

III. GENERALIDADES

III 1. LA FAMILIA BUNYAVIRIDAE

La familia *Bunyaviridae* se constituyó en 1975 hasta abarcar un grupo grande de virus transmitidos por artrópodos que comparten propiedades morfológicas, morfogénicas y antigénicas (32). La familia incluye más de 300 miembros serológicamente distintos, divididos en 5 géneros: *Bunyavirus*, *Phlebovirus* (incluyendo el grupo *Uukuniemi*), *Nairovirus*, *Hantavirus*, géneros que infectan animales y el género *Tospovirus* que infectan a más de 400 especies en 50 familias de plantas (27, 31, 32).

La mayoría de los miembros de la familia causan una infección durante toda la vida del insecto vector. Varios tipos de insectos como mosquitos, garrapatas, moscas y otros artrópodos pueden transmitir a los *Bunyavirus*, pero cada virus infecta a un número limitado de especies de insectos y hospederos vertebrados (2, 4, 27). Muchos *Bunyavirus* dependen de un animal hospedero para su persistencia en la naturaleza, pero la transmisión de humano a humano generalmente no ocurre, ya que éste es un hospedero accidental (21,27, 31, 32).

Muchos de los aislamientos de los virus fueron obtenidos del insecto vector porque éstos tienen una infección permanente (3, 8, 9, 12, 13). El aislamiento en hospederos vertebrados da mejores resultados cuando se obtienen del suero durante el curso del cuadro febril (fase de viremia) o en tejidos, tanto de animales como en humanos recientemente muertos (17, 31).

Los sistemas de aislamiento mayormente usados son: ratones lactantes y cultivo celular. Algunos virus se replican bien en ambos sistemas, pero otros sólo pueden ser aislados en cultivo celular u hospederos vertebrados especiales. La gran mayoría de *Bunyavirus* replican en cultivos celulares como BHK-21 (1), vero E-6 o C6-36, que son frecuentemente usados para aislamiento viral y la preparación de stocks de virus. Muchos de estos virus producen un daño a la monocapa de células de vertebrados o insectos, conocida como efecto citopático (27, 31).

La forma de transmisión de diferentes géneros de *Bunyavirus* es diversa, sin embargo son semejantes dentro de cada uno de ellos (15). Miembros del género *Bunyavirus*, *Phlebovirus* y *Nairovirus* son transmitidos por artrópodos y se mantienen en un ciclo vector-vertebrado; el género *Tospovirus* también son transmitidos por artrópodos, pero mantienen un ciclo vector-planta; pero el género *Hantavirus* es mantenido exclusivamente en un ciclo animal-animal (27, 31).

En general, los factores que afectan a los artrópodos y por ende en la transmisión de un agente patógeno son:

- La capacidad del virus para atravesar el intestino del artrópodo y replicarse en las glándulas salivales, para después infectar al vertebrado.
- El tamaño de la población de artrópodos.
- Los hábitos de picadura (diurnos, nocturnos) y el alcance de vuelo del vector.
- La distribución geográfica y ecológica de cada especie de vector.

- Condiciones climáticas como: temperatura, humedad y lluvias.

Muchos Bunyavirus tienen una forma alternativa de perpetuación, manteniéndose exclusivamente en el artrópodo por transmisión transovárica (17, 28).

III .1.1 GENERO PHLEBOVIRUS

El género *Phlebovirus* comprende dos serogrupos: *Phlebotomus fever*, y *Uukuvirus*, que originalmente se consideraron separados de este género, pero se incluyó en vista de que su organización genómica es similar (27). Mas de 50 virus están incluidos dentro de este género, separados en complejos antigénicos y que comparten características moleculares distintas a otros géneros. Estos virus son transmitidos por mosquitos o por moscas flebótomos (16). El serogrupo *Phlebotomus fever* es el causante de enfermedades significantes en humanos, y dentro de éste la fiebre del valle del Rift (Rift Valley fever) y la fiebre de moscas de arena (Sandfly fever) son los agentes más importantes médicamente y los más estudiados (8, 13, 16, 18, 19, 22, 25).

III 1.2 SANDFLY FEVER

Definición

Sandfly fevers (Pappataci fever, Phlebotomus fever) son enfermedades febriles agudas indiferenciadas y autolimitadas causadas por virus del serogrupo Phlebotomus fever y transmitido por moscas del género *Phlebotomus* (sandflies) (23).

Etiología e Historia

Por lo menos 38 virus registrados son agrupados en el serogrupo Phlebotomus fever. De estos, 8 virus han sido recuperados de personas infectadas (Sandfly fever Naples y Sicilian, Chagres, Candiru, Punta toro, Toscana, Alenquer y Rift Valley fever). Algunos de estos virus incluyendo Sandfly fever Naples, Sicilian y Punta toro no producen enfermedades en muchos animales de laboratorio (amenos que se adapten por repetidos pasajes). Los virus Sandfly fever replican bien en cultivos celulares de Vero y BHK-21, siendo más usados para aislamientos primarios y ensayos que los animales de laboratorio (23).

La enfermedad fue conocida como Pappataci fever en Italia y la relación con moscas sandflies fue sugerida por Taussig en 1905. En 1909, una comisión de militares austriacos encabezada por Doerr, Franz y Taussig reproducen la enfermedad por inoculación de sueros procedentes de casos agudos en humanos voluntarios y demostraron que la infección puede ser transmitida por *Phlebotomus papatasi*.

En 1937, Moshovsky demostró la transmisión transovarial de insectos infectados a sus descendientes, que pudieron después transmitir la enfermedad a humanos voluntarios (31). El interés por *Phlebotomus fever* se incrementó durante la segunda guerra mundial debido a epidemias ocurridas en las tropas aliadas en Italia en 1943 y 1944. La historia de la fiebre sandfly está circunscrita a campañas militares (23, 31).

Ecología y Epidemiología

La transmisión ocurre por la picadura de unas moscas hematófagas de vuelo limitado pertenecientes a los géneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia* y *Lutzomyia*. *Phlebotomus papatasi* y otros *Phlebotomus*, así como especies de *Sergentomyia* son los principales vectores alrededor del Mediterráneo, en el Medio Este y a través de la península arábiga. La transmisión transtadial y transovarial probablemente sirve como un mecanismo alternativo de perpetuación del virus (19). La enfermedad asume gran importancia cuando un número elevado de personas no inmunes (tropas militares, extranjeros, refugiados) entran en áreas epidémicas.

En Centro América y América del Sur, los flebótomos del género *Lutzomyia* son los vectores principales, cuyo hábitat son los bosques. El virus también puede ser perpetuado por transmisión transtadial y transovarial en estos vectores. En América del Sur, la infección en humanos principalmente ocurre en personas que trabajan o viven en la selva (22, 31). Los virus Punta toro y Chagres

vienen siendo aislados de flebotomos panameños, *L. ylephilator* y *Lutzomyia trapidoi* que es una especie altamente antropoflica. El virus Toscana es recuperado de *Phlebotomus perniciosus* (macho y hembra) en Italia y Portugal (23).

Enfermedad en Humanos

La enfermedad aparece en forma abrupta, después del período de incubación (3 a 6 días), incluyendo síntomas como: fiebre, malestar general, cefaleas, dolor retro-orbital, fotofobia, náuseas, vómitos y mialgia. La fiebre aguda dura aproximadamente 3 días, pero puede ser seguida por un periodo de debilitamiento, fatiga y depresión durante una a dos semanas (19, 22).

La inmunidad homóloga es probablemente por toda la vida; sin embargo el título de anticuerpos neutralizantes disminuye significativamente después de 20 años. La infección con el virus de Naples no confiere protección contra el serotipo de Sicilian o viceversa, porque ambas enfermedades ocurren juntas en áreas endémicas (23).

Diagnóstico

Durante la fase aguda de la enfermedad, el virus puede ser aislado de la sangre por inoculación en cultivo de células o en ratones. Un diagnóstico serológico por inhibición de la hemaglutinación, fijación del complemento, ELISA de captura para anticuerpo IgM, o inmunofluorescencia indirecta; es realizado en muestras pareadas (fase aguda y convalescente) (19, 23).

III 1.3 PHLEBOTOMUS FEVER EN AMERICA CENTRAL Y DEL SUR

En las Américas han sido aislados seis virus *Phlebotomus fever* asociados con enfermedades humanas: cuatro en Brasil (Alenquer, Candiru, Morumbi y Sierra Norte) y dos en Panamá (Chagres y Punta toro) (10).

Etiología

Estudios con microscopía electrónica de los virus Chagres y Punta toro, revelaron que son esféricos con un diámetro medio de 100nm (2). La replicación en cultivos celulares de mamíferos producen placas o efecto citopático (10).

Epidemiología

Los seis agentes ocurren sólo en Brasil y Panamá. Se obtuvo aislamientos de cada uno de los cuatro phlebovirus de Brasil, todos de humanos. Los dos virus de Panamá fueron aislados de personas y de mosca flebótomos. Menos del 1% de personas de la región amazónica de Brasil examinadas tuvieron anticuerpos contra Alenquer o Candiru. En Panamá se encontró un alto grado de inmunidad para Chagres y Punta toro, particularmente de este último.

No se conocen los vertebrados hospederos de estos virus. Chagres y Punta toro son repetidamente aislados de hembras *Lutzomyia*, particularmente de *L. trapidoi*, aunque también son recuperados de machos *Lutzomyia* (10).

Infección en animales

No se reportaron enfermedades en animales domésticos o salvajes. Los seis agentes causan una infección en ratones lactantes. Chagres mata a hamsters adultos, y Punta toro causa una infección letal en hámsters recién nacidos; hamsters jóvenes se vuelven virémicos y sobreviven siguientes inoculaciones con el virus Candiru.

Infección en humanos

El cuadro clínico consiste de fiebre, cefalea, escalofrío y mialgia; también pueden estar presentes: dolor retroorbital, náuseas, vómitos y postración (2). Inoculando sueros los virus pueden ser aislados en ratones o en cultivo celular Vero (26).

Tratamiento y prevención

El tratamiento es sintomático. La infección puede ser prevenida mediante vestimentas protectoras apropiadas y repelentes de insectos antes de ingresar a zonas donde el vector infectado pueda estar circulando (26). El uso de insecticidas residuales (DDT) tiene resultados efectivos en el control del vector (19). El impacto en Salud Pública causado por los phlebovirus es desconocido (26).

Tabla 1. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DEL GENERO

PHLEBOVIRUS EN AMERICA CENTRAL Y DEL SUR

COMPLEJO	VIRUS	SUBTIPO	DISTRIBUCION
Bujaru	Bujaru (19)* Munguba (19)*		Brazil Brazil
Rift Valley fever	Rift Valley fever (19)	Rift Valley fever Belterra	Africa Brazil
Candiru	Icoaraci (19)* Candiru (19)* Alenquer (19)* Itaituba (19)* Nique (19)* Turuna (19)*	Itaituba Oriximina	Brazil Brazil Brazil Brazil Brazil Panama Brazil
Punta Toro	Punta Toro (19)*	Punta Toro Buenaventura	Panama Colombia, Panama
Frijoles	Frijoles (19)* Joa (19)*		Panama Brazil
Chilibre	Chilibre (19)* Cacao (19)*		Panama Panama
No asignados a Complejos	Aguacate (19)* Anhangá (19)* Caimito (19)* Chagres (19)* Pacui (19)* Urucuri (19)* Morumbi (26)* Sierra Norte (26)* Ambe (20)* Ixcanal (20)* Mariquita (20)* Durania (20)* Armero (20)*		Panama Brazil Panama Panama Brazil, Trinidad. Brazil Brazil Brazil Brazil Brazil Brazil Brazil

***Citas Bibliográficas**

III 2. ENSAYO INMUNOENZIMATICO

Los inmunoensayos ligados a enzimas (EIAs) están tomando un rol importante en los laboratorios médicos y de investigación, porque brindan una alternativa viable, mediante la cual es posible realizar la identificación de muchos virus a nivel de género. Estas pruebas están reemplazando a los radioinmunoensayos en muchos laboratorios, por su comparable sensibilidad sin los problemas de manejo, eliminación y corto tiempo de vida de los materiales radioactivos (5, 7, 11, 14, 24).

Por su objetividad, facilidad de automatización y posibilidad de trabajar con un gran número de muestras, los ensayos inmunoenzimáticos vienen reemplazando parcialmente a una variedad de técnicas en el laboratorio como son inmunofluorescencia y aglutinación. Como en el EIA el antígeno o el anticuerpo está adsorbido a una fase sólida, este ensayo también es denominado Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) (5, 30, 34, 40).

III 2.1. FUNDAMENTO

La prueba de ELISA se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, uno de los cuales debe ser de reactividad conocida. El color se genera por la interacción de un sustrato cromogénico y una enzima que ha sido acoplada al anticuerpo detector. Si debe medirse el anticuerpo, se coloca el antígeno en la fase sólida, como una capa de captura. Después de la reacción del antígeno con el suero del paciente, la capa de detección puede ser un reactivo antiinmunoglobulina clase

específica (IgM o IgG) para detectar respuesta de anticuerpos clase específicos (ver figura 1) (5, 7, 11, 14, 24, 30, 33, 34, 35, 40).

Dentro de los parámetros fisicoquímicos que intervienen en la unión del antígeno con el anticuerpo tenemos:

- Fuerzas de Van der Waals producidas por el movimiento de átomos en la superficie de las moléculas generado por un cambio eléctrico. Son fuerzas débiles presentes cuando la proximidad del Ag y el Ac es grande.
- Fuerzas electrostáticas originadas por la fuerza de atracción entre moléculas de carga iónica opuesta, como sucede con los grupos NH_3^+ que reaccionan ávidamente con el grupo COOH^- .
- Uniones por puentes de hidrógeno son de carga energética baja entre átomos electropositivos de hidrógeno y átomos electronegativos de oxígeno o nitrógeno.

III 2.2. METODOLOGIA GENERAL:

Los métodos de ELISA dependiendo de la actividad enzimática se dividen en dos tipos: competitivos y no competitivos (5).

ELISA COMPETITIVO: En este método, el anticuerpo de la muestra va a competir con el conjugado por un número limitado de sitios de unión del antígeno. Habrá ausencia de color en una muestra positiva debido a que el sustrato no encontrará a la enzima porque el conjugado ha sido desplazado por el anticuerpo presente en la muestra.

ELISA NO COMPETITIVO: Consiste en enfrentar la muestra con el antígeno o anticuerpo que está en la fase sólida. Si una muestra es positiva se formará el complejo antígeno-anticuerpo y al agregar el conjugado reaccionará con el respectivo sustrato desarrollando color (7, 11, 14).

Dentro de los no competitivos tenemos, los directos que detectan antígenos y los indirectos que detectan anticuerpos. En la presente investigación se utilizará la modalidad de ELISA no competitiva indirecta.

Fijación del Antígeno a la fase sólida:

La reacción inmunológica tiene lugar en la fase sólida, ésta puede ser de plástico, vidrio o nitrocelulosa. Actualmente los más usados son los de plástico, dentro de estos los de poliestireno gammairradiados y los de cloruro de polivinilo porque tienen mayor capacidad para formar enlaces estables que los de poliestireno no tratados.

El antígeno diluido en buffer es adherido a la fase sólida por enlaces electrostáticos entre los sitios activos del plástico y regiones de la proteína responsables de esta interacción. El buffer puede ser carbonato a pH 9.6 o buffer fosfato salino (PBS 1X) a pH 7.4.

La estabilidad de los enlaces electrostáticos, el tiempo de incubación y la temperatura son factores importantes a tener en cuenta para evitar pérdidas de las proteínas y que pueden afectar la sensibilidad del ensayo.

Reacción con anticuerpo:

La reacción del antígeno con el anticuerpo se debe realizar en condiciones similares a las fisiológicas pH 7.4, temperatura de 37°C y concentración salina equivalente a 0.15M de NaCl. Estas condiciones pueden variar dentro de un rango razonable sin afectar la reacción. El tiempo puede variar entre 1 a 3 horas.

Moléculas no específicas en solución pueden adherirse a la fase sólida afectando el resultado final del ensayo, para disminuir este riesgo se suele agregar al medio de reacción un exceso (0.1% a 1%) de una proteína inerte para que compita eficientemente por los sitios de unión inespecíficos en la fase sólida. Esta proteína puede ser seroalbúmina bovina, caseína, suero entero, gelatina u otros.

También es necesario añadir al medio tween 20 para evitar uniones inespecíficas de macromolécula. Por este motivo es agregado en los tampones de dilución y de lavado.

Adición del conjugado enzimático:

El conjugado enzimático se prepara por unión covalente de una enzima con el anticuerpo; esta enzima puede ser peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase, HRP), fosfatasa alcalina (Alcaline Phosphatase, AP) o beta-galactosidasa. Los criterios a tomar en cuenta en la selección de la enzima apropiada son su toxicidad, estabilidad, disponibilidad, viabilidad de conjugarla eficazmente con el anticuerpo elegido, sensibilidad y precio.

Las condiciones de reacción entre el conjugado y el complejo formado por la unión antígeno-anticuerpo son similares a las descritas en la etapa anterior.

Adición del sustrato:

La elección del sustrato va de acuerdo con el tipo de enzima presente en el conjugado. El sistema AP hidroliza al p-nitrofenil fosfato o p-nitrofenol generando un producto soluble de color amarillo. El sistema HRP reduce al sustrato peróxido de hidrógeno produciendo oxígeno que oxida a otros compuestos cromógenos tales como:

Tetrametilbenzidina (TMB), cuya oxidación genera un producto de color azul oscuro.

o-phenylene diamine (OPD), que es oxidado a un producto coloreado que varía del naranja al pardo oscuro.

Acido azino-(3-etil)-benzo-sulfónico (ABTS), cuya oxidación genera un producto que va del verde al azul.

La intensidad del color desarrollado es de acuerdo con la cantidad de enzima presente en la reacción.

La lectura se realiza en un espectrofotómetro a 405 nanómetros (7,11, 24).

Figura 1. INMUNOENSAYO ENZIMATICO PARA ANTICUERPOS IgG

METODO NO COMPETITIVO INDIRECTO

