

Preparación de laboratorio para el diagnóstico de enfermedad por virus Ébola en Argentina

El virus Ébola fue identificado en 1976 a partir de un brote de una enfermedad febril y hemorrágica grave en Zaire, actual República Democrática del Congo¹. El virus fue clasificado por la ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) como perteneciente al género *Ebolavirus* dentro de la familia *Filoviridae* (Orden Mononegavirales). Dentro de la misma familia, el género *Marburgvirus* comprende al virus Marburg, descrito en 1967 a raíz de brotes de una enfermedad similar en personal de laboratorio en Europa por manipulación de monos africanos para la obtención de líneas celulares.

A nivel taxonómico ambos virus fueron incluidos en la misma familia, *Filoviridae*, por varias características en común: genoma a ARN-simple cadena, con orientación negativa, no segmentado y de gran longitud: 19kb. Además las partículas virales son envueltas, filamentosas e infectan mamíferos causando enfermedades hemorrágicas graves en primates. Actualmente, dentro del género *Ebolavirus* se agrupan 5 especies virales: *Zaire ebolavirus* (ZEBOV), *Sudán ebolavirus* (SUDV), *Tai Forest ebolavirus* (TAFV), *Bundibugyo ebolavirus* (BDBV) y *Reston ebolavirus*. Tres de estas especies, ZEBOV, SUDV y BDBV, han estado implicadas en grandes brotes de enfermedad por virus Ébola (EVE) en varios países de África Central: República Democrática del Congo, Sudán, Gabón, República del Congo y Uganda. La especie TAFV fue descrita en un único caso humano comunicado en Tai Forest, Costa de Marfil, fuera del área endémica del virus Ébola. Sin embargo, este fue el primer indicio de la presencia de virus Ébola en África occidental.

La EVE comienza con un cuadro febril indiferenciado, por lo cual deben ser considerados casos sospechosos aquellos pacientes febriles en fase aguda y con antecedentes epidemiológicos como, por ejemplo, historia de viaje reciente a un área endémica o contacto con casos confirmados o sus muestras. La elevada letalidad de la EVE, cerca del 90% en algunos brotes², como también su alta infectividad, han llevado a la clasificación de los filovirus como agentes Categoría A, con potencial para bioterrorismo según el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que el manejo de muestras de pacientes con sospecha de EVE para su diagnóstico de laboratorio se realice dentro de instalaciones de contención biológica nivel 3 (BSL-3). El aislamiento viral no se

recomienda y solo puede llevarse a cabo en laboratorios con un nivel 4 de bioseguridad (BSL-4).

El 23 de marzo de 2014 la OMS publicó su primer comunicado de alerta acerca de un nuevo brote por virus Ébola en África Occidental. El 8 de agosto declaró que la epidemia de Ébola en África Occidental constituía una emergencia de salud pública de importancia internacional. El brote, cuyo origen se remonta a los primeros días de diciembre de 2013 en Guinea³, constituye el mayor ocurrido desde el descubrimiento del virus Ébola y representa la primera transmisión de la enfermedad en grandes zonas urbanas. En respuesta a la declaración de la OMS de principios de agosto, la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación publicó un Alerta Epidemiológico para la preparación de Argentina ante la potencial recepción de casos de EVE. A partir del mismo, en el Servicio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), se diseñó una estrategia de diagnóstico de virus Ébola a nivel local.

El diagnóstico de laboratorio puede ser realizado por determinación de la respuesta inmune a la infección o por detección de partículas virales o componentes de las mismas en individuos infectados. Los ensayos más utilizados para diagnosticar una infección aguda son la RT-PCR y la captura de antígeno por ELISA⁴. El ARN viral puede ser detectado en sangre desde el día 3 hasta aproximadamente el día 16 luego del inicio de los síntomas⁵.

El diseño del diagnóstico en Argentina se basó en la detección de genoma viral en muestras de sangre. El primer paso, la inactivación de la muestra con isotiocianato de guanidina, desnaturaliza las proteínas del virus tornándolo no-infeccioso. Posteriormente las muestras pueden ser sometidas al procedimiento de extracción y purificación del ARN. Para la amplificación del ARN viral se implementaron 2 abordajes: RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real. En base al genoma de los filovirus y en particular de la especie causante del brote en África Occidental, ZEBOV, para la RT-PCR convencional se seleccionaron 3 fragmentos parciales correspondientes a 3 genes diferentes: nucleoproteína (NP), proteína de matriz (VP24) y ARN polimerasa-ARN dependiente (L). El fragmento NP fue seleccionado porque su ARN mensajero es el ARN viral más abundante en las células infectadas; el VP24 por ser un gen con poca variabilidad dentro de la misma especie viral y el L por ser un fragmento ampliamente utilizado para la identificación de Filovirus en brotes de fiebres hemorrágicas graves en África. Para la RT-PCR en tiempo real con sondas TaqMan se seleccionó el mismo fragmento del gen L. En base a secuencias

virales obtenidas de casos de Sierra Leona reportados en 2014 y de sondas previamente publicadas para la detección ZEBOV se diseñó una nueva sonda específica para la cepa causante del brote actual⁶.

Ambos ensayos se pusieron a prueba utilizando como material de referencia ARN viral de ZEBOV enviado por el CDC y muestras de ARN de pacientes en fase aguda de otras infecciones virales obteniendo resultados positivos únicamente para el ARN de ZEBOV. La secuenciación nucleotídica de los fragmentos obtenidos y su comparación con secuencias publicadas en *GeneBank* permitieron confirmar la máxima identidad nucleotídica (99%) del ARN de ZEBOV con la cepa Gabón 2002 (*GeneBank* KC242800) y establecer los porcentajes de identidad con la cepa de África Occidental (*GeneBank* KM034557) correspondientes a los 3 fragmentos (NP: 98%; VP24: 97% y L: 98%) y con el virus Marburg en el caso del fragmento L (77%).

Esta estrategia diagnóstica permitirá realizar la confirmación de laboratorio en casos con sospecha de EVE del brote actual como así también identificar en el futuro posibles casos de infección por otros filovirus. La detección temprana de posibles casos infectados con filovirus es fundamental para evitar su propagación en la población local.

Agradecimientos: A Viviana Molina, Mónica Tous, Elsa Baumeister, María Cecilia Freire y Adrián Lewis, quienes integran el Comité de Emergencia por virus Ébola del INEI. A Pierre Rollin y César Albariño, del *Viral Special Pathogen Branch*, CDC, por el envío del ARN control.

Valeria P. Martínez, Carla M. Bellomo,
Ayelén A. Iglesias

Servicio Biología Molecular, Departamento Virología,
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-
ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina
e-mail: pmartinez@anlis.gov.ar

1. Pattyn S, van der Groen G, Courteille G, Jacob W, Piot P. Isolation of Marburg-like virus from a case of haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* 1977; 12; 1:573-4.
2. World Health Organization. Ebola virus disease. Fact sheet N°103. Updated September 2014. En: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/>; consultado el 20/10/2014.
3. Baize S, Pannetier D, Oestereich L, et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med* 2014; 371:1418-25.
4. Feldmann H & Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet* 2011; 377:849-62.
5. Towner JS, Rollin PE, Bausch DG, et al. Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. *J Virol* 2004; 78:4330-41.
6. Gire SK, Goba A, Andersen KG, et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 2014; 345:1369-72.

Anticuerpos anti PF4/heparina por inmunoturbidimetría en el diagnóstico de trombocitopenia inducida por heparina

Las heparinas son anticoagulantes frecuentemente utilizados en la profilaxis y tratamiento de trombosis. La trombocitopenia inducida por heparina (HIT) es una reacción adversa de origen inmunológico en las terapias con heparina no fraccionada (UFH) o de bajo peso molecular, en la que se producen anticuerpos contra el complejo formado entre la heparina y el factor plaquetario 4 (PF4). Ésta se transforma en un problema médico frecuente debido a la cantidad de pacientes que reciben la droga. La HIT se asocia a trombocitopenia, en general moderada y, con menor frecuencia, a complicaciones trombóticas muy mórbidas. Una serie de factores relacionados con las características de las heparinas y de los pacientes se postulan como responsables del desarrollo de anticuerpos anti-PF4/HEP, trombocitopenia y trombosis¹. La HIT es considerada una entidad clinicopatológica en donde la sospecha clínica puede ser evaluada a través de un índice clínico, el índice de las 4T (*4T Score*) y la confirmación diagnóstica se debe realizar a través del laboratorio².

La detección de anticuerpos por métodos de ELISA es muy sensible pero poco específica para los anticuerpos patogénicos de la HIT, además de requerir más de 2 horas de procesamiento. Existe una tasa de seroconversión elevada, pero los títulos bajos se presentan frecuentemente sin manifestaciones clínicas, lo que provoca ciertas dudas diagnósticas. Es por ello que solo los títulos altos, correspondientes a absorbancias mayores a 1000, y preferentemente observados en ensayos que detecten el isotipo IgG, son considerados patogénicos para el diagnóstico de HIT. Por otro lado, los ensayos funcionales, que son menos sensibles pero más específicos, están poco disponibles^{1,3}. Todo esto dificulta la decisión de suspender la terapia con heparina y reemplazarla por terapéuticas anticoagulantes alternativas. En un estudio realizado en nuestro país, hemos demostrado que los títulos altos de anticuerpos anti-PF4/HEP medidos por un ELISA, correlacionaban claramente con un índice 4T de alta probabilidad (≥ 6) y eran más frecuentes en los pacientes que habían desarrollado trombosis⁴.

Una prueba inmunológica negativa obtenida en tiempo real, a través de un ensayo rápido, en un paciente con probabilidad baja o intermedia medida a través del índice 4T, presenta un alto valor predictivo negativo, evitando la suspensión de la heparina y el cambio de estrategia antitrombótica. Se ha desarrollado un ensayo inmunoturbidimétrico⁵ competitivo, de rápida realización, en el que las partículas de látex están recubiertas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el complejo PF4/HEP, e imitan a los anticuerpos que se encuentran en la HIT. Cuando

estas partículas se ponen en contacto con una solución con complejos formados por PF4 de plaquetas humanas y polovinilsulfonato (polímero de carga negativa que forma complejos macromoleculares con el PF4) y la muestra del paciente, se produce una reacción de aglutinación competitiva. El grado de aglutinación es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-PF4/HEP presentes en la muestra y es determinado a través de la medida de disminución de la luz transmitida a 671 nm. Nuestro objetivo fue aquí comparar la performance de este ensayo con el de ELISA en un grupo de 42 muestras pertenecientes al estudio publicado con anterioridad⁴. Se analizaron los niveles de anti-PF4/HEP por ELISA (HPIA, *Asserachrom HPIA-STAGO*) y por inmuniturbimetría (HIT AB, *Instrumentation Laboratory*) en un coagulómetro ACL TOP 500. Ambos detectan conjuntamente los tres isotipos de anticuerpos. Los resultados se expresaban en % de Abs para el HPIA y U/ml en HIT AB. Los puntos de corte fueron 27% ABS para HPIA y 1U/ml para HIT AB. Se observaron 31% negativos, 21.4% positivos débiles, 9.5% positivos moderados y 38.1 positivos fuertes por ELISA, y 54.8% negativos, 7.2% positivos débiles y 38% positivos fuertes por HIT AB. Los niveles de anticuerpos medidos por ambas técnicas correlacionaron de manera moderada (coeficiente de correlación de Pearson $r = 0.69$, $p < 0.001$) considerando el grupo total de muestras, pero la correlación fue superior cuando solo se consideraron los 19 pacientes con probabilidad alta de HIT, $T4 \text{ Score} \geq 6$, $r = 0.89$, $p < 0.001$ (Fig. 1).

Solo el 30% de las muestras con HPIA positivo débil (% ABS $\geq 27 < 50$), de baja significación clínica, presentaron resultado positivo por HIT AB, mientras que el 78.9% de los positivos moderados o fuertes de HPIA (% ABS $> 50\%$) eran positivos por HIT AB. Los pacientes con índice $4T \geq 6$ presentaron mayor prevalencia de positivo fuerte

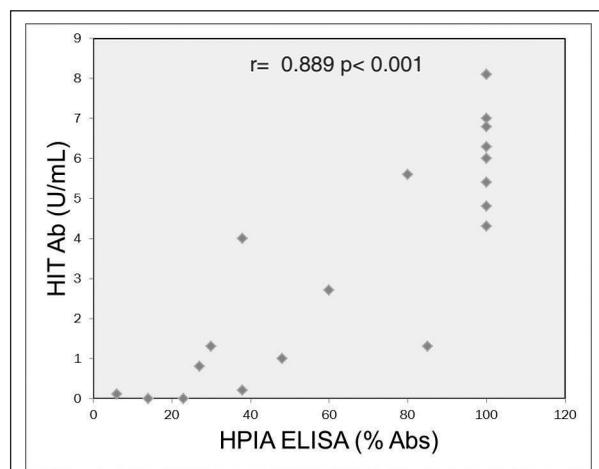


Fig.1.- Correlación de los resultados de HIT AB (ensayo inmuniturbidimétrico) con los HPIA por ELISA en muestras de individuos con probabilidad clínica alta para HIT (índice $4T \geq 6$)

de HIT AB (57.9%) que aquellos con probabilidad baja e intermedia (13.6%), OR 8.71 (1.90-39.75). La prevalencia de positivo fuerte de HIT AB fue superior en el grupo que tuvo complicaciones trombóticas ($n = 18$), 55.5% vs. 19% en aquellos sin trombosis, OR 5.31 (1.27-22.25).

El grado de co-negatividad con ambas técnicas fue muy bueno, 12/13 (92.3%). En cuanto a la co-positividad, el 70% de las muestras con HPIA-ELISA positivo débil, sin significación clínica, dieron negativo por HIT AB. Nuestros resultados demuestran que la presencia de un resultado positivo con este ensayo se asoció estadísticamente a un resultado positivo moderado o alto por ELISA, a un índice $4T$ de moderada o alta probabilidad y a la presencia de complicaciones trombóticas. El método inmuniturbidimétrico posee una ventaja potencial de rapidez, procesado en el coagulómetro utilizado para las pruebas de coagulación. La evaluación de un resultado positivo con esta prueba junto con un índice $4T$ alto, sugeriría la suspensión de la heparina y el cambio de droga antitrombótica. Pero más importante, un resultado negativo permitiría evitar la utilización de terapias antitrombóticas alternativas, no siempre disponibles y económicamente accesibles, en los pacientes con sospecha clínica moderada o baja.

Marta E. Martinuzzo^{1,2}, Luis H. Barrera¹, María A. D'Adamo¹, Juan C. Otao¹, Ricardo R. Forastiero²

¹Grupo Bioquímico, Laboratorio Central del Hospital Italiano de Buenos Aires, ²Universidad Favaloro, Buenos Aires, Argentina
e-mail:memartinuzzo@gmail.com

1. Greinacher A. Heparin induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl. 1): 9-12.
2. Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A. Evaluation of pretest clinical score (4T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 759-65.
3. Warkentin T. How I diagnose HIT? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 143-9.
4. Martinuzzo ME, Cerrato G, Iglesias Varela ML, Adamczuk Y, Pombo G, Forastiero R. Los niveles de anticuerpos anti factor plaquetario 4-heparina y el índice $4T$ para trombocitopenia inducida por heparina: Experiencia argentina. *Medicina (B Aires)* 2012; 72: 19-22.
5. Davidson S, Ortel TL, Smith LJ. Performance of a new, rapid, automated immunoassay for the detection of anti-platelet factor 4/heparin complex antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011, 22: 340-4.

Salud y comunidades indígenas en Formosa

En el artículo sobre el sistema de salud y las comunidades indígenas de Formosa, publicado en MEDICINA¹, se brinda un pantallazo sobre las mejoras entre los Wichí, Qom y Pilagá en los últimos diez años en educación y salud. La autora acota en cuanto a los Wichí que "Mataco" es

despectivo, al igual que “Toba” para los Qom¹. Sin embargo, solo se trataría de una cuestión idiomática menor entre las comunidades aborígenes y los primeros criollos².

A propósito del artículo, viene a cuento parte de la historia de Formosa: la del Dr. Esteban Laureano Maradona (1895-1995) quien escribió sobre las tres etnias mencionadas. Fueron 50 años de dedicación de sus casi 70 años de *praxis*³. El Dr. Maradona estableció un consultorio en Resistencia, Chaco, en 1930. Al tiempo que atendía pacientes, estudiaba la flora y contribuía a la formación de un hospital de leproso en la Isla del Cerrito. A consecuencias de sus conferencias y artículos periodísticos (1931-1932) en defensa de la Ley de Accidentes del Trabajo (Ley 9688), tuvo que huir perseguido por la policía local. Pasó al Paraguay, donde sufrió prisión en Asunción como presunto espía. Logró convencer a las autoridades sobre sus intenciones de practicar la medicina durante la Guerra del Chaco (1932-1935), en la que asistió por igual a heridos paraguayos y bolivianos. Finalizada la contienda, retornó a su patria y viajó para conocerla, con la idea de establecerse en Buenos Aires. Mientras atravesaba el Territorio de Formosa por ferrocarril, en una parada, una llamada urgente de una parturienta lo detuvo en Estanislao del Campo. El parto fue complicado... madre e hija se salvaron. Maradona intentó proseguir viaje, mas un grupo de aborígenes lo retuvo: necesitaban un médico. Así comenzó a ayudar a criollos y aborígenes³. A estos últimos, “Toba-Pilagá” para él, los atendía gratis ganándose su confianza^{3,4}. Escribió acerca de sus costumbres, lenguas y medicinas naturales; fue para ellos primer maestro y médico; aprendió su idioma. En 1948 logró que el Estado Nacional contribuyera en la fundación de la “Colonia Indigenista Juan Bautista Alberdi”, y asentó a los indígenas, trashumantes en búsqueda de agua. En ella inauguró una escuela (oficializada por el Consejo Nacional de Educación, que le asignó el N° 167), con el nombre de su ancestro, el sanjuanino José Ignacio Fernández de Maradona (nominada así no por iniciativa propia)³. Maradona proveyó de agua potable a esta “Colonia”, que no figura en los mapas provinciales; estudió la fauna, la flora, la etnografía y la geología del territorio, y remitió muestras a distintas instituciones de Buenos Aires en beneficio del conocimiento de los aborígenes; de cómo ayudarlos³. Esta personalidad vivió con austeridad, sin electricidad ni teléfono y mantuvo correspondencia con centros de estudios y especialistas nacionales e internacionales de su tiempo³. De sus investigaciones devino la aplicación de muchas plantas medicinales: caso del vinal (*Prosopis ruscifolia*), leguminosa de cuyas hojas se prepara un colirio para la conjuntivitis, además de proveer leña y madera^{3,4}. Defendió Maradona a este árbol ante el Ministerio de Agricultura con motivo de un

decreto (1941) que lo declaraba plaga^{3,4}. Son varias las preparaciones preventivas y terapéuticas a base de plantas y sustancias animales que usaban los pueblos originarios que describe Maradona⁴. Por ejemplo, un ungüento repelente de mosquitos a base de grasa de ñandú (“mañíc” en Pilagá, *Rhea americana*), de pescado (“niíác”) y de extracto de “palo santo” (“asacái”, *Bulnesia sarmiento*)^{2,4}. Este árbol de la familia Zygophyllaceae se utiliza en la obstetricia Toba como facilitador del parto, entre muchas necesidades de tradición cultural (aromática, incineraciones fúnebres, lumbre, otras) y de la salud (cefaleas, lumbalgias, reumatismo, otras) de los pueblos nativos de la región⁴⁻⁶.

Pero no todos los males pueden paliarse con elementos telúricos. En la enfermedad de Chagas la prevención es posible y es indicativa de un alto nivel de pobreza y de una baja salubridad, educación y prevención. Las cifras hablan por sí mismas para Formosa: “alto riesgo de transmisión vectorial”⁷. Hubo alguna mejoría en los últimos años, pero aún resta mucho por hacer, según surge de contrastar las estadísticas del trabajo de Spillman, Burrone y Coto, con el escenario del artículo que origina esta carta.

El ejemplo de Maradona, que enseñó a construir casas de ladrillos a los aborígenes, a trabajar, a evitar el alcoholismo, adelantándose casi cincuenta años en alcanzar los tres postulados básicos de la Cumbre Mundial para el Desarrollo Social (Copenhague 1995): “El ataque a la pobreza, la creación de trabajo y la construcción de solidaridad”³, sigue vigente, y nos indica que aún resta mucho por hacer.

Eduardo M. Vadell

e-mail: eduardo.vadell@gmail.com

1. Mirassou CS. Sistema de salud pública y comunidades indígenas de la Provincia de Formosa. *Medicina (B. Aires)* 2013; 73: 453-6.
2. Da Rocha, A. *Vocabulario Comentado Pilagá-Castellano*. Buenos Aires: Coni, 1938, p 119.
3. Olivera, JL. *Doctor Maradona*. Buenos Aires: Corregidor, 2009, p 285.
4. Maradona, EL. *A través de la selva*. Segunda edición. Santa Fe: Belgrano, 1974, p 336.
5. Alonso J, Desmarchelier C. *Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina*. Buenos Aires: Fitociencia, 2006, p 390-3.
6. Martínez GL. La farmacopea natural en la salud materno-infantil de los Tobas del Río Bermejito. *Kurtziana*. 2007; 33: 39-63.
7. Spillman C, Burrone S, Coto H. Análisis de la situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Argentina: Avances en el control, *Revista Argentina de Salud Pública* 2013; 4: 40-4. En: <http://www.saludinvestiga.org.ar/rasp/articulos/volumen15/40-44.pdf>; consultado el 26/3/2014.