

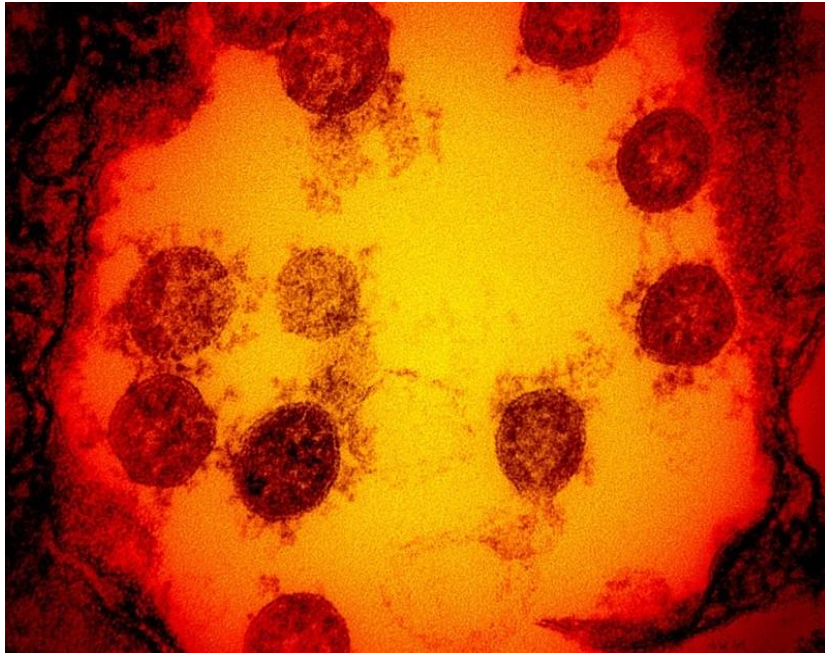
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE BACTERIAS Y VIRUS

Aprendizaje basado en problemas y estudio de
casos

Guía de talleres 2019

Roxana Cannistraci, Victor Giayetto, Silvia González, Ana Littvik, Teresa López, Elena Márquez, Gabriela Peirotti, Silvia Nates, Pedro Rodríguez, Patricia Biganzoli, Leonardo Ferreyra y Jorge Pavan

Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas.
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba



Fotografía a partir de una imagen de microscopía electrónica de SARS-CoV-2

TALLER N° 7

Fiebre y flema

Tema: INFECCIONES RESPIRATORIAS BAJAS (IRB)

Objetivos:

1. Reconocer los agentes etiológicos de las infecciones respiratorias bajas para lograr una valoración del diagnóstico etiológico a seguir en cada una de ellas.
2. Valorar la importancia de las IRB como causa de morbi-mortalidad en la comunidad a fin de aplicar las medidas preventivas necesarias frente a estas entidades clínicas basados en un buen diagnóstico etiológico.
3. Analizar el inicio de pandemias, su etiología y modos de prevención.
4. Conocer los aspectos básicos en bioseguridad.

INFECCIONES RESPIRATORIAS BAJAS
GUIA CONCEPTUAL

**NEUMONÍAS, BRONCONEUMONÍAS, NEUMONITIS, BRONQUITIS,
BRONQUIOLITIS, TUBERCULOSIS Y MICOBACTERIOSIS.
PANDEMIAS**

- Agentes etiológicos de las IRB

BACTERIAS

Y

VIRUS

Streptococcus pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae
Moraxella catarrhalis
Legionella pneumophila
Chlamydia pneumoniae
Chlamydia psittaci
Bordetella pertussis
Mycobacterium tuberculosis
M. medio-ambientales

V. Influenza
V. Parainfluenza
Virus Respiratorio Sincitial
Adenovirus
Citomegalovirus
Virus Varicela-Zoster
Virus Sarampión
Coronavirus: COVID-19

TALLER N° 7

TEMA: INFECCIONES RESPIRATORIAS BAJAS (IRB)



“No tanta fiebre como flema”

Ud. ha finalizado su carrera y comienza con una residencia en un Hospital público de la Provincia de Bs As.

Angela, de 45 años de edad, acude al hospital, por presentar síntomas respiratorios y fiebre.

Ud. la recibe en el área anexa del Hospital donde son atendidos los pacientes sospechosos de COVID-19. Recibe a una paciente mujer de 45 años muy preocupada por haber bajado tanto de peso. Le refiere que hace unos quince días siente cansancio, pérdida de apetito, tos y flema. A medianoche la despierta la transpiración. Comenta que por las tardes le sube la temperatura, Ud. sospecha que hace febrículas. De todas maneras, este comentario le llevó a preguntarle porque no se acercó antes a un dispensario por la premura que requiere detectar los casos de Covid. Angela le responde que está sola todo el día, no tiene medios para moverse y no quiere abandonar su casa ni siquiera unas pocas horas.

Ante el interrogatorio epidemiológico le refiere que su vivienda es precaria de un solo ambiente en un barrio popular. Vive con su marido y dos hijos de 23 y 25 años, El marido se dedica a la construcción y los hijos hacen changas. Refiere que uno de ellos hace rato presenta tos. **Pregunta 1**

Inmediatamente dispone a realizarle el hisopado nasofaríngeo para investigación del nuevo coronavirus. Pero presenta una sospecha diagnóstica importante, la clínica solapada, esa pérdida de peso, la febrícula y la tos lo orientan a una patología pulmonar que no es aguda. Le indica a Angela que también tendrá que tomarle muestras de esputos. Quizás necesite más de uno. **Pregunta 2**

Informe del laboratorio de microbiología,(24 horas luego de enviadas las muestras):

Laboratorio Hospital

Paciente: Angela Rodríguez

Material: Esputo (dos muestras)

Fecha: 02/07/2020

Examen microscópico directo (Coloración de Ziehl Neelsen): Se observan B.A.A.R (++).

Se informará cultivo.

Preguntas 3 y 4



Pregunta 1: Tenga en cuenta las variables epidemiológicas y clínicas del relato para dar una respuesta a Angela. Despliegue los agentes etiológicos sospechosos.

Pregunta 2: Recuerde los pasos del diagnóstico microbiológico aplicados a esta situación.

Pregunta 3: Reflexione acerca del alcance del informe que está interpretando (contexto clínico, epidemiológico) y qué acciones se desprenden en consecuencia.

Pregunta 4: Esta situación, con este diagnóstico requiere un tratamiento inmediato y medidas de prevención.



Un rubicundo TEJEDOR

Ya comenzado el invierno, llega a su consultorio Mario Leonel Tejedor, un joven de 28 años de edad que trabaja como repositor en un supermercado. Tiene un aspecto rubicundo, se queja de fiebre alta, tos con expectoración purulenta, disnea y un dolor tipo puntada de costado en el tórax. Refiere que el comienzo fue brusco y que se siente muy decaído y con malestar; lo que le imposibilita realizar sus tareas.

Vive con su familia: mujer y dos hijos pequeños. No menciona tener pájaros, ni estar en contacto con los mismos. No refiere haber sido vacunado para la gripe. Paciente sin enfermedades de base. Área epidemiológica sin Covid 19 (zona blanca). **Pregunta 1**

El examen físico muestra un síndrome de consolidación en tórax derecho.

Ud., médico de del Hospital zonal, decide solicitarle una serie de estudios: radiografía de tórax, estudio de laboratorio de química y estudios para diagnóstico microbiológicos.

Pregunta 2

Una hora después, recibe el informe radiológico: imagen de condensación en lóbulo pulmonar derecho. Laboratorio de química: leucocitosis con desviación de la fórmula a la izquierda y formas inmaduras. Gasometría: insuficiencia respiratoria.

Todo le hace pensar en una neumonía de la comunidad. Comienza con el tratamiento empírico. **Pregunta 3**



Frasco recolector, tapa a rosca, estéril.



Frasco con muestra de esputo purulenta

Pregunta 4

Los primeros resultados del laboratorio de microbiología que recibe son los siguientes, lo que requiere su interpretación.

Laboratorio de Microbiología Hospital Zonal

Nombre: Mario Leonel Tejedor **HC:** 7777777

Muestra: Esputo (para gérmenes comunes)

Fecha de recolección: 14/07/2020

Estudio macroscópico: muestra purulenta

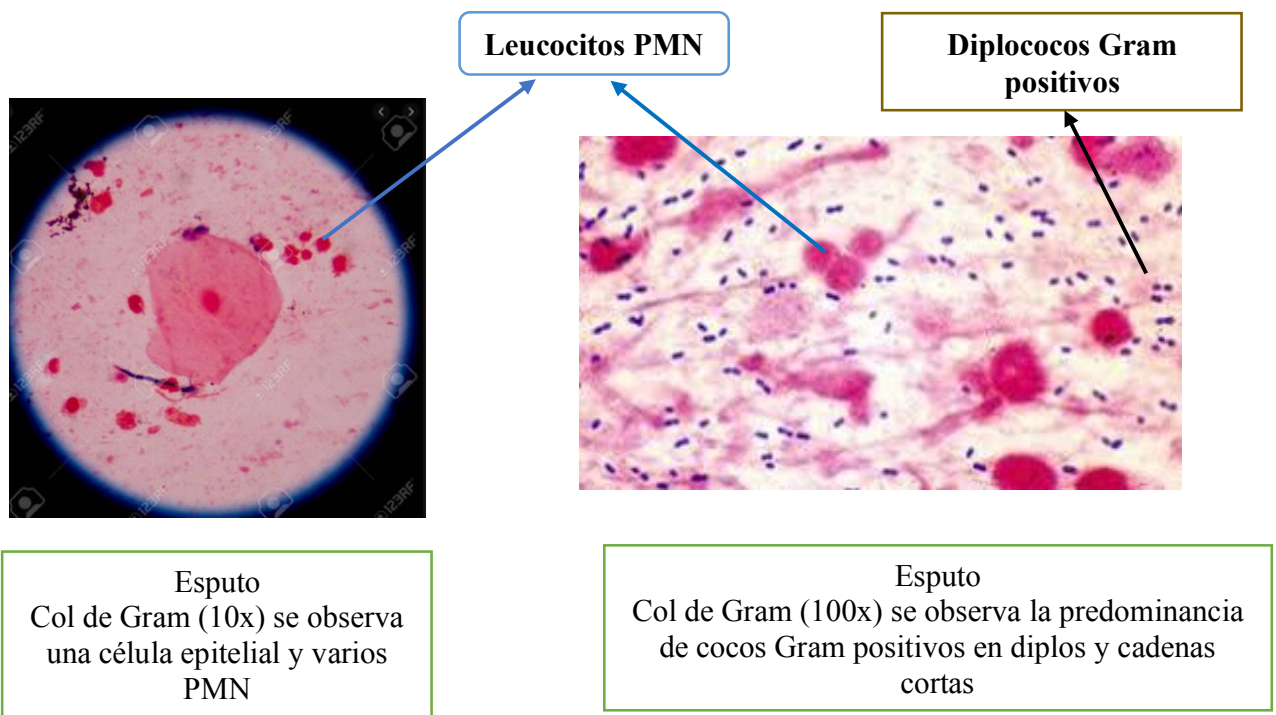
Estudio microscópico: Examen directo: Coloración de Gram: muestra apta (se observan menos de 10 células epiteliales planas y más de 25 PMN por campo). Flora mixta con predominancia de cocos Gram positivos en diplos y cadenas cortas.

Cultivo: se informará.

Fecha: 14/07/2020

Firma: *****

Su espíritu inquieto lo lleva al laboratorio de bacteriología para solicitar a los especialistas que le muestren las imágenes que corresponden a los resultados enviados.



A las 48 hs recibe el resto del estudio bacteriológico.

**Laboratorio de Microbiología
Hospital Zonal**

Nombre: Mario Leonel Tejedor **HC:** 7777777

Muestra: Espuito (para gérmenes comunes)

Fecha de recolección: 14/07/2020

Cultivo: Han desarrollado cocos Gram positivos identificados como *Streptococcus pneumoniae*.

Pruebas de sensibilidad:

Antibiograma por difusión: Penicilina: S, Levofloxacin: S, Vancomicina: S.

Concentración inhibitoria mínima (CIM): Penicilina: 0.06 ug/ml (S)

Fecha: 16/07/2020

Firma: *****

Sentado en su consultorio, a través de la computadora revisa la historia clínica digital del paciente. En la misma puede leer los *restantes* estudios solicitados, la mayoría fueron negativos. Excepto uno. **Pregunta 5**



Pregunta 1- Señale que agentes etiológicos pueden ser causantes del cuadro, por lo menos en un primer momento.

Pregunta 2- En función de los agentes etiológicos, que estudios microbiológicos solicitaría (tanto bacterianos como virales).

Pregunta 3- En este momento la sospecha inicial es más evidente, señale los pasos del diagnóstico microbiológico.

Pregunta 4- ¿Observe las imágenes, a que paso del diagnóstico microbiológico corresponden? Explíquelos con fundamentos.

Pregunta 5- Detalle lo que lee en la Historia clínica. ¿No se olvide de un estudio bacteriológico complementario al solicitado, como fue su resultado?



PANDEMIAS



Consecuencias de mezclar información:

la emergencia del virus influenza pandémico en el año 1968

¡Qué ensalada es esta! Afirma Ud. mientras relee su diario y trata de comprender lo que sucedió para que se mezclara esta información!

Todo comenzó con aquellos meses tibios. La primavera podía sentirse en el aire de marzo de aquel **1968**. Una extraña mezcla de ozono y flores recién abiertas, movidas por la brisa le completaban esa extraña sensación interna de placer y temor que origina lo nuevo. Sí, hacía apenas un mes y medio que había llegado al hospital regional de Haikou (海口市) en China, como médico extranjero.



Ciudad de Haikou está situada en el norte de la isla de Hainan, en el canal de Qiongzhou, en China (señalada en la flecha en el mapa).

Tenía una interesante oportunidad de aprender algo de la tan mentada medicina oriental, o al menos eso esperaba en los largos doce meses de estadía. La formación en medicina occidental recibida en un país sudamericano le otorgaban a Usted una particular perspectiva respecto a la medicina oriental; en cierto modo algunas cosas se compartían. Uno de los médicos del Hospital, el Dr. Wo Chen lo había invitado a la pequeña granja de sus padres, en dónde éstos criaban animales. Si bien vivían con simpleza, daba gusto ver con el esmero que cuidaban gran cantidad de gallinas, cerdos, conejos y patos. Su casa estaba ubicada a la vera del mar y al atardecer se veían las aves volver a sus nidos, **probablemente luego de largas migraciones**. Fue particularmente hermoso la última tarde donde una gran bandada casi oscureció el cielo, ubicándose en un peñón o islote cercano a la costa.

El Dr. Wo Chen le comentó que esas aves migratorias venían cada año en la misma época y que a muchos granjeros no les agradaba porque solían acercarse a los sembradíos produciendo estragos en las cosechas de verano, especialmente la de maíz y arroz.

Los días pasaban lentos en el hospital, aun con la cantidad enorme de personas que se atendían diariamente. La tradicional tranquilidad oriental no lograba contagiarlo, más bien

lo exasperaba ver las salas de espera llenas, pero nadie se mostraba enojado, ni médicos ni pacientes. Ciertamente tendría algo más que medicina oriental que aprender.

En pleno verano, uno de los hijos del Dr. Wo Chen es internado en el hospital. No podían controlarle la fiebre, no dejaba de toser y se quejaba de fuertes dolores de cabeza. Fue entonces cuando solicitó una **inmunofluorescencia directa del aspirado nasofaríngeo para virus influenza A/B/C, virus respiratorio sincitial y virus parainfluenza**.

¡Qué sorpresa cuando el resultado de la inmunofluorescencia dio negativo!

Pregunta 1

A los pocos días varios granjeros, incluyendo al padre del Dr. Wo Chen tuvieron que ser hospitalizados con los mismos síntomas.

Al cabo de 15 días el hospital estaba con sus camas llenas de pacientes afiebrados, con tos y los más débiles muriendo de neumonía. La medicina se mostraba ineficiente con este aparente brote que parecía expandirse como una mancha de aceite.

-Esta enfermedad nos ha encontrado a todos indefensos.- le comenta el Dr. Wo Chen después de tantos días con pocas horas de sueño y con sombras oscuras bajo sus ojos.

Ud se queda solo, mirando su pequeño diario de viaje en el que ha registrado cada una de sus experiencias y mientras lee, comienza a comprender algo de lo que pudo haber sucedido.



Preguntas1: ¿Puede explicar el resultado negativo de la inmunofluorescencia?

Pregunta 2 ¿Cuál es su interpretación de esta historia y qué habrá cambiado en el virus?

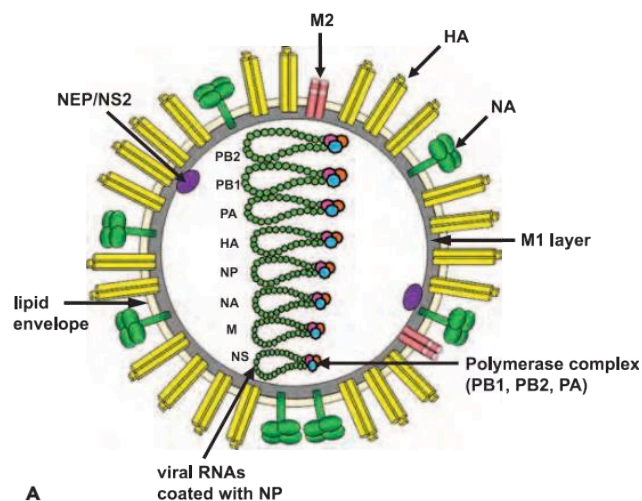


Ud. está asistiendo al inicio de la pandemia en el verano de 1968 en el sur de Asia. El virus influenza H2N2 que circulaba desde el año 1957 estaba siendo desplazado en su circulación por un nuevo virus. Un nuevo virus influenza denominado H3N2, comienza a hacer estragos. Este virus contenía una HA aviaria del subtipo H3 que poseía menos del 30% de homología con su predecesor la proteína H2. Además del genoma H3, el virus poseía una secuencia nueva de origen aviario: la nucleoproteína PB1.

Sin embargo la proteína N2 era similar, quizás ello le permitía a los individuos que poseían anticuerpos para N2, moderar la severidad del desenlace.

Las pandemias por virus influenza se originan por al menos dos mecanismos: a. La recombinación entre una cepa de influenza animal y otra de influenza humano, b. la directa transmisión y adaptación del virus animal en el huésped humano.

Las cepas pandémicas que emergieron fueron: la influenza española de 1918 (H1N1), la influenza asiática de 1957 (H2N2), y la influenza Hong Kong de 1968 (H3N2, en donde esta situada esta actividad) y la H1N1 en el año 2009, las que se diseminaron rápidamente por el mundo.



Esquema de la estructura del virus influenza en donde se observan las dos proteínas principales con forma de espícula en la envoltura viral, la HA y la NA

HA: hemoaglutinina (H) proteína que permite la adherencia y fusión del virus a células hospederas. Los anticuerpos para HA son los más importantes en la neutralización viral. Aún cuando la respuesta inmune se genera también contra la NA, M y NP.

NA: neuraminidasa (N): (i) remueve al ácido siálico de la capa de mucina del tracto respiratorio facilitando la adherencia del virus al receptor celular en la superficie de las células epiteliales; así como a (ii) la liberación posterior al ingreso por fusión de la HA en la célula infectada.

M1: proteína de matriz que se encuentra debajo de la envoltura nuclear.

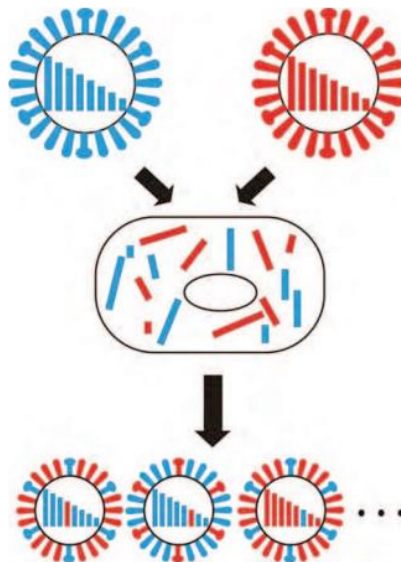
M2: proteína que se inserta en la membrana del virus con función de canal iónico.

NEP/NS2: proteína de transporte nuclear.

PB1, PB2 y PA: Complejo de nucleoproteínas que rodean al RNA viral segmentado. Este RNA corresponde a 8 cadenas helicoidales rodeadas por proteínas.

Las variaciones menores están originadas por mutaciones puntuales del RNA viral, que originan cambios en las secuencias de aminoácidos de las glucoproteínas hemoaglutinina y/o neuraminidasa. Estas variaciones menores ocurren en los virus Influenza A, B y C. Las **variaciones mayores**, descritas únicamente para el Virus Influenza A, consisten en alteraciones drásticas de las proteínas de la superficie viral. Un mecanismo probable para

este cambio es el entrecruzamiento o reordenamiento genético entre Virus Influenza A humano y otro Virus Influenza A no humano como se observa en la figura siguiente.



Variaciones mayores en virus influenza A. Se puede generar cuando dos tipos distintos de Influenza A coinfectan a una célula; de este modo se pueden generar diversos genotipos, en virtud de la recombinación de su ARN segmentado.

LECTURA DE UNA PANDEMIA ACTUAL



Escenario del COVID-19 e iniciativas en desarrollo¹

Jorge V Pavan, Ariel Depetris y Silvia V Nates

Instituto de Virología "Dr JM Vanella". Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Córdoba

Durante el mes de diciembre del 2019, un grupo de pacientes con neumonía de etiología desconocida emergía en Wuhan, China. Un nuevo coronavirus fue identificado como el agente etiológico y la nueva patología fue denominada COVID-19 (coronavirus 2019) por la OMS. En base a estudios filogenéticos, el Comité Internacional de Taxonomía viral, por su similitud con el coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV) denominó al virus emergente SARS-CoV-2, el que rápidamente se diseminó en el mundo. La OMS declaró la pandemia el 11 de marzo del 2020.

SARS-CoV-2 es un nuevo miembro de la familia *Coronaviridae*, que además incluye a numerosos coronavirus causales de infecciones leves del tracto respiratorio en humanos, así como otros coronavirus que infectan mamíferos como ratas, perros, gatos, murciélagos, civetas, camélidos y aves. En este último grupo dan lugar a infecciones respiratorias, entéricas, hepatitis e infección del sistema nervioso central. Las infecciones en estos hospederos pueden, mediante un salto de especie, emerger como patógenos en humanos. Ejemplos de estas situaciones fueron el virus SARS-CoV (Síndrome Respiratorio Agudo

¹ Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba. 2020 May 29;77(2):59-60.
doi: 10.31053/1853.0605.v77.n2.28784

Severo) que emergió en la provincia de Guangdong, China, en 2002 y en el 2012 MERS-CoV en Arabia Saudita.

SARS-CoV-2 es un virus de origen zoonótico que se transmitió a humanos a partir de diferentes escenarios o combinación de estos tales como: (i) selección natural en el hospedero animal antes de su diseminación a humanos (ii) la presencia de un segundo hospedero no humano en su selección o bien (iii) que la selección humana ocurrió después de la transmisión zoonótica. Según estudios filogenéticos su hospedero original pudo ser el murciélago (coronavirus RaTG13), debido a que entre coronavirus de murciélagos y SARS-CoV-2 hay una homología de ácidos nucleicos del 93,1%. Por otra parte, SARS-CoV-2 tiene una homología del 79% con SARS-CoV y del 50% con MERS-CoV, lo que revela estrechas similitudes. Tan es así que SARS-CoV-2 y SARS-CoV comparten el mismo receptor celular ACE2 (enzima convertidora de Angiotensina 2) mientras que MERS-CoV utiliza el CD26. Análisis estructurales por criomicroscopía electrónica demostraron que SARS-CoV-2 posee entre 10 a 20 veces mayor afinidad para ACE2 que SARS-CoV, lo que podría sugerir su mayor capacidad infectiva.

El principal modo de transmisión de SARS-CoV-2 es la vía respiratoria de persona a persona, con un número reproductivo básico (R_0) entre 2 y 3,5, lo que señalaría que un individuo infectado podría transmitir la enfermedad a dos o tres susceptibles. El R_0 refleja la capacidad de diseminación y la evolución de la epidemia en el tiempo según las estrategias de contención y las áreas geográficas. Lo importante es que cuando es menor a 1 la epidemia está en proceso de control y cuando es mayor a 1 refleja crecimiento. La vía conjuntival y el contacto con mucosas es otro mecanismo de transmisión, así como el contacto con fomites contaminados con secreciones respiratorias. Finalmente, el virus se transmitiría también por la vía fecal-oral. SARS-CoV-2 tendría una mayor estabilidad que SARS-CoV tanto en aerosoles (donde permanecería viable por horas) como en superficies (horas o días según el tipo de superficie). Lo referido, da cuenta de la alta transmisibilidad del virus, lo que queda ejemplificado por su alta incidencia en infecciones nosocomiales, en geriátricos y en barrios populares densamente poblados y con precarias condiciones de vida.

La patogénesis viral no está del todo esclarecida. El virus infecta las mucosas, en particular la nasal y laríngea y realiza una fase virémica que le permite acceder a diferentes tejidos y órganos, de manera particular a las células que expresan ACE2, en alvéolos pulmonares, vasos sanguíneos, corazón, riñones y tracto digestivo. En su patogénesis involucra una severa inflamación de los alvéolos pulmonares, relacionada con una inapropiada respuesta inmune y una síntesis aumentada de citoquinas; lo que conduciría a daño tisular local y sistémico.

El período de incubación es entre 2 a 10 días aún cuando puede ser más prolongado y llegar a 24 días. Una vez establecidos los síntomas la carga viral es alta y desciende a los 20 días, aun cuando se ha detectado la excreción viral por períodos más prolongados. El período sintomático puede incluir, fiebre, tos, anosmia, disgeusia, disnea, fatiga, neumonía atípica y avanzar a un síndrome de dificultad respiratoria severa y falla multiorgánica. En el proceso del conocimiento de la clínica se han incorporado síntomas tales como diarrea y manifestaciones cutáneas mayoritariamente asociadas a casos leves. Recientemente se han incorporado las dificultades en el habla y en el movimiento corporal así como un síndrome similar al de Kawasaki² en niños. Además, se ha señalado el potencial neuroinvasivo de SARS-CoV-2, similar a MERS-CoV, que podría acceder por vía hematógena o linfática produciendo patología neurológica.

La pandemia de COVID-2 ha modificado la vida cotidiana en el mundo, enfrentándonos al desafío del aislamiento social en cuarentena, con cambios drásticos en nuestras relaciones sociales y condiciones laborales. Acompañando esta situación, los medios de comunicación han generado una enorme difusión a la comunidad de conceptos virológicos, epidemiológicos y de prevención de la infección. Con esta información, la población general hoy conoce que es un virus, sus vías de transmisión y fuentes de infección, conceptos hasta hace 3 meses atrás, ajenos al conocimiento e interés público. Respecto a medidas de prevención ya son conductas aprendidas que el uso de tapaboca, lavado de manos y distanciamiento social son las medidas individuales disponibles para disminuir el riesgo de

² La enfermedad de Kawasaki es una vasculitis sistémica de etiología desconocida que afecta principalmente a niños menores de 5 años

infección viral, lo que va a impactar sin dudas también en la disminución de infecciones respiratorias y gastrointestinales causadas por otros agentes etiológicos. Junto a este rápido aprendizaje de la biología del virus, se ha visibilizado el aporte de la ciencia y tecnología argentina, recibiendo la sociedad respuestas tales como el desarrollo nacional de tests diagnósticos. Uno de ellos está diseñado para detección de genoma del coronavirus SARS-CoV-2 a través de la técnica de amplificación isotérmica del ácido nucleico viral y el otro, para detección de anticuerpos específicos anti SARS-CoV-2 inducidos por la infección. Sin duda, logros nacionales que fortalecen la capacidad diagnóstica de esta virosis.

En este escenario pandémico, fuertemente enmarcado en desafíos de respuestas, el Instituto de Virología “Dr. J.M.Vanella” (InViV), centro dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Córdoba), ha orientado las actividades institucionales de diagnóstico virológico e investigación al estudio de este virus emergente, actividades desarrolladas por docentes-investigadores formados en el área de virología.

Respecto al diagnóstico de la infección viral, personal del InViV colabora con el Laboratorio Central del Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba en el procesamiento de muestras biológicas para la confirmación por laboratorio de casos sospechosos de infección por SARS-CoV-2. Esto se realiza a través de la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa en tiempo real. Esta actividad posibilita reforzar la capacidad diagnóstica de casos confirmados en la Provincia de Córdoba.

Respecto al desarrollo de proyectos de investigación, el Instituto de Virología ha desarrollado y estandarizado una técnica que permite la detección y cuantificación de anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus SARS-CoV-2 en la sangre de quienes han cursado la enfermedad y se han recuperado. Una vez identificados los individuos, son invitados a donar voluntariamente sus plasmas, los que son recuperados en el Centro Provincial de Plasmaféresis Córdoba, inaugurado por el Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba el día 21 de Mayo del corriente año, en instalaciones del Hospital San Roque de la Ciudad de Córdoba. Los plasmas obtenidos se utilizan para ser transfundidos a individuos que están cursando la enfermedad por SARS-CoV-2 para ayudar a su recuperación y también para la obtención de inmunoglobulina hiperinmune anti SARS-CoViD-2. Los

anticuerpos que se transfunden se denominan anticuerpos neutralizantes porque tienen la capacidad de unirse al virus y “neutralizarlo” de tal manera de impedir o limitar la infección y daño en nuevas células en el paciente infectado. Esta estrategia de transferir inmunidad pasiva ha sido efectiva para el tratamiento de infecciones producidas por otros coronavirus primos-hermanos del SARS-CoV-2, como son los coronavirus SARS-CoV-1 y MERS-CoV. Además, el tratamiento con plasma inmune se ha utilizado con éxito en nuestro país en individuos infectados con el virus de la Fiebre Hemorrágica Argentina, permitiendo salvar muchas vidas. El tratamiento de inmunidad pasiva en enfermos con SARS-CoV-2 ha sido autorizado por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos y aplicado en grupos reducidos de pacientes en distintas partes del mundo, con buenos resultados de recuperación de la enfermedad. Este proyecto se enmarca en un convenio de cooperación firmado entre el Instituto de Virología de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Córdoba) y el Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba (Convenio Nº 07, de fecha 8 de Abril del 2020)

Otro proyecto que se lleva adelante se refiere al monitoreo ambiental de SARS-CoV-2 en aguas cloacales de la Ciudad de Córdoba. Las aguas residuales constituyen una muestra poblacional de la excreción viral, particularmente en áreas geográficas con alta cobertura de red cloacal, como es la Ciudad de Córdoba (colecta el 61% de las excretas que llegan a la planta depuradora de aguas cloacales de Bajo Grande). La detección y cuantificación genómica de SARS-CoV-2 en aguas cloacales (suma de la excreción viral de personas sintomáticas y asintomáticas) refleja la magnitud de circulación del virus en la comunidad y permite, además, por estudios de secuenciación génica, conocer las cepas virales que circulan en esa comunidad. Es de destacar que la presencia de virus en aguas residuales tiene impacto sobre otras matrices ambientales. Así, debido a la fragilidad del sistema de eliminación de excretas en nuestro medio, con frecuencia las aguas crudas o mal tratadas alcanzan cursos de aguas superficiales, que son utilizados como fuente de abastecimiento de agua, con fines recreacionales y/o para riego en sistemas productivos de verduras. Así se abren nuevos escenarios ambientales con potencialidad de transmisión viral a la población expuesta. Esto refleja la importancia del estudio de aguas residuales como fuente

de información de la circulación del virus en la comunidad y como potencial fuente de contaminación de aguas superficiales y alimentos.

La presente pandemia se ha instalado como una crisis por su impacto sanitario y económico, por su complejidad y dinámica, por los desafíos a la acción científico-técnica y por la necesidad de definiciones de políticas públicas. Como toda crisis, tiene también su espacio de oportunidad, el que desde el Instituto de Virología asumimos con el desafío del desarrollo de proyectos de investigación y con reforzar lazos de cooperación con el Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, poniendo al servicio de la Salud Pública recursos humanos y desarrollos metodológicos generados desde el área de virología.

Pregunta 1

Diagnóstico virológico

<https://www.cba.gov.ar/wp-content/uploads/2020/06/Protocolo-COVID-19-16-DE-JUNIO.pdf>

<https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus-COVID-19/definicion-de-caso>

Métodos directos: técnicas moleculares para la detección del genoma viral mediante real time PCR (rt-PCR)³ en muestras de hisopado faríngeo.

La rt-PCR es la metodología de elección para diagnóstico de SARS-CoV-2. Una prueba positiva por rt-PCR indica que la persona está cursando una infección actual. Ante un resultado negativo por rt-PCR y con nexo epidemiológico se sugiere repetir la PCR en 14 días al momento del alta del aislamiento preventivo.

Métodos indirectos: test serológicos para la detección de anticuerpos tipo Ig M e Ig G anti-SARS-CoV-2.

³ La PCR en tiempo real (rt-PCR) es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. La detección puede ser a nivel cualitativo (presencia o ausencia) o cuantitativo (carga viral).

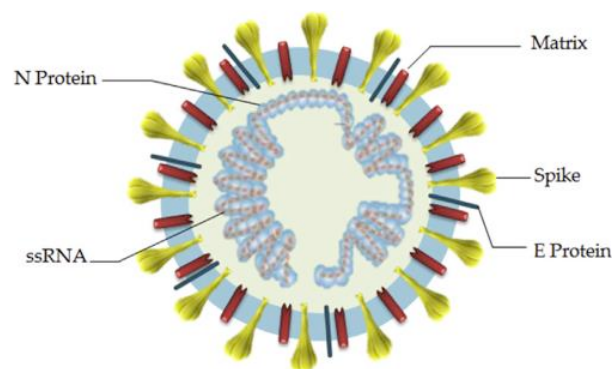
Una prueba serológica reactiva puede indicar una exposición previa a COVID-19 o una infección con un virus relacionado de la misma familia. Un resultado no reactivo, no descarta la infección por SARS-CoV-2.

La metodología de referencia es la seroneutralización.

La utilidad de estas es para:

- Identificación de personas que pueden haber estado expuestas al virus o que se han recuperado de la infección por SARS-CoV-2,
- Identificación de personas potenciales donantes de plasma, con el objetivo de medir luego el título de anticuerpos neutralizantes.
- Estudios epidemiológicos

El virus SARS-CoV-2: estructura viral, respuesta inmune y estrategias posibles para el desarrollo de una vacuna



Estructura de un Coronavirus

SARS-CoV-2, pertenece a la Familia *Coronaviridae*, tiene cuatro glicoproteínas estructurales importantes: la denominada S (de “spyke”, espiga), proteína involucrada en la interacción con el receptor ACE2 y entrada posterior a la célula hospedera por fusión de membranas, la E que es una pequeña proteína de envoltura, la glicoproteína de matriz M, estructura proteica más abundante que da la forma a la partícula viral y la glicoproteína de nucleocápside N, que se une al ARN viral; de polaridad positiva y cadena simple.

La activación del sistema inmune se produce luego que los receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (TLR 3 y TLR 7, entre otros) reconocen el ARN viral e inducen la síntesis de citoquinas activando el sistema inmune innato y adaptativo.

Los anticuerpos que neutralizan al virus están dirigidos hacia diferentes proteínas de envoltura, en particular hacia la proteína S, proteína blanco para una vacuna. En este sentido al desarrollar una vacuna se debe primero identificar la proteína viral que induce la mayor cantidad de anticuerpos capaces de generar una importante respuesta inmune, en particular los capaces de neutralizar al agente.

A la clásica metodología de producción de vacunas basada en un procedimiento empírico que seguía la idea de “aís-la-inactiva o atenúa-inyecta” se han añadido nuevas estrategias. En este sentido hay diferentes tipos de vacunas en desarrollo para SARS-CoV-2.

Tipos de vacunas en desarrollo:

1. Vacunas que utilizan vectores virales como adenovirus, que incluyen un ADN codificante hacia las proteínas inmunogénicas virales, cuya expresión en el hospedero induce una respuesta inmune. En otros términos, consisten en la introducción de genes en vectores vivos, es decir microorganismos no patógenos para el hombre de forma natural, o tras someterlos a un proceso de atenuación, que ulteriormente inoculados aporten las proteínas virales inmunogénicas.
2. Vacunas que contienen el ADN viral o el ARNm viral autoamplificante, que codifica las proteínas inmunogénicas virales.
3. Vacunas asociadas a subunidades proteicas basadas en péptidos sintéticos o proteínas recombinantes virales.
4. Vacunas a virus inactivado, ejemplos de la vacunas más utilizadas históricamente.
5. Finalmente, las vacunas similares al virus (virus-like-particle, VLP), cuyas partículas contienen las proteínas virales estructurales pero no al genoma viral. Un ejemplo de éstas es la vacuna contra el virus papiloma humano.

Fases de desarrollo de una vacuna (extraído de OMS, OPS)

El desarrollo de una vacuna tiene diferentes fases. Los diversos estudios de investigación tienen como prioridad la seguridad de uso de una vacuna, seguida de su eficacia. Los estudios son realizados en fases: fase preclínica y fases I, II, III, y IV.

- **Fase preclínica:** Resultados experimentales sobre la eficacia y tolerancia en modelo animal apoyan su posterior investigación en humanos. Los estudios preclínicos usan sistemas de cultivos de tejidos o cultivos de células y pruebas en animales, que pueden ser ratones o monos, para evaluar la seguridad de la vacuna candidata y su capacidad inmunógena, o capacidad de provocar una respuesta inmunológica.

- **Fase I:** Usualmente testa una nueva vacuna en etapa experimental en un pequeño número de humanos, en general menos de 100 adultos con el objetivo de evaluar inicialmente su **seguridad y sus efectos biológicos, incluida la inmunogenicidad.**

- **Fase II:** Testa una vacuna que fue considerada segura en la Fase I y que necesita un grupo más grande de humanos (generalmente entre 200 y 500) para monitorear seguridad y también los ensayos que determinarán la **eficacia** de la vacuna. Las metas de las pruebas de fase II son estudiar la vacuna candidata en cuanto a su **seguridad, capacidad inmunógena, dosis propuestas y método de administración.**

- **Fase III:** Tiene como objetivo evaluar de forma más completa la seguridad y la eficacia en la prevención de las enfermedades e involucran una mayor cantidad de voluntarios que participan en un estudio multicéntrico adecuadamente controlado. Pueden incluir cientos a miles de humanos en un país o varios países. Las pruebas de fase III son aleatorias y doble ciego. Involucran la vacuna experimental que se prueba contra un placebo (el placebo puede ser una solución salina, una vacuna para otra enfermedad o alguna otra sustancia). En general es el paso anterior a la aprobación de una vacuna.

- **Fase IV:** Son los estudios que ocurren después de la aprobación de una vacuna en uno o varios países. Estos estudios tienen como objetivo evaluar como la vacuna funciona en el “mundo real”. En general son los estudios de **efectividad** y también siguen monitoreando los eventos adversos.

En algunas oportunidades las fases pueden fusionarse: estudio Fase I/II, cuando comprenden los componentes respectivos.



Pregunta 1: ¿Cuál es la importancia de la detección de anticuerpos neutralizantes para SARS-CoV-2?

Pregunta 2: ¿Hacia que estructura viral estarían dirigidos, en particular, dichos anticuerpos?

Pregunta 3: Redacte el o los resultados de laboratorio (similares a los previamente vistos en las actividades ubicadas al inicio del taller) que indicarían que un sujeto actualmente está infectado por SARS-CoV-2.