

Directrices de Laboratorio para la Detección y el Diagnóstico de la Infección por virus Usutu

1.º de septiembre de 2023

Contexto y consideraciones generales

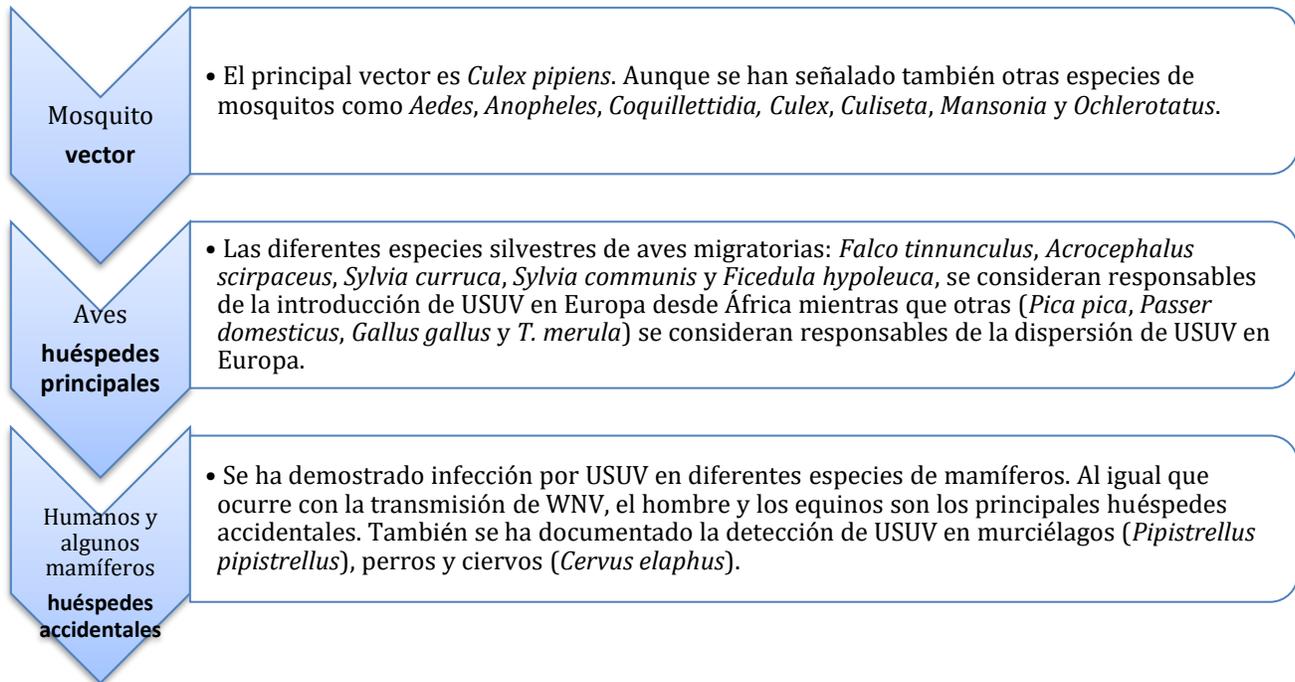
El virus Usutu (USUV) es un virus transmitido por mosquitos que pertenece al serocomplejo del virus de la encefalitis japonesa, género *Orthoflavivirus* (ex-*Flavivirus*), familia *Flaviviridae*, grupo IV de la clasificación de Baltimore (genoma viral: ARN monocatenario positivo). Se postula que de un flavivirus ancestral con un ciclo natural que incluía aves y mosquitos evolucionaron las distintas especies del serocomplejo conocidas actualmente como el virus del Nilo Occidental (WNV) y el USUV en África, Asia y Europa, el virus Kunjin y el virus de la encefalitis de Murray en Australia, el virus de la encefalitis japonesa (JEV) en Asia, y el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV) en las Américas.

USUV se aisló por primera vez en 1959 en un mosquito *Culex spp.* en Sudáfrica en las cercanías del río Usutu. Desde entonces el virus se ha detectado en varios países africanos como Senegal, Nigeria, Uganda, Burkina Faso, Côte d'Ivoire y Marruecos. La primera infección humana se describió en la República centroafricana en 1981 en un paciente con fiebre y exantema. Hasta principios de los años 2000, el virus no se había asociado con enfermedad grave/mortal en animales, ni en humanos y se consideraba restringido a las zonas tropicales y subtropicales de África.

En Europa, USUV fue detectado por primera vez de manera retrospectiva en un brote en mirlos (*Turdus merula*) en la Toscana italiana en 1996, causando alta mortalidad. Cinco años después, en 2001, USUV fue responsable nuevamente de mortalidad en mirlos, esta vez en los alrededores de Viena, Austria. Actualmente USUV ha sido encontrado recurrentemente en varios países de Europa, sugiriendo una persistencia del ciclo de transmisión en las áreas afectadas. Asimismo, en Europa se ha observado con frecuencia la co-circulación de USUV y WNV. Estudios de seroprevalencia en donantes de sangre sanos en Alemania e Italia reportan una prevalencia de anticuerpos anti-USUV del 0.02% and 1.1%. A la fecha, no se han detectado infecciones fuera de África y de Europa ni en animales ni en humanos.

Huésped, vector y ciclo de vida

El ciclo de vida del USUV es similar al de otros flavivirus que pertenecen al serocomplejo del JEV, como WNV. El virus circula en un ciclo enzoótico que involucra a los mosquitos como vectores (principalmente *Culex pipiens*) y las aves como principal huésped amplificador. A través de los vectores, USUV también puede infectar a los humanos, los equinos y otros mamíferos, que se consideran huéspedes accidentales.



Presentación clínica

A la fecha se han descrito alrededor de 100 casos de infección por USUV en humanos, la gran mayoría en Europa. Los signos y síntomas reportados pueden ir desde fiebre, erupción cutánea y dolor de cabeza leve, hasta manifestaciones neurológicas graves, en particular en pacientes inmunosuprimidos. Las manifestaciones neurológicas más frecuentes son la meningoencefalitis, la encefalitis y la meningitis, aunque también se han identificado casos de parálisis flácida. La infección por USUV puede cursar de forma asintomática y se ha descrito en donantes de sangre sanos en Alemania, Austria e Italia.

Diagnóstico por laboratorio

El diagnóstico de USUV requiere de la confirmación por técnicas de laboratorio, puesto que el cuadro clínico no es específico. En los países donde el USUV circula, las infecciones en humanos deben ser sospechadas en pacientes con fiebre y síntomas neurológicos con una etiología desconocida. Entre los métodos de laboratorio se pueden distinguir los métodos de diagnóstico virológicos (directos) por amplificación del genoma del virus o cultivo celular, y los métodos serológicos (indirectos), consistentes en detectar anticuerpos producidos contra el virus. En general, las muestras para el diagnóstico son el suero y el líquido cefalorraquídeo (LCR). El LCR se utiliza solamente en casos con síntomas neurológicos y por indicación clínica.

Bioseguridad

Las muestras biológicas frescas, cualquiera sea su tipo, deberán considerarse potencialmente infecciosas. Las muestras deben ser procesadas y manipuladas únicamente por profesionales entrenados después de una evaluación local del riesgo considerando todas las indicaciones de bioseguridad y equipo de protección personal apropiado. Todo proceso que incluya la manipulación de muestras debe realizarse en cabinas de bioseguridad de clase II certificadas. Lo anterior incluye la etapa de lisis realizada durante la extracción de ARN. Las muestras obtenidas de la lisis se consideran no infecciosas. La manipulación de ARN extraído no necesita llevarse a cabo en cabinas de bioseguridad. Asimismo, se deberán tomar todas las precauciones necesarias para evitar la exposición percutánea.

Métodos virológicos

La detección del ARN viral se puede realizar en muestras de suero y de LCR por **RT-PCR** en tiempo real o punto final haciendo uso de iniciadores (y sondas) específicos para USUV. También pueden usarse protocolos genéricos (pan-flavivirus) seguidos de secuenciación nucleotídica. En algunos casos se ha descrito la presencia del ARN viral en orina.

El **aislamiento viral** se lleva a cabo con los mismos tipos de muestras que la RT-PCR. Se utilizan líneas celulares de mamíferos (por ejemplo, células Vero) al igual que células de mosquitos (por ejemplo, células C6/36). En general, el aislamiento viral no se aplica de manera rutinaria ni es un requisito para la confirmación del diagnóstico. La complejidad técnica, los costos, así como la necesidad de identificar los virus aislados por RT-PCR o por inmunofluorescencia, limitan el uso y la oportunidad temporal del diagnóstico mediante aislamiento viral.

Un resultado positivo por RT-PCR (o aislamiento viral) **confirma** la infección. Aunque no se ha descrito totalmente la dinámica de la viremia en las infecciones por USUV y por analogía con virus similares como WNV, es probable que esta sea baja y de corta duración (Figura 1). En particular, si el caso se detecta en la fase neurológica es probable que el virus ya no esté presente en la sangre. Por lo tanto, un resultado negativo **no descarta** la infección y, ante la sospecha clínica y epidemiológica, se deben usar métodos serológicos (Figura 2).

Métodos serológicos

La detección de anticuerpos de tipo IgM o IgG se realiza por **ELISA** o **inmunofluorescencia** usando metodologías *in house*. La detección se puede realizar tanto en suero como en LCR. La cinética de producción de anticuerpos no se ha descrito totalmente. Sin embargo, por analogía con WNV, es probable que la detección de anticuerpos se pueda realizar tempranamente después del inicio de síntomas, en particular neurológicos (Figura 1).

Debido a la potencial reactividad cruzada entre USUV y otros flavivirus (en particular SLEV, WNV y otros del serocomplejo de JEV), un resultado positivo para IgM debe ser confirmado por ensayos de neutralización como la **prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT)** o la **microneutralización**. Como mínimo, y en función de la situación epidemiológica del área probable de infección del caso, se recomienda detectar en paralelo los anticuerpos neutralizantes contra USUV, SLEV y WNV (Figura 2).

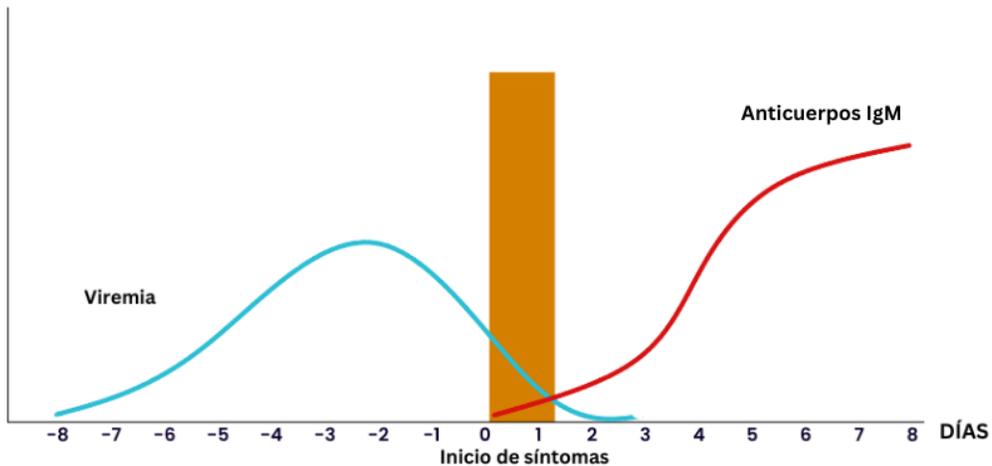
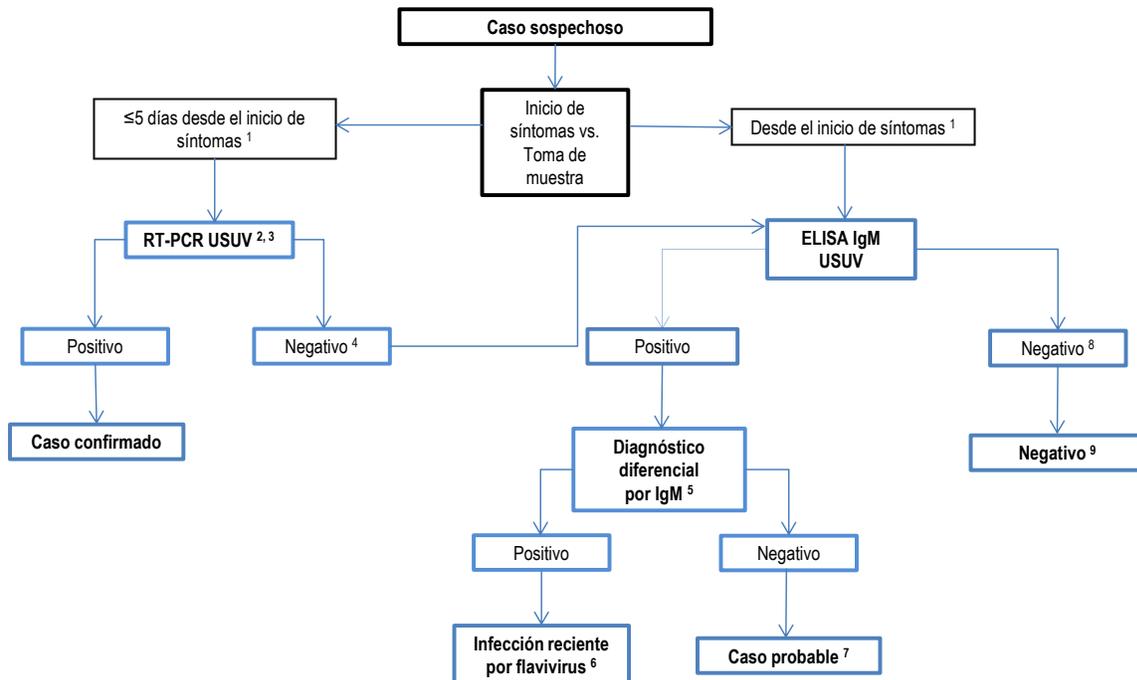


Figura 1. Dinámica de la infección por el virus Usutu en base a la información disponible y al comportamiento de virus similares como el virus del Nilo Occidental.

Tomando en cuenta estos elementos, en ausencia de confirmación por métodos virológicos, el análisis de los resultados serológicos debe realizarse a la luz de la información clínica y epidemiológica. En general, se considera que la detección de anticuerpos específicos en LCR (confirmada por neutralización) **confirma** la infección por USUV en un caso con manifestaciones neurológicas. Los casos con sospecha clínica y epidemiológica, con detección de anticuerpos IgM específicos (teniendo en cuenta el diagnóstico diferencial por IgM) pero sin confirmación por neutralización pueden considerarse como **casos probables**.

Algoritmo de laboratorio



¹ El número de días es indicativo ya que no se ha descrito la dinámica del ARN viral o de la producción de anticuerpos de forma detallada..

² Realizar la RT-PCR en suero y, en casos con presentación neurológica, en LCR. La presencia del virus en LCR puede ser más prolongada que en suero.

³ Considerar otros patógenos dependiendo de la situación epidemiológica, p.ej., SLEV y WNV.

⁴ Ante la sospecha clínica y epidemiológica, y considerando que la viremia puede ser baja y de corta duración, usar métodos serológicos.

⁵ Considerar en particular WNV y SLEV, así como otros flavivirus dependiendo de la situación epidemiológica de la zona / país.

⁶ En los casos de reactividad cruzada, los resultados de ELISA IgM no permiten confirmar el agente etiológico. Sin embargo, este resultado no descarta la infección por USUV. Deben usarse criterios clínicos y epidemiológicos adicionales para la interpretación final del caso. También se puede considerar realizar neutralización en un laboratorio de referencia para analizar las muestras con reactividad cruzada.

⁷ Considerar realizar neutralización en un laboratorio de referencia para confirmar el caso.

⁸ Si la muestra se tomó con menos de 5 días desde el inicio de síntomas, solicitar la toma de una segunda muestra y repetir el ELISA IgM.

⁹ Investigar los casos y realizar el diagnóstico clínico diferencial.

Figura 2. Algoritmo para confirmación por laboratorio de la infección por el virus Usutu (USUV). LCR: líquido cefalorraquídeo; SLEV: virus de la encefalitis de San Luis; WNV: virus del Nilo Occidental.

Conservación de la muestra

- Mantener refrigerada (2 – 8 °C) si será procesada (o enviada a un laboratorio de referencia) dentro de 48 horas.
- Mantener congelada (-10 a -20 °C) si será procesada después de 48 horas o en un período no mayor de 7 días.
- Mantener congelada (-70 °C o menos) si será procesada más de una semana después de la toma. La muestra se conserva adecuadamente a -70 °C durante periodos prolongados de tiempo.
- Se recomienda separar las muestras en al menos dos alícuotas.
- Evitar múltiples ciclos de congelación – descongelación.

Envío de la muestra por vía aérea al laboratorio de referencia

- Garantizar la cadena de frío con hielo seco preferiblemente o con geles refrigerantes. Utilizar siempre triple empaque.
- Enviar las muestras preferentemente dentro de las primeras 48 horas.
- Las muestras originales deben ser empacadas, marcadas, etiquetadas apropiadamente y documentadas como **categoría B**.
- Acompañar el envío con la ficha clínica y epidemiológica completa.

Referencias

Angeloni G, Bertola M, Lazzaro E, Morini M, Masi G, Sinigaglia A, Trevisan M, Gossner CM, Haussig JM, Bakonyi T, Capelli G, Barzon L. Epidemiology, surveillance and diagnosis of Usutu virus infection in the EU/EEA, 2012 to 2021. *Euro Surveill.* 2023 Aug;28(33):2200929. Disponible en:

<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.33.2200929>

Ashraf U, Ye J, Ruan X, Wan S, Zhu B, Cao S. Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses.*

2015 Jan 19;7(1):219-38. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4306835/>

Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, Baldet T, Foulongne V, Simonin Y.

Usutu virus: A new threat? *Epidemiol Infect.* 2019 Jan;147: e232. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6625183/>

Del Amo J, Sotelo E, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Llorente F, Agüero M, Jiménez-Clavero MA. A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *J Virol Methods.* 2013 May;189(2):321-7. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166093413000682>

Nikolay B, Diallo M, Boye CS, Sall AA. Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011

Nov;11(11):1417-23. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2011.0631>

Nikolay B, Weidmann M, Dupressoir A, Faye O, Boye CS, Diallo M, Sall AA. Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe.

J Virol Methods. 2014 Mar; 197:51-4. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093413003868>

OPS. Laboratory Diagnosis of West Nile Virus Encephalitis Virus Infection. Diciembre 2016. Disponible

en: <https://www.paho.org/en/documents/laboratory-diagnosis-west-nile-virus-encephalitis-virus-infection>

Zannoli S, Sambri V. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and

Implications. *Microorganisms.* 2019 Jun 26;7(7):184. Disponible en: [https://www.mdpi.com/2076-](https://www.mdpi.com/2076-2607/7/7/184)

[2607/7/7/184](https://www.mdpi.com/2076-2607/7/7/184)