

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.