez", "Juan P. Garrahan" y otros ha permitido determinar el papel protagónico de los adenovirus de la especie B en la etiología de las neumonías graves (secuelas o fatales) y en particular, la alta prevalencia del serotipo 7 y el tipo genómico Ad7h. Esta variante genómica aislada por primera vez en Argentina en 1985, y desde entonces en circulación ininterrumpida en el cono sur de Sudamérica (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay), es un recombinante intertípico con un hexón correspondiente al serotipo 7 y una fibra correspondiente al serotipo 3. La variante genómica Ad 7h ha sido detectada recientemente en Japón y en los Estados Unidos en casos de infección respiratoria, demostrando así la reciente diseminación de este tipo genómico de Ad7 a otras áreas geográficas distantes.

Los datos de los estudios epidemiológicos moleculares realizados sobre muestras de aspirado nasofaríngeo de pacientes pediátricos hospitalizados por infección respiratoria aguda baja y el análisis de la aparición en el tiempo de distintas variantes genómicas de Ad7 sugieren la emergencia del tipo genómico Ad7h en reemplazo de Ad7c, la variante predominante hasta 1985 (Figura 55.2). Reemplazos o sustituciones similares han sido descriptos en Europa, Australia (7b sustituyendo a 7c), China (7d sustituyendo a 7b) pero los mecanismos moleculares de este intrigante fenómeno no han sido elucidados. Da-

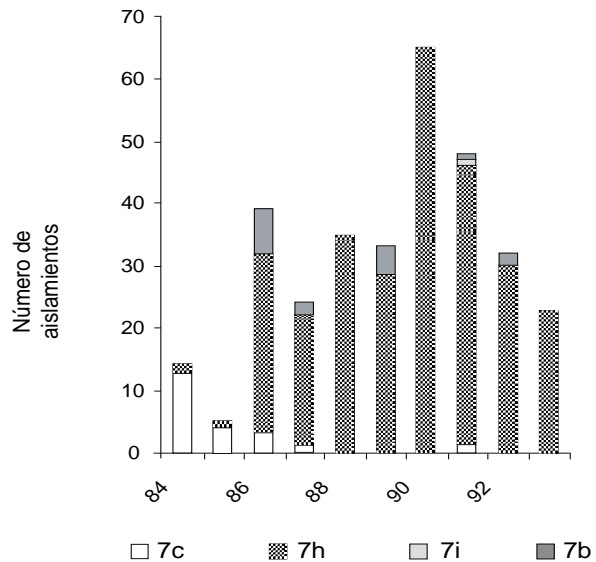


Figura 55.2: Distribución temporal de aislamientos de adenovirus tipo 7 en el cono sur de Sudamérica correspondientes a los tipos genómicos 7b, 7c, 7h, y 7i, mostrando el reemplazo de Ad7c por Ad7h a partir de 1986.

tos de estudios recientes demuestran la continua circulación de Ad7h hasta por lo menos 2005 y la frecuente asociación de esta variante genómica con enfermedad respiratoria grave y secuelar en la población pediátrica del cono sur de América.

Este capítulo fue finalizado en el año 2008.

Bibliografía

- Adrian T, Wadell G, Hierholzer JC, Wigand R. "DNA restriction analysis of adenovirus prototypes 1 to 41". *Arch Virol* 1986; 91:277-90.
- Erdman DD, Xu W, Gerber SI, Gray GC, Schnurr A, Kajon A, Anderson LJ. "Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000". *Emerg Infect Dis* 2002; 8:269-77.
- Kajon A, Wadell G. "Characterization of adenovirus genome type 7h: analysis of its relationship to other members of serotype 7". *Intervirology* 1992; 33:86-90.
- Kajon A, Wadell G. "Genome analysis of South American adenovirus strains of serotype 7 collected over a 7-year period". *J Clin Microbiol* 1994; 32:2321-3.
- Kajon A, Erdman, D. "Assessment of Genetic Variability Among Subspecies B1 Human Adenoviruses for Molecular Epidemiology Studies". *En Adenovirus Methods and Protocols*. Second Edition. W Wold and A Tollefsson, editors. Humana Press, 2006.
- Murtagh P, Cerqueiro C, Halac A, Avila M, Kajon A. "Adenovirus type 7h respiratory infections: a report of 29 cases of acute lower respiratory disease". *Acta Paediatr* 1993, 82: 557-61.
- Murtagh P, Kajon A. "Chronic pulmonary sequelae of adenovirus infection". *Pediatr Pulmonol* 1997, Suppl 16, 150-1.
- Wadell, G. "Molecular epidemiology of human adenoviruses". *Curr Top Microbiol Immunol* 1984; 110:191-220.
- Wadell G, de Jong JC, Wolontis S. "Molecular epidemiology of adenoviruses: alternating appearance of two different genome types of adenovirus 7 during epidemic outbreaks in Europe from 1958 to 1980". *Infect Immun* 1981; 34:368-77.
- Weissenbacher M, Carballal G, Avila M, Salomon H, Harisiadi J, Catalano M, et al. "Etiologic and clinical evaluation of acute lower respiratory tract infections in young Argentinian children: an overview". *Rev Infect Dis* 1990; 12 Suppl 8: S889-98.

Epidemiología molecular de hantavirus

Paula J. Padula

En este capítulo se describen los avances en la epidemiología molecular de los hantavirus en Sudamérica. Estos estudios están basados en la caracterización molecular de los virus que permitieron la construcción de un banco de datos genéticos de las cepas representativas de la región, de relevancia epidemiológica para el continente, y que ha servido para el análisis filogenético de los virus responsables por las emergencias sanitarias que ocurrieron en América en los últimos años.

Un aspecto importante del uso de la biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas es el poder establecer patrones epidemiológicos más precisos. La contribución más valiosa de la epidemiología molecular es brindar una evaluación certera de una situación específica y dar una respuesta adecuada y a tiempo con decisiones basadas en un mínimo de incertidumbres. Por otra parte, la monitorización epidemiológica permite establecer la evolución de especies patógenas por variaciones genotípicas o mutaciones.

Por ser el síndrome pulmonar por hantavirus (SPH) una enfermedad de reciente descubrimiento es importante, además del diagnóstico serológico y la investigación epidemiológica, la caracterización del hantavirus asociado a cada caso ocurrido.

Para los virus causantes del SPH, el período de incubación oscila entre 12 a 27 días, lo que dificulta determinar el preciso sitio de infección, especialmente en aquellos casos donde hubo desplazamientos por razones laborales o turísticas. En el caso de los estudios en roedores, los muestreos epidemiológicos moleculares permiten establecer poblaciones de riesgo en donde se pueda intervenir de manera preventiva para disminuir la incidencia de los hantavirus.

Una vez confirmado un caso por serología, se realiza la amplificación genómica viral, mediante transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y secuenciamiento genómico. La determinación automatizada de las secuencias posibilita realizar en forma rápida la comparación genómica, analizar las relaciones filogenéticas entre diferentes aislamientos y trazar una correlación de las diferencias encontradas con la relevancia de posibles cambios biológicos, por ejemplo la gravedad de la enfermedad. A su vez, por tratarse de una zoonosis, la información resultante del análisis de variantes circulantes en roedores es importante, ya que permite inferir la dinámica de variación en los reservorios, y así optimizar las interpretaciones acerca del posible origen de cepas emergentes en un futuro.

Los miembros de la familia *Bunyaviridae*, género *Hantavirus* poseen un genoma consistente en 3 segmentos de RNA simple cadena de polaridad negativa, denominados largo (L) de 6,5-kb, medio (M) de 3,6-kb, y pequeño (S) de 1,8-kb. El segmento L codifica para una proteína, la RNA polimerasa-RNA dependiente, que contiene la actividad enzimática para la replicación y transcripción de los segmentos genómicos. El segmento M codifica para un precursor glicoproteico que da lugar a las glicoproteínas de superficie Gn y Gc y el segmento S codifica para la nucleoproteína (N).

Para comenzar a conocer las relaciones filogenéticas de las especies virales involucradas en la infección en humanos en el Cono Sur de América, se realizó un análisis filogenético de máxima parsimonia basado en las diferencias nucleotídicas de fragmentos del segmento viral S correspondiente a zonas codificantes para la N, así como el análisis del segmento M correspondiente a zonas co-

dificantes para la Gn y Gc de casos confirmados en comparación a hantavirus ya caracterizados. Cabe aclarar que actualmente no existe reloj molecular alguno que permita predecir la evolución de los hantavirus; es por ello que el análisis de elección fue el de máxima parsimonia.

En virus con genoma segmentado, como los hantavirus, es importante realizar el estudio filogenético en más de un segmento ya que existe la posibilidad de reasociación genómica dando lugar a variantes virales de patogenia desconocida. Por otro lado, la posibilidad de recombinación, ya detectada para algunos de los hantavirus, sugiere la necesidad de secuenciar los segmentos genómicos completos al menos en las cepas prototipo.

La secuencia nucleotídica completa del segmento genómico S y M del virus Andes reveló una organización similar en comparación con otros hantavirus. Para el monitoreo de la circulación de las diferentes variantes de hantavirus, sin embargo, se utilizan fragmentos genómicos de menores tamaños pero representativos del gen completo.

En las muestras humanas y de roedores analizadas, los árboles filogenéticos mostraron buena correspondencia entre ambos segmentos, por lo que en esta breve descripción de las cepas virales circulantes en la región mostraremos sólo el análisis de un fragmento codificante de 905 nucleótidos del segmento S representativo de un mayor número de secuencias disponibles en el banco de genes (Tabla 56.1 y Figura 56.1).

En Argentina, los virus de casos correspondieron a variantes genéticas del virus Andes (AND) o del virus Laguna Negra (LN), caracterizado originalmente en Paraguay. Dentro de las variantes genéticas del virus AND se pudieron distinguir al menos 6 linajes genéticos. El rango de identidad nucleotídica y aminoacídica de los linajes del virus AND oscila entre el 82,9 al 92,6% y del 95,4 al 99,3%, respectivamente.

Un estudio filogenético más detallado que realizamos en la provincia de Buenos Aires mostró que en una de las localidades de esa provincia co-circulan dos de los tres linajes asociados a casos de SPH. Aún no se ha podido relacionar la gravedad de la enfermedad con las distintas variantes genéticas circulantes, ni atribuir la capacidad de transmisión persona a persona a algún linaje particular ya que, hasta el momento actual, dos linajes fueron responsables de estos eventos.

La combinación de información molecular, serológica, y ecológica es necesaria para poder categorizar a las cepas de hantavirus en especies virales diferentes, o variantes de un mismo virus. Hasta la fecha el Comité Internacional de Taxonomía de virus (ICTV) reconoció únicamente como especie viral al virus Andes, de entre las cepas circulantes en Argentina. El criterio utilizado fue: i) único nicho ecológico; ii) exhibir por lo menos 7% de diferencias a nivel aminoacídico en las secuencias correspondientes a las proteínas N y al precursor glicoproteico; iii) mostrar una diferencia de por lo menos 4 veces en una prueba de neutralización cruzada de dos vías; y iv) que las especies no presenten reasociación natural con otras especies.

Otras cepas virales caracterizadas hasta el momento no permiten, según el criterio expuesto, ser consideradas nuevas especies virales; es por ello que a veces se las denomina virus relacionados a Andes. Tal es el caso de las cepas Lechiguanas. Plata, Hu39694 circulantes en Provincia de Buenos Aires y sur de Entre Ríos y

Santa Fe, o Bermejo, Orán y, probablemente Jujituba en el norte del país.

A diferencia de los otros cuatro géneros de la familia *Bunyaviridae* que involucran en su ciclo artrópodos como mosquitos o garrapatas, cada hantavirus se perpetúa en la naturaleza en una única o pocas y muy relacionadas especies de roedor. El número tan bajo de animales positivos capturados en algunas regiones de Argentina no permitió postular cuál es el reservorio de algunos linajes. Sin embargo, la existencia de diversos linajes en cuatro especies de roedores *Oligoryzomys* (*O. longicaudatus*, *O. chacoensis*, *O. flavescens* y *O. nigripis*) es una evidencia para considerar a este género como el reservorio de virus patogénicos y por ende factor de riesgo para la adquisición de la enfermedad. Se requieren más datos sobre la geografía, ecología y evolución de los diferentes reservorios primarios para clarificar el estado taxonómico de los diferentes linajes de virus junto con reacciones de neutralización cruzadas entre los distintos linajes y cepas virales. La gran dificultad para aislar estos virus es lo que detiene y limita la clasificación final. En general, las relaciones filogenéticas entre diferentes hantavirus y sus roedores reservorios son imágenes en espejo, apoyando así la co-evolución entre virus y hospedador. La mayor fuente de variación genética para los hantavirus es la acumulación de bases, deleciones y sustituciones. La reasociación se comprobó en muy pocas oportunidades. Sin embargo, la recombinación parecería más probable como ya ha sido demostrada para otros virus a RNA.

La interpretación que se deriva del estudio de las relaciones filogenéticas y evolutivas, depende en gran medida de una conformación integral del banco de datos con la totalidad de las variantes existentes, para lo cual resulta esencial el continuo compromiso de todos los países en un proyecto regional integrado. Hasta el momento, si bien se han detectado casos o roedores serológicamente positivos en diferentes localidades, no todos los virus asociados fueron determinados.

La distribución de casos de SPH en la región es muy amplia abarcando localidades con alta densidad poblacional. Por lo tanto, la población en riesgo potencial es grande. Ante el escaso conocimiento sobre los roedores reservorios, la inexistencia de vacunas y de antivirales efectivos, la principal herramienta contra esta enfermedad es actualmente el diagnóstico rápido y la implementación de terapias de apoyo adecuadas y tempranas en el tratamiento de los pacientes.

Otra enfermedad grave producida por hantavirus es la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR), caracterizada por fiebre, hemorragia, falla renal y trombocitopenia. Al menos siete hantavirus causan FHSR: Hantaan, Seoul (SEO), Dobrava-Belgrade, Saaremaa, Amur, Thailand y Puumala, siendo el virus SEO de distribución mundial. Hasta la fecha no se encontraron indicios de infección por virus SEO en humanos en Argentina, aunque la búsqueda no ha sido exhaustiva.

Para investigar la epidemiología de la FHSR y la transmisión viral, diseñamos bacterias genéticamente modificadas conteniendo un plásmido procariota con capacidad para expresar la nucleoproteína del virus SEO de 430 aminoácidos. Luego de la expresión, la nucleoproteína recombinante fue probada satisfactoriamente como antígeno para su uso en ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para diagnóstico de la infección. La nueva herramienta diagnóstica permitirá su uso con mínimo riesgo de infección laboratorial ampliando las investigaciones de la circulación del virus en poblaciones de ratas y la posible enfermedad en humanos.

Con el fin de conocer el nivel de transmisión viral en poblaciones de ratas marrones (*Rattus norvegicus*) capturadas en la ciudad de Buenos Aires, evaluamos la presencia de genoma viral en tejidos de ratas serológicamente positivas para el virus SEO. El genoma viral fue detectado en 11 de las 21 ratas seropositivas

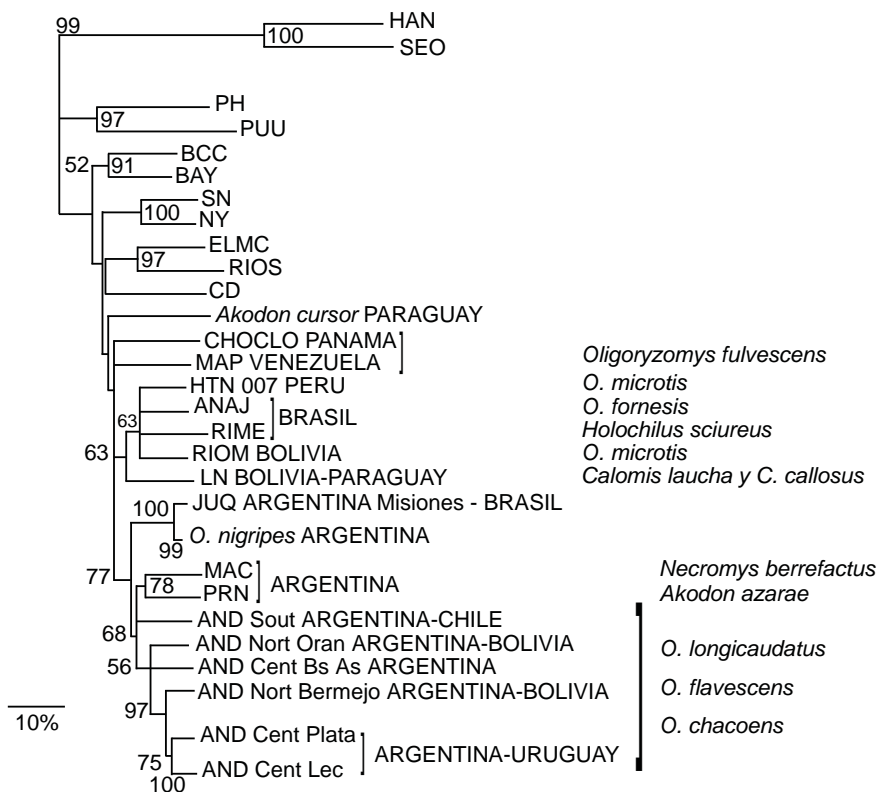


Figura 56.1. Árbol filogenético de máxima parsimonia entre secuencias nucleotídicas disponibles de la proteína N de hantavirus de América utilizando un fragmento de 904 nucleótidos. Se muestra en la unión de los brazos los valores de *bootstrap* superiores al 50% obtenidos de 1000 réplicas. El largo de los brazos horizontales es proporcional a las diferencias nucleotídicas.

(52,4%), capturadas en dos parques de la ciudad. El análisis de las secuencias de un fragmento viral genómico (333 nts.) de la proteína Gc presentó 97% y 96% de similitud con las cepas de SEO colectadas en Baltimore y en Brasil, respectivamente. Los datos obtenidos confirman que una gran proporción de las ratas tienen virus, que la diversidad genética es muy pequeña entre las cepas del virus SEO y la necesidad de estrategias de control que permitan reducir el riesgo de infección de las ratas a los humanos.

La aplicación de las técnicas moleculares en la caracterización precisa del agente y su posterior análisis filogenético en estudios

de epidemiología molecular contribuye a la identificación, caracterización, y el seguimiento a campo de las fuentes de diseminación del virus.

La sistematización de la metodología para los análisis filogenéticos y estudios de epidemiología molecular de los diversos países de la región, complementados con los análisis antigénicos y de sero-neutralización serán útiles para evaluar la inmunogenicidad de las cepas utilizadas en la formulación de futuras vacunas, representando una importante contribución al establecimiento de mejores estrategias para la vigilancia y el control de los hantavirus.

Bibliografía

- Bohlman MC, Morzunov SP, Meissner J, Taylor MB, Ishibashi K, Rowe J, *et al.* "Analysis of hantavirus genetic diversity in Argentina: S segment-derived phylogeny". *J Virol* 2002;76:3765-73.
- Cueto GR, Cavia R, Bellomo C, Padula PJ, Suárez OV. "Prevalence of hantavirus infection in wild *Rattus norvegicus* and *R. rattus* populations of Buenos Aires City, Argentina". *Trop Med Int Health* 2008; 13:46-51.
- Levis S, Garcia J, Pini N, Calderon G, Ramirez J, Bravo D, *et al.* "Hantavirus pulmonary syndrome in northwestern Argentina: circulation of Laguna Negra virus associated with *Calomys callosus*". *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:658-63.
- Martinez VP, Bellomo C, San Juan J, Pinna D, Forlenza R, Elder M, *et al.* "Person-to-person transmission of Andes virus". *Emerg Infect Dis* 2005;11:1848-53.
- Mills JN. "Regulation of rodent-borne viruses in the natural host: implications for human disease". *Arch Virol Suppl* 2005; 19: 45-57.
- Padula, PJ; Martínez, VP; Cueto, GR; Cavia, R; Suárez, OV. "Partial genetic characterization of Seoul hantavirus in rats from Buenos Aires City, and generation of a Seoul recombinant nucleoprotein antigen". *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; 1: 97-103.
- Padula PJ, Colavecchia SB, Martinez VP, Gonzalez Della Valle MO, Edelstein A, Miguel SD, *et al.* "Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America". *J Clin Microbiol* 2000;38:3029-35.
- Padula PJ, Sanchez AJ, Edelstein A, Nichol ST. "Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Andes virus and analysis of the variability of the termini of the virus S, M and L RNA segments". *J Gen Virol* 2002;83:2117-22.



PARTE 7

Bioseguridad

Bioseguridad en la práctica biomédica y en el laboratorio

Liliana Martínez Peralta

1. INTRODUCCIÓN

Los laboratorios microbiológicos son lugares de trabajo especiales, que presentan riesgos identificables de contagio de infecciones a personas dentro o cerca de ellos. Las infecciones se han adquirido en laboratorios durante toda la historia de la Microbiología. Reportes publicados a comienzos del siglo XX describían infecciones de fiebre tifoidea, cólera, brucelosis y tétanos asociadas al laboratorio. En 1949 Sulkin y Pike publicaron la primera de una serie de encuestas de infecciones asociadas al trabajo en laboratorio. Reportaron 222 infecciones virales, de las cuales 21 fueron fatales. Por lo menos en un tercio de los casos la probable fuente de infección era considerada asociada al manipuleo de animales y tejidos infectados, habiéndose reportado accidentes en sólo un 12% de los casos estudiados. En 1951 publicaron la segunda serie de casos, basados en un cuestionario enviado a 5 000 laboratorios. Sólo un tercio de los 1 342 casos citados había sido reportado en la literatura. La brucelosis fue la infección más citada –y junto con la tuberculosis, tularemia, tifoidea y estreptococcias– comprendieron al 72% de infecciones bacterianas. La mortalidad fue de 3% y nuevamente sólo 16% de los accidentes habían sido reportados. La mayoría fue relacionado al uso de jeringas y agujas y a la aspiración con la boca de fluidos contenidos en pipetas.

Esta encuesta se actualizó en 1965, añadiendo 641 casos nuevos, y luego en 1976, totalizando 3 921 casos. Las infecciones más comúnmente reportadas fueron: brucelosis, tifoidea, tularemia, tuberculosis, hepatitis y encefalitis equina venezolana. Menos del 20% de estas infecciones estaba relacionada con un accidente reportado. La exposición a aerosoles contaminados fue considerada una fuente de infección posible aunque no confirmada para más del 80% de los casos. Los cambios en las prácticas de laboratorio, por ejemplo, el dejar de aspirar con la boca pipetas conteniendo líquidos significó un cambio en las causas de accidentes, aunque planteó nuevos riesgos, como la inhalación de aerosoles y los accidentes percutáneos.

En 1974 Skinholj publicó los resultados de una encuesta que mostraba que la incidencia de hepatitis en los trabajadores de laboratorios clínicos de Dinamarca era siete veces mayor que la de la población general. En 1976, una encuesta en Inglaterra realizada por Harrington y Shannon demostró que los trabajadores médicos tenían una probabilidad de adquirir tuberculosis cinco veces mayor que la población general.

En contraste con la ocurrencia documentada de infecciones adquiridas en el laboratorio por parte del personal del mismo, los laboratorios que trabajan con agentes infecciosos no han presentado en sí mismos una amenaza a la comunidad. Por ejemplo, a pesar de que el Centro de Control de Enfermedades (*Centres for Diseases Control and Prevention [CDC]*, Atlanta, EE.UU.) reportó 109 infecciones asociadas al laboratorio en el período 1947-1973, no se registraron casos secundarios en familiares o contactos de la comunidad. Sólo se han documentado casos aislados, lo cual confirma las observaciones en este sentido.

En su revisión de 1979, Pike concluyó que "el conocimiento, las técnicas, y el equipo para prevenir la mayoría de las infecciones de laboratorio están disponibles".

Aún antes de que el HIV fuera identificado como el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), los principios para manipular un patógeno transmisible por sangre eran adecuados para el trabajo en laboratorio. Pero el descubrimiento del HIV significó un estímulo para la aplicación de manuales de laboratorio y de trabajo médico en actividades asociadas con la manipulación del HIV. Entonces se promulgaron reglas para los trabajadores de salud bajo la rúbrica de **Precauciones Universales**.

La experiencia ha demostrado la eficiencia de las prácticas sistemáticas de las medidas de **Bioseguridad** (en inglés *biosafety level* o BSL) de Nivel 1-4, y procedimientos descriptos para la manipulación de agentes etiológicos en laboratorios y bioterios para animales. A pesar de que no hay sistemas organizados para la vigilancia de las infecciones adquiridas en el laboratorio, la información anecdótica sugiere que la estricta adherencia a estas reglas contribuye a un ambiente de trabajo más seguro y saludable para laboratoristas, personal de apoyo, y para la comunidad en general. Para reducir aún más el potencial para infecciones asociadas al laboratorio, cada laboratorio debería tomar las Precauciones Universales como una guía mínima. Las guías deben ser adaptadas a cada laboratorio individual y utilizadas en conjunción con toda la posible información científica.

2. PRINCIPIOS DE BIOSEGURIDAD

La definición de Bioseguridad implica un concepto muy amplio: **es el conjunto de normas diseñadas para la protección del individuo (personal de salud, pacientes), de la comunidad y del medio ambiente contra el contacto accidental con patógenos biológicos, químicos o elementos radiactivos.**

Dado que en este capítulo no se pueden desarrollar todos los aspectos concernientes a la bioseguridad, el tema se concentrará en la bioseguridad en el trabajo en laboratorio, que constituye uno de los lugares más riesgosos de las instituciones de salud. En la bibliografía se proveen referencias para consultar otros temas de bioseguridad.

El término "**contención**" se utiliza para describir los métodos de barreras para manipular material infeccioso en el laboratorio donde se manipulan o mantienen. El propósito de esta contención es reducir o eliminar la exposición de trabajadores de la salud y del laboratorio, de otras personas, y del medio externo a agentes patógenos potenciales.

Barreras primarias. La protección del personal y el medio del laboratorio para la exposición a agentes infecciosos se logra a través de las buenas prácticas de laboratorio y del uso de equipo apropiado de protección. El empleo de vacunas puede proveer un nivel mayor de protección personal.

Barreras secundarias. La protección del medio externo con respecto al laboratorio microbiológico se logra a través de la combinación del diseño de las instalaciones y de las prácticas operacionales. En síntesis, los tres elementos de contención incluyen:

- Prácticas y Técnicas de laboratorio.
- Equipo de seguridad
- Diseño de las instalaciones

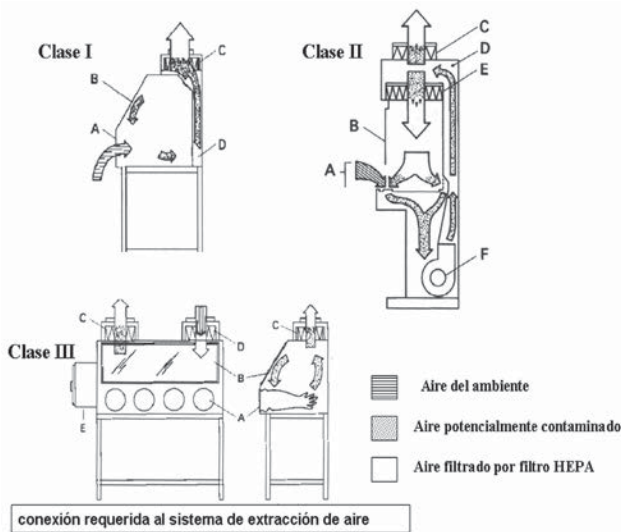


Figura 57.1. Esquema de cabinas de bioseguridad clase I, II y III. Flechas: A: Abertura frontal; B: mampara; C: filtro HEPA de salida; D: Compartimento de salida (en Clase II: filtro HEPA de entrada); E: filtro HEPA de entrada (en Clase III: dispositivo de presión negativa) F: dispositivo de presión negativa.

2.1 BARRERAS PRIMARIAS: PRÁCTICAS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO

El elemento de contención más importante es la adherencia estricta a las prácticas y técnicas de rutina de laboratorio. Las personas que trabajan con agentes infecciosos o materiales potencialmen-

te infectados deben estar informados sobre peligros potenciales, y deben estar entrenados eficientemente en las prácticas y técnicas requeridas para manipular este material adecuadamente. El director o la persona a cargo del laboratorio es el responsable de organizar el entrenamiento adecuado del personal.

Cada laboratorio deberá desarrollar o adoptar un manual de bioseguridad que identifique los riesgos posibles de trabajo, y que especifique las prácticas y procedimientos diseñados para minimizar o eliminar las exposiciones a dichos riesgos. El personal deberá firmar formalmente su compromiso a conocer y seguir los lineamientos del manual de bioseguridad.

2.2 BARRERAS PRIMARIAS: EQUIPO DE SEGURIDAD

Éste incluye las cabinas de seguridad, contenedores de seguridad, y otros controles diseñados para minimizar exposiciones a materiales peligrosos.

Las cabinas de bioseguridad son los principales elementos para evitar salpicaduras o aerosoles generados a través de muchos procedimientos microbiológicos. Existen tres tipos de cabinas, las que se ilustran en la Figura 57.1.

Las cabinas abiertas al frente (Clase I y II) son barreras primarias que ofrecen niveles significativos de protección al personal de laboratorio y al medio si se utilizan con buenas prácticas microbiológicas. Las cabinas de Clase II también protegen de la contaminación externa de los materiales (por ejemplo, cultivos celulares, *stocks* microbiológicos) que se manipulan dentro de la cabina. La cabina Clase III provee el nivel mayor de protección al personal y al medio.

Otro ejemplo de barreras primarias son las centrifugas de seguridad biológica (CSB), que previenen los aerosoles originados por los procedimientos de centrifugación. Además, se incluyen dentro de las barreras primarias los artículos de protección personal, tales como guantes, guardapolvos, cobertura de calzado, o máscaras. Este equipo de protección personal se usa a menudo en combinación con cabinas de bioseguridad y otros elementos de protección.



Nivel	Agentes	Prácticas	Barreras primarias	Barreras secundarias
BSL-1	No se conoce que cause enfermedad en adultos	De rutina	Ninguna requerida	Mesada abierta Lavado de manos
BSL-2	Asociados con enfermedad Riesgo: percutáneo ingestión, membrana mucosa	BSL-1 más: Acceso limitado Señales de riesgo Precauciones contra punzantes Manual definiendo descontaminación de residuos y vigilancia	Barreras primarias: Clase I o II u otras que eviten aerosoles Protección personal: guardapolvos, guantes, protección facial si es necesaria	BSL-1 más: autoclave
BSL-3	Agentes locales o exóticos con potencial para transmisión por aerosol: la enfermedad causada puede tener consecuencias serias o letales	BSL-2 más: Acceso controlado Descontaminación de todo residuo Descontaminación de ropa de laboratorio antes de lavandería Serología de control al entrar a trabajar	Barreras primarias: Clase I o II u otras que eviten aerosoles. Protección personal: guardapolvos, guantes, protección respiratoria si es necesaria	BSL-2 más: Separación física de corredores de acceso Acceso de doble puerta Aire de salida no recirculado Flujo de aire negativo en el laboratorio
BSL-4	Agentes peligrosos/exóticos que presenten alto riesgo de enfermedad con alta letalidad, infecciones transmitidas por aerosol, o agentes con riesgo de contagio desconocido	BSL-3 más: Cambio de ropas antes de entrar Ducha al salir Todos los materiales deben ser descontaminados antes de salir de instalaciones	Barreras primarias: Todos los procedimientos realizados en Clase III; II; o I; en combinación con un traje completo de presión positiva	BSL-3 más: Edificio separado o zona aislada Sistemas especiales de provisión y eliminación de residuos, vacío y descontaminación Otros requerimientos que se agregan en el texto

Tabla 57.1. Niveles de Bioseguridad de laboratorios (BSL).

Nivel	Procedimientos y equipo de seguridad
NBSA-1	Acceso restringido, ropa y guantes protectores
NBSA-2	Procedimientos del NBSA-1, más acceso limitado CSB de clase I o II para actividades que producen aerosoles Descontaminación de desechos y jaulas antes del lavado
NBSA-3	Procedimientos del NBSA-2, más acceso controlado CSB y ropa protectora especial para todas las actividades
NBSA-4	Procedimientos del NBSA-3, más acceso estrictamente restringido Muda de ropa antes de entrar. CSB de clase III o trajes de presión positiva Duchas a la salida Descontaminación de todos los desechos antes de su salida de las instalaciones

Tabla 57.2. Niveles de contención de bioerios (NBSA).

2.3 BARRERAS SECUNDARIAS: DISEÑO DE LAS INSTALACIONES

El diseño y construcción de las instalaciones contribuye a:

- Proteger los trabajadores del laboratorio
- Proveer una barrera para proteger a las personas fuera del laboratorio
- Proteger a las personas o animales de la comunidad de agentes infecciosos que pueden accidentalmente ser liberados del laboratorio.

Las barreras secundarias recomendadas dependerán del riesgo de transmisión de agentes específicos. Por ejemplo, los riesgos de exposición para la mayoría de los trabajos de laboratorio en los niveles 1 y 2 están asociados al contacto directo con los agentes, o a la exposición inadvertida a través del medio de trabajo contaminado. Las barreras secundarias en esos laboratorios pueden incluir la separación de las áreas de trabajo del laboratorio del acceso de público, posibilidad de descontaminación (autoclave) y facilidades para el lavado de manos.

Cuando se presenta el riesgo de infección por exposición a aerosoles, se requieren mayores niveles de contención y múltiples barreras secundarias para prevenir el escape de agentes infecciosos al medio. Esto incluye sistemas de ventilación especializados para asegurar el flujo aéreo, sistemas de tratamiento del aire para descontaminar o remover agentes del aire de salida, zonas de acceso controlado, entradas a los laboratorios como esclusas de aire (*air-lock*), o edificios o módulos separados para instalar el laboratorio.

Virus	Riesgo de seroconversión
Hepatitis B * (HBsAg-positivo)	HBeAg-negativo: 5% HBeAg-positivo: 19-30%
Hepatitis C *	1,8%
HIV *	0,31%

Tabla 57.3. Riesgo promedio de seroconversión post-exposición percutánea a fuente infectada. * Datos de *Epidem Rev* 1994, 16:437-50. * Datos de *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998, 47(RR-19):1-39.

3. NIVELES DE BIOSEGURIDAD

Se describen cuatro niveles de bioseguridad, que consisten en combinaciones de prácticas y técnicas de laboratorio, equipo de seguridad, y facilidades. Cada combinación es apropiada para las operaciones que se realizan, las rutas documentadas o sospechadas de transmisión de los agentes infecciosos, y la actividad o función del laboratorio. La descripción de estos niveles se muestra en la Tabla 57.1.

3.1. NIVEL 1 (BSL-1)

Este nivel es adecuado para el entrenamiento de pregrado, y para los laboratorios en los cuales se trabaja con cepas definidas de microorganismos que no causen enfermedad en adultos sanos. Ejemplos representativos son: *Bacillus subtilis*, *Naegleria gruberi*, el virus de la hepatitis canina, etc. Se debe recordar que muchos agentes no asociados con patología humana pueden ser, sin embargo, peligrosos para los muy jóvenes, los ancianos y los inmunocomprometidos. Las cepas vacunales que han sufrido numerosos pasajes *in vivo* no se deben considerar avirulentas simplemente por ser vacunales.

Este es un nivel básico de contención que se basa en las prácticas de rutina de microbiología sin recomendación especial de barreras primarias o secundarias, más que disponibilidad para lavado de manos.

3.2. NIVEL 2 (BSL-2)

Este nivel es adecuado para el trabajo clínico y diagnóstico, y otros laboratorios que trabajen con agentes de riesgo moderado que están presentes en la comunidad y asociados con enfermedades de gravedad variable. Con buenas prácticas microbiológicas estos agentes pueden ser manipulados en cabinas abiertas, siempre que el riesgo de aerosoles o salpicaduras sea bajo. Ejemplos representativos de este nivel son: el virus hepatitis B, HIV, *Salmonella spp.*, *Toxoplasma spp.*

Este nivel es adecuado cuando se trabaja con fluidos humanos como sangre, tejidos humanos, o cultivos primarios humanos en los que la presencia de un agente infeccioso puede ser desconocida.

N (%) de infecciones por HIV en Trabajadores de la salud

Ocupación	Documentados	Posibles	Total
Enfermeras	49 (52,1)	45 (26,5)	94 (35,7)
Trabajadores del Laboratorio	20 (21,2)	23 (13,5)	43 (16,2)
Médicos			
Clínicos	9 (9,6)	17 (10,0)	26 (9,8)
Cirujanos	1 (1,1)	14 (8,2)	15 (5,7)
Otros	15 (16,0)	71 (41,8)	86 (32,6)
Total	94 (100)	170 (100)	264 (100)

Tabla 57.4. Casos de infección por HIV documentados y posibles por ocupación a nivel mundial, 1997. Datos de *Clin Infect Dis* 1999, 28:365-83.

Estado de vacunación y respuesta del trabajador expuesto*	Tratamiento		
	Fuente HBsAg ¹ positivo	Fuente HBsAg negativo	Fuente desconocida o no disponible
Previamente vacunado			
Respondedor ³	No tratar	No tratar	No tratar
No respondedor ⁴	HBIG x 1 ² e iniciar vacunación o HBIG x 2 ⁵	No tratar	Si la fuente es de alto riesgo tratar como si fuera positivo
Respuesta de anticuerpos desconocida	Comprobar título de Ac 1) si es adecuado, no tratar 2) si no es adecuado: HBIG x 1 y <i>booster</i> de vacunas	No tratar	Comprobar título de Ac 1) si es adecuado, no tratar 2) si no es adecuado: dar <i>booster</i> de vacuna y rechequear en 1-2 meses

Tabla 57.5. Profilaxis post-exposición recomendada para el virus de la hepatitis B. ¹ Personas previamente infectadas que son inmunes y no requieren profilaxis. ¹ Antígeno de superficie del virus hepatitis B. ² HBIG: Inmunoglobulina hiperinmune anti-hepatitis B. Dosis: 0,06 ml/kg, intramuscular. ³ Respondedor es quien tiene niveles adecuados de anticuerpos (Ac) anti-HBsAg: >10mUI/ml. ⁴ No respondedor es quien tiene respuesta inadecuada a la vacunación, anticuerpos (Ac) anti-HBsAg: <10mUI/ml. ⁵ La opción de dar una dosis de HBIG y reiniciar la vacunación es para los no respondedores que no completaron una segunda serie de 3 vacunas. Para los que completaron dos series de vacunas pero no respondieron, se prefieren dos dosis de HBIG.

Estado del paciente fuente	Tipo de exposición	
	Menos grave ¹	Grave ²
HIV-Positivo Clase 1 ³	Recomendar 2 drogas	Recomendar 3 drogas
HIV-Positivo Clase 2 ⁴	Recomendar 3 drogas	Recomendar 3 drogas
Status desconocido ⁵	Considerar 2 drogas en caso de paciente con factor de riesgo	Considerar 2 drogas en caso de paciente con factor de riesgo
Fuente desconocida ⁵	Considerar 2 drogas en ámbitos donde la exposición a personas infectadas es probable	Considerar 2 drogas en ámbitos donde la exposición a personas infectadas es probable

Tabla 57.6. Profilaxis post-exposición recomendada para HIV para heridas percutáneas. ¹ por ejemplo: aguja sólida y herida superficial. ² por ejemplo: aguja hueca con gran cavidad, herida profunda, sangre en instrumento. ³ HIV positivo Clase 1: paciente asintomático o con carga viral baja, por ej., <1500 copias de RNA/ml. ⁴ HIV positivo Clase 2: sintomático, SIDA, seroconversión aguda, o carga viral alta conocida. Si se conoce variante resistente en paciente fuente no demorar el inicio de terapia. ⁵ Considerar que la terapia es opcional y deberá estar basada en un diálogo entre la persona expuesta y el médico.

Los riesgos primarios para el personal que trabaje con dichos agentes se relacionan a accidentes percutáneos o de membrana mucosa, o a la ingestión de material infeccioso. Se debe tener extremo cuidado con agujas o instrumentos filosos contaminados. A pesar de que los agentes manipulados en este nivel no se transmiten mediante aerosoles, los procedimientos con potencial de aerosolización o salpicaduras deben ser realizados con barreras primarias (protección facial, guantes, guardapolvos), o bien en cabinas de seguridad o con centrifugas de seguridad. La posibilidad de descontaminar materiales y de acceder al lavado de manos debe existir para reducir la posible contaminación ambiental.

3.3. NIVEL 3 (BSL-3)

Este nivel es adecuado para el trabajo clínico y diagnóstico, y otros laboratorios de producción que trabajen con agentes de

transmisión respiratoria que causen entidades de riesgo serio y potencialmente letal. Ejemplos representativos de este nivel son: *Mycobacterium tuberculosis*, virus de encefalitis de Saint Louis, *Coxiella burnetti*, etc. Los riesgos primarios para el personal trabajando con estos agentes son: autoinoculación, ingestión y exposición a aerosoles infecciosos.

En este nivel se enfatiza el uso de barreras primarias y secundarias para proteger al personal en áreas contiguas, la comunidad, y el medio de la exposición a posibles aerosoles infecciosos. Por ejemplo, todas las manipulaciones deberán ser realizadas en cabinas de seguridad, u otras instalaciones a prueba de aerosoles. Las barreras secundarias para este nivel incluyen el acceso controlado al laboratorio y los requerimientos de ventilación que minimicen el escape de aerosoles infecciosos del laboratorio.

3.4. NIVEL 4 (BSL-4)

Este nivel es adecuado para el trabajo con agentes peligrosos que presenten un alto riesgo individual de una enfermedad que entrañe riesgo para la vida, que puede ser transmitido por aire y para el cual no exista vacuna ni tratamiento. Ejemplos representativos de este nivel son: virus causantes de fiebres hemorrágicas como Machupo, Ebola y Marburg.

Los riesgos primarios para el personal que trabaja con estos agentes son: la exposición respiratoria a aerosoles, exposición de membrana mucosa o piel no intacta a salpicaduras, y la autoinoculación. Todas las manipulaciones de materiales potencialmente infecciosos, aislamientos y de animales infectados en forma natural o experimental, presentan un alto riesgo de exposición e infección al personal de laboratorio, la comunidad, y el medio.

El aislamiento completo del trabajador respecto a materiales aerosolizados se logra a través del trabajo en una cabina Clase III o en un traje personal completo con aire a presión positiva. Las instalaciones de BSL-4 generalmente se ubican en edificios separados o en zonas completamente aislados con requerimientos de ventilación y de tratamientos complejos y especializados de efluentes para evitar el escape de agentes viables al exterior.

3.5. BIOTERIOS DE ANIMALES

Por motivos de seguridad, los animales deben estar alojados en un local independiente, separado del laboratorio. Si se trata de un local contiguo, deberá estar construido de tal modo que sea posible aislarlo de las partes públicas del laboratorio en caso de necesidad, así como para las operaciones de descontaminación y desinfección. Además, hay que tener en cuenta que el empleo de animales de laboratorio con fines experimentales y de diagnóstico impone al usuario la obligación moral de adoptar todas las medidas necesarias para evitar que aquellos padezcan dolores o sufrimientos innecesarios.

Se describen asimismo cuatro niveles de bioseguridad para actividades que involucren el trabajo experimental con animales infectados. Los niveles de contención de bioterios se describen en la Tabla 57.2.

4. INMUNIZACIÓN Y TRATAMIENTO DEL PERSONAL

La transmisión de agentes patógenos por sangre en pacientes y trabajadores de la salud está relacionada a la frecuencia de exposiciones capaces de transmitir, a la prevalencia de la enfermedad en la población fuente, al riesgo de cada tipo de accidente y a la efectividad del manejo postexposición. Los pinchazos por agujas y otros accidentes percutáneos y mucocutáneos son frecuentes, así

como el sub-reporte de estos accidentes. Por ejemplo, en EE.UU. el sistema de vigilancia de hospitales –EPINet– estimó que en 1996 se produjeron aproximadamente 590 164 exposiciones percutáneas y 196 721 mucocutáneas a sangre o sustancias biológicas riesgosas, con un 39% de los incidentes sin reportar. Las estimaciones del CDC son 30% más altas. Cerca de 75% de los médicos residentes de Emergencias de EE.UU. y los residentes de Medicina Interna de Canadá se ven expuestos a pinchazos de agujas durante su entrenamiento, la mayoría de estos casos no son reportados. Un estudio realizado en esos países en cirujanos de ortopedia, demostró 11 pinchazos con agujas promedio por profesional en un período de tres años, con 70% de los accidentes sin reportar. Una revisión realizada por del CDC sobre 9 estudios prospectivos –llevados a cabo desde 1990– reportó que un miembro del equipo quirúrgico sufría por lo menos una herida percutánea durante 1,3-15,4% de los procedimientos. Los accidentes de pacientes por un objeto punzante que previamente hubiera herido al cirujano ocurrieron en 1,7-2,5% de las cirugías y en 0,1% de los partos.

En la población general la prevalencia de individuos potencialmente infecciosos varía mucho dependiendo del virus. En EE.UU. las prevalencias en la población general son: HBV: < 0,5%, HCV: 1%; y HIV: 0,15%. Sin embargo, en grupos de alto riesgo esta prevalencia puede ser mucho mayor. Por ejemplo, en drogadictos intravenosos en Montreal y Vancouver la prevalencia de HCV es del 70 y 85%, respectivamente; y en Buenos Aires y alrededores es del 60% (Ver Capítulo de Epidemiología de HIV). La prevalencia de HIV en usuarios de drogas ilícitas por vía endovenosa ha sido estimada en 19,5%, 9% y 23% en Montreal, Toronto y Vancouver, respectivamente, y en 43% en Buenos Aires. Estas cifras indican la necesidad urgente de adoptar precauciones universales. El uso del examen prequirúrgico es engañoso ya que da una falsa seguridad: el período ventana de HIV es el más contagioso y no se detecta por la serología de tamizaje. Por otro lado, se está mejor entrenado cuando no se varían las condiciones de trabajo de acuerdo al paciente. Existe información limitada sobre la prevalencia de patógenos transmitidos por sangre en trabajadores de la salud, y los datos están basados en muestras no representativas. Aproximadamente 13-17% de los cirujanos tienen evidencia de infección por HBV previa o presente; de 0,8 a 0,9% son positivos para HCV, mientras que la prevalencia de HIV ha sido baja: 0-0,1%. Esto está de acuerdo con el riesgo promedio de seroconversión estimada luego de una exposición significativa a patógenos transmitidos por sangre, sin beneficio de profilaxis (HIV) o vacuna (HBV) (Tabla 57.3). Cuanto mayor sea el volumen de sangre y el título de virus el riesgo será mayor. Usando estos riesgos de transmisión y las posibilidades de heridas percutáneas, se ha estimado el riesgo de transmisión de trabajadores de la salud infectados a los pacientes. Según estimación del CDC durante la carrera de un cirujano el riesgo de transmisión a por lo menos un

Estado de paciente fuente	Tipo de exposición	
	Volumen escaso ¹	Gran volumen ²
HIV-Positivo Clase 1 ³	Recomendar 2 drogas	Recomendar 2 drogas
HIV-Positivo Clase 2 ⁴	Recomendar 2 drogas	Recomendar 3 drogas
Status desconocido ⁵	Considerar 2 drogas en caso de paciente con factor de riesgo	Considerar 2 drogas en caso de paciente con factor de riesgo
Fuente desconocida ⁵	Considerar 2 drogas en ámbitos donde la exposición a personas infectadas es probable	Considerar 2 drogas en ámbitos donde la exposición a personas infectadas es probable

Tabla 57.7. Profilaxis post-exposición recomendada para HIV para la exposición de membranas mucosas y piel no intacta *. * Para accidentes en piel se recomienda el seguimiento sólo cuando hay compromiso de su integridad. ¹ Por ejemplo: sólo unas gotas. ² Por ejemplo: salpicadura abundante de sangre. ³ HIV positivo Clase 1: paciente asintomático o con carga viral baja, por ej., <1500 copias de RNA/ml. ⁴ HIV positivo Clase 2: sintomático, SIDA, seroconversión aguda, o carga viral alta conocida. Aun si se conoce variante resistente en paciente fuente no demorar el inicio de terapia. ⁵ Considerar indica que la terapia es opcional y deberá estar basada en un diálogo entre la persona expuesta y el médico. Se discontinúa la terapia si se comprueba que el paciente era negativo.

paciente durante 3 500 procedimientos es de 0,81-8,1% para HIV y de 57-100% para un portador HBeAg positivo. Los riesgos para HCV no se calcularon en este estudio, pero se estima que serían intermedios entre los de HIV y de HBV.

La introducción de la vacuna para HBV y las precauciones universales contribuyeron a un 95% de disminución en la transmisión ocupacional de HBV a trabajadores de la salud en EE.UU. desde 1983 a 1995. Es difícil reconocer la transmisión de HCV aguda, ya que a menudo es asintomática. La Tabla 57.4 muestra la distribución de casos posibles y documentados de infección por HIV en trabajadores de la salud. La mayoría de estas infecciones fueron causadas por un accidente percutáneo (87,2%) y, cuando se conocía el estadio, 77% de los pacientes fuentes tenía SIDA.

Es necesario que cada institución sanitaria organice un **Comité de Bioseguridad** para prevenir accidentes y para actuar eficazmente cuando se han producido. Se debe prever un grupo de personas que atiendan los casos clínicos particulares después de una infección accidental, ya que se necesita acompañamiento especializado así como –muchas veces– un asesoramiento legal.

Las recomendaciones para profilaxis de la postexposición (PEP) a HBV incluyen: iniciación del esquema de vacunación a cualquier persona no vacunada que tenga un riesgo ocupacional a sangre o fluidos corporales. La administración de gammaglobulina hiperinmune (HBIG) y/o el esquema de vacunación será analizado ante un

accidente luego de la evaluación del estatus del antígeno de superficie (HBsAg) del paciente fuente y la vacunación y respuesta de la persona expuesta (Tabla 57.5). No se recomienda el uso de inmunoglobulinas o terapia antiviral (interferón con o sin ribavirina) para la PEP de HCV. Se realiza seguimiento y pruebas de laboratorio para determinar si se desarrolla la infección. Las recomendaciones para la PEP de HIV incluyen un régimen básico de dos drogas para la mayoría de los accidentes y una tercera droga para los accidentes con riesgo mayor de transmisión (Tablas 57.6 y 57.7). Cuando se sabe o sospecha la resistencia del virus del paciente fuente a una o más drogas utilizadas para el PEP, se recomienda seleccionar las drogas hacia las cuales no es resistente.

Los riesgos que entraña el trabajar con ciertos agentes deben explicarse de forma completa a cada investigador. Antes de comenzar a utilizar probables vacunas o agentes terapéuticos (antibióticos o antivirales) en caso de exposición, deberá evaluarse su disponibilidad local, si están aprobados y su utilidad. Ya existen normas en cuanto al tratamiento de una exposición al HIV y al virus hepatitis B. Lo importante es que haya disponibilidad de drogas para la emergencia en las instituciones de salud.

Con respecto a las vacunas, si están aprobadas y disponibles localmente, deben ofrecerse y, asimismo, exigir su uso en las instituciones sanitarias, por ejemplo la vacuna anti-hepatitis B, la anti-tetánica y la doble bacteriana.

Bibliografía

- Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, US Department of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition, April 1999. Acceso en: <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4s2.htm>
- Fink V, Laufer N, Fonio S, Figueroa MI, Rolón MJ, Cando O, *et al.* "Profilaxis post-exposición ocupacional: experiencia en un hospital general de la Ciudad de Buenos Aires." *Actualizaciones en SIDA* 2005; 13: 119-25.
- Moloughney BW. "Transmission and postexposure management of bloodborne virus infections in the health care setting: Where are we now?" *CMAJ* 2001; 165: 445-51.
- O'Sullivan BG, Levy MH, Dolan KA, Post JJ, Barton SG, Dwyer DE, *et al.* "Hepatitis C transmission and HIV post-exposure prophylaxis after needle- and syringe-sharing in Australian prisons." *Med J Aust* 2003; 178:546-9.
- Organización Mundial de la Salud, Ginebra. *Manual de Bioseguridad en el laboratorio*, 3^a Edición, 2005. ISBN 924-3546-50-3.



Nuevos virus respiratorios emergentes incluyendo el virus de la influenza pandémica H1N1 (2009)

Virus respiratorios emergentes y el nuevo impacto de los rinovirus por medio del diagnóstico molecular

Guadalupe Carballal - Débora N. Marccone - Cristina M. Videla

INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) constituyen una de las principales causas de morbilidad en el ser humano en todo el mundo. Las IRA del tracto inferior (IRA baja) son responsables de 4 millones de muertes anuales mundialmente. Numerosos virus conocidos (influenza, virus sincicial respiratorio, adenovirus y parainfluenza) son responsables de algunas de estas infecciones. Sin embargo, en una proporción importante (50-60%) el o los patógenos responsables no podían ser identificados con las metodologías convencionales de diagnóstico.

La identificación de patógenos desconocidos empleando tecnología molecular es difícil cuando la secuencia *blanco* es desconocida. Para solucionar este problema, van der Hoek y col. (2004), y Allander y col. (2005) desarrollaron innovadoras metodologías moleculares que permitieron la identificación de nuevos virus emergentes asociados a IRA tales como los nuevos coronavirus y el bocavirus humano, respectivamente (Tabla 58.1).

Los virus de influenza A (H1N1) pandémica, influenza aviaria, metapneumovirus humano y SARS se describen en los capítulos respectivos. En este capítulo comentaremos los virus humanos emergentes, detectados en los comienzos del siglo XXI, productos o asociados a IRA: los nuevos bocavirus humanos, los nuevos coronavirus y los poliomavirus respiratorios.

Asimismo, se describirá el nuevo impacto de virus ya conocidos, los rinovirus (causantes del resfrío común) en las IRA del tracto inferior, cuyo estudio fue posible mediante procedimientos moleculares.

Los clásicos postulados enunciados por Roberto Koch, padre de la Microbiología, en relación a la etiología de las enfermedades infecciosas (bacterianas), suelen ser a veces difíciles de demostrar en algunos virus que fueron descubiertos por técnicas moleculares

y que solamente pueden ser identificados por éstos. Según los postulados de Koch, el agente infeccioso debe recuperarse de individuos enfermos, debe poder ser cultivado *in vitro* y debe reproducir la enfermedad en un hospedador animal o voluntario humano. Todos estos postulados se cumplen en el caso de los rinovirus. Por el contrario, el bocavirus humano, o los poliomavirus KI/WU y otros no cumplen con esos postulados. Por esta razón, resulta aún poco claro si estos virus son causa directa de IRA o si actúan en forma sinérgica aumentando la gravedad de otras infecciones virales. Para demostrarlo se requerirán más estudios clínicos de casos y controles y el desarrollo de modelos en animales o de cultivos *in vitro* (no disponibles aún) para demostrar su real patogenicidad.

1. LOS NUEVOS PARVOVIRUS HUMANOS

1.1. EL DESCUBRIMIENTO DEL BOCAVIRUS HUMANO (HBoV)

En el año 2005 se identificaron dos nuevos parvovirus que se denominaron bocavirus humano y PARV4; ambos constituyen otro ejemplo de virus emergentes ya que se desconocían hasta ese momento.

El bocavirus humano (HBoV) por su nombre en inglés (*Human Bocavirus*) fue identificado por Allander y colaboradores en la Universidad Karolinska, Estocolmo, en septiembre de 2005 luego de un arduo y riguroso trabajo de investigación que incluyó un ensayo innovador de PCR y clonado, seguido de análisis bioinformático de las numerosas secuencias de los clones resultantes.

Se emplearon mezclas de 24 muestras respiratorias en las que se concentraron los virus presentes y se eliminaron los ácidos nucleicos no virales por ultracentrifugación, microfiltrado y tratamiento con DNAasas. Luego, se extrajeron los DNA o RNA virales y se amplificaron mediante PCRs con *random primers*. Los amplicones

Virus	Enfermedad	Año de su primera detección
<i>Influenza aviaria</i>	IRA baja grave	Fines del siglo XX y comienzo del XXI, autores varios
<i>Influenza A (H1N1) pandémica</i>	IRA alta, IRA baja grave	2009, autores varios
<i>Nuevos coronavirus humanos</i>		
SARS	IRA baja grave, alta mortalidad	2003, Drosten y col.
HCoV-NL63 (grupo I)	IRA alta y baja	2004, van der Hoek y col.
HCoV-NL (grupo I)	IRA baja	2004, Fouchier y col.
HCoV-HKU1 (grupo II)	IRA alta y baja	2005, Woo y col.
HCoV-NH	IRA alta y baja	2005, Esper y col.
<i>Metapneumovirus</i>	IRA alta y baja	2001, van der Hoogen y col.
<i>Parvovirus humanos</i>		
Bocavirus humanos	IRA alta y baja, diarrea, viremia	2005, Allander y col.
PARV4	en estudio, transmisión parenteral ¿?	2005, Jones y col.
<i>Poliomavirus respiratorios</i>		
KI / WU	Detectados en muestras respiratorias. En estudio su asociación con enfermedad.	2006

Tabla 58.1. Nuevos virus respiratorios humanos emergentes detectados en el siglo XXI. IRA: enfermedad respiratoria aguda.

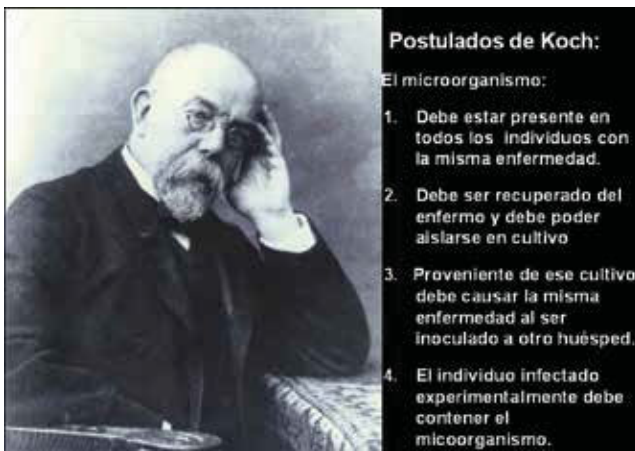


Figura 58.1. Roberto Koch, padre de la Microbiología 1843-1910.

obtenidos se clonaron y se secuenciaron. El análisis informático de las secuencias de los clones permitió identificar varias especies virales diferentes, algunas de virus ya conocidos (influenza A, RSV, hMPV, adenovirus, coronavirus del grupo 2), y otras pertenecientes a virus no conocidos hasta el momento, como el nuevo coronavirus HCoV-HK1 y una secuencia cercana a los parvovirus de animales. El análisis del genoma completo de este nuevo virus, presente en muestras respiratorias humanas, demostró su relación con los parvovirus bovinos y el virus *minute* (diminuto) de los caninos, pertenecientes al género *Bocavirus*, familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*.

El nuevo virus presentó un 42-43% de identidad con la secuencia aminoácídica de los 2 principales marcos abiertos de lectura del parvovirus bovino y del virus *minute* canino, respectivamente; debido a esto fue denominado bocavirus (acrónimo de **bo**vino / **ca**nino) humano (HBoV).

Allander y col. desarrollaron una PCR específica para HBoV y lo detectaron por primera vez en 3,1% de muestras respiratorias pertenecientes a niños internados con IRA baja en Estocolmo, Suecia.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA PARVOVIRIDAE Y LA INCLUSIÓN DEL HBoV EN ELLA

Los parvovirus son virus muy pequeños (20-22 nm) desnudos, con cápside icosaédrica y contienen DNA de cadena simple no segmentado.

Muchos de estos virus eran conocidos en Medicina Veterinaria por producir enfermedad en animales, pero hasta el descubrimiento del HBoV solamente se conocía como patógeno humano a otro parvovirus, el Parvovirus humano B19, clasificado en el género *Erythrovirus* (véase el capítulo 19 *Parvovirus*).

El HBoV fue incluido en la familia *Parvoviridae* debido a su morfología típica y a la homología con parvovirus bovinos y caninos, como se ha mencionado más arriba (Tabla 58.2).

Las dos primeras cepas detectadas de HBoV fueron secuenciadas completamente y se denominaron ST1 (Stocolmo 1) y ST2 (Stocolmo 2), observándose entre ambas 26 nucleótidos de diferencia, la mayoría en la región codificante de las proteínas de la cápside.

La longitud de su genoma es de 5 217 pares de bases. Presenta tres marcos abiertos de lectura, correspondientes a dos proteínas no estructurales NS1 (esencial para la replicación) y NP1, y dos proteínas de la cápside (VP1 y VP2). Las mayores diferencias se encuentran en estas últimas proteínas, en las que se han detectado polimorfismos. El análisis filogenético del gen VP2 ha determinado que habría dos linajes principales o genotipos y en uno de ellos habría dos sub-linajes.

2. BOCAVIRUS HUMANO (HBoV)

2.1 FRECUENCIA Y CUADROS CLÍNICOS

HBoV e infección respiratoria

Luego del descubrimiento de Allander en 2005, el HBoV se detectó en Europa, Asia, América y Australia, lo que indica una distribución mundial. Estos estudios emplearon diferentes PCRs que amplificaban distintos genes virales. Dado que la selección de las muestras en cada estudio fue realizada con criterios diferentes, las frecuencias de positividad para HBoV publicadas hasta principios del 2010 son muy variables. Lo que sí resulta claro es la asociación del HBoV con las IRAs bajas en muestras negativas para los virus ya conocidos y la destacable elevada frecuencia de co-infección observada para el HBoV con otros virus respiratorios.

La frecuencia del HBoV inicialmente detectada por Allander y col. fue del 3,1% en muestras de niños hospitalizados en Estocolmo. Utilizaron una PCR con *primers* específicos para el gen NP1 cuyo producto es de 354 pares de bases.

Estudios posteriores realizados en Escocia por Manning y col. (2005-06) sobre muestras respiratorias archivadas y anónimas, provenientes de niños con IRA baja, empleando dos PCR anidadas (para regiones altamente conservadas, la primera para la NS –la región NS de la familia *Parvoviridae* y la segunda para la región NP1) demostraron que el HBoV se detectaba en tercer lugar (8,2%), luego del virus sincicial respiratorio (16%) y del adenovirus (10%). El pico de incidencia se observó en niños de 6 a 24 meses durante el invierno. Este perfil epidemiológico es similar al observado con el virus sincicial respiratorio.

Los cuadros clínicos asociados a HBoV fueron: bronquiolitis, neumonía, bronquitis, exacerbación de cuadros asmáticos, fiebre y también cuadros de IRA alta, similares a influenza.

Se observó una elevada frecuencia de coinfección entre HBoV y otros virus (43%), lo que sugiere que el HBoV podría ser un factor de exacerbación de las infecciones por virus sincicial respiratorio y otros virus respiratorios.

Subfamilia <i>Parvovirinae</i> : Virus de vertebrados	
Género	Especie
<i>Parvovirus</i>	<i>Minute virus del ratón</i>
<i>Erythrovirus</i>	Parvovirus humano B19*
<i>Dependovirus</i>	Virus adenovirus asociados
<i>Amdovirus</i>	Virus de la enfermedad del visón aleutiano
<i>Bocavirus</i>	Parvovirus bovino <i>Minute virus canino</i> Bocavirus humano*
Subfamilia <i>Densoviridae</i> : Virus de insectos: varios géneros	

Tabla 58.2. Familia *Parvoviridae*. *Parvovirus humanos.

La frecuencia de HBoV detectada en el estudio de Manning y col. es mayor a la observada inicialmente en Suecia y en otros países. Esto se debe, probablemente, a la selección de los pacientes, ya que en Escocia se incluyeron sólo niños con IRA baja y durante la época invernal y, además, porque se empleó una doble PCR anidada, de mayor sensibilidad.

Posteriormente estudios realizados en población pediátrica (menores de cinco años) con IRA baja demostraron que el HBoV era el cuarto en frecuencia (5,6%) en Australia (Arden K, 2006), luego de los rinovirus, adenovirus, y metapneumovirus. Coincidentemente, una frecuencia análoga (5,7%) se observó en Japón en una población similar.

También en 2006, Kesebir y col., en la Universidad de Yale (EE. UU.), investigaron el HBoV en las muestras provenientes de niños menores de 2 años con IRA alta y baja, y que resultaron negativas para los virus conocidos. En esas muestras detectaron una positividad del 5,2% para HBoV y los casos fueron más frecuentes en otoño, invierno y primavera temprana. Este estudio incluyó un grupo control (niños asintomáticos) en los que no se detectó HBoV.

Se identificaron dos genotipos del HBoV y se detectaron tres casos de infección intrahospitalaria, todos con la misma cepa de HBoV.

En 2007, Fry y col., en Tailandia, detectaron el HBoV en 4,5% de niños pequeños hospitalizados con neumonía en quienes el HBoV fue el tercero en frecuencia, luego de rinovirus y sincicial respiratorio. Sorprendentemente, observaron un 83% de coinfección entre HBoV y otros virus respiratorios. Además, se detectaron altos niveles de DNA de HBoV en el suero de algunos pacientes con neumonía que presentaban elevada carga viral en secreciones respiratorias, lo que indica la existencia de viremia en estos pacientes. También se observó HBoV en 1% de controles asintomáticos.

Estudios preliminares sobre HBoV en Argentina y Chile

Un estudio preliminar realizado en Argentina, en el Laboratorio de Virología del CEMIC durante el año 2005, detectó HBoV por PCR en el 17% de muestras respiratorias de niños hospitalizados menores de 5 años. La mayor frecuencia de HBoV se observó en época invernal. Además, se detectó un 59% de coinfección con otros virus respiratorios, principalmente con virus sincicial respiratorio (Cartamil S, Videla C y col. Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires. Septiembre 2008. Resúmenes).

También en Chile se detectó HBoV en el 24% de muestras de niños con IRA. En el 26% de los casos, el HBoV fue el único patógeno detectado, mientras que en el 74% se observó coinfección con otros virus respiratorios.

2.2 HBoV Y DIARREA: ¿UN NUEVO PATÓGENO ENTÉRICO?

El estudio de Kesebir y col. (2006) describió la presencia de diarrea en algunos niños con infección respiratoria, aspecto interesante ya que es conocido que los parvovirus bovinos y caninos producen diarrea en esos animales.

En España, Vicenti y col. (2007) detectaron HBoV en materia fecal en el 9% de niños menores de 3 años con gastroenteritis en ausencia de cuadro respiratorio alguno. Asimismo, observaron 50% de coinfección con bacterias entéricas, rotavirus y norovirus.

En Brasil, Albuquerque y col. (2007) estudiaron en niños que presentaban sólo gastroenteritis, y detectaron HBoV en materia fecal en el 2% de los casos. También se observó coinfección con rotavirus, adenovirus y norovirus en el 21% de los casos.

Estos datos indicarían que el HBoV también podría ser un patógeno entérico como sucede con los parvovirus bovinos y caninos. Deberán realizarse futuros estudios para determinar su forma de transmisión y su patogenicidad.

2.3 DIAGNÓSTICO

Métodos directos

Hasta el momento, el HBoV no es cultivable en las líneas celulares habituales ni existen reactivos para detección directa de antígenos. Por ello, su diagnóstico es exclusivamente molecular mediante PCRs de diferente diseño para detectar el DNA viral en muestras respiratorias, suero y materia fecal. Los detalles técnicos se encuentran en la bibliografía.

Serología

En 2007, investigadores japoneses desarrollaron una técnica de inmunofluorescencia para detectar IgG anti-HBoV utilizando cultivo de células de insecto transfectadas con un baculovirus recombinante con el gen de la VP1 de HBoV. Mediante esta técnica determinaron una seroprevalencia de IgG anti HBoV del 71% en población japonesa de 6 meses a 70 años. La seroprevalencia era baja entre los 6-8 meses de edad y fue gradualmente incrementándose con la edad y prácticamente todos los niños mayores de 6 años habían estado expuestos al virus.

Serán necesarios posteriores estudios y la disponibilidad de reactivos comerciales para conocer la seroprevalencia de este virus en diferentes poblaciones.

2.4 CONCLUSIONES

El HBoV presenta una distribución universal y su frecuencia varía, en poblaciones con infección respiratoria, entre el 1,5 y el 19%.

Este virus puede producir cuadros de IRA alta y baja, similares a los producidos por el virus sincicial respiratorio.

Es destacable la elevada frecuencia de coinfecciones (17 a 90%) observada con HBoV y otros virus respiratorios.

Se ha detectado la presencia de HBoV en sangre (viremia) y en materia fecal, cuyo significado clínico deberá establecerse en un futuro.

Un estudio de casos y controles realizado en Canadá por Longtin J y col. (*Emerg Infect Dis* 2008) reveló sorprendentemente que la positividad para HBoV fue tres veces mayor en muestras respiratorias de niños controles, sin IRA (43%) que en aquellos niños que presentaban cuadros de IRA (14%). Ante este hallazgo inesperado surgió la pregunta de cómo se seleccionaron los 100 niños controles. Estos controles se eligieron entre niños sin cuadros respiratorios que se internaban para cirugías programadas de adenoides o amígdalas. La elevada detección de HBoV en esos niños abre muchos interrogantes: i) ¿produce el HBoV una infección persistente en estos tejidos?; ii) ¿facilita la infección bacteriana?; iii) ¿facilita la infección con otros virus?

Para intentar contestar esas preguntas, Lu X y col. (*Emerg Infect Dis* 2008) estudiaron linfocitos purificados de amígdalas o adenoides extraídas durante cirugía de niños controles sin IRA. En esas muestras pudieron detectar un 32% de PCR positivas para HBoV, lo que sugiere que este virus podría presentar una infección latente o persistente en esos tejidos.

Estas observaciones ameritan la necesidad de estudiar este virus en muestras respiratorias.

En un futuro próximo deberán diseñarse investigaciones para determinar:

- 1) Cómo la coinfección puede influenciar y/o exacerbar los cuadros clínicos producidos por otros virus
- 2) Cómo el HBoV puede interactuar con otros virus
- 3) La asociación de viremia, cuando la carga viral es elevada en secreción respiratoria, y la diseminación por viremia a otros órganos
- 4) El tiempo de eliminación respiratoria del virus y la distribución estacional en los diferentes climas
- 5) Si existen células capaces de replicar este virus *in vitro*, lo que permitirá un ensayo de aislamiento en cultivo. Este punto es interesante ya que los parvovirus sólo replican en células en multiplicación activa.

- 6)Cuál es la patogenia de la enfermedad
- 7) Cuáles son los procedimientos de diagnóstico rápido más eficaces para su aplicación de rutina
- 8) El espectro de patologías causadas por este virus emergente en población adulta, ancianos e inmunocomprometidos

3. PARV4: ¿UN NUEVO VIRUS EMERGENTE DE PROBABLE TRANSMISIÓN POR SANGRE?

Jones MS y col., en 2005, empleando una metodología similar a la de Allander, detectaron otro nuevo parvovirus humano en la sangre de un paciente en riesgo de infección por HIV y usuario de drogas ilícitas por vía endovenosa, que presentaba fiebre de origen indeterminado. Denominaron a este nuevo virus PARV4.

Este virus no presenta similitudes con otros parvovirus de mamíferos y aún no se encuentra clasificado.

El PARV4 no se ha asociado aún con enfermedad específica y se ignora si es un patógeno respiratorio. Sorprendentemente, este virus se ha detectado en *pools* de plasma de algunos laboratorios que manufacturan productos médicos y, en baja frecuencia (< 2%), en *pools* de donantes de sangre en EE.UU.

Un estudio realizado en septiembre de 2007 detectó PARV4 en el 70% de tejidos obtenidos en autopsias de pacientes con SIDA y drogadicción endovenosa, pero no en tejidos de no infectados por HIV.

Muchos miembros de la familia *Parvoviridae* pueden establecer infecciones persistentes con replicación restringida y ausencia o escasa viremia persistente.

Dada la resistencia de los parvovirus a los procedimientos de inactivación, los pacientes receptores de productos derivados de plasma podrían estar en riesgo de infección con PARV4.

Aunque se ignoran los cuadros clínicos y la patogenia, el PARV4 representa un nuevo virus emergente de probable transmisión por sangre.

4. CORONAVIRUS

4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA CORONAVIRIDAE

La familia *Coronaviridae* incluye numerosos virus conocidos desde hace tiempo que infectan una amplia variedad de mamíferos y aves en los que causan enfermedad del tracto respiratorio, gastrointestinal y del sistema nervioso central.

Los viriones son envueltos, pleomórficos y miden 120 a 140 nm. La nucleocápside es de simetría helicoidal. El nombre de esta familia, *Coronaviridae*, proviene del latín (*corona*) debido a las características espículas de 20 nm de largo que le dan al virión una apariencia de corona al microscopio electrónico.

Poseen RNA de cadena simple y polaridad positiva; su genoma es el de mayor tamaño de todos los virus a RNA (30 kb). Estos virus maduran por brotación a través de las membranas intracitoplasmáticas. La familia *Coronaviridae* posee dos subfamilias: *Coronavirinae* y *Torovirinae*; esta última incluye al torovirus, que produce enfermedad entérica en el ganado y probablemente en el humano.

La subfamilia *Coronaviridae* se divide en tres géneros (I a III), habitualmente mencionados como grupos en base a su reactividad serológica y a su análisis genómico. El grupo I incluye patógenos para animales y los coronavirus humanos HCoV 229 y HCoV HKU1, que producen IRA.

El grupo II incluye también patógenos de relevancia veterinaria y los coronavirus humanos OC43 y HCoV NL 63, que causan IRA. Además, en este grupo también se incluyen virus que infectan ratones y ratas y producen enfermedad entérica, neurológica y hepatitis.

Se ha discutido si el coronavirus productor del SARS debe ser incluido como un nuevo grupo de coronavirus o si es un miembro distante del grupo II.

El grupo III incluye coronavirus que afectan a aves.

El receptor para la mayoría de los coronavirus del grupo I es el CD13 (aminopeptidasa humana) con la excepción del

HCoV-NL63 y del SARS que emplean como receptor funcional la ACE2 (enzima convertidora de la angiotensina 2), que está presente en el epitelio nasal ciliado y en el tráqueo-bronquial (Véase el capítulo 36 *Síndrome respiratorio agudo grave*).

4.2 CORONAVIRUS CLÁSICOS

La primera descripción de un coronavirus que afectaba a humanos fue realizada por Tyrrell y Bynoe en 1965, quienes lograron aislar un virus de un niño con un cuadro de resfriado común por cultivo en tráquea humana embrionaria, que al microscopio electrónico presentaba las características típicas de los coronavirus. El virus aislado del cultivo reprodujo un cuadro de resfriado en voluntarios humanos, es decir, se cumplieron los clásicos postulados de Koch. Se denominó a esta cepa B814.

Pocos años más tarde, otros investigadores aislaron otros coronavirus de infecciones respiratorias en estudiantes de medicina y denominaron a las cepas 229E y OC43. Se definieron dos serogrupos: grupo I (229E) y grupo II (OC43). La cepa OC43 es la prototipo.

Cuadros clínicos y epidemiología

En el ser humano, los coronavirus son responsables del 2 al 10% de las IRAs altas, pero también pueden diseminarse al tracto respiratorio inferior produciendo infecciones más graves. Estos virus replican en las células del epitelio del tracto superior, lo que produce edema, inflamación y secreciones durante varios días luego de la destrucción de las células en las que replicó.

Los cuadros de IRA alta por coronavirus en el hemisferio norte ocurren durante los meses fríos y en la primavera temprana y se registran brotes cada 2-4 años. Las reinfecciones son frecuentes y los estudios serológicos demostraron que la mayoría de los individuos han sido infectados durante su vida. Algunos coronavirus producen gastroenteritis en humanos.

Diagnóstico

El diagnóstico de estos virus no ha sido fácil dada la dificultad de su propagación en los cultivos celulares de empleo habitual en los laboratorios de diagnóstico. Sólo pueden realizarse cultivos de órganos traqueales de origen humano, que son difíciles de efectuar. Por esta razón no se estudiaban de rutina.

En los inicios del siglo XXI, la aplicación de técnicas moleculares ha permitido un mejor diagnóstico de los coronavirus ya conocidos y la identificación de otros nuevos que afectan al ser humano.

4.3 LOS NUEVOS CORONAVIRUS RESPIRATORIOS

SARS

En 2003, la emergencia en Asia de un nuevo coronavirus asociado a un cuadro de gravedad, el Síndrome Respiratorio Agudo grave, en inglés *Severe Acute Respiratory Syndrome* –SARS– renovó el interés y las investigaciones sobre los coronavirus.

Este brote se diseminó rápidamente y llegó a afectar a 29 países de América, Europa y Asia. Se registraron 8 000 infectados y 774 casos fatales, es decir, la mortalidad fue cercana al 10%. La transmisión fue de persona a persona por contacto directo y por secreciones respiratorias y otros fluidos corporales (*Capítulo 36*).

Coronavirus humano NL63 (HCoV-NL63) su descubrimiento.

En 2004, investigadores holandeses (van der Hoek L y col.) descubrieron un nuevo coronavirus respiratorio humano (que llamaron HCoV-NL63) mediante una innovadora técnica molecular que denominaron VIDISCA (*Virus Discovery-cDNA-AFLP*). La ventaja de esta técnica consiste en que no es necesario el conocimiento previo de la secuencia viral, ya que la presencia de sitios para enzimas de restricción es suficiente para garantizar la amplificación.



En breve, el procedimiento consistió en remover residuos celulares, emplear DNAsas para eliminar el DNA celular (este tratamiento no afectaba el DNA viral por estar protegido dentro de la partícula viral). Luego de purificar los ácidos nucleicos virales emplearon enzimas de restricción conocidas, amplificaron los fragmentos y los clonaron y secuenciaron. El análisis de las secuencias demostró que existía similitud en muchos fragmentos con las de virus de la familia *Coronaviridae*, pero también se observaron divergencias significativas. Se estaba en presencia de un nuevo virus.

El HCoV-NL63 fue descubierto en 2004 en una niña de 7 meses con conjuntivitis y bronquiolitis, cuyas muestras resultaron negativas para otros virus conocidos. El nuevo virus replicó y produjo ACP en cultivos de LLC-MK 2 y en células de primates, pero no pudo ser identificado con los reactivos disponibles. A partir del cultivo se identificó su genoma mediante el VIDISCA. La secuenciación permitió clasificarlo en el grupo I de coronavirus.

Cuadros clínicos, epidemiología y diagnóstico

Estudios posteriores demostraron que tiene una distribución universal, que produce IRA alta y baja, y que predomina durante el invierno. Se lo ha detectado en el 1-10% de las infecciones respiratorias en niños y adultos.

El espectro de enfermedades asociadas incluye resfrío común, bronquitis, bronquiolitis, neumonía y, especialmente, crup (laringo-traqueobronquitis).

Un estudio prospectivo realizado en Alemania mostró un 5,2% de frecuencia de HCoV-NL63 en niños pequeños con IRA baja y también frecuente co-infección con otros virus respiratorios.

Se han secuenciado completamente varios aislamientos y se determinaron dos genotipos. Su estructura genómica es un mosaico con múltiples sitios de recombinación.

El diagnóstico se realiza por RT-PCR y también puede aislarse en cultivo de LLC-MK2, Vero E6 y Vero B4.

Coronavirus Humano HKU1 (HCoV-HKU1)

En 2005, Woo y col. comunicaron el descubrimiento en Hong Kong de un nuevo HCoV del grupo II, en un anciano con neumonía, que fue denominado HCoV-HKU1.

Este virus no se propaga en las líneas celulares convencionales; se lo detectó por técnicas moleculares. Los estudios de secuenciación demostraron que está relacionado con el virus de la hepatitis del ratón y es diferente del HCoV-OC43, el otro coronavirus conocido del grupo II.

Posteriormente, este nuevo virus fue descrito en Australia y en EE. UU. En ese país, Esper y col. (2006) detectaron el HCoV-HKU1 en el 1% de muestras respiratorias de niños con IRA negativas para los virus habituales. La mayoría de los pacientes presentaban IRA alta pero algunos exhibían IRA baja y en un caso, se observó enfermedad extrapulmonar.

En adultos, se detectó este virus en el 2,5% de casos con neumonía de la comunidad en Hong Kong. En Francia se lo detectó en muestras respiratorias y también en materia fecal de niños y adultos.

Se han observado dos genotipos que probablemente puedan haber evolucionado por recombinación entre el HKU1 y otros coronavirus.

Los intentos para propagar este virus en cultivo han sido infructuosos y su diagnóstico es exclusivamente molecular.

5. POLIOMAVIRUS RESPIRATORIOS: KI Y WU

En el año 2007, dos nuevos poliovirus humanos, denominados KIV y WUV, fueron identificados mediante un estudio molecular de secreciones respiratorias de niños menores de 2 años de edad con IRA. KIV y WUV son miembros de la familia *Poliomaviridae*, poseen un genoma a DNA de doble cadena circular, covalentemente cerrado, pequeño, capaz de infectar un amplio rango de mamíferos y aves.

Las publicaciones iniciales de Allander y col. (2007) y Gaynor y col. (2007) detectaron el KIV en el 1% de muestras respiratorias de Suiza y en el 0,6- 3% de Australia y EE.UU., respectivamente. Posteriores estudios detectaron los virus KIV y WUV en numerosas partes del mundo, sugiriendo una presencia global de estos virus.

Wattier y col. (2008) observaron 2% de KIV y 7% de WUV en 367 niños con IRA. Además, al estudiar 96 niños asintomáticos, no encontraron KIV, pero sí WUV en un 6,3% de las muestras. Las coinfecciones con otros virus fueron muy frecuentes observándose en el 25% de las muestras KIV positivas, y en el 50% de las positivas para WUV.

En pacientes inmunocomprometidos, Mourez y col. (2009) observaron 8% de KIV y 1% de WUV. La coinfección con otros virus fue del 37% en los pacientes KIV positivos.

La alta frecuencia de coinfección observada en estos estudios sugiere que KIV y WUV no serían la causa directa de las infecciones respiratorias. Se requieren más estudios para dilucidar este aspecto.

6. RINOVIRUS

Históricamente, los rinovirus junto con los coronavirus son los productores de más del 50% de los casos de resfrío común (IRA alta). Sin embargo, debido a la escasa gravedad de los cuadros clínicos y a las dificultades para su aislamiento en cultivo, el estudio de rinovirus habitualmente no era solicitado. Los progresos en biología molecular y la disponibilidad actual de técnicas de PCR para su diagnóstico han permitido demostrar un nuevo impacto de los rinovirus, ya que –además de los conocidos cuadros de IRA alta– se los ha observado recientemente como agentes etiológicos frecuentes de IRA baja (del tracto inferior) en niños, a veces de gravedad, y asimismo, de exacerbaciones de cuadros asmáticos y de la enfermedad obstructiva crónica.

6.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS RINOVIRUS (TABLA 58.3)

Los rinovirus pertenecen a la familia *Picornaviridae*, una de las familias de virus humanos más antiguas y diversificadas, caracterizados por ser de pequeño tamaño (≈ 30 nm), desnudos y simetría icosaédrica, poseer un genoma RNA simple cadena de polaridad positiva. Actualmente pertenecen al género *Enterovirus* (anteriormente formaban parte del género *Rinovirus*). Su nombre proviene de la palabra griega *rhino*, que significa nariz.

Los rinovirus presentan más de 100 serotipos, clasificados por la diversidad de epitopes antigénicos de su cápside. Actualmente, estos serotipos se clasifican en 3 especies: A, B y C. La cápside está constituida por cuatro proteínas virales (VP): VP1, VP2, VP3, VP4, las tres primeras están en la superficie de la partícula. Estas proteínas derivan de una única poliproteína generada por el RNA viral que funciona como RNA mensajero. La variación en esas proteínas de superficie es responsable de la diversidad antigénica de los rinovirus y de la respuesta inmune específica del hospedador luego de la infección.

El aislamiento de rinovirus en cultivo requiere células de primate o humanas a 33-34° C. Los rinovirus pueden ser diferenciados de otros picornavirus (poliovirus, Coxsackie) por su labilidad al tratamiento con ácido. Inicialmente, la identificación del aislamiento se realizaba por técnicas serológicas con antisueros policlonales por neutralización, de compleja realización. El crecimiento preferencial a 33° C, sugería la posibilidad de que los rinovirus no infecten las vías aéreas inferiores, pero con estudios recientes se ha comprobado que este virus puede replicar en el tracto respiratorio inferior.

Los receptores celulares son: la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) para la mayoría de los rinovirus A y B (91 serotipos), y el receptor lipoproteico de baja densidad (LDLR), de muy baja densidad (VLDLR) y una proteína asociada a LDLR (PLR) para un grupo mino-

ritario (12 serotipos). Los rinovirus C, poseen diferencias estructurales con los A y B, en los sitios de unión a los receptores celulares. Esto sugiere que los rinovirus C utilizarían un receptor diferente, que se refleja en la falla para hacerlos propagar en cultivos celulares tradicionales.

El genoma es RNA de polaridad positiva (7 kb) y presenta gran similitud con otros miembros de la familia *Picornaviridae* y es infeccioso. El genoma contiene tres regiones que codifican para diferentes proteínas: P1, que codifica para las proteínas estructurales y P2 y P3 para las proteínas no estructurales. En el extremo 3' terminal no traducible el genoma presenta una región de poli-A. El extremo 5' tiene unido una proteína Vpg, importante para la síntesis de una cadena negativa de RNA como templado para la replicación. En este extremo también se encuentra una secuencia llamada IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) que permite la unión a la subunidad ribosomal donde comenzará la traducción proteica.

El RNA actúa directamente como mensajero y es traducido en una sola poliproteína de gran tamaño que es luego clivada por la proteasa viral 3C (esencial para la replicación) para formar 12 proteínas estructurales y no estructurales. El RNA replica por medio de un intermediario de doble cadena.

Similar a otros virus RNA, la polimerasa rinoviral (con una tasa de error estimada entre 10^{-3} y 10^{-4} errores/nucleótido/ciclo de replicación) puede acumular un gran número de mutaciones nucleotídicas en un corto período de tiempo, situación que favorece la adaptación viral. Esto lleva a la evolución viral y resulta en una gran diversidad genética y fenotípica ilustrada por el alto número de serotipos identificados a la fecha: 77 rinovirus serotipo A, 25 serotipo B y 49 rinovirus C. Además, como en otros virus RNA, la inmunidad adaptativa ejerce una selección positiva sobre ciertas cuasiespecies, siendo su blanco la cápside viral. Estos virus tienen una alta habilidad para mutar rápidamente las proteínas de la cápside conservando su capacidad replicativa. Por lo tanto, todas las especies y serotipos de rinovirus han emergido debido a la habilidad de acumular mutaciones en su genoma manteniendo su capacidad replicativa y de transmisibilidad.

La ultraestructura de la cápside de los rinovirus por cristalografía de rayos X mostró una topología de las proteínas VP1, VP2 y VP3 muy similar a los demás miembros de la familia *Picornaviridae*. Cada proteína de la cápside está enrollada en 8 cadenas anti-paralelas β , y puede aceptar numerosas inserciones en las esquinas entre las cadenas. Estas inserciones dan un aspecto externo que recibe el nombre de *puffs* y *loops*, que son hipervariables y constituyen el sitio de unión a los anticuerpos neutralizantes en los picornavirus.

La unión de las proteínas VP1, VP2 y VP3 en la cápside forman depresiones conocidas como *cañones* (*canyon*) que son el sitio de unión al receptor celular. La disposición morfológica de las proteínas hacen a este sitio inaccesible a anticuerpos, permitiendo de esta manera evadir la vigilancia inmune (Figura 58.2).

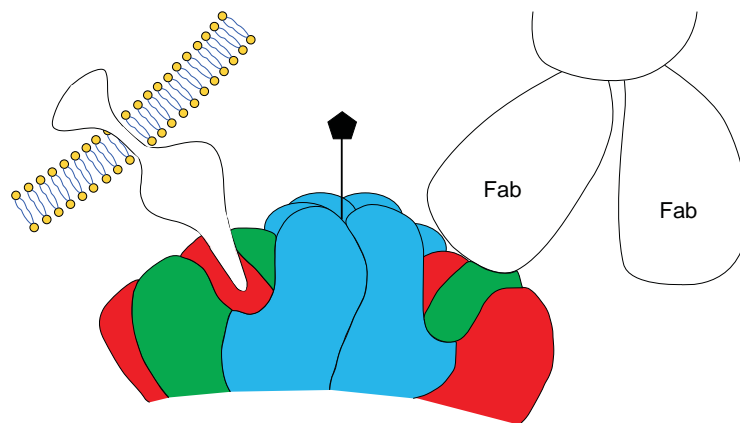


Figura 58.2. Hipótesis del cañón: unión del rinovirus al receptor celular y cómo pueden evadir la vigilancia inmunológica (adaptado de Rossman M. G. *Protein Sci*, 1994; 3: 1712). En este esquema se puede observar a la izquierda del símbolo, la interacción de las proteínas virales que forman el cañón (en color) con el receptor celular. A la derecha, se observa que el fragmento Fab de un anticuerpo no puede interactuar con los sitios internos del cañón.

6.2 CUADROS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLOGÍA

Resfrío común

Los rinovirus son causantes aproximadamente del 50% de los casos de resfrío común, cuadros habitualmente leves y autolimitados en adultos sanos, aunque pueden ser más graves en neonatos, en niños o adultos con infecciones crónicas pulmonares previas o inmunocomprometidos.

Aunque los cuadros de resfrío común suelen ser triviales, producen pérdidas económicas debidas a los millones de casos de ausentismo laboral y escolar, al aumento de visitas a los médicos y a la prescripción totalmente inadecuada de antibióticos.

La transmisión de rinovirus ocurre por contacto directo, auto-inoculación por manos contaminadas, fomites y aerosoles. El período de incubación es de 2-3 días y los síntomas –que duran varios días– son: congestión nasal, estornudos, odinofagia y abundante secreción nasal.

Los rinovirus se registran en todo el mundo, en todo grupo etario y durante todo el año, aunque son más frecuentes en otoño y primavera en los climas templados.

Los niños se infectan tempranamente y aquellos en edad escolar, con frecuencia, introducen la infección en los hogares. La tasa de ataque secundaria es elevada (25-70%). Las escuelas y guarderías constituyen importantes sitios de diseminación de los rinovirus.

La ocurrencia frecuente de más de un cuadro de resfrío por persona y año se debe al alto número de serotipos y a que la inmunidad es tipo-específica, por lo que la protección no es total contra serotipos diferentes de aquellos que infectaron por primera vez.

6.3 PATOGENIA DE LOS RINOVIRUS

La infección comienza en el tracto respiratorio superior mediante la unión de los rinovirus a receptores celulares específicos (Tabla 58.3). La infección del epitelio activa mecanismos de inflamación y se liberan mediadores que incluyen leucotrienos; interleuquinas 1, 6 y 8; factor de necrosis tumoral alfa y RANTES, algunos de los cuales son responsables de los síntomas respiratorios (Greenberg SB, 2007).

Asma

Numerosos estudios han demostrado que la exacerbación de cuadros asmáticos en niños y adultos está frecuentemente relacionada con infecciones por rinovirus y por coronavirus.

Se ha demostrado obstrucción al flujo aéreo e inflamación de la vía aérea en individuos asmáticos o atópicos luego de la infección por rinovirus.

Familia <i>Picornaviridae</i>	
Genoma	RNA, cadena única, polaridad positiva, 7 Kb, infeccioso
Envoltura	No
Simetría	Icosaédrica
Serotipos	Más de 100
Receptores	ICAM-1: grupo mayoritario de rinovirus A y B LDLR, VLDLR, PLR: grupo minoritario de rinovirus A y B Desconocido para rinovirus C
Enfermedad	IRA alta (resfrío común): 25-50%. Otitis, sinusitis IRA baja Exacerbación del asma bronquial y de la enfermedad obstructiva crónica
Distribución	Mundial, todos los grupos etarios; todo el año con predominio en otoño y primavera en climas templados
Diseminación	Contacto directo, manos contaminadas, fomites, aerosoles. Alta frecuencia de transmisión en escuelas, guarderías de infantes, en el hogar y también intra-hospitalaria
Diagnóstico directo	Aislamiento en cultivo en células de primates o humanas (MRC-5 ó WI-38) a 33-34° C RT-PCR; RT-PCR en tiempo real

Tabla 58.3. Características de los rinovirus.

La disfunción del tracto respiratorio inferior puede ser desencadenada directamente por la infección, o bien por mecanismos inflamatorios, inmunológicos o neurogénicos provocados por la infección del tracto superior.

Estudios de infección experimental con rinovirus en pacientes asmáticos voluntarios demostraron: estrechamiento de la vía aérea; presencia en el esputo de marcadores de activación de eosinófilos, interleuquina 8 y neutrófilos; infiltración bronquial con eosinófilos, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺; activación de prostaglandinas y leucotrienos e inducción de óxido nítrico.

Asimismo, se ha observado que la respuesta de inmunidad innata puede ser defectiva en pacientes asmáticos luego de la infección experimental en voluntarios con rinovirus 16.

Se detectó disminución de la producción de interferones y de la apoptosis, lo que favorece la replicación de los rinovirus. También existen evidencias de la disminución de la inmunidad adquirida –Th1– a rinovirus en estos pacientes, en comparación con voluntarios normales.

Enfermedad obstructiva crónica

Múltiples estudios demostraron la importancia de las infecciones virales en la exacerbación de la bronquitis crónica, siendo los rinovirus responsables del 43% de estas infecciones. Los posibles mecanismos están en estudio y se postula una sobre-regulación del receptor ICAM-1 en la mucosa bronquial en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lo que favorece una mayor replicación viral y/o el papel de los mediadores de inflamación liberados.

Otitis y sinusitis

Las infecciones virales, en especial por los rinovirus, son importantes cofactores que predisponen al desarrollo de otitis media en niños y también de sinusitis.

La inflamación que resulta del daño mucociliar disminuye la ventilación en el oído medio y aumenta la cantidad de mucus en la trompa de Eustaquio, lo que lleva a la sobreinfección bacteriana y a la acumulación de fluidos, en los que se han detectado rinovirus en el 40% de los niños con otitis media. También se ha encontrado rinovirus en cepillados sinusales de pacientes con sinusitis; una proporción menor de estos pacientes, presentaba coinfección con bacterias.

A pesar que muchos casos de otitis media y sinusitis se diagnostiquen como complicaciones bacterianas de las infecciones por rinovirus, es frecuente que la infección sea directamente atribuible al rinovirus, y por lo tanto no requiera tratamiento antibiótico.

Inmunocomprometidos

Estudios recientes demostraron que los rinovirus son los detectados con mayor frecuencia en estos pacientes por RT-PCR. Algunos pacientes con trasplante de células hematopoyéticas han desarrollado neumonía fatal por rinovirus. En un estudio de pacientes con trasplante de pulmón, se ha detectado infección activa y persistente de las vías aéreas inferiores.

Asintomáticos

El uso de técnicas moleculares para la detección de rinovirus, ha revelado una incidencia sorprendentemente alta de infecciones asintomáticas. Estudios recientes han detectado un 12-20 % de positividad para rinovirus en muestras provenientes de personas sin síntomas. Asimismo, en un modelo de infección experimental con rinovirus en voluntarios se observó que el 20-30 % de los mismos se mantuvieron asintomáticos.

6.4 DIAGNÓSTICO

Los rinovirus pueden aislarse en cultivos convencionales de origen humano o de primate (WI/38 o MRC-5) a 33-34° C. Producen ACP en forma rápida y se pueden diferenciar de otros picornavirus por su labilidad al tratamiento con ácido. La identificación de los virus aislados se puede realizar por neutralización, proceso muy complejo, o por inmunofluorescencia sobre el cultivo, que permite diferenciar rinovirus de enterovirus. El diagnóstico de rutina de rinovirus en los laboratorios de Virología Clínica no se ha implementado debido a la imposibilidad de algunas cepas para propagarse en cultivos celulares; la dificultad y tiempo que demanda el aislamiento; la ineficacia del ensayo de labilidad ácida para diferenciar ciertas cepas de rinovirus de enterovirus; y la extrema variabilidad antigénica que no permite la detección directa de antígenos.

Recientemente, se han diseñado varias RT-PCRs para la detección de rinovirus: algunas tienen como blanco regiones comunes con enterovirus y otras son específicas para rinovirus. La porción 5' no codificante del genoma de los rinovirus contiene una secuencia altamente conservada que puede ser utilizada para la amplificación y permite una detección altamente sensible de los mismos. Sin embargo, esta región no permite asignar relaciones filogenéticas. Mediante la secuenciación parcial de la región VP4/VP2 del genoma y su posterior análisis filogenético, es posible identificar las especies de rinovirus, evaluar la asociación entre las distintas especies y las manifestaciones clínicas de la infección.

La detección de anticuerpos, si bien disponible, no es de valor clínico dado el gran número de serotipos. Además, sería necesario realizar técnicas de neutralización serotipo-específicas para detectar el aumento de anticuerpos séricos luego de una infección reciente, lo que resulta poco práctico.

La reciente aplicación de RT-PCR y de RT-PCR en tiempo real a diversas muestras respiratorias ha aumentado enormemente la sensibilidad de detección de rinovirus, lo que ha permitido observar un nuevo e importante impacto de estos virus tanto en las IRA altas como bajas.

6.5 EL NUEVO IMPACTO DE LOS RINOVIRUS EN LAS IRA ALTAS Y BAJAS EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA POR MEDIO DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Numerosos estudios en diferentes poblaciones empleando técnicas de RT-PCR han demostrado claramente una mayor frecuencia de rinovirus que la habitualmente detectada por cultivo. Arden y col., en Australia, estudiaron aspirados nasofaríngeos de 315 niños menores de 5 años internados con IRA baja con 17 diferentes PCRs y RT-PCRs para todos los virus clásicos y emergentes. Observaron que los rinovirus fueron los primeros en frecuencia, detectándose en el 44,4% de las muestras. Los rinovirus se detectaron en el 38% de los pacientes con IRA baja como único patógeno y en el 77% en los casos en coinfección con otros virus.

Kusel MM y col. (2006) realizaron en Australia el primer estudio prospectivo de cohorte sobre morbilidad de virus respiratorios en menores de un año (n = 984) por técnicas moleculares en aspirados nasofaríngeos. Los episodios de IRA observados fueron 2-5 por niño durante el primer año de vida, de los que un tercio fue de IRA baja. La frecuencia total de virus detectados fue del 69%. Sorprendentemente, los rinovirus fueron los detectados con mayor frecuencia (48,5% de los casos), seguidos por virus sincicial respiratorio (10%). La frecuencia de rinovirus en las IRA altas fue 10 veces mayor que para sincicial respiratorio, mientras que en IRA baja con sibilancias fue 3 veces mayor para rinovirus que para sincicial respiratorio.

Wright PF y col. (2007) demostraron por RT-PCR en tiempo real el genoma de rinovirus en el 36% de muestras de lavado nasal de pacientes con síntomas de IRA alta, pero además, lo detectaron en el 22% de las muestras obtenidas de pacientes sin síntomas respiratorios. En individuos con múltiples muestras observaron positividad por períodos muy prolongados. Un estudio reciente, Piotrowska y col. (2009) demostró que los rinovirus fueron la mayor causa de sibilancias y hospitalización en niños menores de 2 años.

En un estudio preliminar, realizado en el laboratorio de Virología de CEMIC, en 186 niños menores de 5 años ambulatorios que presentaban cuadros de IRA alta y baja, se detectó un 27% de rinovirus, mediante una RT-PCR en tiempo real. En estos pacientes se

encontró 2% de coinfección con otros virus respiratorios. Además, para determinar las especies circulantes, se realizó en 6 pacientes el análisis filogenético de la región VP2/VP4, y se encontró en esta población argentina que 3 cepas pertenecían a la especie A y 3 a la especie C (Marcone D, Carballal G y col. "Los rinovirus son la causa mas frecuente de infección respiratoria aguda en niños ambulatorios en Bs. As., Argentina. Congreso de Virología, Soc. Argent. Virol. Bs. As., 2011).

Estos resultados indican que, a pesar de la elevada detección del genoma de rinovirus por RT-PCR en muestras respiratorias, serán necesarias más investigaciones para establecer el grado de impacto real de estos virus en las IRA del tracto inferior.

6.6 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

No existe tratamiento específico para estos virus, siendo el tratamiento actual sintomático (véase el Capítulo 38 *Infecciones respiratorias en adultos*). Es de destacar que los antibióticos son totalmente inapropiados, aunque son prescritos con frecuencia.

Se han ensayado diferentes estrategias de tratamiento específico tales como la aplicación de Interferon alfa 2; el bloqueo del receptor ICAM-1; drogas que inhiben la adsorción de la cápside y bloquean la descapsidación *in vitro* (pleconavir); compuestos que inhiben la proteasa 3C, necesaria para la replicación y el ensamblaje viral (rupintrivir), etc. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos ha demostrado ser eficaz y libre de efectos colaterales adversos.

Al momento actual no existen vacunas disponibles. Es improbable que estén disponibles en un futuro cercano debido a la existencia de más de 100 serotipos y a que la respuesta inmune contra un serotipo no protege totalmente contra los otros. Además, dada la estructura de la cápside viral (*ver hipótesis del cañón*, Figura 58.2), el sitio de interacción con el receptor celular es de difícil acceso para los anticuerpos.

En cuanto a la prevención, dado que los rinovirus se pueden recuperar de las manos contaminadas de los pacientes con resfriado común, el lavado correcto y frecuente de manos así como el uso de antisépticos virucidas (yodo al 2%, ácidos orgánicos, etc.) han demostrado ser efectivos para disminuir la transmisión de estos virus.

6.7 CONCLUSIONES

El rol de los rinovirus en las infecciones respiratorias había sido subestimado cuando se empleaban para su detección procedimientos clásicos de aislamiento en cultivo. En la actualidad, las técnicas moleculares han demostrado una significativa asociación etiológica de los rinovirus tanto en las IRAs altas como bajas.

Numerosos grupos están realizando investigaciones sobre patogenia, filogenia y respuesta inmune, indispensables para el futuro desarrollo de antivirales específicos.

Bibliografía

Bocavirus

- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. "Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples". *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005;102:12891-6.
- Albuquerque MC, Rocha L, Benati F, Soares CC, Maranhão AG, Ramírez ML, et al. "Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil". *Emerg Infect Dis* 2007;13:1756-57.
- Arden K, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. "Frequent detection of human rhinovirus, paramyxoviruses, coronaviruses and bocaviruses during acute respiratory infections". *J Med Virol*, 2006;78:1232-40.
- Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, Teramoto S, Shirkoohi R, Ma X, et al. "Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan". *J Clin Microbiol* 2007;45:3218-23.
- Fry AM, Xiaoyan L, Cittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. "Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand". *J Infect Dis* 2007;195:1038-40.
- Fryer JF, Delwart E, Hecht FM, Bernardin F, Jones MS, Shah N, et al. "Frequent detection of the parvovirus PARV4 y PARV5 in plasma from blood donors and symptomatic individuals". *Transfusion* 2007;47:7:1054-61. Erratum en: *Transfusion* 2007; 47: 1045.
- Kesebir D, Vázquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. "Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus". *J Infect Dis* 2006;194:1276.
- Lüssenbrink J, Wittenben F, Schildgen V, Schildgen O, et al. "Human bocavirus: insights into a newly identified respiratory virus". *Viruses* 2009; 1,3-12.
- Longtin J, Bastien M, Gilca R, Leblanc E, et al. "Human bocavirus infections in hospitalized children and adults". *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 217-21.
- Lu X, Gooding LR, Erdman DD. "Human bocavirus in tonsillar lymphocytes". *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1322-34.
- Manning A, Russel V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, et al. "Epidemiological profile and clinical associations of human bocaviruses and other human parvoviruses". *J Infect Dis* 2006;194:1283-90.
- Schildgen O, Müller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B, et al. "Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infection?". *Clin Microbiol Reviews*. 2008, 21:291-304.
- Simmonds P, Manning A, Kenneil R, Carnie FW, Bell JE.. "Parental transmission of the novel human parvovirus PARV4". *Emerg Infect Dis* 2007;13:1386-8.
- Vicenti D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. "Human bocavirus, a respiratory and enteric pathogen". *Emerg Infect Dis* 2007;13:636-7.
- van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. "Identification of a new coronavirus". *Nature Med*, 2004;10:368-70.
- Weiss SR, Navas-Martin S. "Coronavirus pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus". *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69: 635-64.

Poliovirus

- Norja P, Ubillos I, Templeton K, Simmonds P. "No evidence for an association between infections with WU y KI polyomaviruses and respiratory disease". *J Clin Virol* 2007;40:307-11.
- van de Pol AC, Wolfs TF, Jansen NJ, Kimpen JL, van Loon AM, Rossen JW. "Human bocavirus and KI/WU polyomavirus in pediatric intensive care patients". *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 454-7.
- Wattier RL, Vázquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. "Role of human polyomaviruses in respiratory tract disease in young children." *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1766-8.

Rinovirus

- Arden KE, Mackay IM. "Newly identified human rhinoviruses: molecular methods heat up the cold viruses". *Rev Med Virol* 2010; 20:156-76.
- Browlee J, Turner R. "New developments in the epidemiology and clinical spectrum of rhinovirus infections". *Curr Opin Pediatr* 2008; 20:67-71.
- Greenberg SB. "Rhinovirus and coronavirus infections. Respiratory viral infections". Ed. EE Walsh. *Semin Respir Crit Care Med* 2007;28:182-92.
- Heymann PW, Platts-Mills TA, Johnston SL. "Role of viral infections, atopy and antiviral immunity in the etiology of wheezing exacerbations among children and young adults". *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24:S217-22.
- Kusel MMH, et al. "Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study". *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:680.
- Marcone DN, Ricarte C, Videla C, Ekstrom J, Carballal G, Vidaurreta S, et al. "Rinovirus. Frecuencia en niños con infección respiratoria aguda, no internados". *Medicina (Bs As)*. 2012; 72:28-32.
- Marcone DN, Ellis A, Videla C, Ekstrom J, Ricarte C, Carballal G, et al. "Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized and outpatient young children from Buenos Aires, Argentina". *Pediatr Infect Dis J* 2013; 32 e105-10
- Miller EK, Lu X, Erdman DD, Poehling KA, Zhu Y, Griffin MR, et al. "Rhinovirus-associated hospitalizations in young children". *J Infect Dis* 2007;195:773.
- Piotrowska Z, Vazquez M, Shapiro ED, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. "Rhinoviruses are a major cause of wheezing and hospitalization in children less than 2 years of age". *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28:25-29.
- Savolainen C, Blomqvist S, Hovi T. "Human rhinoviruses". *Pediatr Respir Rev* 2003; 4:91-8.
- Vidaurreta SM, Marcone DN, Ellis A, Ekstrom J, Cukier D, Videla C, et al. "Infección respiratoria aguda viral en niños menores de 5 años. Estudio epidemiológico en dos centros de Buenos Aires, Argentina". *Arch Argent Pediatr* 2011; 110:19-26.
- Wright PF, Deatly AM, Karron RA, Belshe RB, Shi JR, Gruber WC, et al. "Comparison of results of detection of rhinoviruses by PCR and viral culture in human nasal wash specimens from subjects with and without clinical symptoms of respiratory illness". *J Microbiol* 2007; 45: 7, 2126.

Coronavirus

- Esper F, Welbel C, Ferguson D, Landry M, Landry ML, Kahn JS. "Coronavirus HKU1 Infection in the United States". *Emerg Infect Dis* 2006;12:5.
- Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, et al. "A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:6212-6.
- Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. "New DNA viruses identified in patients with acute viral respiratory syndrome". *J Virol* 2005;79:8230-6.

Los comienzos de la pandemia por una nueva cepa de influenza A (H1N1), 2009

Guadalupe Carballal - Débora Marccone - Osvaldo Uez

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS INFLUENZA A Y EL POTENCIAL PANDÉMICO DE LAS CEPAS DE INFLUENZA AVIAR

La Organización Mundial de la Salud (OMS) comunicó, a fines de abril de 2009, la aparición de una enfermedad humana causada por una nueva cepa de influenza A (H1N1).

Se resumen en este capítulo los datos iniciales de esta pandemia a nivel mundial y en Argentina durante el año 2009. Se incluyen aquí datos epidemiológicos y de diagnóstico.

Los orígenes de la cepa pandémica, su genoma y constituyentes asociados a mecanismos patogénicos se detallan en el Capítulo 5 (*Patogenia de las infecciones virales*).

Los virus influenza A pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*; poseen 8 segmentos de RNA de cadena negativa que codifican para 11 proteínas conocidas. De ellas, las 2 glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) permiten diferenciar los múltiples subtipos de virus serológicamente diferentes. Las características morfológicas y las definiciones, imprescindibles para comprender este tema, de cambios antigénicos mayores (*antigenic shift*), productores de pandemias, y cambios antigénicos menores (*antigenic drift*), productores de los brotes epidémicos anuales de influenza estacional, se describen en el Capítulo 14, *Orthomyxovirus*.

Es bien conocido que los virus influenza A pueden presentar 16 HA y 9 NA diferentes en las aves acuáticas salvajes, que constituyen los hospederos naturales de los virus influenza A y, por ello, son los reservorios desde los cuales esos virus emergen para infectar a las aves domésticas y, ocasionalmente, a los mamíferos incluyendo al ser humano y al cerdo.

De las 16 HA conocidas, 6 se han detectado en casos humanos (H1, H2, H3, H5, H7 y H9). Tres de ellas (H1, H2 y H3) produjeron pandemias durante el siglo XX, debido a los cambios antigénicos mayores (*antigenic shift*) que involucraron la reasociación de genes de origen animal en una nueva HA con genes de cepas de influenza estacional.

Este evento puede ocurrir en los raros casos de infección simultánea, en una misma célula, con cepas de influenza estacional y cepas zoonóticas, tales como H5N1 (influenza aviar, u otras) que fuera postulada como una probable nueva cepa pandémica.

La mayoría de los virus influenza que infectan aves domésticas o salvajes causan en ellas una enfermedad asintomática o limitada y se denominan virus de influenza aviaria de baja patogenicidad (*LPAI - Low pathogenicity avian influenza*). Sin embargo, los virus de los subtipos H5 y H7 poseen la capacidad de adquirir propiedades genéticas que le confieren alta virulencia y producen elevada letalidad en aves domésticas. Esos virus se denominan influenza aviaria de alta patogenicidad (*HPAI - High pathogenicity avian influenza*). Los virus LPAI (H9N2), prevalentes en aves domésticas en muchos países, también poseen potencial pandémico.

A fines del siglo XX, en áreas muy limitadas del planeta, algunos subtipos de influenza aviaria HPAI H5 y H7 se observaron asociados esporádicamente con infección humana grave y con elevada mortalidad (50%) como resultado de una transmisión directa

desde las aves domésticas a individuos que estaban en contacto directo con esos animales por razones laborales. Sin embargo, ninguno de esos virus había adquirido la capacidad de transmitirse eficientemente entre humanos. Debido a la extraordinaria expansión geográfica del subtipo H5N1 desde el año 2003 y a la continua aparición de casos esporádicos en humanos, se sospechó un gran potencial pandémico de esa cepa. Sin embargo, la primera pandemia del siglo XXI fue de un origen diferente.

1.1. LAS PANDEMIAS DEL SIGLO XX

Cuando un virus influenza (que posee una HA contra la cual la población humana tiene poca o ninguna inmunidad) desarrolla cambios genéticos que le confieren la capacidad de cruzar la barrera de las especies y, además, adquiere la capacidad de transmitirse eficientemente entre humanos, el resultado puede ser una **pandemia**.

En el siglo XX ocurrieron tres pandemias por diferentes subtipos de virus influenza A. La primera se registró en 1918 y fue producida por una cepa H1N1 denominada "gripe española", que se diseminó a todo el planeta y produjo 50 millones de casos fatales, cifra mayor que la producida por todas las guerras, la tuberculosis y la epidemia de SIDA.

La segunda pandemia se registró en 1957 y fue producida por una cepa H2N2. La tercer pandemia se observó en 1968 y la causante fue una cepa H3N2. Sin embargo, ninguna de esas cepas pandémicas poseía la mutación en el sitio de clivaje de la HA, característica de los virus HPAI. Por ello, el genotipo HPAI parece no ser requerido para que un virus influenza pueda causar una pandemia (véase el Capítulo 5 *Patogenia de las infecciones virales*).

Aunque la gravedad de un virus pandémico no puede ser reconocida con anterioridad, las tasas de ataque pueden alcanzar un 25-35%. Como consecuencia, el número de personas que requieran atención médica puede rápidamente colapsar todos los sistemas de salud de un país.

La comparación entre las cepas pandémicas del siglo XX y la nueva influenza A H1N1, productora de la pandemia de 2009, se describen en el Capítulo 5.

Desde hace años, circulan en la población humana virus influenza A con tres subtipos diferentes de HA (H1, H2 y H3), además del influenza B. Dos de esos subtipos, H1N1 y H3N2, producen las epidemias de influenza estacional en todo el mundo que se registran durante cada temporada invernal. La mortalidad asociada a esta influenza estacional, ya sea por neumonía viral primaria o por infección bacteriana sobre-agregada, es habitualmente menor al 1% y se observa en grupos de riesgo (ancianos, pacientes con cardiopatías congénitas, enfermedades pulmonares previas, inmunosuprimidos, etc.). Los casos fatales de influenza estacional notificados cada año en EE.UU. son aproximadamente 36.000 y en Argentina 1.500 a 2.000.

2. LOS INICIOS DE LA PANDEMIA POR EL NUEVO VIRUS INFLUENZA A (H1N1)

Del 24 de marzo al 29 de abril de 2009, se produjo en México un aumento brusco de los pacientes que requerían hospitalización por

neumonía y se observó un aumento alarmante de la mortalidad por cuadros respiratorios. En ese período, se denunciaron al sistema nacional de vigilancia epidemiológica de ese país 2.155 casos de neumonía grave, de los cuales 821 requirieron hospitalización y 100 fueron casos fatales.

Esto produjo una alerta mundial ya que se esperaba, desde hace años, una nueva cepa pandémica de influenza, probablemente de origen aviar. El nuevo virus emergente fue aislado en cultivo celular y secuenciado. Se observó que su estructura genómica era diferente a la de todos los virus de influenza A conocidos hasta el momento y que contenía genes virales de origen porcino, aviar y humano. Rápidamente, se diseñaron los *primers* específicos para su diagnóstico por RT-PCR en tiempo real.

En los primeros casos detectados en México llamó la atención el hecho que el 87% de las muertes y el 70% de los casos de neumonía grave se observaron en pacientes de 5-59 años, cifras muy superiores a las registradas en períodos anteriores para ese grupo etario. Se sugirió que la relativa protección de personas mayores de 60 años podría deberse a exposición a cepas H1N1 durante la infancia antes de la pandemia de 1957 (Chowell G, *et al.*, *N Engl J Med*, 2009).

La epidemia se extendió rápidamente, en primer término a EE.UU., luego a Canadá y, finalmente a la mayoría de los países. En las Figuras 59.1 y 59.2 se observan los casos confirmados por estudio virológico y notificados a la Organización Mundial de la Salud (OMS). Al 18 de mayo de 2009, los casos confirmados fueron 8.829 incluyendo 74 casos fatales (Figura 59.1). Sólo tres semanas después, 3 de junio de 2009, se observó una mayor diseminación de la pandemia y los casos confirmados se duplicaron, ascendiendo a 19.273 con 117 casos fatales.

Al 6 de julio de 2009 los casos confirmados a nivel mundial alcanzaron 94.512 incluyendo 429 casos fatales (Figura 59.2). La expansión de la pandemia continuó.

Los últimos datos informados por la OMS en su página *web* (www.who.int/Flunet, 4 de julio de 2010) indican que las muertes asociadas al virus influenza A (H1N1) en el mundo desde el comienzo de la pandemia en el 2009 y hasta el 4 de julio de 2010 ascendieron al menos a 18.311 casos. Sin embargo, el número de casos confirmados por laboratorio son menores al real número de casos. En EE. UU. se registraron 59 millones de casos, de los cuales 265.000 requirieron internación y 12.000 fueron casos fatales.

En la Figura 59.3 se puede observar la vigilancia epidemiológica de influenza en EE. UU. desde el año 2008 hasta los comienzos de la pandemia en 2009. Se observa la circulación de los virus de influenza estacional durante 2008 y la disminución del número de casos de enfermedad tipo influenza a partir de la primavera. En la semana epidemiológica 17 (20 de abril, 2009), se registró un aumento inusitado del número de casos para esa época del año. De ellos, un elevado porcentaje correspondió a la nueva cepa H1N1 que co-circuló junto con distintos subtipos de influenza estacional.

3. FASES DE ALERTA DE PANDEMIA: DEFINICIONES

De acuerdo a la OMS las fases de Alerta de Pandemia para virus influenza son:

- *Fase 1-3: Infección predominante en animales y escasas en humanos.*
- *Fase 4: Transmisión sostenida de humano a humano.*
- *Fase 5: Focos de transmisión interhumana en al menos dos países dentro de una región de la OMS. Esta fase indica que el tiempo disponible para la finalizar las tareas de organización, comunicación e implementación para los planes de mitigación es breve.*
- *Fase 6: Una pandemia global está ocurriendo. Más de 70 países comunicaron inicialmente números crecientes de casos de transmisión interhumana con el nuevo virus influenza A.*
- *Post-pandemia: actividad estacional de influenza.*

El 3 de junio de 2009, la OMS comunicó que el nivel de alerta de pandemia continuó siendo de Fase 5. Sin embargo, **el 11 de junio de 2009, la OMS elevó el nivel de alerta de pandemia a Fase 6.** Esta decisión indicó que se registraba una importante diseminación del nuevo virus emergente con transmisión interhumana en diferentes comunidades en múltiples áreas del planeta, pero no se refería a la gravedad de la enfermedad.

Al comienzo de la pandemia se desconocía la patogenia de la enfermedad y los grupos con mayor riesgo de enfermedad grave. No existían vacunas específicas, aunque éstas se desarrollaron rápidamente. Si existían drogas antivirales específicas como oseltamivir y zanamivir, ambas inhibidoras de la neuraminidasa viral.

Desde el comienzo de la pandemia existió una preocupación por la situación de los países del hemisferio sur en los que la pandemia coincidiría con el otoño e invierno y, por ende, con la circulación de la influenza estacional y de los demás virus respiratorios. Se anticipó que la dificultad en acceder rápidamente a una asistencia médica adecuada y a las condiciones de higiene y educación, así como también al nivel de alerta necesario podrán agravar la situación en las poblaciones carenciadas.

4. EL VIRUS: SU NOMBRE Y PATOGÉNESIS

Inicialmente, se lo denominó "virus de la gripe porcina" debido a que los primeros estudios mostraban alguna similitud de este nuevo virus con un virus que infectaba cerdos en EE. UU., aunque el nuevo virus no había circulado en porcinos; otro nombre fue influenza mejicana, porque los primeros casos se habían detectado en ese país. Sin embargo, ninguno de estos nombres fueron totalmente correctos. La denominación de influenza A (H1N1) tampoco es correcta dado que no es específica, debido a que habitualmente circulan en la población mundial cepas de influenza A H1N1, causantes de influenza estacional. Asimismo, el virus causante de la pandemia de 1918 -gripe española- también correspondía a un subtipo H1N1. Por el momento, el nombre más aceptado es **nueva influenza A (H1N1)**. En la literatura inglesa también se lo denominó **S-OIV** (*swine-origin influenza virus*).

Los estudios genómicos demostraron que este virus emergió como una triple reasociación que contiene cinco genes de influenza porcina de dos linajes diferentes: EE.UU. (genes de hemaglutinina, nucleoproteína y proteínas no estructurales) y Eurasia (genes de neuraminidasa y matriz); dos genes de influenza aviar (genes de polimerasa básica 2 y polimerasa ácida); y un gen de influenza humano (gen de polimerasa básica 1). La composición génica del virus se describe en el Capítulo 5.

Se han detectado varios grupos genéticos y se desconoce si existirían diferencias en los cuadros clínicos que produce. Se ha observado que replica en mayores títulos que la influenza estacional en pulmón en animales pero, sin embargo la cepa A (H1N1) carece de las mutaciones asociadas a patogenicidad aumentada descriptas para otros virus influenza.

4.1. PATOGÉNESIS

La hemaglutinina (HA) de la cepa pandémica, al igual que las cepas de influenza estacional, se une a residuos de ácido siálico unidos a galactosa por un enlace alfa 2-6 presentes en la mucosa nasal, paranasal, faríngea, traqueal y bronquial. Pero, a diferencia de las cepas estacionales, también se une a los receptores de ácido siálico unidos a galactosa por un enlace alfa 2-3, que están presentes en conjuntiva, tracto respiratorio bajo y neumocitos alveolares tipo I y II. Esta capacidad de replicar eficientemente en tejido pulmonar es la causa de la neumonía viral primaria.

El estudio histopatológico del pulmón de los casos fatales ha demostrado un daño alveolar difuso con membrana hialina y edema septal, traqueítis; bronquiolitis necrotizante, congestión vascu-



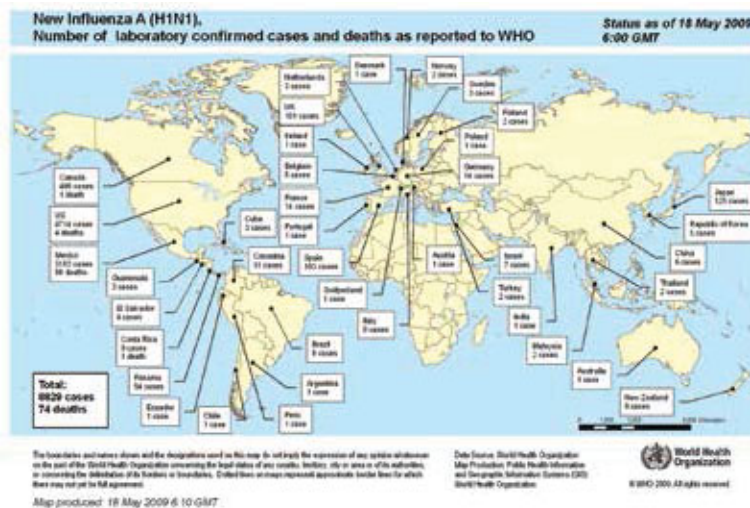


Figura 59.1. Los primeros casos de la nueva influenza A (H1N1), confirmados por estudio virológico y notificados a la OMS al 18 de mayo de 2009.

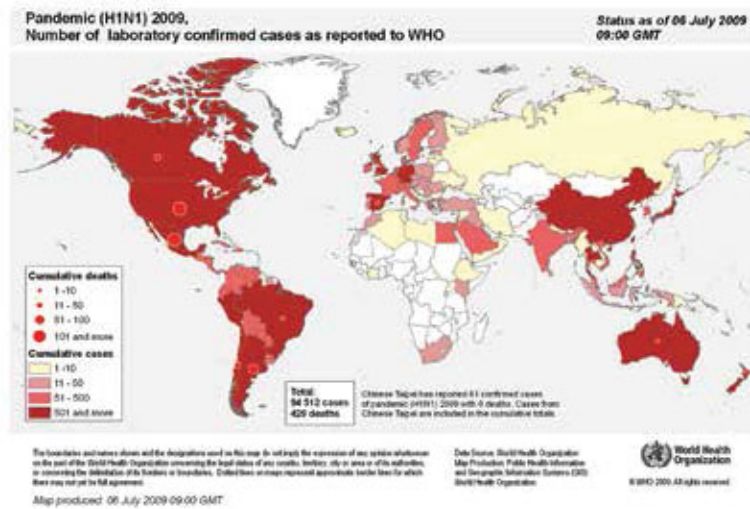


Figura 59.2. Casos de la nueva influenza A (H1N1), confirmados por estudio virológico y notificados a la OMS al 6 de julio de 2009. En esa fecha el nivel de alerta de pandemia era fase 5.

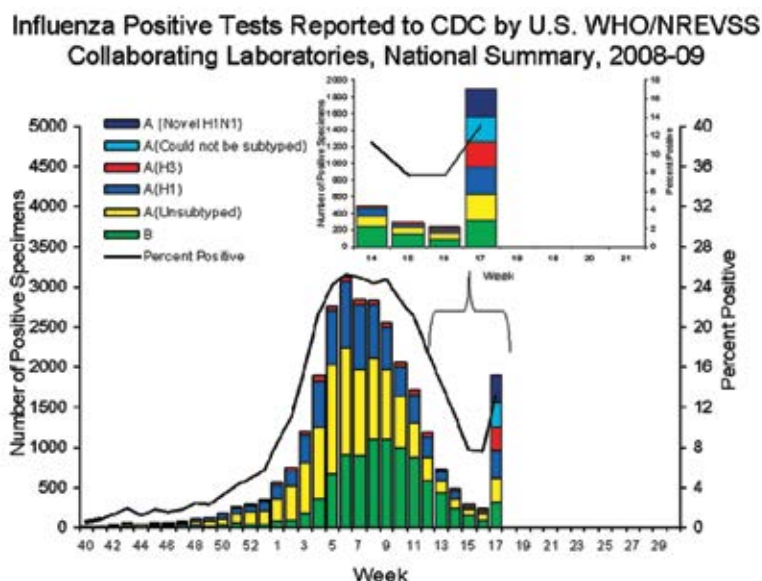


Figura 59.3. Corredor endémico de influenza en EE. UU. Desde fines de 2008 (semanas epidemiológicas 40 a 52) hasta comienzos de 2009 (semanas epidemiológicas 1 a 17).

lar pulmonar y hemorragias. En aproximadamente el 30% de los casos fatales también se ha observado bronconeumonía bacteriana sobre-agregada.

La cepa pandémica induce un patrón de mediadores pro-inflamatorios *in vitro* similar a la de las cepas estacionales, pero no activa en forma efectiva a la respuesta de la inmunidad innata antiviral en células dendríticas y macrófagos alveolares. Los niveles aumentados de interleuquinas 15, 12p70, 8 y 6, podrían ser marcadores de enfermedad grave.

El detalle de los orígenes de la nueva cepa pandémica, su genoma, los constituyentes virales que se relacionan a mecanismos patogénicos de la enfermedad, y la respuesta inmune que permite la limitación viral se describen en los capítulos 5 y 7.

5. TRANSMISIÓN VIRAL Y PERÍODO DE CONTAGIO

Como todos los virus respiratorios, los virus influenza se transmiten por vía respiratoria, por ingreso a través de las mucosas de nariz, boca o conjuntiva de secreciones que los individuos infectados eliminan durante el acto de toser o estornudar. También es muy importante la transmisión por manos contaminadas o por fomites (elementos en contacto con secreciones infectadas; véase el capítulo 13, *Infecciones respiratorias de origen viral: Impacto y diagnóstico etiológico*).

Para controlar la transmisión respiratoria se deben emplear las medidas de aislamiento respiratorio. Para evitar la transmisión por contacto se sugiere evitar el contacto social (besos, estrechar manos, etc.), realizar un lavado cuidadoso y frecuente de manos y extremar las medidas de higiene.

El nuevo virus influenza A (H1N1) no se transmite mediante la ingesta de alimentos de origen porcino, adecuadamente cocidos, ya que una temperatura de 70°C (habitualmente empleada para la preparación de embutidos u otros productos derivados del cerdo) lo inactiva totalmente. El virus no se encuentra en el tejido muscular. Además, es un virus lábil al pH ácido estomacal y a las sales biliares.

El virus es viable fuera del organismo por 12 h. en superficies porosas y hasta 24 h. en superficies no porosas. Debido a la presencia de envoltura, este virus es lábil al calor, a la desecación y a los antisépticos comunes como jabón, detergentes, etanol 70% y agua lavandina al 10%, que lo inactivan rápidamente.

5.1 PERÍODO DE CONTAGIO

Se aceptan los mismos períodos que para otros virus influenza. Las personas infectadas con influenza A (H1N1) deben considerarse como fuentes potenciales de contagio desde un día antes de la aparición de los síntomas y hasta 7 días después. Por este motivo, un individuo aparentemente sano pero ya infectado puede contagiar, lo que facilita la transmisión de este virus en viajeros. Aquellos pacientes que continúan con síntomas más allá de ese período, deben considerarse potencialmente contagiosos hasta que la sintomatología desaparezca. Los niños pequeños y los pacientes inmuno-comprometidos son contagiosos por períodos más prolongados (semanas en el primer caso, hasta meses en el segundo).

6. CUADRO CLÍNICO Y DEFINICIONES

El período de incubación es de 1,5 a 3 días, similar al de la influenza estacional. En algunos casos ha llegado a ser de 7 días.

Los cuadros clínicos abarcan un amplio espectro que va desde un cuadro de infección respiratoria del tracto superior (con o sin fiebre) hasta una neumonía viral fulminante. Los síntomas sistémicos de gripe son muy frecuentes y los síntomas gastrointestinales son más frecuentes que con la gripe estacional.

La mayoría de los casos son agudos y autolimitados y la tasa de ataque es mayor en niños y adultos jóvenes. La tasa global de ataque fue estimada en 11%.

La causa principal de hospitalización es la neumonitis viral difusa con hipoxemia grave, síndrome respiratorio grave y, a veces, *shock* y falla renal. Se ha publicado que el 25% de los pacientes internados y/o fallecidos no presentaban condiciones médicas pre-existentes. Asimismo, las embarazadas, en especial en el tercer trimestre, o los pacientes con condiciones neurológicas previas presentaron con mayor frecuencia cuadros graves.

La mortalidad global fue estimada en aproximadamente 0,5%. Los casos más severos se observaron en niños y adultos jóvenes, a diferencia de la influenza estacional que suele ser grave en mayores de 65 años.

6.1 DEFINICIONES DE CASO PROBABLE, SOSPECHOSO Y CONFIRMADO

Estas definiciones clásicas se aplican a influenza y a los demás virus respiratorios. De acuerdo al Ministerio de Salud (Argentina) son:

Enfermedad Tipo Influenza (ETI). Aparición súbita de fiebre superior a 38°C, y además un signo o síntoma respiratorio (tos o dolor de garganta) y otro sistémico (mialgias, astenia, etc.) en ausencia de otras causas.

Infección respiratoria aguda grave (IRAG) para mayores de 5 años: aparición súbita de fiebre superior a 38° C, más tos o dolor de garganta y disnea o dificultad para respirar.

Infección respiratoria aguda grave (IRAG) para niños menores de 5 años: sospecha clínica de la presencia de neumonía o neumonía grave y requiera hospitalización.

Neumonía. Aparición súbita de fiebre (>38°C) con tos y disnea. Puede estar acompañada de dolor torácico y taquipnea.

6.2 DEFINICIONES DE CASO PARA INFLUENZA A (H1N1)

En los comienzos de la pandemia, de acuerdo al Ministerio de Salud, Argentina, las definiciones fueron:

Caso sospechoso. Toda persona que presente enfermedad respiratoria aguda febril (>38° C) en un espectro que va de enfermedad tipo influenza a neumonía y que:

- Presente síntomas dentro de los 7 días posteriores a la fecha de su salida de zonas afectadas con transmisión humano-humano sostenida (según listado de países de OMS, México, Estados Unidos, Canadá, Chile), o
- Presente síntomas en los próximos 7 días a haber tenido contacto estrecho con un caso sospechoso o confirmado de influenza A (H1N1).

En ambos casos, si se considera un *cluster*, el período debe extenderse a 14 días. Se define como *cluster*: dos o más personas que presenten enfermedad respiratoria aguda inusitada con fiebre (>38° C) y que hayan iniciado síntomas dentro de los 14 días en una misma área geográfica o con nexo epidemiológico, o que hayan muerto por enfermedad respiratoria aguda inusitada

Contacto estrecho. Aquella persona que haya cuidado o convivido con una caso confirmado sospechoso de influenza A (H1N1), o haya estado en un lugar donde existió una alta probabilidad de contacto con secreciones respiratorias de una persona infectada. Ejemplos: besos, abrazos, compartir elementos de cocina, exámenes médicos o cualquier contacto entre personas que hayan estado expuesta a secreciones respiratorias de los casos.

Caso confirmado. Aquel en que se detectó por estudios virológicos la presencia del nuevo virus A (H1N1).

En julio del 2009, dada la amplia circulación del nuevo virus en Argentina, las autoridades modificaron la definición de **Caso Sospechoso**. La nueva definición fue la siguiente: **Toda persona que presente enfermedad aguda febril desde ETI a neumonía.**



7. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

¿A qué pacientes realizar el diagnóstico de influenza A (H1N1)?

En los comienzos de la pandemia, en Argentina se realizaba la obtención de hisopados a todos los casos sospechosos, es decir, a aquellos con nexo epidemiológico. Por disposición del Ministerio de Salud, estas muestras debían ser derivadas al Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán" quien centralizaba el diagnóstico. Recién el 11 de junio de 2009 se autorizó a algunos laboratorios especializados a realizar el diagnóstico.

A fines de junio, dado el elevadísimo número de pacientes ambulatorios que concurrían a consultas por cuadros de ETI y, con el objetivo de reservar los reactivos diagnósticos para pacientes críticos, se modificó el criterio para obtención de muestras. Se propuso realizar el diagnóstico de influenza A (H1N1) solamente a: casos de Infección Respiratoria Aguda Grave que requiriera internación; casos con factores de riesgo (inmunosuprimidos, trasplantados, diabéticos, insuficiencia renal, mayores de 65 años, adultos o niños de cualquier edad con afecciones respiratorias crónicas (cardiopatía, asma grave, enfisema, enfermedad fibroquística, etc.); embarazadas que cursaran el 2^{do} o 3^{er} trimestre durante la época de influenza; personal de salud que cumpliera con la definición de caso sospechoso; niños en riesgo entre los 6 meses y los 5 años de edad (prematuros o con displasia bronco-pulmonar). Además, para continuar con la vigilancia epidemiológica se sugirió realizar diagnóstico a 1 de cada 10 pacientes ambulatorios.

7.1. MUESTRAS RESPIRATORIAS

Las muestras se deben obtener lo antes posible luego de la aparición de los síntomas, de preferencia dentro de los primeros 3 días. Es necesario utilizar elementos de protección individual que se detallan más abajo. Las muestras para niños y adultos son:

Para Internados

- **Aspirado nasofaríngeo (muestra de elección).**
- Aspirado endotraqueal o lavado broncoalveolar, si el paciente está intubado.

También pueden obtenerse las mismas muestras que para ambulatorios.

Para Ambulatorios

- **Hisopado nasofaríngeo, con hisopos flexibles** (de elección, según la *American Society for Microbiology, ASM*, 2009).
- Hisopado nasal y orofaríngeo combinado, con hisopos rígidos.

7.2 PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN

El operador que realice la toma de muestras deberá colocarse los elementos de protección personal (barbijo N95 ó doble barbijo, camisolín, guantes y antiparras).

Dado que la obtención de la muestra adecuada es imprescindible para un diagnóstico correcto, se describen en detalle los procedimientos de obtención, de acuerdo a las normas del laboratorio de Virología de CEMIC.

Hisopado nasal y faríngeo combinado

- Retirar de la heladera un tubo con medio de transporte para virus (MTV) y rotular con el nombre del paciente con marcador indeleble.
- Utilizando un hisopo estéril de dacrón con palillo plástico (no usar hisopos de madera y algodón), inclinar la cabeza del paciente hacia atrás a 45 grados, sujetando el mentón, e insertar el extremo de dacrón en las narinas del paciente. Girar el hisopo con suavidad sobre la mucosa de *ambas narinas* para asegurar recoger células y mucus.
- Colocar este **primer** hisopo en el tubo con MTV. Debe quedar sumergido en el líquido. Cortar el sobrante del palillo del hisopo y cerrar el tubo.

- **Para obtener el hisopado faríngeo:** sostener la lengua con baja-lengua y frotar suavemente **un segundo hisopo** sobre las dos amígdalas. Colocar este **segundo hisopo en el mismo tubo con MTV.**
- Cerrar el tubo con los dos hisopos herméticamente, asegurándose no producir derrames, y colocarlo en una bolsa plástica hermética con cierre hermético, o bien cerrar con agrafadora.
- Colocar la bolsa con el tubo en un contenedor plástico especial para envío de muestras en condiciones de Bioseguridad (**envase secundario**). Si no se dispone del mismo, puede usarse un recipiente plástico grande con boca ancha y tapa a rosca.
- Colocar en heladera o recipiente de poliestireno expandido (telgopor) con tapa (**envase terciario**): 1- El contenedor con las muestras; 2- Las órdenes y fichas epidemiológicas (dentro de otra bolsa o folio plástico); 3- Un refrigerante en gel.

Hisopado nasofaríngeo

- Para esta muestra **deben usarse solamente hisopos flexibles.**
- Rotular con marcador indeleble un tubo de MTV.
- Inclinar la cabeza del paciente hacia atrás a 45 grados e insertar el hisopo flexible en una narina hasta que se encuentre una ligera resistencia al encontrar la nasofaringe.
- Rotar el hisopo 2-3 veces y mantenerlo en el lugar por 5 segundos para permitir que se impregne con la secreción.
- Repetir el procedimiento en la otra narina con el mismo hisopo.
- Retirar el hisopo, colocarlo en el tubo con MTV, cortar el extremo sobrante del hisopo y tapar herméticamente el tubo.
- Envasar como se indicó más arriba en condiciones de Bioseguridad

Aspirado nasofaríngeo

- Retirar de la heladera un tubo con MTV.
- Retirar de su envase el tubo colector estéril (mucosuctor, que puede ser plástico o de vidrio) para aspirado nasofaríngeo y rotular con marcador indeleble con el nombre del paciente.
- Seleccionar la sonda nasofaríngea de acuerdo a la edad del paciente.
- Conectar el mucosuctor a la sonda nasogástrica por un lado y a la bomba de vacío por el otro.
- Insertar la sonda nasogástrica hasta la nasofaringe y aspirar las secreciones con bomba de vacío.
- Al finalizar la aspiración, retirar la sonda del paciente, destapar el tubo con MTV y aspirar el mismo para arrastrar todo el mucus que pueda haber quedado en la sonda hacia el mucosuctor.
- Descartar la sonda y el tubo vacío en condiciones de bioseguridad.
- Cerrar herméticamente el mucosuctor y colocarlo en una bolsa plástica con cierre hermético.
- Colocar la bolsa con la muestra en un contenedor plástico para envío en condiciones de bioseguridad (**envase secundario**).
- Colocar en una heladera o recipiente de telgopor con tapa (**envase terciario**): 1- El contenedor con las muestras; 2- Las órdenes y fichas epidemiológicas (dentro de otra bolsa o folio plástico); 3- Un refrigerante en gel.

En pacientes intubados: pueden obtenerse

- Aspirado endotraqueal: según procedimientos habituales. Al finalizar, volcar el contenido de un tubo de MTV (o 2 ml de solución fisiológica) en el recipiente que contiene la muestra.
- Lavado broncoalveolar (BAL): Igual que el anterior.

7.3 ALMACENAMIENTO Y ENVÍO DE MUESTRAS EN CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD

Las muestras obtenidas deben colocarse inmediatamente a 4°C - 8°C (en heladera o con refrigerantes en gel) hasta su transporte. No congelar en *freezer* ni en hielo seco. No almacenar por más de 4 días.

Las muestras deben enviarse lo más rápido posible en las condiciones de bioseguridad indicadas más arriba (triple envase, de acuerdo a normas de IATA), con refrigerantes en gel. No congelar. No son aceptables: muestras remitidas en la sonda de aspiración, que contengan hisopos secos, que estén derramadas, que no estén rotuladas o que carezcan de la orden y la ficha epidemiológica.

7.4 INSUMOS PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Hisopos

- Para hisopados nasal /faringeo combinado: se recomiendan hisopos con punta sintética (de poliéster o *Dacrón*) y mango de aluminio o plástico. Por ejemplo: *Hisopos estériles de Dacrón individuales en tubo de transporte*, COPAN disponibles en Argentina u otras marcas con características similares. No son recomendables los hisopos de algodón con mango de madera. No son aceptables los hisopos de alginato de calcio.
- Para hisopados nasofaríngeos: están disponibles en Argentina unos nuevos hisopos flexibles. COPAN: Número de catálogo: 503CS01. Especificaciones: *flexible, nasopharyngeal flocked swabs, nylon tip, plastic applicator, sterile, individually wrapped*.

Medio de Transporte para Virus (MTV)

El MTV contiene proteínas (para estabilizar el virus), antibióticos y antimicóticos para inhibir crecimiento bacteriano y fúngico y una solución *buffer*. Deben colocarse 2-3 ml en tubos estériles con tapa hermética y, de preferencia cónicos. Este medio se conserva a 4°C durante semanas o a -20°C durante meses.

Si no se dispone de medio de transporte para virus se puede usar solución fisiológica estéril. En este caso estas muestras sirven para PCR o para detección de antígenos por ensayos rápidos pero no pueden emplearse para cultivo viral.

El MTV puede adquirirse ya preparado. Por ejemplo, *VTM-RT 3 ml* (COPAN) o de otras marcas. Otra opción, de menor costo, es la preparación artesanal de MTV que contiene: Medio MEM EARLE (High Clon) o bien Hanks (Gibco) (1000 ml), esterilizado por filtración; penicilina 1000 UI; estreptomycin 1000 ug; albúmina al 0, 5%, esterilizada por filtración. El pH debe ser 7. Fraccionar en tubos plásticos con tapa hermética, colocando 2 a 3 ml de medio de transporte en cada uno. Conservar a 4° C o congelar a -20° C. En este caso, descongelar antes de usar. El color debe ser rosa, si es amarillo o violeta -debido a cambio de pH- no utilizar.

8. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO: METODOLOGÍA

Las muestras deben manipularse en laboratorios de nivel BSL 2, como mínimo y dentro de flujos laminares de seguridad biológica y con prácticas BSL 3 (acceso restringido, barbijo N95, camisolín, cofia, guantes, protección ocular). Se recomienda realizar el aislamiento en cultivo en laboratorios con nivel de bioseguridad BSL3 (véase el capítulo 57 *Bioseguridad en la práctica biomédica y en el laboratorio*).

La metodología para diagnóstico de influenza A (H1N1) es directa:

- Detección del RNA viral por RT-PCR en tiempo real o RT-PCR convencional.
- Aislamiento en cultivo celular más secuenciación.
- Detección de antígeno viral por inmunofluorescencia u otras técnicas.

Los métodos indirectos o serológicos no son útiles para diagnóstico. Sin embargo, son de gran importancia en estudios epidemiológicos para detectar anticuerpos específicos por medio de técnicas de micro-neutralización o de inhibición de la hemaglutinación. Asimismo, la detección de anticuerpos específicos por medio de las técnicas mencionadas es indispensable en los estudios de eficacia de las nuevas vacunas.

8.1 DETECCIÓN DEL RNA VIRAL POR RT-PCR EN TIEMPO REAL

Es el **ensayo de elección**. El CDC (Atlanta, EE.UU.) diseñó inicialmente (Abril, 2009), un protocolo para la detección del nuevo virus influenza A (H1N1), y luego realizó una actualización en noviembre de 2009. Ambos están disponibles en:

- WHO. *CDC protocol of real time RT-PCR for swine influenza A (H1N1)*.: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimepcer/en/index.html>
- WHO *information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans-revised*. *Publication date: 23 November 2009*.: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/diagnostic_recommendations/en/index.htm

De acuerdo al protocolo inicial del CDC se deben realizar cuatro PCR diferentes utilizando cuatro grupos de *primers* y sondas: uno, para detectar la proteína de matriz de influenza A (M1 y M2-segmento 7); otro, para detectar el gen de la nucleocápside de influenza porcina (segmento 5); otro, específico para la hemaglutinina del nuevo influenza A (H1N1) (segmento 4); y el último grupo, para detectar el gen P (DNA humano) como control de calidad de la muestra. Este protocolo puede ser empleado en diferentes termocicladores de PCR en tiempo real (*Smart Cycler, Cepheid; Light Cycler, ROCHE; ABI Prism*, etc.).

El tiempo aproximado para la obtención del resultado por estas metodologías es de 24 h., pero el protocolo de la OMS indica repetir las determinaciones negativas con el fin de confirmar el diagnóstico, por lo que se requiere un tiempo adicional.

También existen reactivos de origen comercial de distintas marcas (*Argene, Invitrogen, Roche, RVP- Respiratory Virus Panel, Quiagen Luminex*, y otras) que permiten discriminar entre influenza A estacional y el nuevo virus H1N1.

8.2 AISLAMIENTO EN CULTIVO

El aislamiento del nuevo virus pandémico *influenza A (H1N1) 2009* es diagnóstico de infección. Los resultados se pueden obtener entre los 7 y 10 días; por lo tanto, no resulta útil para el manejo clínico del paciente. Un cultivo negativo no excluye infección por el nuevo virus.

El aislamiento viral puede realizarse en células MDCK o en R-Mix (estas últimas no disponibles en Argentina). Luego de la detección de la acción citopática, debe realizarse la identificación del virus aislado por técnicas moleculares, secuenciación o RT-PCR).

Dado los riesgos de amplificar este nuevo virus, se recomienda realizar el aislamiento en laboratorios con nivel de bioseguridad BSL 3.

8.3 DETECCIÓN DE ANTÍGENO VIRAL POR INMUNOFLUORESCENCIA U OTROS ENSAYOS RÁPIDOS

8.3.1 Detección de antígeno viral por inmunofluorescencia (IF)

La detección de antígenos virales por IF con anticuerpos monoclonales permite detectar la nucleoproteína común a todos los virus influenza tanto A o B. Por ello, un resultado positivo no permite discriminar si se trata de las cepas de influenza A estacional o del nuevo virus pandémico.

Una de las ventajas de la técnica consiste en que, en la misma muestra, pueden detectarse los demás virus respiratorios si se emplean los anticuerpos monoclonales específicos para ellos (sincial respiratorio, adenovirus, parainfluenza 1-4, metapneumovirus humano). Otras ventajas son la rapidez en la obtención del resultado (horas) y la posibilidad de detectar la calidad de la muestra en la observación microscópica. Las desventajas son: la necesidad de un operador entrenado en la lectura, microscopio de fluorescencia de calidad. Se requiere la utilización de controles de calidad.

La sensibilidad de la IF para el diagnóstico rápido de influenza A (H1N1) es variable, de acuerdo a diferentes publicaciones y al tipo de población. Ginocchio y col. (*J Med Virol*, Junio, 2009) re-

portó una sensibilidad de sólo el 48% pero en ese estudio, la mayoría de las muestras provenían de adultos. En el Laboratorio de Virología de CEMIC, así como en varias publicaciones, la sensibilidad de la IF en muestras pediátricas fue del 60- 80%, en comparación con las técnicas moleculares.

Desde principios del 2010 está disponible un monoclonal específico para influenza A (H1N1).

8.3.2 Otras técnicas de diagnóstico rápido de influenza

Los ensayos de diagnóstico rápido de influenza (*Rapid Diagnostic Influenza Test* -RDIT) se basan en la detección de un antígeno viral, como la nucleoproteína (NP) del virus influenza (altamente conservada). Su ventaja consiste en que permiten obtener un resultado en menos de 30 min. y pueden ser realizados en el centro de atención del paciente; esto permite tomar decisiones en forma rápida. Pueden consistir en ELISAs de membrana, inmuno-ensayos ópticos o inmuno-cromatografía.

Están disponibles varios ensayos de origen comercial; algunos permiten: i) detectar y distinguir entre influenza A o B; ii) detectar ambos influenza A y B, sin diferenciarlos; iii) detectar la nucleoproteína del nuevo virus pandémico A (H1N1).

Las desventajas de estas técnicas son: i) su sensibilidad es baja a moderada (10-70%) tanto en la detección de influenza estacional como en la detección del virus pandémico, si se compara con el cultivo o la RT-PCR. ii) ninguno de los RDIT aprobados por la FDA (EE. UU.) permite distinguir entre los subtipos (H1N1 y H3N2 estacionales), ni proveer información acerca de la sensibilidad a los antivirales.

Debido a esta baja sensibilidad, un resultado negativo no significa ausencia de infección con el nuevo virus. Entre los factores que podrían afectar la sensibilidad, están: el tipo de muestra (hisopado nasal vs. hisopado nasofaríngeo), la calidad de la muestra, el tiempo transcurrido desde la aparición de los síntomas (en los 3 primeros días mayor título viral y en consecuencia mayor sensibilidad), y la edad del paciente.

El rol de RDIT para la detección del nuevo virus influenza A (H1N1). Cuando los virus influenza circulan en una comunidad (alta prevalencia), un resultado positivo indica que, probablemente, el virus esté presente en la muestra. Sin embargo, un resultado negativo no asegura la ausencia de infección. Existen resultados falsos negativos, y si existe alta sospecha de que el paciente puede estar infectado, deben implementarse las medidas de control y/o tratamiento del paciente, independientemente del resultado negativo de la prueba.

La **especificidad** de RDIT es generalmente alta. Sin embargo, especialmente en los períodos de baja actividad de influenza (ejemplo: al comienzo o final de la estación) pueden ocurrir falsos positivos; por lo tanto, un resultado positivo por una técnica rápida requiere la confirmación por cultivo o RT-PCR en tiempo real.

Cuando se utilicen los ensayos RDIT, el informe debe ir acompañado de una explicación que oriente al médico en la conducta a seguir.

9. NOCIONES DE TRATAMIENTO

Los inhibidores de la neuraminidasa viral (oseltamivir, vía oral y zanamivir, vía inhalatoria) se pueden utilizar para tratamiento o profilaxis. En ambos casos deben administrarse dentro de las 48 horas del comienzo de los síntomas para ser efectivos. Tanto en niños como en adultos la duración del tratamiento es de 5 días y de profilaxis es de 10 días.

Las dosis de oseltamivir en adultos son: como tratamiento, 75 mg (1 cápsula) cada 12 h.; como profilaxis, 75 mg cada 24 h. Se recomienda administrarlo con las comidas para evitar náuseas o vómitos.

Las dosis de oseltamivir en pediatría son:

Para niños de 12 meses o mayores: si pesa menos de 15 kg, como tratamiento 60 mg/día y como profilaxis 30 mg/día; si pesa entre 15-23 kg, como tratamiento 90 mg/día y como profilaxis 45 mg/día; si pesa 24-40 kg, como tratamiento 120 mg/día y como profilaxis 60 mg/día; si pesa más de 40 kg, tratamiento 150 mg/día y profilaxis 75 mg/día.

Para menores de 1 año: si es menor a 3 meses, se indican 12 mg cada 12 h.; entre 3-5 meses, 20 mg cada 12 h. y entre 6-12 meses, 25 mg cada 12 h.

Las dosis son de 2-3 mg/kg, 2 veces por día para tratamiento y 2-3 mg/kg. una vez al día para profilaxis. Las formas farmacéuticas son cápsulas de 30-45-75 mg. Si no se dispone la medicación en forma de jarabe, se debe disolver la cápsula de oseltamivir y mezclarla con algún alimento de consistencia cremosa (no ácido ni caliente).

9.1 RESISTENCIA A ANTIVIRALES

La OMS informó en diciembre de 2009, unos pocos casos (n= 96) de resistencia de la cepa pandémica al oseltamivir, un tercio de los cuales aconteció en pacientes inmunocomprometidos.

Las cepas de influenza estacional pueden ser resistentes al oseltamivir. Esta resistencia, asociada a la mutación His275Tyr, se ha observado también en el virus pandémico pero en un número muy restringido de casos, en general en relación a pacientes inmunocomprometidos. No se ha detectado aún resistencia al zanamivir.

Esta resistencia también se ha observado en un pequeño número de inmunocomprometidos en Argentina (B.Bouzas, trabajo presentado en el Simposio de la *Pan American Society for Clinical Virology*, Daytona, EE. UU., Abril, 2010).

Si bien los casos de cepas pandémicas resistentes al oseltamivir hasta comienzos de 2010 fueron ínfimos en relación al número total de cepas estudiadas, los expertos internacionales han expuesto el posible riesgo teórico de la ocurrencia de un evento de reasociación entre el genoma del virus pandémico con el gen NA de cepas del virus de la gripe estacional A/H1N1 resistente al oseltamivir; Por ello, el monitoreo de esta posible resistencia debe ser permanente.

10. PREVENCIÓN

Las medidas a nivel individual constituyen una responsabilidad social y su objetivo es disminuir la diseminación del virus en la comunidad. Para individuos asintomáticos las medidas de prevención son: lavado de manos frecuente durante 20 segundos con agua y jabón, puede aplicarse posteriormente alcohol 70 o en gel; evitar el saludo social (besos, abrazos); evitar sitios con aglomeraciones; ventilar los ambientes y extremar las medidas de higiene en el hogar y en el trabajo.

Los individuos con síntomas deben auto-aislarse en su hogar, evitar la automedicación, en especial con aspirina, emplear barbijo y consultar al médico. Para el personal de salud las medidas de prevención son estrictas y están especificadas por los Comités de Bioseguridad de cada institución. A nivel comunitario, la prevención es la dispuesta por la autoridades sanitarias de cada país y varía ampliamente, desde la difusión masiva de las medidas de prevención, hasta el cierre de escuelas, guarderías y universidades, limitación los espectáculos públicos, etc.

Las vacunas disponibles para influenza A (H1N1) se analizan en el capítulo siguiente.

11. DATOS INICIALES DEL NUEVO VIRUS INFLUENZA A H1N1 EN ARGENTINA

La vigilancia epidemiológica de las virosis respiratorias en Argentina ha sido implementada hace muchos años. En el Capítulo 17 (Vigilancia Epidemiológica) se definen: el sistema de notificación obligatoria, la vigilancia epidemiológica de influenza y otros virus respiratorios, el corredor endémico, el sistema de

médicos centinelas y de unidades centinelas, la estructura de la red de vigilancia en nuestro país, la importancia de la notificación de virus respiratorios, y de la tipificación y sub-tipificación de las cepas de influenza circulantes cada año, en relación a la fórmula vacunal.

La existencia y funcionamiento de este sistema de vigilancia ha permitido el estudio adecuado de la pandemia de 2009.

El primer caso de la nueva influenza A (H1N1) en Argentina fue detectado en Puerto Madryn, (Pcia. de Chubut) en un ciudadano que regresó al país desde México y presentó síntomas el 25 de abril de 2009. En esa oportunidad no se contaba aún con los *primers* recomendados por el CDC para el diagnóstico específico; por ello éste se realizó en el Instituto "Carlos G. Malbrán" por aislamiento en cultivo y secuenciación parcial del virus. Este diagnóstico inicial demoró 10 días.

En la primera semana de mayo, las autoridades locales y el Ministerio de Salud de Nación realizaron la investigación de con-

tactos y quimioprofilaxis de los mismos. Luego de esas acciones se determinó que no hubo circulación del virus en esa área y que se logró cortar la cadena de circulación del nuevo virus.

A partir del 16 de mayo, se detectaron los primeros casos en Buenos Aires, que se relacionaron con un brote en una escuela, originado a partir de un viaje a EE. UU. (Figura 59.4).

Como se puede observar en la Figura 59.5, a partir del caso índice detectado en una escuela se produjo una diseminación libre de la enfermedad hasta el día 23, en que se realizó la intervención con tratamiento de los casos, la quimioprofilaxis a los contactos y el cierre de la escuela el día 25 con lo que se logró la contención del brote en esa institución.

En la Figura 59.6 se observa el estudio realizado en contactos y casos en esa escuela. Entre los contactos cercanos de los alumnos (columnas en verde) se demostró que sólo una baja proporción pasó a casos (columnas en azul). Con esta relación se pudo esti-

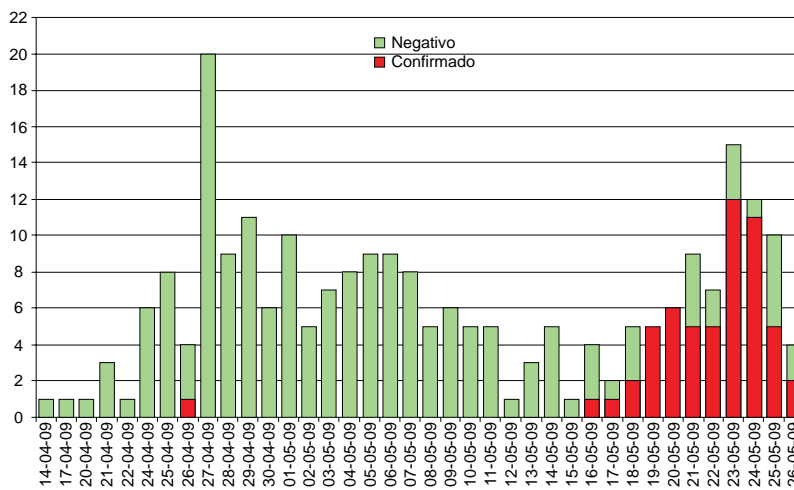


Figura 59.4. Los comienzos de la pandemia: los primeros casos de la nueva influenza A (H1N1), según fecha de inicio de síntomas. Abril-mayo, 2009. Buenos Aires, Argentina. n = 250.

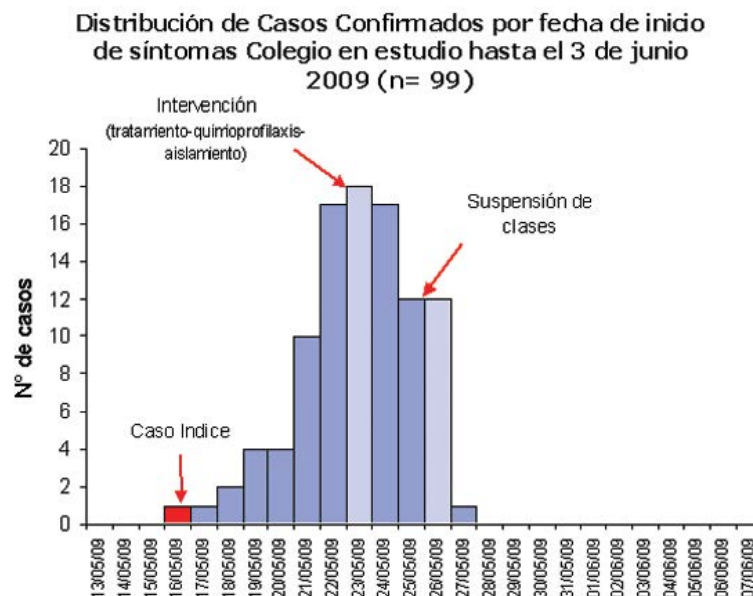


Figura 59.5. Los comienzos de la pandemia. Distribución de casos confirmados de nueva influenza A (H1N1) en un colegio en estudio hasta el 3 de junio, 2009 (n = 99), Buenos Aires, Argentina.

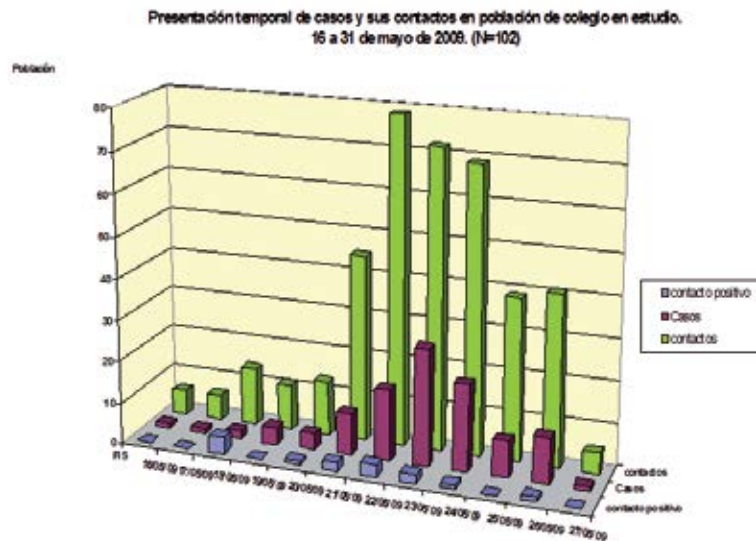


Figura 59.6. Los comienzos de la pandemia. Casos y contactos en el estudio de la diseminación inicial de influenza A (H1N1) en un colegio del 16 al 31 de mayo de 2009 en Buenos Aires, Argentina

mar que la transmisión a los contactos cercanos en el hogar fue del 1,1% contra 8,7% en la escuela. También se pudo determinar que el período de incubación en la escuela fue de 48 h. y que la diseminación se dio con un R0 de 2,4.

Para ese entonces (mayo de 2009), se detectó una gran cantidad de estudiantes de escuelas afectadas en Capital Federal y zona norte del Gran Buenos Aires, dada por la intensa interrelación de los alumnos en actividades extra-programáticas, desde académicas hasta deportivas y sociales. Además, para el mismo período, se realizó un evento hípico con alta concurrencia de jinetes extranjeros y nacionales donde se produjo otra cadena de transmisión, la cual se extendió a otras instituciones educativas.

Utilizando los datos hallados en la escuela se estimó, mediante un modelo matemático sobre la población estimada de las escuelas de la zona norte de Gran Buenos Aires y CABA, de 100.000 personas que se presentarían 8000 casos en 13 días, los cuales serían suficientes para realizar la diseminación del virus en la población general. Por esta razón, se propuso el cierre de las escuelas desde 8 al 19 de junio de la zona mencionada. Lamentablemente, no se logró este objetivo porque las autoridades de Salud y Educación de esas jurisdicciones desestimaron que la medida fuera apropiada en ese momento.

En poco tiempo la diseminación viral en la Capital Federal (CABA) y zona metropolitana se transformó en sostenida con la consecuente aparición de casos graves y fatales.

El 15 de junio se presentó el primer caso fatal y sólo diez días después se registraron 17 casos fatales en la Pcia. de Buenos Aires y 5 en la CABA.

La falta de contención de la epidemia en la CABA y la zona Metropolitana perteneciente a la Pcia. de Buenos Aires resultó en la diseminación de la epidemia en las principales ciudades de la Pcia. de Buenos Aires y en las capitales de varias provincias, comenzando con Santa Fe.

En la última semana de junio la diseminación se transformó en sostenida para gran parte del país como se observa en la Figura 59.7.

Los datos del Ministerio de Salud (página web, 30/12/09) analizan la situación del brote de influenza pandémica en Argentina desde el 17 de mayo del 2009 al 30 de diciembre, 2009 (semanas epidemiológicas 20 a 51; Tabla 59.1).

En ese período se notificaron un total de 1 390 566 casos de Enfermedad Tipo Influenza (ETI). Se confirmaron por diagnóstico virológico como influenza A (H1N1), 11 746 casos. El total de hospitalizaciones por enfermedad respiratoria ascendió a 14 034. Se confirmaron 617 defunciones en 21 provincias.

En la Figura 59.7 se puede observar la curva epidémica desde el inicio de la circulación del nuevo virus de influenza A (H1N1) a partir del 16 de mayo de 2009 en la ciudad de Buenos Aires. El primer conglomerado de casos ocurrió en una población escolar de esa ciudad. El pico máximo de transmisión se detectó entre el 20 de junio y el 3 de julio, con una transmisión generalizada en todo el país. A partir de la SE 27 (5 al 11 de julio) se observa una tendencia descendente en el número de casos a nivel país.

La mayoría de los casos por el nuevo influenza A (H1N1) se registró en niños y adultos jóvenes, siendo menor el número de casos en mayores de 65 años. Este hecho resulta llamativo ya que ese grupo es el más afectado durante los brotes de influenza estacional. Esta "protección" podría deberse a inmunidad previa por infección o vacunación con cepas de influenza A H1N1 que circularon con anterioridad a 1957.

En la Figura 59.8 se observa la distribución de casos fatales según edad y sexo y las tasas por cien mil habitantes. Se observan diferencias en las tasas de letalidad entre los distintos grupos de edad. El grupo donde se presenta el mayor número de casos fatales fue el de adultos de 50 a 59 años, seguido por el grupo de 40 a 49 años. Se destaca que en el grupo de 20 a 29 años, las mujeres superan a los hombres en un 80% ($p < 0,001$), invirtiéndose a favor de los varones luego en el grupo de 40 a 59 años de edad. De un total de 268 mujeres embarazadas notificadas desde el inicio de la pandemia hasta mediados de agosto de 2009, el 51% requirió hospitalización.

Se están investigando al presente cuáles son los mecanismos patogénicos que induce este nuevo virus pandémico y las causas, probablemente inmunológicas, de la mayor gravedad de los cuadros clínicos en adultos jóvenes (véase el capítulo 5 *Patogenia de las infecciones virales*).

Hasta la SE 51 (20 al 26 de diciembre, 2009) se habían notificado 27 928 casos sospechosos de influenza por el virus pandémico. De ellos, 11.746 fueron positivos para la nueva influenza A (H1N1), 2009.

En la Figura 59.9 se observa que entre las semanas 21 a 26, se produjo un aumento sostenido de la notificación de casos de influen-

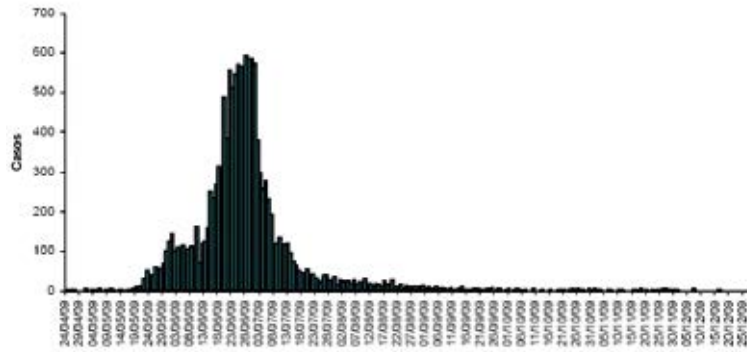


Figura 59.7. Distribución de casos confirmados y en estudio de la nueva influenza A (H1N1) según fecha de inicio de los síntomas a partir del 16 de mayo de 2009 en Argentina. n = 15 819.

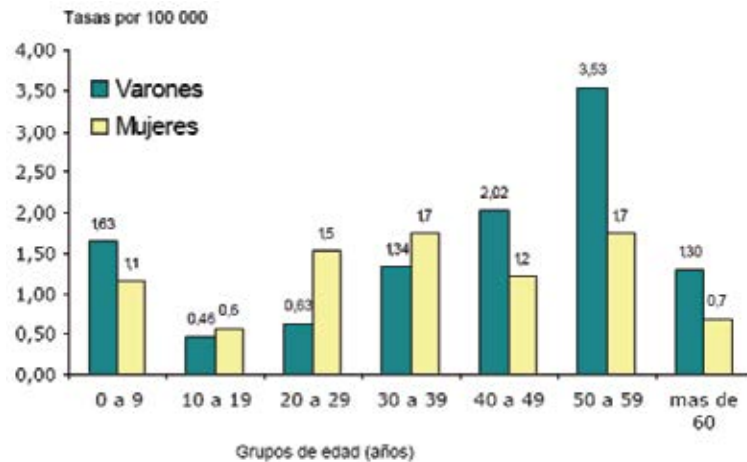


Figura 59.8. Distribución de fallecidos confirmados por influenza A (H1N1) según grupos de edad y sexo. Tasas por cien mil habitantes. Argentina, 2009. n = 572.

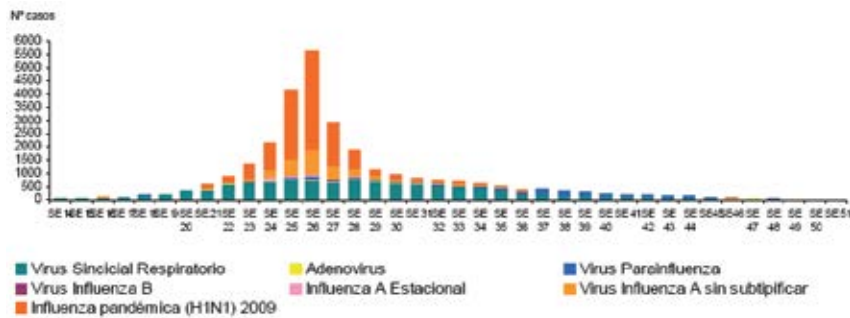


Figura 59.9. Distribución de virus respiratorios por semana epidemiológica. Argentina, 2009.

	Casos y tasas acumuladas desde la SE 20 a 32 de 2009	
ETI estimadas a la SE 31*	Total casos	811 940
	Tasa semana 31	14,1/10 000 hab.
	Tasa acumulada	202,3/10 000 hab.
Casos confirmados SE 32		7 173
Casos hospitalizados por enfermedad respiratoria SE 32		6 346
Nº de casos fallecidos confirmados SE 32		439

Tabla 59.1. Distribución de casos y tasas de ETI notificadas, confirmadas, pacientes hospitalizados y defunciones acumuladas. Argentina, semanas epidemiológicas 20 a 32 de 2009. SE: semana epidemiológica.



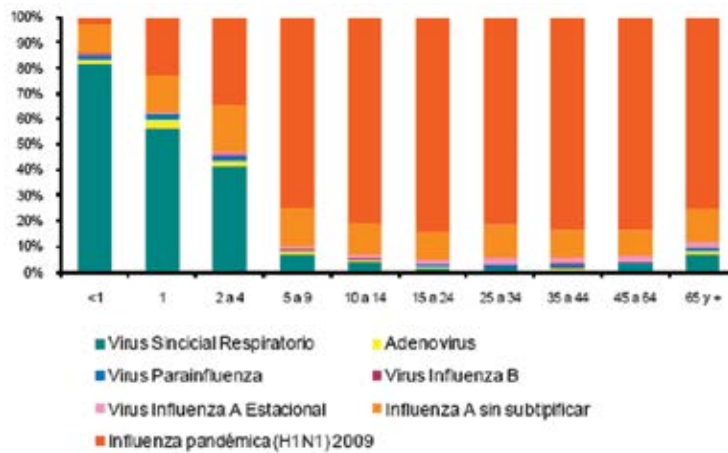


Figura 59.10. Distribución porcentual de virus respiratorios por grupo de edad. Argentina, 2009.

za pandémica H1N1 e influenza A sin subtipificar, llegando a 4688 casos en la SE 26, lo que representa un 83% del total de virus respiratorios circulantes. Se observa, además, la circulación de sincicial respiratorio, adenovirus, influenza estacional y parainfluenza.

Hasta la SE 51, los virus de influenza pandémica (H1N1) e influenza A sin tipificar, sumados, representaron el 93% del total de virus respiratorios notificados en los mayores de 5 años de edad. Por el contrario, en los menores de 5 años, esta proporción se redujo al 22%, mientras que se elevó el porcentaje de virus sincicial respiratorio, representando el 66% (Figura 59.10).

Al año siguiente a la pandemia (2010) se continuó con la vigilancia epidemiológica y con el diagnóstico etiológico de casos graves. Se han organizado hospitales para atención especializada de pacientes con influenza A (H1N1), se indicaron esquemas de tratamiento y se adquirieron drogas antivirales y vacunas de distribución gratuita para la población.

Se requieren posteriores estudios epidemiológicos, clínicos, inmunológicos y virológicos para determinar la magnitud de la pandemia de influenza A (H1N1) en Argentina.

Los primeros datos publicados sobre la pandemia de influenza A H1N1,2009 en Argentina se pueden encontrar en: a) Medicina (Buenos Aires) 2009. Trabajo donde se describe la preparación y la atención médica de 662 pacientes durante la pandemia en el "Hospital Nacional Prof. A Posadas"; b) *Emerging Infectious Diseases*, 2010, Echavarría M y col., "Pandemic (H1N1) 2009 cases, Buenos Aires, Argentina.2009", donde se analizan los primeros 513 casos estudiados en el Hospital Universitario CEMIC durante el pico de la pandemia; y c) *The New England Journal of Medicine*, 2010, Libster y col., "Pediatric Hospitalizations associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Argentina", donde se estudiaron niños hospitalizados en seis hospitales públicos durante la pandemia 2009.

Bibliografía

- Bioseguridad: www.cdc.gov/OD/ohs/biosfty/bmbl5/mbl5toc.htm
- Obtención de muestras: www.cdc.gov/swinwflu/specimencollection.htm
- Diagnóstico :www.cdc.gov/swienflu/pdf/HAN_042509.pdf debe decir swineflu.
- Epidemiología: WHO Influenza A (H1N1) –update [www. CDC. Gov/flu/weekly/](http://www.CDC.Gov/flu/weekly/)
- (www.dev.dcd.govhttp://) www.cdc.gov/flu/weekly/fluactivity.html
- Páginas del Ministerio de Salud, Argentina www.msal.gov.ar/
- Epidemiología: [www.who.int/ Flunet](http://www.who.int/Flunet)
- Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical aspects fo Pandemic H1N1, 2009, Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, et al. "Clinical aspects of Pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infections". *N Eng J Med* 2010; 362: 1708-19. 2039.
- Zimmer S, Burke D. "Historical Perspective - Emergence of influenza A (H1N1) viruses". *N Engl J Med* 2009; 361:279-85
- Malik Peiris J, Poon L, Guan Y. "Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S- OIV) H1N1 virus in humans". *J Clin Virology* 2009; 45: 169-73.
- Gatherer D. "The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context". *J Clin Virology* 2009; 45: 174-8.

- Chowell G, Bertozzi SM, Colchero MA, Lopez-Gatell H, Alpuche-Aranda C, Hernandez M, et al. "Severe respiratory disease concurrent with the circulation of H1N1 influenza". *N Eng J Med* 2009; 361: 674-9.
- Meijer A, Beerens A, Claas E, Hermans M, de Jong A, Molenkamp R, et al. "Preparing the outbreak assistance laboratory network in the Netherlands for the detection of the influenza virus A (H1N1) variant". *J Clin Virology* 2009; 45: 179-84.
- Ginocchio C, F Zhang, R Manji, Arora S, Bornfreund M, Falk L, et al. "Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak". *J Clin Virol* 2009; 45:191-5.
- Epidemia de Influenza A (H1N1) en la Argentina. Experiencia del "Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas". *Medicina* (Buenos Aires); 2009: 69 393-423.
- Echavarría M, Quercia M, Marcone D, Videla C, Martínez A, Bonvehí P, et al. "Pandemic (H1N1) 2009 cases, Buenos Aires, Argentina". *Emerg Infect Dis*, 2010; 16: 311-6.
- Libster R, Bugna J, Coviello S, Hijano DR, Dunaiewsky M, Reynoso N, et al. "Pediatric hospitalizations associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Argentina". *N Engl J Med* 2010; 362: 45-55.

Vacunas para el virus de influenza pandémica A H1N1, 2009

Débora N. Marcone, Guadalupe Carballal

INFLUENZA PANDÉMICA

En junio de 2009, la OMS declaró la primera pandemia de gripe de este siglo producida por un nuevo virus influenza A H1N1. Este virus pandémico comenzó su circulación en Argentina en mayo de 2009 y durante ese año se registraron cerca de 10.000 casos confirmados y más de 600 defunciones.

Este nuevo virus influenza A H1N1 es un claro ejemplo de enfermedad emergente.

Para definir una pandemia son necesarias tres condiciones: a) la emergencia de una nueva cepa de influenza frente a la cual la mayoría de la población carece de inmunidad; b) la capacidad del virus de infectar a humanos y causar enfermedad grave; c) la capacidad de transmisión sostenida de persona a persona con diseminación mundial.

La gripe pandémica presentó signos y síntomas similares a los de la gripe estacional, pero el nuevo virus afectó gravemente a poblaciones que habitualmente no presentan alto riesgo de complicaciones por influenza como son los niños y adultos jóvenes.

Los virus de influenza estacional suelen infectar a cerca del 20% de la población; por el contrario, un virus pandémico puede afectar a más del 50% de la misma, ocasionando mayor mortalidad y grave sobrecarga de los sistemas de salud.

La forma más efectiva de controlar una pandemia de gripe, además de las medidas de higiene, es la vacunación de la población susceptible.

1. DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA INFLUENZA PANDÉMICA

A partir del alerta emitido por los sistemas de vigilancia mundiales de gripe sobre la circulación de un nuevo virus influenza que

no podía ser tipificado con los reactivos existentes, los centros de referencia de EE. UU. y Europa comenzaron rápidamente la identificación, el aislamiento y la secuenciación del nuevo virus. La cepa prototipo elegida por la OMS como cepa vacunal fue A/California/7/2009 (H1N1). Se comenzaron las primeras etapas de producción de vacunas inactivadas con formalina, en forma similar a la empleada para las vacunas de influenza estacional. Luego de evaluar la adecuada inactivación viral, se realizaron en el hemisferio norte los ensayos clínicos para determinar su inocuidad y eficacia. A fines de 2009, varios laboratorios presentaron estas vacunas a las entidades internacionales para su aprobación.

1.1 OBJETIVOS DE LA CAMPAÑA NACIONAL DE VACUNACIÓN 2010 EN ARGENTINA

Para el otoño del año 2010, el Ministerio de Salud de Argentina adquirió dos vacunas para cumplir con los objetivos de la campaña 2010: la vacuna monovalente *Focetria*® y la trivalente *Begrivac*®. La primera sólo confiere protección contra influenza A H1N1 pandémica 2009; la segunda, protege también contra las cepas de gripe estacional.

Los objetivos fueron:

- **Vacunar con vacuna monovalente a:**
 - 95 % de embarazadas (en todo período de gestación) previamente y durante la circulación viral.
 - 95 % del personal de salud y de laboratorio en contacto con pacientes y/o con secreciones.
 - 85 % de los niños entre 6 meses y 2 años de vida, con 2 dosis de vacuna.
 - 85 % de los niños entre los 3 –5 años de vida.



Casos de Enfermedad Tipo Influenza (ETI) por semana epidemiológica. Total país. SE 1ª a 52ª - Años 2009-2011. Argentina

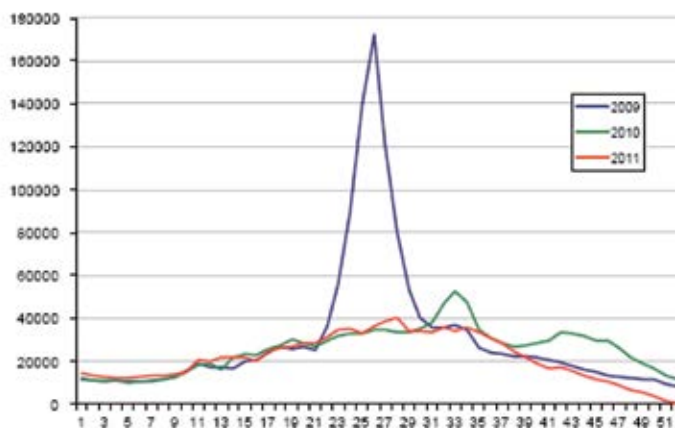


Tabla 59.1.1. En el año 2009, una nueva cepa de influenza A (H1N1) fue el agente causal de la mayoría de los casos de ETI notificados en Argentina. A partir de 2010 esta cepa se incorporó a la formulación de la vacuna que contiene una cepa A (H3N2) y una cepa B. Se señala que en 2010 y 2011 las cepas circulantes en Argentina estaban antigénicamente relacionadas con las presentes en la fórmula vacunal.

- 85 % de la población entre 5 años y 64 años de edad que presenten factores de riesgo.
- **Vacunar con vacuna trivalente a:**
 - 85 % de la población mayor de 65 años.

1.2 INDICACIONES DE LA VACUNACIÓN CONTRA INFLUENZA PANDÉMICA DURANTE EL AÑO 2010

La vacunación se realizó por fases y se utilizaron los dos tipos de vacunas.

De acuerdo a las recomendaciones de la Comisión Nacional de Inmunizaciones, el Comité de Expertos Asesores de la Campaña de Vacunación Pandémica y a datos epidemiológicos de Argentina y del mundo, las indicaciones para la Campaña Nacional de Vacunación 2010 para el virus de Influenza A H1N1 pandémica en Argentina fueron:

1.2.1 Vacuna monovalente

Personal de salud en contacto con pacientes o de laboratorio en contacto con muestras de secreciones respiratorias.

Personal esencial: fuerzas de seguridad, etc.

Embarazadas y puérperas. Embarazadas: en cualquier trimestre de gestación; puérperas hasta los 6 meses luego del parto.

Esta decisión se fundamentó en la necesidad de proteger pasivamente a los menores de 6 meses (en los que está contraindicada la vacuna pandémica) y que representaron el grupo de mayor mortalidad dentro de los menores de 5 años durante la pandemia del 2009. Las puérperas también presentaron mayor mortalidad que la población general.

Niños de 6 meses a 4 años (inclusive). En la primera etapa de vacunación se dio prioridad a los menores de 2 años.

Niños de 5 años o más y adultos hasta 64 años inclusive, con las siguientes entidades:

Obesos mórbidos, retraso madurativo grave, síndromes genéticos, enfermedades neuromusculares con compromiso respiratorio y malformaciones congénitas graves, enfermedad respiratoria crónica (hernia diafragmática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, displasia broncopulmonar, bronquiectasias, fibrosis quística del páncreas, etc.), asma grave, cardiopatías congénitas, trasplantados de órganos sólidos o de tejido hematopoyético, enfermedad onco-hematológica hasta 6 meses posteriores a la remisión completa, tumor de órgano sólido en tratamiento, insuficiencia renal crónica en diálisis o con expectativas de ingresar a diálisis en los próximos meses, inmunodeficiencia congénita o adquirida, medicación inmunosupresora o corticoides a altas dosis, diabéticos, insuficiencia cardíaca, enfermedad coronaria o reemplazo valvular o valvulopatías.

1.2.2 Vacuna trivalente

Se utilizó solamente para mayores mayores de 65 años.

1.3 INDICACIONES DE LA VACUNACIÓN CONTRA INFLUENZA A PARTIR DEL AÑO 2011

Las indicaciones de la vacunación antigripal son dinámicas y pueden variar de año a año, de acuerdo a la epidemiología regional.

Sin embargo, es importante recordar que la vacunación antigripal debe repetirse cada año debido a dos factores: los títulos de anticuerpos decaen, y además, las cepas pueden variar por lo que la OMS reformula anualmente las vacunas para los hemisferios norte y sur (véanse los capítulos 14 y 48).

A partir del 2011, se utiliza en Argentina la vacuna trivalente para influenza, que incluye la cepa pandémica. Las indicaciones de vacunación son las mencionadas en el ítem 1.2.1 con los siguientes cambios:

Niños de 6 a 24 meses (inclusive) independientemente de los factores de riesgo.

Niños mayores de 2 años y adultos menores de 64 años con factores de riesgo

Para los adultos mayores de 65 años, continúa la indicación de la vacuna trivalente, independientemente de la presencia o no de factores de riesgo.

2. VACUNA MONOVALENTE INACTIVADA PARA GRIPE PANDÉMICA

2.1 COMPOSICIÓN

Es a virus inactivados con formalina. Los virus se cultivaron en huevos embrionados de pollo. Contiene 7,5 microgramos (µg) de hemaglutinina de la cepa pandémica A/ California/7/2009 (H1N1) (Cepa análoga: A/California/7/2009 X-179A). Con el objetivo de aumentar la inmunogenicidad se añadió un adyuvante, denominado MF59C.1, formado por escualeno, polisorbato 80, trioleato de sorbitano, citrato de sodio dihidrato y ácido cítrico monohidrato.

Se puede presentar como jeringa prellenada o como vial multidosis. La jeringa prellenada (una dosis de 0,5 ml) contiene como ingrediente activo 7,5 µg de antígenos de superficie de virus de la gripe (hemaglutinina y neuraminidasa) de la cepa pandémica A/California/7/2009 (H1N1) (Cepa análoga: A/California/7/2009 X-179A). Como excipientes contiene: cloruro de sodio, cloruro de magnesio hexahidrato, cloruro de potasio, dihidrógeno fosfato potásico, hidrógeno fosfato disódico dihidrato, cloruro de calcio dihidrato, el adyuvante MF59C.1.

El vial multidosis (5 ml) contiene: 10 dosis de 0,5 ml con los mismos ingredientes activos y excipientes mencionados anteriormente más timerosal.

Forma farmacéutica: suspensión inyectable para aplicación por vía intramuscular de aspecto líquido blanco lechoso.

2.2 DOSIS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Actualmente, no se recomienda la vacunación de niños menores de 6 meses.

A partir de los 6 meses de vida y hasta los 35 meses y 29 días se deben administrar 2 dosis con un intervalo mínimo de 3 semanas.

A partir de los 3 y hasta los 64 años es suficiente una sola dosis. No existe contraindicación a la aplicación simultánea o con cualquier intervalo, entre ésta y otras vacunas aplicadas en sitios diferentes.

La aplicación debe realizarse con **técnica aséptica y por vía intramuscular en el músculo deltoides en mayores de 1 año y en el cuádriceps en menores de 1 año. En todos los casos debe**

Edad	Dosis	Número de dosis	Vía
6 meses a menores de 1 año	0,5 ml	2	IM en cuádriceps
Mayores de 1 año y hasta 35 meses	0,5 ml	2	IM en deltoides
3 años a 17 años	0,5 ml	1	IM en deltoides
18 a 64 años	0,5 ml	1	IM en deltoides

Tabla 59.1.1. Vacuna monovalente inactivada para influenza A H1N1: dosis y vías de administración. IM: intramuscular.

entregarse el certificado de vacunación, registrar los datos del paciente en las planillas correspondientes y descartarse los materiales de desecho de acuerdo a las normas locales de bioseguridad.

2.3 CONSIDERACIONES PARA EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA

Los fundamentos de la necesidad de vacunación de la embarazada son:

- Ser especialmente vulnerables a las infecciones por los virus de la gripe
- Tener mayor riesgo de morbilidad
- Brindar protección al recién nacido durante los primeros meses de vida mediante la transferencia de anticuerpos maternos (inmunidad pasiva natural).

2.4 CONSERVACIÓN, PRESENTACIÓN Y VACUNACIÓN SEGURA

Todas las vacunas se deben mantener entre 2 y 8° C, no exponerlas a la luz solar y no deben congelarse. Su aplicación debe realizarse con técnicas asépticas y deben usarse solamente las vías de administración indicadas.

2.5 CONTRAINDICACIONES PARA LA VACUNACIÓN

Absoluta. Reacción alérgica grave (anafilaxia) luego de una dosis previa de vacunas preparadas en huevos. La reacción puede ser a la proteína de huevo o a otros componentes (kanamicina, neomicina, formaldehído o bromuro de cetilmetilamonio).

Relativa. Enfermedad aguda grave febril. Se deberá posponer la vacunación.

No constituyen contraindicaciones: ser conviviente de un paciente inmunosuprimido, infección con HIV asintomática o levemente asintomática, intolerancia al huevo o antecedente de reacción alérgica no anafiláctica, tratamiento con antibióticos y/o convalecencia de enfermedad leve, tratamiento con corticoides (vía oral) en bajas dosis, en aplicaciones tópicas y aerosoles para tratamiento de asma, enfermedad aguda benigna (rinitis, catarro, tos o diarrea).

3. VACUNA TRIVALENTE PARA GRIPE PANDÉMICA

3.1 COMPOSICIÓN

Esta vacuna, además de los antígenos de la cepa pandémica, contiene los antígenos de dos cepas de influenza estacional (una cepa influenza **A H3N2**) y una cepa de influenza **B**. Por esta razón, **la vacuna trivalente confiere protección no solamente contra la cepa pandémica sino también contra los virus de influenza estacional. Esta vacuna es a virus inactivado y no contiene adyuvantes.**

La OMS ha recomendado 3 cepas para la formulación de las vacunas contra la gripe para el Hemisferio Sur durante el año 2010:

Dos cepas de virus influenza A: A/California/7/2009 (H1N1) – cepa análoga (pandémica) y A/Perth/16/2009 (H3N2) – cepa análoga (estacional)

Cepa de virus influenza B: B/Brisbane/60/2008 – cepa análoga (estacional)

Composición: virus influenza fragmentados, inactivados, con antígenos de superficie (hemaglutinina): A/California/7/2009 (H1N1) (Virus análogo: A/California/7/2009 Reass NYMC X-181) 15 µg de HA; A/Perth/16/2009 (H3N2) (Virus análogo: A/Wisconsin/15/2009 Reass NYMC X-183) 15 microgramos HA; B/Brisbane/60/2008 (Virus análogo: B/Brisbane/60/2008) 15 µg de HA, por dosis de 0.5 mL, propagado en huevos fertilizados de gallina. Excipientes: formaldehído, éter, polisorbato 80, sacarosa, solución buffer (pH= 7,2) compuesta por cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio hexahidratado, fosfato ácido de sodio dihidratado, fosfato diácido de potasio y agua para inyección.

3.2 PRESENTACIÓN, DOSIS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

La recomendación del Ministerio de Salud de Argentina para la campaña 2010 fue para pacientes mayores de 65 años. Sin embargo, también pudo emplearse en otros grupos etarios en los que está indicada la vacunación para influenza estacional.

Se presenta como jeringa prellenada de 0,5 ml. Debe aplicarse con técnica aséptica y por vía intramuscular.

4. VACUNA INTRANASAL A VIRUS VIVO Y ATENUADO

A diferencia de las vacunas a virus inactivados, las vacunas a virus *vivo* y atenuado contienen virus *vivo* que replicará en el tracto respiratorio, por lo que deben administrarse por vía intranasal.

Estas vacunas atenuadas, al contener virus viable, pueden producir signos y síntomas leves (congestión nasal, goteo nasal, fiebre, etc).

Contienen las mismas tres cepas usadas en las vacunas trivalentes inactivadas. La diferencia es que contienen virus *vivo* y atenuado, sensibles a la temperatura (*cold adapted*). Por ello, sólo pueden replicar a temperaturas presentes en el epitelio de la mucosa nasal y no en el tracto inferior.

Estas vacunas no están disponibles en Argentina (2010). En EE. UU. se han licenciado para administración intranasal en personas **no embarazadas, ni con factores de riesgo de 2 a 49 años de edad**. No se ha establecido su seguridad para individuos con condiciones médicas pre-existentes.

Los vacunados con estas cepas pueden eliminar pequeñas cantidades de virus viable luego de la vacunación que pueden infectar a otros individuos no vacunados. Sin embargo, no se han registrado efectos adversos entre aquellos no vacunados que se infectaron con el virus vacunal. Los virus aislados de pacientes vacunados conservaron su fenotipo atenuado (*cold adapted*) y sensibles a la temperatura. Estas vacunas producen, además de anticuerpos séricos, anticuerpos secretorios en la mucosa respiratoria y también inmunidad celular.



5. EFICACIA Y SEGURIDAD DE LAS VACUNAS PARA INFLUENZA

5.1 EFICACIA

Las vacunas inactivadas para influenza inducen el desarrollo de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y de anticuerpos neutralizantes, que pueden detectarse y titularse en el suero de los vacunados. Estos anticuerpos disminuyen los riesgos de enfermedad grave por las cepas virales circulantes siempre que sean antigénicamente similares a las contenidas en la fórmula vacunal.

Las vacunas a virus *vivo* y atenuado, además de inducir anticuerpos séricos y secretorios en la mucosa respiratoria, estimulan mecanismos de inmunidad celular.

Estudios realizados en EE. UU. y China, demostraron tasas de seroprotección (a los 21 días post-vacunación) del 92-100% en adultos y del 45-69% en niños. Esto sugiere su eficacia.

5.2 VACUNACIÓN SEGURA

La vacunación segura es prioritaria para los programas de inmunización y debe garantizar el empleo de vacunas de calidad, el transporte y almacenamiento a las temperaturas adecuadas, la aplicación de prácticas de vacunación seguras y la vigilancia de los eventos adversos supuestamente atribuidos a la vacunación, así como también brindar a la población mensajes claros en relación a las ventajas de la vacunación.

La inocuidad de las vacunas depende de sus características (virus inactivado o *vivo* y atenuado, la calidad del sustrato en que fue producida, la ausencia de patógenos contaminantes, etc.). La eficacia y seguridad de las vacunas de uso humano es, en primer término, estudiada por los laboratorios fabricantes; luego es investigada y autorizada por entidades internacionales (*Food and Drug Administration*) EE. UU. o entidades similares en Europa. Finalmente, la autoridad sanitaria de cada país habitualmente supervisa las prácticas de fabricación, los antecedentes clínicos, las publicaciones relacionadas

con la eficacia y seguridad de todos los componentes incluidos en las vacunas, así como la calidad de cada lote que ingresa al país.

La calidad de las vacunas, en especial de las nuevas vacunas contra la influenza pandémica A H1N1, está garantizada y se sustenta en la precalificación que la OMS realiza a los laboratorios productores, y en el control de calidad que llevan a cabo las autoridades nacionales de regulación en cada país para el registro y liberación de los lotes de vacuna.

Los resultados de estudios publicados hasta el presente indican que aquellas contra la influenza pandémica son tan seguras como las vacunas contra la influenza estacional. Hasta marzo de 2010, se habían aplicado cerca de **300 millones de dosis** de vacuna anti-pandémica en el mundo.

La mayoría de los eventos adversos reportados han sido leves. Las vacunas que contienen adyuvante pueden causar reacciones locales en el sitio de la vacunación con mayor frecuencia que aquellas sin adyuvante. Para las vacunas anti-influenza pandémica disponibles al 2010, se han reportado eventos adversos luego de la vacunación con una frecuencia de 10-100 casos/ 100.000 dosis de vacuna. Los eventos serios comunicados tuvieron una frecuencia mucho menor: 0,5-2/100.000 dosis administradas. Se han reportado casos de anafilaxia con una tasa de 0,1- 1 casos/ 100.000 dosis de vacuna administrada.

6. VIGILANCIA Y NOTIFICACIÓN DE EFECTOS ADVERSOS SUPUESTAMENTE ATRIBUIDOS A VACUNACIÓN (ESAVI)

6.1 VIGILANCIA Y NOTIFICACIÓN

A pesar de los controles mencionados, en un número muy limitado de casos pueden ocurrir eventos adversos, supuestamente atribuidos a la vacunación que se denominan ESAVI. En general, los ESAVI graves se registran con muy escasa frecuencia. En la mayoría de los casos, los beneficios de la inmunización son siempre mayores que los riesgos.

Durante las campañas masivas de inmunización al aumentar el número de dosis de vacuna aplicadas, puede también aumentar el número de ESAVI. Por ello, es muy importante su notificación a la autoridad sanitaria, con el objeto de registrarlos e investigar los ESAVI graves.

Los ESAVI deben notificarse a:

Ministerio de Salud de la Nación, Av. 9 de Julio 1925 (C1073ABA), TE: 4379-9043 int. 4830/ 4810. FAX: 4379 9000 int. 4806. **E mail:** vacunas@msal.gov.ar. arearte@msal.gov.ar

ANMAT, Av. de Mayo 869, piso 11 (1084) Buenos Aires, TE: 011-4340-0800 int. 1166. FAX: 011 4340 0866, **E mail:** snfvg@anmat.gov.ar, Internet: <http://www.anmat.gov.ar/aplicaciones-net/applications/lvg/esavi-web>.

6.2 CLASIFICACIÓN

Se define como ESAVI a todo cuadro clínico que aparece luego de la administración de una vacuna y que, supuestamente, pueda atribuirse a la misma. Un ESAVI severo es todo evento que resulte en hospitalización o fallecimiento.

Los ESAVI pueden clasificarse según su gravedad y/ o por su relación causal.

- *Por su gravedad*. *Leves*: reacciones menores, no requieren tratamiento ni hospitalización; *Moderados*: requieren tratamiento; existe malestar que interfiere con la actividad usual; *Graves*: amenazan la vida, causan daño permanente; *Letales*: contribuyen directa o indirectamente a la muerte.
- *Por su relación causal*. *Evento coincidente*: cuando definitivamente no está relacionado a la vacuna. *Evento relacionado con la vacuna*: en relación al manejo de las vacunas (error programático) o a componentes de la vacuna. *Evento no concluyente*: cuando la evidencia disponible no permite determinar la etiología del evento.

6.3 ESAVI EN RELACIÓN A VACUNAS INACTIVADAS PARA GRIPE PANDÉMICA

Dado que las vacunas inactivadas no poseen por definición virus vivo, no pueden causar influenza. En general, estas vacunas son

bien toleradas. Sin embargo, pueden observarse efectos adversos leves y, con mucha menor frecuencia, graves.

ESAVI leves: los más frecuentes son dolor a nivel de la inyección, induración y, rara vez, eritema y síntomas generales como fiebre, malestar, mialgias o artralgias.

ESAVI graves:

Anafilaxia: la anafilaxia post-vacunación es un evento muy raro (1 a 10 casos/1.000.000 de dosis aplicadas). Las reacciones alérgicas pueden observarse en minutos luego de la vacunación; en general se detectan durante la 1ª hora. Pueden consistir en urticaria, edema angioneurótico, asma alérgica y anafilaxia generalizada.

Estas reacciones son producidas por mecanismos de hipersensibilidad a la proteína residual de huevo que puede estar contenida en la vacuna, dado que los virus fueron replicados en huevos embrionados de pollo. Por ello, en los individuos con alergia a las proteínas de huevo la vacunación debe abordarse con cuidado o estar totalmente contraindicada.

También puede presentarse hipersensibilidad a otros componentes de las vacunas, por ejemplo el timerosal. En este caso, en general se trata de hipersensibilidad retardada local.

Durante la campaña de vacunación para gripe pandémica en Argentina (temporada 2010) se emplearon jeringas monodosis para las embarazadas, que no contienen timerosal. Se utilizaron jeringas multidosis (que sí contienen timerosal) para púrpuras y para el resto de la población.

Síndrome de Guillain-Barré. Es una neuropatía periférica aguda de escasa frecuencia en la población general (1-2 casos por año /100.000 individuos). Si bien se desconoce la causa de este síndrome puede ocurrir luego de algunas infecciones, por ej. por *Campylobacter jejuni* (1 caso de Guillain-Barré / 3000 infecciones por esta bacteria). Se postula un mecanismo de autoinmunidad.

En el año 1976, se realizó en EE. UU. una vacunación de grupos militares contra un nuevo virus de influenza porcina (de posible potencial pandémico). Luego, se detectó un aumento del número de casos de Guillain-Barré en algunos vacunados (menos de 10 casos /1.000.000 de vacunados) (CDC, Atlanta, 1998) y por ello se discontinuó la vacunación. Sin embargo, nunca fue posible determinar la asociación causal de este síndrome con la vacuna ya que en el mismo período se registró un brote de *Campylobacter jejuni*.

Los riesgos de Guillain-Barré asociados a vacunas para influenza estacional son aún menos claros. Los datos de Argentina comunicados al Programa Ampliado de Inmunización indican 60-80 casos de Guillain-Barré por año (Tasa: 0,6 a 0,8 /100.000 menores de 15 años). Esta tasa es inferior a la registrada en casos sin relación con la vacunación, que es de 280 casos por año (tasa: 7 casos / 1.000.000 habitantes).

6.4 ESAVI NOTIFICADOS EN RELACIÓN A LA VACUNA ANTI-INFLUENZA

En EE. UU. se administraron 46,2 millones de dosis de vacuna para influenza A H1N1 y 98,9 millones de dosis de vacuna contra influenza estacional (2009-10); las tasas de notificación de ESAVI fueron: 82 / millón con vacuna para influenza pandémica y 47 / millón con vacunas para influenza estacional; y las de acontecimientos graves fueron 4,4 y 2,9 / millón, respectivamente. Estos y otros resultados publicados indican que no existe evidencia que la administración de las vacunas para influenza pandémica represente un riesgo significativo de ESAVI.

En Argentina, el Ministerio de Salud notificó 70 casos de ESAVI en relación a la vacuna antigripal durante el año 2011, sobre un total de más de 4.000.000 de dosis aplicadas. De ellos, 6 fueron casos graves y correspondieron a: 3 casos de anafilaxia, 1 caso de mielitis transversa y 2 casos de púrpura trombocitopénica. Todos requirieron internación y se recuperaron post-tratamiento.

7. CONCLUSIÓN

La prevención de enfermedades virales se basa en dos pilares fundamentales: 1) la inmunización de la población susceptible, es decir la inducción de inmunidad activa artificial por vacunación; y 2) la educación para la salud en cuanto a las medidas de higiene.

NOTA

Las cepas recomendadas por la OMS para la vacunación durante 2011-2012 fueron idénticas a las que contenían las vacunas de

2010-2011. Esto incluía a los antígenos tipo A /California/7/2009 (H1N1), tipo A Perth/16/2009 (H3N2) y tipo B (Brisbane/60/2008).

Bibliografía

- Boletín integrado de vigilancia del Ministerio de Salud de la Nación 2011: <http://www.msal.gov.ar/index.php/home/boletín-integrado-de-vigilancia>
- CDC. Summary of 2009 Monovalent H1N1 Influenza Vaccine Data – Vaccine Adverse Event Reporting System. Disponible en: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/vaccination/>
- CDC. Seasonal Influenza Vaccine Safety: A Summary for Clinicians. Disponible en: http://origin.cdc.gov/flu/professionals/vaccination/vaccine_safety.htm
- CDC. Prevention and control of influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practice (ACIP). MMWR :agosto 26,2011/60(33):1128-1132
- FluNet: Global influenza programme :<http://www.who.in/flunet>
- Fundación FEMEBA. Gripe A (H1N1) y vacunación. Folia Doc. Suplemento Abril 2010.
- Liang XF, Wang HQ, Wang JZ, Fang HH, Wu J, Zhu FC, *et al.* "Safety and immunogenicity of 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccines in China: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial". *Lancet* 2010; 375: 56–66.
- Ministerio de Salud. Campaña Nacional de Vacunación para el Nuevo Virus de Influenza A H1N1 en Argentina. Manual del Vacunador Año 2010. Disponible en: http://municipios.msal.gov.ar/h1n1/camp_2010/manual_2010.pdf
- Ministerio de Salud de la Nación. Lineamientos Técnicos. Campaña Nacional de Vacunación 2012. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/inmunizaciones/equipos-de-salud/or_guia_lineamientos_tecnicos_gripe_2012.pdf
- MMWR 2011, agosto 26; 60 (33): 1128-32. Prevención y control de influenza con vacunas: Recomendaciones del Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización, 2011.
- MMWR, 2010, agosto 6; 59: 1-62. Prevención y control de influenza con vacunas: Recomendaciones del Comité Asesor sobre Prácticas de Inmunización, 2010.
- OMS: <http://www.who.int/influenza/surveillance>
- OMS: <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus>
- Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2009. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5808a1.htm>
- Prioridades para la incorporación de vacunas al calendario Nacional <http://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/ConsensoVacunas2011.pdf>
- Vajo Z, Tamas F, Sinka L, Jankovics I. "Safety and immunogenicity of a 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccine when administered alone or simultaneously with the seasonal influenza vaccine for the 2009–10 influenza season: a multicentre, randomised controlled trial". *Lancet* 2010; 375: 49–55.

ÍNDICE ANALÍTICO

- A**
Abacavir (ABC) 717
ACE 2 628, 629
Aciclovir 400, 402, 673, 684, 709, 710, 712
Acido siálico (como receptor del virus influenza y de rotavirus) 77, 95, 96, 112, 274, 275, 281, 284, 292, 306
ACP 207, 212, 215, 217-219, 266, 267, 299, 300, 304, 315, 316, 323, 399, 408, 412, 549, 551, 553, 584
ADAR 149, 151, 495
Adefovir 489, 490, 713, 717
Adenovirus 309, 317, 678, 745, 746
Adenoviridae 309-318
Aglutinación 54, 56-58
Aislamiento en cultivo 216, 220
Agotamiento del sistema inmune 194, 470, 510, 513, 514, 516, 546
Akodon azarae 540, 541, 548, 550
Algoritmo diagnóstico de hepatitis virales 653, 654
Alfa distroglicano (receptor para ciertos arenavirus) 95, 96, 121
Amantadina 274, 275, 284, 287, 300, 709, 710, 714
Amprenavir (APV) 717
Análisis mediante enzimas de restricción 233
Anelloviridae 536
Anticuerpos 212, 215
Anticuerpos neutralizantes 39, 70, 84, 87, 88, 100, 112, 136, 147, 159-163, 165, 183, 186, 215, 274, 278, 279, 294, 296, 298, 309, 329, 334, 336, 341, 349-352, 354, 375, 387-389, 396, 405, 406, 442, 444, 446, 448, 450, 456, 457, 465, 471, 474, 475, 479, 484, 508, 509, 538, 542, 548, 549, 552, 555, 556, 567, 597
Anti-HBc 478, 479, 653, 654, 655, 665
Anti-HBe 127, 459, 470, 471, 472, 478, 480, 481, 489, 654
Anti-HBs 456, 465, 466, 478, 479, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 499, 500, 654
Antirretrovirales 717-723
Antivirales 707, 714
Antropozoonosis 41, 532
APOBEC3G 101, 108, 109, 375
Apoptosis 90, 91, 93, 101, 170, 178
Árboles filogenéticos 295, 731, 732, 733, 736, 737, 739, 740, 743, 747
Arbovirus 41-43, 74, 83, 84, 89, 127, 205, 210, 213, 215, 217, 228, 609, 615, 619, 621, 649
Arenaviridae 538-559
Arenavirus del nuevo mundo 547
Arenavirus del viejo mundo 558
Atazanavir (ATZ) 717
Autoinmunidad 165, 496, 629, 781
AZT 717
- B**
Barreras primarias 754
Barreras secundarias 755
Bases moleculares de la virulencia viral 103-116
Bases moleculares y genéticas de la persistencia viral 116-121
Bcl-2 170, 172, 174, 197, 199-202, 517-519
BCRF-1 192, 196, 197, 198
Bioseguridad 753, 757
Bocavirus humano 762
Boceprevir 528
Branched DNA 226, 231
Bronquitis 81, 85, 261-263, 280, 295, 300, 312, 314, 332, 372, 640, 644, 646, 762, 765, 767
Bronquiolitis 77, 81, 122, 186, 261, -263, 269, 280, 295-297, 300, 304, 312, 314, 332, 640, 646, 674, 678, 714, 762, 765, 772
Buenas prácticas de laboratorio 246, 247
Bunyaviridae 561-562, 574, 577, 623-626, 679
- C**
Calendario oficial de vacunación en Argentina 699
Caliciviridae 348, 357
Calomys callosus 557
Calomys laucha 540, 550
Calomys musculinus 548
Cambios antigénicos mayores 277
Cáncer cervical 593, 595
Candid-1 547, 693, 699
Cápside (aspectos generales) 36-45, 47-50, 54, 67, 68, 81, 85, 87-89, 93, 95-99, 101, 103, 104, 112, 120, 127
CAR (receptor para virus Coxsackie y ciertos adenovirus) 47, 311
Carcinoma hepatocelular 459, 468, 472, 499
Carcinoma nasofaríngeo 102, 394, 425-428
Cardiomiopatía dilatada 342
Carga viral 239, 240, 722
Caspasas 171, 172
Cataratas 82, 325, 349, 402, 661, 662
Caveolina 95, 98
CCR2-V64I 374
CCR5 (coreceptor de HIV) 78, 79, 80, 82, 83, 84, 88, 95, 98, 122, 144, 201, 361, 362, 373-375, 385, 387, 389, 535
CCR5Δ32 138
CD4⁺ (como receptor primario del HIV) 47, 76, 78-84, 94-96, 100, 101, 106-109, 116, 136, 142, 144, 160, 193, 197, 200, 203, 239, 361, 362, 364, 371-375, 385, 387, 389, 535
CD8⁺ 165, 375, 376, 377, 549, 630, 631, 691, 697
CD5 (receptor del HCV en LB) 528
CD21 (receptor del EBV en LB) 202, 203, 423
CD46 (receptor del HHV-6 y de cepas vacunales del virus sarampión) 151, 153, 296, 306, 417, 418
CD81 (receptor del HCV) 193, 198, 203, 506, 507, 511, 517, 518
Células de Hofbauer 88
Células de Ito 437, 464, 517
Células de Küpffer 436, 437, 514, 528
Células dendríticas 138, 193, 195, 197, 546, 593, 629, 630
Células endoteliales sinusoidales 437
Células NK 86, 107, 137, 121, 140, 156, 178, 418, 511
Células NKT 78, 80, 120, 121, 136, 137, 141-145, 436-439, 445, 464, 466, 471, 511
Células permisivas 41, 45, 73, 91, 108, 120, 127, 140, 181, 217, 343, 629
Células susceptibles 59, 60, 71, 73, 88, 136, 217, 343, 352, 371, 408, 584, 708, 720
Cepa 63, 37, 138, 144, 156, 159, 160, 182, 183, 193, 206, 214, 215, 217, 219, 222, 233, 235, 241, 258, 263, 268, 273, 274, 277, 279-287, 295-298, 300, 301, 304, 306-308, 310, 314, 316, 319-324, 328-330, 332, 342-345, 350, 351, 353, 354-357, 362, 372-374, 387, 388, 397, 400, 402, 404, 407, 408, 410, 412, 414-417, 419, 420, 427, 441, 442, 445, 448, 457, 459, 470, 473, 480-484, 488, 490, 494, 496, 509, 524-526, 538, 539, 542-544, 546, 548, 549, 552-558, 560, 561, 566, 567, 571, 574-576, 578, 586, 587, 604, 605, 610, 617, 619, 620, 626, 633, 640, 641, 645, 661, 664, 665, 689, 690, 701, 703, 704, 711, 713, 718, 719, 723, 762-764, 767, 768, 771-774, 776-779, 782-784, 786
Cepa Urbani 633
Ciclosporina 669
Cidofovir 707
Cirrosis 160, 435, 459, 467, 468, 471, 472, 476-478, 480, 482, 483, 485, 489, 490, 498, 500, 502, 504, 510, 515, 517, 524, 534
Cistitis hemorrágica 660, 678
Citomegalovirus 404, 414, 669
Citoquinas 78, 83, 88, 94, 105, 107, 121, 122, 138
Citotoxicidad 135, 198, 708
Claudina (receptor para HCV) 506, 507

CMH-I 107, 140
 CMH-II 96, 138, 187, 188
 CMV 404-414
 Coilocitos 132, 223, 591-593
 Colectinas 137, 153, 167, 178, 630
 Complejo Lassa 538, 558
 Complejo Tacaribe 538, 547, 548, 558
 Complemento 84, 110, 127, 136, 137, 150-155, 161, 178, 182, 202, 203, 375, 617, 647, 694
 Condiloma acuminado 592
 Conjuntivitis 82, 209, 211, 560, 648, 725, 765
 Control de calidad en el Laboratorio de Virología 245, 246
 Conversión serológica 205, 207, 208, 212, 213, 215
 Coriorretinitis 394, 399, 402, 407, 409, 662
Coronaviridae 42, 348, 764
 Coronavirus 42, 81, 261, 263, 645
 Coronavirus asociado al SARS 627, 667
 Corpúsculos de Negri 90, 100, 223, 567, 568
 Coxsackie 3, 45, 52, 74, 75, 78, 82, 84, 85, 86, 89, 92, 95, 104, 118, 120, 122, 138, 219, 211, 215, 262, 339, 341, 342, 345, 647
 CTL 22, 140, 145, 164-167, 170, 171, 176-179, 186, 187, 194, 195, 279, 387-389, 510
 Cuantificación de virus 54, 216, 224
 Cuantificación viral 59, 633
 Cuasiespecies 43, 119, 159, 233, 236, 333, 365, 719, 723, 733, 766
 Cuerpos de Henderson-Paterson 224
 Cultivos celulares 56, 216
 CXCR4 (correceptor del HIV) 78, 79, 88, 95, 146, 197, 201, 202, 361, 362, 373, 375, 385, 535

D

DAF 151, 153
 DC-SIGN (como molécula de adhesión viral) 95, 167, 193, 362, 373, 506, 629
 Delavirdina (DLV) 717
 Dengue 110, 163, 188, 193, 194, 217, 334, 609, 610, 613, 615
 Detección del estado inmune 329
 Diagnóstico 53, 56, 205, 240
 Diarreas virales 347
 Didanosina (ddl) 717
 Diversidad del HIV 364
 Dot blot 226
 Drift antigénico 182, 276, 734

E

EBER 195, 422, 425, 426
 EBNA 102, 186, 187, 188
 Ébola 560, 562
 EBV 422, 428, 671, 685
 ECHO 345, 346
 Efavirenz (EFV) 717
 EGF (factor de crecimiento epidérmico, receptor del virus molusco contagioso) 582
 EIE 221, 241
 Electroquimioluminiscencia 222, 241
 ELISAs ópticos o de membrana 221, 268
 Emtricitabina (FTC) 717
 Encefalitis 41, 75, 84, 121, 127, 273, 280, 290, 301, 307, 313, 324, 326, 335, 341, 342, 345, 372, 388, 399, 402, 568, 569, 573, 574, 575, 576, 578, 586, 599, 617, 619, 620, 621, 662, 667, 670, 673, 674, 678, 679, 680, 681, 683, 684, 693, 695, 696, 699, 701, 704, 725
 Encefalitis equina del Este 573-575, 578, 579
 Encefalitis equina del Oeste 573-575, 578, 579
 Encefalitis equina venezolana 573, 575, 578
 Encefalitis de San Luis 75, 573, 575, 576, 578
 Encefalitis herpética 399
 Encefalitis japonesa 573-575, 578
 Encefalitis post-infecciosa 307, 324
 Encefalopatía por HIV 372, 683
 Encefalopatía por virus influenza 280, 640
 Encefalopatía por virus rubéola 280, 640
 Encefalopatías espongiiformes 603-606
 Endocitosis mediada por receptor 41, 47, 48, 92, 97, 98
 Enfermedad de Bornholm (pleurodinia o mialgia epidémica) 342
 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob 604
 Enfermedad injerto contra huésped 313, 669
 Enfermedad multicéntrica de Castleman 394, 429, 431, 432, 674

Enfermedad de Tschamer-Escherich (eritema infeccioso o megaloteritema) 85, 213, 332, 335-337
 Enfermedad mano-pie-boca 341, 342, 647, 648
 Enfermedad neonatal 342, 658
 Enfurvitida (T20) 717
 Entecavir 487, 676
 Enterotoxina NSP4 79, 104, 116, 118, 353
 Enterovirus 34, 339
 Entrada, diseminación y egreso viral del organismo 74
 Enzimas de restricción 233
 Enzimoimmunoensayos 221
 Epidemiología de las infecciones virales 253, 261, 263, 269, 282, 284, 286, 294, 295, 296, 300, 301, 303, 304, 308, 313, 316, 327, 323, 336, 345, 347, 348, 353, 354, 365, 367, 392, 402, 413, 416, 426, 429, 445, 476, 482, 497, 531, 541, 549, 560, 562, 67, 578, 584, 591, 615, 619, 623, 632, 639, 643, 648, 657, 658, 663, 726, 731, 732, 764, 766
 Epidemiología molecular 446, 459, 481, 498, 524, 533, 535, 632, 729, 739, 743, 745, 747
 Eritema infeccioso (megaloteritema) 85, 213, 332, 334-336, 647, 648
 Esteatosis 435, 514, 515
 Evasión viral a la respuesta inmune 167, 181-204, 238, 278, 396, 406, 472, 474, 505, 510, 511, 516, 630
 Evolución viral 731, 737
 Exantemas 647, 650
 Exantema súbito 416, 647, 648
 E6 (de HPV) 102, 132, 191, 193, 198, 199, 200, 590, 593, 594
 E7 (de HPV) 102, 132, 198, 199, 200, 590, 593, 594, 597

F

Factor reumatoideo 214
 Faringitis 78, 261, 262, 295, 300, 312, 372, 426, 560, 644, 646, 648, 649, 657
 Fas 107, 175
 FasL 107
 Fenómeno de von Magnus 277
 Fenómeno de interferencia viral 58
 Fenotipo virtual (de HIV) 717
 Fenotipos 719
 Fiebre amarilla 41, 74, 75, 85, 127, 135, 163, 208, 609, 617, 679, 692, 693, 699, 701, 702, 703
 Fiebre faringoconjuntival 312, 313
 Fiebre hemorrágica africana 558, 561
 Fiebre hemorrágica argentina 538, 547, 557
 Fiebre hemorrágica boliviana 557
 Fiebre hemorrágica brasileña 557
 Fiebre hemorrágica venezolana 557
 Fiebres hemorrágicas con compromiso renal 560, 562
 Fijación de complemento 213
 Filogenia 731
Filoviridae 560-562
 Filovirus 560
Fitness 508, 719
Flaviviridae 504-529, 535, 574, 576, 580, 615-622

G

Galectina-1 169, 170
 Galectina-3 169
 Galectina-9 170, 171
 Galectinas 168
 Gammaglobulina hiperinmune 485
 Ganciclovir 710-712, 714
 Gastroenteritis 79, 103, 159, 209, 210, 214, 230, 310, 312, 313, 316, 347-349, 351, 353, 354, 356, 651, 694, 725, 763, 764
 GBV-C 19, 535, 666
 Genética reversa 283, 705
 Genotipificación 230, 459, 480, 520, 721, 745
 Genotipos 43, 68, 70, 81, 102, 104, 110
 Globósido P (receptor del parvovirus B19) 88
 Glomerulonefritis 80, 127, 401, 470, 471, 518, 534, 546, 558
 GLUT-1 (transportador de glucosa 1, receptor del HTLV-I) 391
 Granzima A 177
 Granzima B 94, 140, 166, 171, 177, 195
 Granzima H 177
 Granzima K 178
 Granzima M 178
 Granzimas 122, 143, 145, 171, 176, 177
 Gripe aviar 283, 610



- H**
 HAART 385, 717
 Hantavirus 562, 747
 HAV 441, 448
 HAVCR1/TIM1 (receptor del HAV) 443
 HBe Ag 453, 480
 HBIG 500, 757
 HBs Ag 65, 66, 223, 464
 HBV 450, 490, 653, 665, 676
 HBZ 106, 107
 HCc 519
 HCoV NL63 764
 HCV 504, 528, 665
 HDV 492, 495, 501
 Hemaglutinina 54, 213, 281
Hepadnaviridae 450-491
 Hepatitis 434, 536
 Hepatitis A 36, 73, 76, 80, 85, 89, 123, 127, 158, 159, 163, 210, 213, 214, 434, 441, 653, 689, 695, 696, 699, 701, 702, 704, 725, 726
 Hepatitis B 45, 49, 53, 75, 76, 85, 86, 99, 110, 118, 120, 122, 128, 136, 158, 163, 164, 210, 213, 230, 235, 653, 662, 676, 693, 697, 699, 700, 701, 702, 704, 712
 Hepatitis C 47, 55, 75, 76, 85, 86, 100, 102, 116, 119, 125, 126, 127, 137, 160, 170, 174, 210, 216, 230, 653, 665, 676, 712
 Hepatitis crónica 459, 509
 Hepatitis D 492, 502
 Hepatitis E 76, 80, 85, 530, 532
 Hepatitis fulminante 44, 445, 448, 676, 677
 Heparan sulfato 506, 582
 Hepatocarcinoma 467
Hepeviridae 529-534
 Herpangina 341, 342
 Herpes genital 399, 400
Herpesviridae 394-432
 HEV 530, 533
 HHV-6 416, 421, 674
 HHV-7 416, 421, 674
 HHV-8 429, 432, 667
 Hibridación con sondas 225
 Histopatología 223
 HIV 7, 41, 47, 48, 55, 65, 74, 76, 78-86, 88-90, 94-101, 106-110, 120, 121, 127, 128, 136, 138, 144, 146, 153-156, 160, 162, 163, 166, 167, 169, 181-183, 185-190, 195-205, 208-211, 213-216, 222, 224, 228-233, 236, 237, 239, 240, 242, 246, 248, 249, 256, 257, 280, 306, 313, 318, 332, 334, 335, 360-389, 390, 391, 394, 404, 406, 407, 414-416, 418, 429, 430-432, 435, 459, 477, 482, 484, 490, 497, 498, 502, 509, 510, 524, 526, 528, 535, 536, 546, 552, 586, 593, 600, 601, 609, 610, 634, 647, 648, 651, 657-668, 680, 683-685, 690, 691, 694, 697, 700, 701, 703, 704, 705
 HPV 589, 597
 HSV 394, 417
 HSV-1 396, 400
 HSV-2 399
 HTLV-I 76, 81, 86, 93, 99, 102, 104, 105, 106, 131, 169, 170, 193, 198, 360, 390, 609, 666, 680
 HTLV-II 104, 390, 666
 HVEM (*herpes virus entry mediator*) 95, 396
Hydrops fetalis 334
- I**
 ICAM-1 198, 374
 ICP0 92, 93, 94, 188, 191, 220, 396, 397, 398
 ICP4 92, 94, 396, 397, 398
 ICP47 187, 188, 396, 397
 Idoxiuridina 709
 IF 212, 220
 IFN 137, 139, 187, 191
 IFN- α 139
 IFN- β 139, 187
 IFN- γ 187
 IFN- λ 147, 150
 IgM específica 212, 215
 IL-10 110, 120, 121, 138, 143, 164, 165, 169, 197, 198, 202, 279, 298, 334, 437, 438, 439, 470, 512, 513, 514, 516, 531, 546, 630, 697, 700
 IL-12 122, 139, 141, 142, 143, 148, 149, 150, 193, 306, 473, 516
 IL-15 104, 105, 141, 149, 158, 164, 202, 388, 437
 IL-17 144, 164
 IL-18 141, 142, 148, 149, 198, 438, 464
 IL-21 142, 148, 149, 164, 165
 IL-28B 147, 528
 Indinavir (IDV) 717
 Infección aguda 127, 139, 157, 208, 224, 225, 295, 306, 307, 317, 334-336, 342, 344, 371, 374, 375, 395-398, 401, 405, 412, 424, 427, 447, 466, 468, 471, 478-481, 495, 498, 499, 504, 510, 512, 513, 516, 519, 523, 528, 533, 534, 547, 558, 573, 617, 647, 653, 654, 666, 680, 739, 765, 767
 Infección crónica 77, 110, 117, 119, 121, 128, 202, 391, 394, 395, 404, 405, 416, 427, 439, 452, 463, 465, 467, 470-473, 476, 480, 482, 485, 486, 489, 495, 498-502, 504, 509, 510, 512-514, 516, 523, 528, 589, 623, 647, 654, 680, 707, 712, 713
 Infección latente 77, 78, 91, 93, 94, 128, 137, 146, 167, 224, 315, 384, 395, 401, 405, 407, 420, 425, 426, 464, 496, 590, 660, 674
 Infección lenta 77, 89
 Infección persistente 127-138, 183, 192, 194, 307, 312, 315, 326, 334, 335, 337, 387, 404, 418, 423, 427, 441, 466, 470, 471, 478, 479, 481, 487, 497, 512, 513, 516, 518, 539, 546, 547, 558, 562, 590, 594, 595, 599, 647, 654, 655, 659, 763
 Infecciones oculares 312, 342
 Infecciones respiratorias 261, 639, 643, 761, 768
 Infecciones respiratorias en Pediatría 639, 641
 Influenza 273, 286, 771, 777
 Influenza pandémica H1N1 35, 111, 115-118, 127, 771-777, 782-785
 Inhibición de la hemaglutinación (IHA) 54, 59, 207, 215, 280-282, 316, 317, 328, 574, 599
 Inhibición de la presentación antigénica 182, 188
 Inmunidad adaptativa 136, 164, 444, 689, 705
 Inmunidad humoral 158, 695
 Inmunidad pasiva 689
 Immunoblot 224
 Inmunoensayos 220
 Inmunomodulador 487, 694
 Inmunoperoxidasa 223
 Insomnio familiar fatal 604
 Insulino-resistencia 514-516
 Integrinas 47, 95, 96, 98, 153, 311, 334
 Interferencia 58, 90
 Interferón 147, 487, 489, 712
 IPS 139, 510, 511
 IPV 344-346, 699
 IRES 117, 120, 195, 340, 441, 442, 505, 506, 511, 762
 IRF3 188, 191, 277, 398, 421
 IRF7 191
- J**
 JAK-STAT 120, 147, 148, 150, 152, 187-189, 193, 194, 196, 511, 512, 516
 Junín 538, 547
- K**
 Kuru 604
- L**
 Lamivudina (3TC) 710, 717, 721
 Laringitis 261, 262, 640
 Latencia 94, 396, 398, 401, 416, 424, 429
 LATs 91, 93, 94, 186, 397
 LCM 558
 LDLr (receptor de LDL y para el HCV) 506, 507
 Leucoencefalopatía multifocal progresiva 128, 372, 599, 601, 659, 677, 683, 684
 Leucopenia 419, 550, 553, 554, 616, 620, 631, 670
 LIA 216, 519, 655
 Linfoma B 102, 144, 172
 Linfoma de Burkitt 101, 102, 394, 422, 425, 426, 680
 Linfoma de Hodgkin 102, 169, 418, 425, 428, 680
 Linfoma inmunoblástico 425
 Linfoma no Hodgkin 518
 Linfoma primario de efusión 394, 426, 429, 431, 674
 Linfoma T 93, 390, 391, 425
 Linfopenia 306, 334, 620, 631
 Lopinavir/r (LPV) 717
 L-SIGN (como molécula de adhesión viral) 95, 506, 629, 631
 LT 138, 192, 691
 LT CD4⁺ 164, 371, 373
 LT CD8⁺ 109, 164, 464

M

Macropinocitosis 47, 98
 Manchas de Köplik 307
 Maraviroc (MVC) 717
 Mecanismos de defensa antiviral 135-180, 278
 Mecanismos de evasión a la respuesta inmune 167, 181-204, 238, 278
 Mecanismos directos de daño celular 90, 91, 100-123, 200, 689
 Mecanismos indirectos de daño celular 121-127, 200, 468, 555, 689
 Meningitis 84, 209, 575, 679
 Meningo-encefalitis 620, 675, 680
 Metapneumovirus humano 303, 646
 Métodos directos 216, 239
 Método de Reed y Muench 60, 215
 Métodos indirectos 212, 215
 Microdisposiciones de DNA 237
 Microcefalia 88, 326
 Microscopia electrónica 224
 Miocarditis 88, 89, 120, 122, 211, 280, 310, 313, 326, 335, 339, 341, 342, 345, 551, 558, 644, 695
 Miosisitis 85, 280, 391, 644
 Mononucleosis infecciosa 213, 224, 372, 394, 404, 406, 407, 422, 424, 426, 427, 648, 680
 miRNA 155, 397
 Muestras para virus respiratorios 263
Mus musculus 540, 541
 Mutante 60, 63, 65-68, 70, 110, 119, 140, 159, 182, 183, 186, 233, 236, 255, 256, 387, 419, 442, 453, 455, 457, 471, 472, 474, 475, 479, 482, 484, 485, 487, 489, 490, 496, 508-510, 689, 692, 693, 699, 711, 713, 722
 Mx 149, 151, 152, 512

N

NA 54, 273, 277
 NASBA 226
 Nectina-1 (receptor del HSV-1 y HSV-2) 95
 Nectina-4 (receptor del virus sarampión) 293, 308
 Nef 100, 101, 106-109, 187, 188, 198, 200-203, 360-363
 Nefritis intersticial 600, 659
 Nefropatía 600, 677
 Nested PCR 226, 227
 Nelfinavir (NFV) 717
 Neumonía 77, 81, 85, 118, 120, 122, 127, 261-263, 269, 280, 281, 283-286, 294-297, 300, 303, 305, 307-309, 312, 314, 320, 332, 360, 368, 401, 402, 421, 550, 551, 583, 625, 627, 632, 635, 640, 643, 644, 646, 648, 658, 662, 670, 674-676, 678, 702, 711, 746
 Neumonitis 85, 100, 262, 278, 307, 372, 391, 394, 404, 406, 418, 558, 599, 600, 625, 646, 658, 670, 672, 673
 Neuraminidasa 54, 275
 Neutralización 217
 Nevirapina (NVP) 717
 Norovirus 74, 76, 79, 209, 210, 224, 230, 347-350, 356, 357
 Northern blot 226
 Nucleoide 36-38
 Nucleocápside (aspectos generales) 38-41, 47, 67-68, 98, 112, 120, 124, 127
 Nucleoproteína 36, 273
 Nucleotina (receptor del virus sincicial respiratorio) 299
 Nuevos coronavirus 764
 Nuevos poliomavirus 765

O

OAS 117, 149, 151, 152, 189, 190, 196, 511, 512
 Oncogénesis 101, 102, 131-133, 430, 479, 594
 Oncogenes 69, 102, 105, 128, 132, 326, 390, 478, 518, 593, 594
 OPV 699, 702
Orthomyxoviridae 273-288, 771-785
 Orthomyxovirus 273
 Oseltamivir 714

P

P53 68, 102, 104, 106, 132, 171, 199-201, 315
 P56 149, 151
 Pandemias 283, 367, 681, 771
 Panencefalitis esclerosante subaguda 118, 307
 Papilomatosis laríngea 591, 592
Papillomaviridae 589-598
 Papilomavirus humano 589, 597
 Parainfluenza 290, 300, 646
Paramyxoviridae 290-308

Paramyxovirus 290, 308
 Parechovirus 339
 Parotiditis 56, 74, 75, 84-86, 89, 121, 127, 135, 261, 262, 290-293, 300, 301, 330, 435, 679, 692, 693, 701
 Partículas defectivas 41
 Partículas subvirales 451, 475, 483
 PARV4 764
Parvoviridae 331-337, 761-764
 Parvovirus B19 331, 336, 666, 678
 Patogénesis 73, 128
 Patogenicidad 56, 61, 65, 73, 84, 102, 106, 112, 114, 127, 135, 212, 255, 256, 276, 277, 283, 285, 286, 332, 347, 349, 495, 536, 538, 540, 553, 558, 561, 566, 567, 573, 587, 610, 619, 623, 666, 667, 674, 694, 698, 761, 771, 772
 PCR a tiempo real 231
 Persistencia viral 102, 127, 466, 538
Picobirnaviridae 348, 651
Picornaviridae 339-346, 441-449, 765-768
 Pirosecuenciación 235
 Plasma inmune de convaleciente 550
 Pleconaril 344
 Pleurodinia 341, 342
 Polio 341, 345
 Polioma 131, 132
 Poliomavirus 599, 601
 Poliomieltis 35, 36, 41, 42, 73, 79, 135, 158, 159, 182, 340, 342, 344, 346, 569, 580, 599, 689, 692, 695, 698, 699
Polyomaviridae 599-601, 765
Poxviridae 581-588
 Poxvirus 581, 587
 PRb 102, 132, 172, 199-201, 631
 Precauciones universales 751, 755, 756
 pre-core 110, 450-456, 459, 460, 463, 471-474, 480-482
 Preemptive therapy 670, 671
 pre-S1 450, 451, 453, 454, 456, 459, 460, 464, 465, 470, 475, 495
 pre-S2 192, 450, 451, 453, 454, 456, 460, 464, 465, 470, 475-478, 484, 495
 Presión de selección 63, 88, 111, 117, 183, 351, 382, 451, 456, 508, 509, 516
 Priones 603-605
 Profilaxis activa 449, 475, 483, 634
 Profilaxis pasiva 160, 297, 449, 486, 501, 502, 634
 Protámeros 39
 Provirus 41, 49, 69, 76, 93, 101, 131, 136, 364, 372, 387, 390, 722
 PrP 603-605

Q

Queratitis 82, 120, 122, 205, 211, 401, 586, 709, 710
 Quimioluminiscencia 222, 231, 241, 244, 248, 378
 Quimioquinas 78, 88, 98, 107, 122, 138, 142, 143, 145, 146, 152, 166, 168, 193, 198, 296, 362, 372-375, 421, 464, 468, 535, 630, 631, 700, 703

R

R5X4 373
 Rabia 565
 Radioinmunoensayo 213, 221, 331, 478
 Raltegravir (RAL) 717
 RANTES 88, 142, 145, 146, 149, 166, 193, 198, 295, 296, 373, 374, 398, 535, 630, 762
 Reasociación de segmentos genómicos 65
 Reassortment 63, 65, 66, 67, 69
 Receptor I de transferrina (receptor de ciertos arenavirus, patógenos humanos) 96
 Receptor de asialoglicoproteínas y glicosaminoglicanos (receptor del HCV) 506
 Recombinación 63, 65-67, 69-71, 101, 137, 181, 182, 184, 185, 277, 365, 442, 459, 476, 494, 587, 610, 703, 704, 718-720, 731, 733-735, 745, 747, 749, 761
 Registro de hepatitis virales en Argentina 439
Reoviridae 348-356, 574
 Replicación viral 132, 137, 138, 140, 146, 147, 150, 151, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 163, 178, 186-188, 190, 202, 224, 238, 276-279, 281, 295, 306, 309, 311, 318, 334, 341, 344, 347-354, 360, 362, 364, 365, 371, 372, 374, 375, 377, 380, 382, 387, 388, 390, 394, 395, 397, 398, 404, 405, 412, 417, 423, 424, 428, 444, 453, 457, 463-465, 467, 470, 472, 475-477, 480-482, 489, 490, 494, 495, 497, 499, 500, 505-508, 510, 512-514, 516, 523, 531, 542, 543, 553, 571, 583, 587, 615, 617, 619, 621, 623, 628, 629, 631, 634, 767
 Reservorio 94, 128, 187, 192, 286, 340, 345, 387, 405, 413, 424, 430, 437, 445, 482, 498, 520, 523, 524, 532, 538-541, 546, 547, 550, 552, 554, 557, 558, 561, 562, 566-568, 600, 610, 624, 625, 632, 643, 713, 736, 749
 Resistencia antiviral 233, 284, 711

- Responsabilidad médica 240
 Respuesta Th1 140, 141, 170, 192, 193, 203, 439, 472, 501, 694, 700, 705
 Respuesta Th2 144, 165, 170, 192, 193, 197, 298
 Respuesta virológica rápida 528
 Respuesta virológica sostenida 528
 Respuesta virológica temprana 528
Retroviridae 359-392
 Retrovirus 361, 397
 Rev 101, 106-108, 360-362, 364
 Reversión a la virulencia 105, 695, 698, 701, 703
 Rex 104, 107, 390
 RFLP 55, 71, 207, 233, 235, 316, 426, 481, 482, 520, 522, 525, 595, 596
Rhabdoviridae 565-571, 575, 578
 RIA 221, 241, 331, 332, 478, 487, 504
 RIBA 55, 210, 216, 249, 519, 520, 655
 Ribavirina 297, 304, 317, 502, 515, 522, 528, 552, 553, 554, 557, 558, 562, 584, 621, 625, 634, 646, 660, 675, 676, 677, 678, 710, 713, 714, 756
 RIG 112, 115, 117, 139, 444, 505, 510, 511, 529
 Rimantadina 709, 710, 713
 Rinitis 261, 295, 300, 332, 643, 784
 Rinovirus 58, 83, 96, 103, 182, 261, 263, 266, 270, 271, 339, 344, 388, 441, 639, 640, 757, 759, 761-765
 RISC 117, 152, 155, 156, 178, 714
 Ritonavir (RTV) 717
 RNAdc 139, 141, 149, 152, 188, 189, 191, 195
 RNA dependiente 39, 49, 274, 291, 339, 390, 530, 548, 565, 694, 747
 RNAPg 450, 451, 453, 455, 457, 460-464, 468, 475
 RNA polimerasa 49, 65, 106, 117, 155, 159, 229, 231, 274, 276, 277, 291, 339, 364, 390, 397, 442, 443, 451, 463, 494, 495, 497, 505, 508, 530, 542, 544-546, 548, 582, 623, 694, 713, 736, 747
 RNA polimerasa-RNA dependiente 274, 291, 339, 530, 548
 RNAsa H 152, 227, 229, 231, 362, 454, 457, 463
 RNAsa L 115, 117, 149, 189, 190, 195, 511, 512
 Roséola infantum 416
 Rotavirus 348, 356
 RSV 69, 77, 78, 81, 82, 120, 122, 144, 182, 186, 188, 191, 193, 204, 222, 269, 290-299, 303-305, 639, 640, 646, 674, 675, 710, 714, 739-744, 758
 RT-PCR 228, 230
 Rubéola 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330
 Rubéola congénita 124, 127, 325-329, 663, 664
- S**
 Sapovirus 79, 347
 Saquinavir (SQV) 717
 Sarampión 307, 309
 Sarcoma de Kaposi 80, 94, 102, 106, 144, 188, 372, 394, 429-432, 667, 674, 680
 Sarcoma de Rous 69, 131
 SARS 98, 212, 230, 261, 263, 270, 435, 610, 611, 627-635, 643, 667, 703, 707, 757, 760
 SARS-CoV 435, 627-635
 Screening prenatal 661
 SDF-1 145, 373, 374, 376, 535
 Secuenciación nucleotídica 207, 233, 235, 236, 343, 360, 448, 459, 481, 482, 520, 522, 626, 721
 SEN-V 667
 Serorreversión 163, 225, 385, 513, 519
 S HBs Ag 450, 452-454
 Shell vial 219, 266, 299, 402, 408-410, 412, 420, 678
 Shift 66, 181, 182, 277, 697, 734, 767
 Shift antigénico 111, 181, 182
 SIDA 81, 106, 110, 138, 146, 195, 230, 239, 296, 313, 360, 365, 367-372, 374, 375, 383, 384, 386, 387, 389, 404, 406, 407, 410, 411, 414, 416, 419, 425, 426, 428, 430, 432, 586, 587, 601, 649, 666, 680, 683-685, 697, 700, 701, 705, 707, 711, 714, 723, 736, 751, 754-756, 760, 767
 Síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker 604
 Síndrome de guantes y medias 355
 Síndrome de Guillain-Barré 280, 534, 679, 680
 Síndrome mononucleosiforme 418, 672
 Síndrome post-polio 341
 Síndrome pulmonar por hantavirus 120, 560, 562, 623
 siRNA 136, 137, 152, 155, 297, 714
 Sistema de notificación obligatoria 319, 320, 773
 SLAM (receptor de cepas salvajes del virus sarampión) 193, 292, 306, 307
 Slot blot 55, 225-227
 Smac/DIABLO 174, 176, 177
 Sobre-expresión de receptores para Fc 182, 202, 203
 Southern blot 55, 225-227, 230, 269, 522
 SPH 623-626, 747, 749
 SR-B1 (scavenger receptor B1; receptor para HCV) 506, 507
 Stavudina (d4T) 717
 Subversión viral 204
 Superantígenos 182, 195, 197
- T**
 Tacrolimus 600, 669, 677
 TAPs 187, 188
 Tasa de ataque secundaria 256, 257, 645, 762
 Tasa de incidencia 257
 Tat 101, 106-108, 146, 189, 200-202, 360-362, 364
 Tax 93, 104-107, 169, 390
 TCPH alogénico 669, 670, 674, 677
 Técnica moleculares 224, 239
 Telaprevir 528
 Telbivudina 489, 490
 Tenofovir (TDF) 717
 TFG β 104-107, 156, 437, 439
 Th1 120-122, 140-146, 164-166, 169, 170, 177, 192, 193, 203, 438, 439, 468, 472, 501, 512, 514, 531, 630, 694, 700, 705, 763
 Th2 120-122, 140, 142-144, 164, 165, 169, 170, 192, 193, 197, 203, 298, 438, 468, 472, 514, 531, 630, 703
 Th3 164, 165, 167, 439
 Th17 142, 143, 164, 165, 169, 170
 Tipos de HPV de alto riesgo 591
 TLR 122, 136, 139-142, 145, 150, 154-156, 193, 297, 298, 444, 511, 516, 528, 705
 TLR-2 140, 695, 700
 TLR-3 139-141, 150, 444, 511, 700
 TLR-4 140, 141, 154, 193, 297
 TLR-7 139, 140, 464, 700, 705
 TLR-8 140, 141, 700, 705
 TLR-9 139-141, 516, 700
 TMA 208, 211, 228, 229, 231, 234, 239, 482, 519, 520, 522, 523
 TNF- α 77, 88, 94, 107, 110, 111, 120-122, 140-144, 146, 149, 154, 165-167, 169, 171, 175, 177, 178, 193, 195, 335, 438, 465, 468, 473, 515-517, 551
Togaviridae 323-330, 574-575
 Tolerancia inmune 118, 164, 428, 439, 469, 471, 472, 496, 497, 546, 558
 Torovirus 79, 210, 348, 651
 Tr1 164, 165, 167, 169, 439, 514, 516
 TRADD 177, 199, 200, 517
 Transcriptasa inversa 42, 49, 64, 65, 70, 101, 104, 106, 107, 182, 183, 227, 229, 231, 360, 362, 365, 450, 452, 454, 457, 461, 482, 489, 490, 495, 509, 717
 Transformación celular 126, 131, 200, 428, 457, 475, 479, 517, 590, 594
 Transmisión fecal-oral 89, 435, 446
 Transmisión perinatal 137, 384, 497, 662
 Transporte de muestras 212, 247, 265, 266
 Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas 406, 646, 657
 Treg 140, 142, 143, 164, 165, 167, 177, 437, 439, 514, 528
 Trombocitopenia / plaquetopenia 86, 334, 336, 407, 409, 550, 553, 554, 560, 616, 617, 631, 749
 Tropismo 39, 42, 47, 65, 73, 74, 79, 88, 95, 96, 98, 102, 111, 112, 117, 118, 121, 127, 128, 144, 157, 230, 285, 312, 340, 353, 362, 373, 374, 395, 416, 418, 422, 441, 454, 493, 506, 535, 553, 554, 567, 579, 589, 590, 600, 619, 628, 653, 674, 677, 689, 707, 722, 723
 T-tropicas 373, 374
 TTV 535, 536, 667
- U**
 UFP 59, 60, 323, 551, 691
 Unidades centinela 285, 439
- V**
 Vacuna 689-705
 Vacuna Fuenzalida-Palacios 693, 696
 Vacuna Sabin 105, 701
 Vacuna Salk 344, 696, 698
 Vacunas a virus inactivado 300, 448, 634, 689, 694-697, 700
 Vacuna Triple Viral 330, 664
 Valaciclovir 400, 402, 658, 671, 673, 684, 710
 Valganciclovir 670, 671, 710, 711
 Variabilidad del HIV 388, 718, 722, 723
 Variabilidad genética 304, 307, 309, 310, 365, 387, 442, 723, 742, 745
 Variabilidad genética y antigénica 442

Variación antigénica 69, 70, 181, 182, 277, 278, 285, 569, 734, 739
Variante 63, 66, 67, 69, 70, 81, 82, 88, 96, 104, 106, 110, 138, 144, 163, 181, 262, 274, 277, 281, 282, 284, 285, 310, 316, 319, 331, 332, 341, 343, 349, 350, 352, 365, 373, 374, 385, 387, 416-419, 426-429, 432, 442, 448, 457, 472-475, 477, 480-482, 489, 490, 500, 508, 516, 519, 520, 522, 538, 541, 546, 559, 567, 568, 574, 575, 590, 603-605, 619, 666, 689, 694, 711-713, 719, 720, 722, 723
Variante de Creutzfeldt-Jakob 604
Varicela 401, 403
Varicela zóster 401, 403
Verrugas genitales 589, 597, 658, 659
Vías de diseminación viral en el organismo 74, 82-88
Vif 100, 101, 106, 109, 361, 362, 364
Vigilancia epidemiológica 35, 205, 257, 258, 282, 284, 287, 308, 319, 321, 368, 571, 611, 697, 726, 727, 746, 768, 771, 773, 777
Vigilancia virológica 258, 285, 597
Viremia 43, 74, 76, 77, 80, 82-85, 158, 159, 163, 181, 208, 224, 261, 262, 290, 301, 306, 324, 325, 330, 334-336, 340, 341, 371, 372, 375, 380, 381, 387, 401, 407, 408, 409, 411, 434, 443, 447, 448, 464, 473, 482, 512, 513, 516, 519, 520, 523, 524, 528, 531, 532, 536, 551-555, 573, 576, 577, 579, 583, 586, 601, 616, 617, 619, 621, 647, 661, 666, 667, 672, 674, 677, 696, 698, 703, 713, 761, 763, 764
Viremia primaria (concepto) 74, 84
Viremia secundaria (concepto) 74, 84
Virión 43
Viroide 43
Viroporina 100, 505
Viroquina 191
Viroreceptor 189, 192
Viruela 583-586
Virulencia 56, 91, 92, 94, 103-105, 107, 110-112, 114, 115, 117, 127, 135, 212, 274, 276, 287, 314, 339, 340, 344, 348, 364, 548, 553-555, 557, 576, 583, 590, 615, 620, 629, 631, 661, 694, 695, 698, 699, 701, 703, 714, 731, 734, 736, 771
Virus Andes 561, 562, 624, 747
Virus BK 85, 209, 229, 599-601, 609, 659, 660, 677
Virus Calchaquí 578
Virus Chapare 538, 557
Virus Cocal 578
Virus coriomeningitis linfocitaria 162
Virus del Oeste del Nilo 75, 621, 667
Virus parotiditis 290, 292, 301
Virus Ébola 83, 188, 560, 561, 679
Virus Epstein-Barr 75, 76, 78, 86, 94, 103, 121, 131, 142, 181, 208, 210, 211, 214, 224, 228, 394, 395, 422, 428-431, 435
Virus emergentes 258, 560, 609-611, 666, 731, 737, 757
Virus Guanarito 538, 557, 561
Virus Hantaan 76, 560-562, 624-626
Virus hepatitis A 36, 73, 76, 85, 89, 123, 127, 158, 159, 163, 210, 213, 214, 222, 242, 248, 339, 347, 434, 441-449, 484, 653-655, 666, 680, 689, 695, 696, 699, 701, 702, 704, 725, 726
Virus hepatitis B 29, 45, 76, 86, 99, 118, 125, 126, 128, 132, 136, 181, 208, 221, 223, 225, 227, 228, 235, 435, 450-492, 501, 510, 664, 694, 700
Virus hepatitis C 35, 36, 43, 75, 76, 86, 95, 100, 102, 104, 116, 117, 120, 137, 144, 160, 170, 172-174, 439, 504-529, 609, 653-655, 662, 663, 665, 672, 677, 700, 703, 713, 732, 733
Virus hepatitis D 92-503, 694
Virus hepatitis E 436, 530, 534
Virus Ilhéus 574, 576, 578, 579
Virus JC 599, 600, 601, 659, 660, 677, 684
Virus Junín 538-558
Virus Lassa 558
Virus Machupo 547
Virus Marburg 43, 212, 560, 561, 609, 610, 679
Virus Mayaro 574, 575, 578
Virus Nipah 169, 188, 290, 293
Virus Oropuche 577-579, 609
Virus papiloma humano 589-598
Virus parainfluenza 300, 646
Virus parotiditis 56, 74, 84-86, 89, 121, 163, 193, 194, 209, 210, 215, 222, 257, 261, 290-293, 301, 330, 692, 693, 701
Virus Puumala 561-562, 624, 626
Virus recombinantes 71, 233, 283, 571, 587, 703, 720, 690
Virus respiratorios 222, 232
Virus Sabiá 538, 558
Virus satélite 493
Virus Seoul 561-562, 624, 626

Virus Sin Nombre 120, 122, 561, 562, 624, 625, 748
Virus sincicial respiratorio 294, 299
Virus Tacaribe 538, 539, 542, 543, 547, 548, 553, 555
Virus transmitidos por artrópodos 573
Virus vacunal Sabin derivado 345
Virus Whitewater Arroyo 538, 544
VLP 534, 597
Vpr 100, 101, 200, 202, 360, 362, 364
Vpu 100, 101, 106, 108, 200, 201, 203
Vpx 101, 106
VP16 (o alfa TIF) 91, 93, 94

W

Western blot 597, 87, 215, 216, 378, 379, 383, 385, 392, 432, 533, 605, 14, 55, 215, 378, 380, 544, 584
West Nile virus 621, 667, 668

Z

Zalcitabina (ddC) 717
Zanamivir 284, 640, 645, 675, 714, 768, 773, 640, 710, 773
Zhangfei 91, 94
Zidovudina (AZT) 717
Zóster generalizado atípico 673