



Diagnóstico por laboratorio de la infección por Virus Usutu

Septiembre 2019

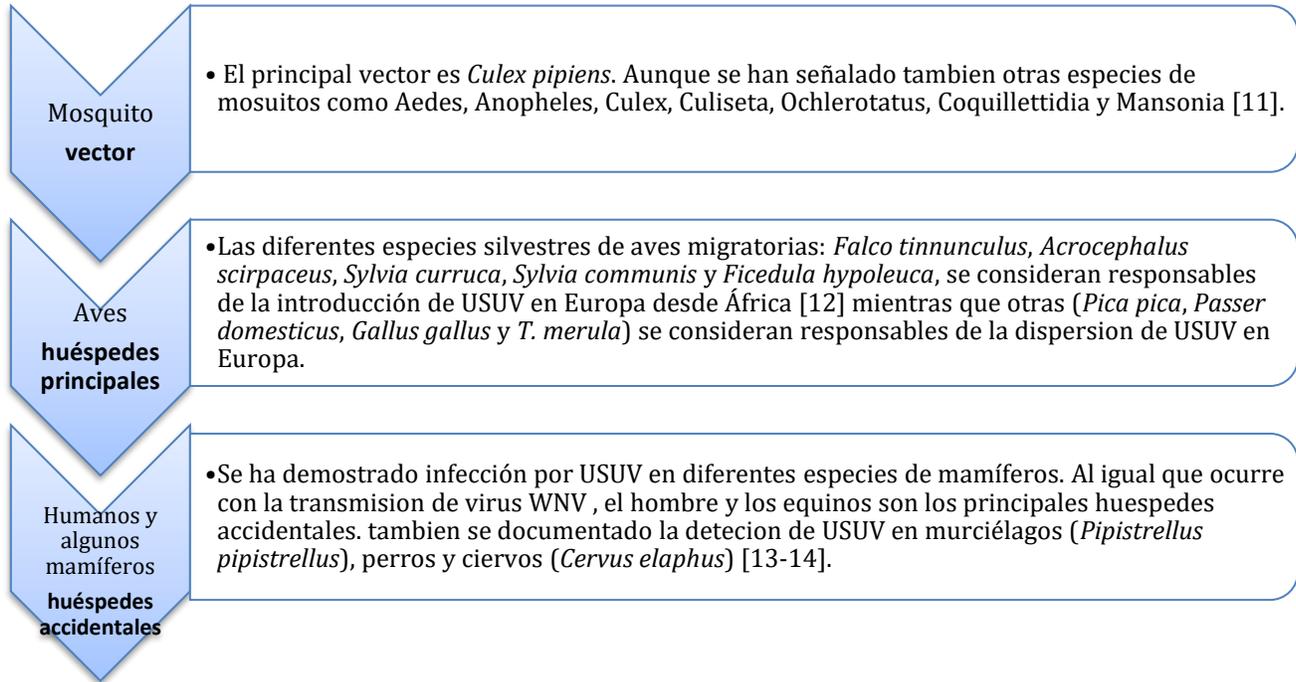
El virus Usutu (USUV) es un virus transmitido por mosquitos que pertenece al serocomplejo encefalitis japonesa, género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Se postula que de un flavivirus ancestral con ciclo natural que incluía aves y mosquitos evolucionaron las distintas especies del complejo conocidas 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 en las Américas.

USUV se aisló por primera vez en 1959 en un mosquito *Culex spp.* en Sudáfrica en 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 un paciente con fiebre y exantema. Hasta principios de la década pasada 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 la Toscana italiana durante en 1996, causando alta mortalidad en mirlos (*Turdus merula*, una especie de ave paseriforme de la familia *Turdidae*). Cinco años después, en 2001, USUV fue el responsable nuevamente de la mortalidad en mirlos, esta vez en los alrededores de Viena, Austria. Actualmente USUV ha sido encontrado recurrentemente durante varios años en Europa, Austria (2001-2006) [1], Hungría (2003-2006) [2], Italia (2009-2016) [3-4-5], España(2006-2009-2012) [6-7,8]y Alemania (2010-2015)[9-10], sugiriendo una persistencia del ciclo de transmisión en las áreas afectadas.



Huésped, vector y ciclo de vida



El ciclo de vida natural del USUV involucra a los mosquitos del género *Culex* como vectores y las aves como principal huésped amplificador. El ciclo USUV es similar al de otros flavivirus que pertenecen al serocomplejo JEV, como ocurre con la transmisión de WNV, en el cual los humanos se consideran huéspedes accidentales [15].

USUV como los demás flavivirus miembros del Complejo de JEV, presenta un genoma ARN de sentido positivo, de unos 11 kb de tamaño. Presentando una similitud en la organización y composición de su genoma con el DENV y el WNV. Con tres proteínas estructurales y cinco no-estructurales. En función de la similitud estructural con los demás miembros de su grupo antigénico, se puede suponer que el USUV tiene un periodo de incubación similar a otros flavivirus como el WNV (2-14 días) [16-17]. El genoma de USUV por tanto también puede ser detectado en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) en la etapa aguda de la enfermedad y los anticuerpos IgM pueden hacerse presentes cinco días después del inicio de los síntomas, en analogía con el conocimiento actual sobre la patogenia de las enfermedades relacionadas con la infección de WNV en humanos.

Presentación Clínica

Aunque la infección por USUV es menos común que la producida por el WNV, la misma ha sido documentada, aunque en principio se creía que la infección era asintomática.[18] y solo se presentaba en individuos inmunocomprometidos, actualmente se sabe que puede causar enfermedad neuroinvasiva. Aunque la casuística de infección por virus USUV aún es escasa, se han documentado 25 casos

que dan cuenta sobre sus síntomas y presentación clínica; de estos, 22 están relacionados a enfermedad neuroinvasiva causada por USUV, todos reportados en Europa. Italia es el país con mayor número de casos reportados (n =15), pero también Croacia, Alemania, Francia y Austria. [19]. USUV también fue descrito recientemente en donantes de sangre sanos en Alemania, Italia y Austria.

Así, los signos y síntomas pueden ir desde fiebre, erupción cutánea y dolor de cabeza leve, hasta manifestaciones más graves. Las manifestaciones neurológicas dependen de qué parte del sistema nervioso está infectada: las meninges (causando meningitis), el parénquima cerebral (encefalitis) o la médula espinal (mielitis). La meningitis aséptica es menos común que la encefalitis. Las presentaciones severas (que a menudo se superponen) incluyen un nivel de conciencia reducido, que puede estar asociado con convulsiones, una parálisis flácida que se asemeja a la de la poliomielitis y trastornos del movimiento parkinsoniano [20].

Diagnóstico por laboratorio

Consideraciones de bioseguridad

Todas las muestras biológicas se consideran potencialmente infecciosas. Todo el personal de laboratorio que entre en contacto con la muestra deberá utilizar los elementos de protección personal adecuados. Asimismo, se recomienda realizar cualquier procedimiento dentro de cabinas de bioseguridad de clase II certificadas, extremando las medidas para evitar accidentes por punción.

El diagnóstico de USUV requiere de la confirmación por técnicas de laboratorio, puesto que el cuadro clínico no es específico. Entre los métodos de laboratorio se pueden distinguir los métodos de diagnóstico directos por amplificación del genoma del virus o cultivo celular, o los métodos indirectos, consistentes en detectar anticuerpos producidos contra el virus.

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.

Debido a la similitud de la estructura del genoma entre USUV y WNV los criterios para el diagnóstico podrían ser similares a los de WNV, para la confirmación del diagnóstico de enfermedad neuroinvasiva la evidencia serológica además de la clínica son necesarios. Debido a un alto nivel de reactividad cruzada entre los flavivirus, las pruebas de neutralización son el estándar de oro de la serología de flavivirus. [21]

- El uso de **RT-PCR** debe ser priorizado para aquellos casos clínicos en los que un rápido y preciso diagnóstico es requerido. Existen metodologías validadas *in house* en tiempo real así como para tiempo final, seguidas de secuenciación.



- **Aislamiento del virus**

Es el estándar de oro para la detección del virus, pero generalmente se ve obstaculizado por la corta duración y los bajos niveles de viremia, por lo tanto, no se aplica de manera rutinaria para el diagnóstico de USUV [22-23].

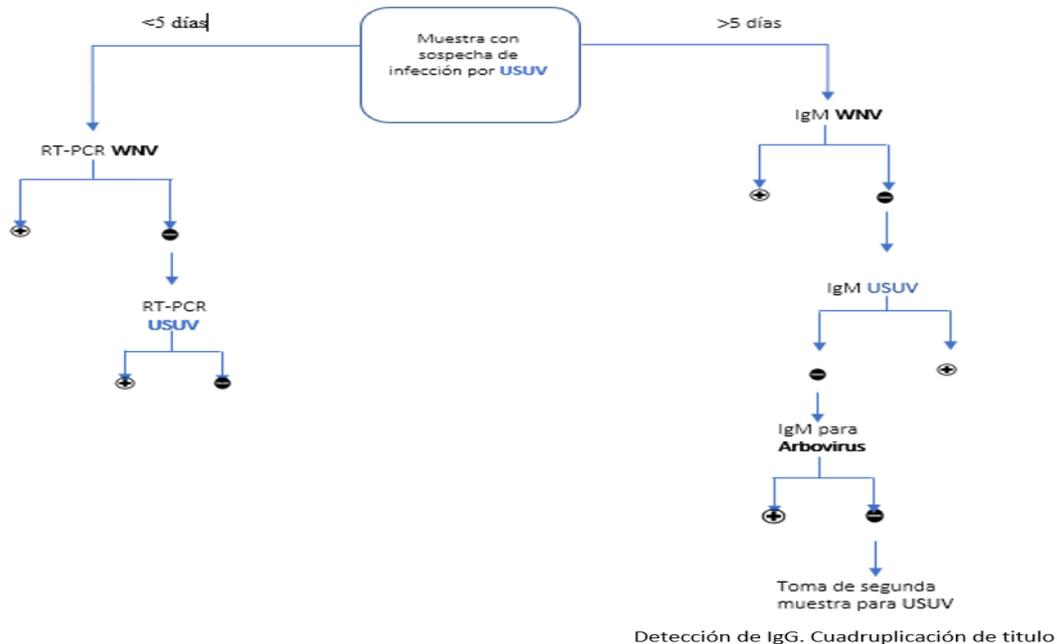
- **Serología**

Por la falta de pruebas específicas para USUV, actualmente se utilizan pruebas de detección de anticuerpos contra el WNV, como las pruebas ELISA con antígenos de WNV o las células infectadas con WNV para detectar anticuerpos de USUV. El diagnóstico serológico de una infección aguda de USUV se lleva a cabo mediante la determinación de anticuerpos IgM específicos de USUV en suero o LCR. Como prueba confirmatoria, se realiza el PRNT. El estándar de oro para la confirmación de anticuerpos específicos de USUV, y la exclusión de anticuerpos contra otros flavivirus, es el PRNT (neutralización por reducción de placas) [24].

Los sueros deben analizarse frente a diferentes virus relacionados y los resultados deben confirmarse posteriormente mediante diferentes ensayos, como el ensayo de inmunofluorescencia, inhibición de la hemaglutinación o, preferiblemente, prueba de neutralización por reducción de placa [25].

Algoritmo para casos sospechosos

Algoritmo para detección de USUV





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 periodo no mayor de 7 días.
- Mantener congelada (-70 °C o menos) si será procesado 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.
- Las muestras de tejido fresco (aproximadamente 1 cm³) pueden ser utilizados para diagnóstico molecular. Congelar a -70 °C y enviar a un laboratorio de referencia en hielo seco. De no ser posible, enviar el tejido fresco en seco con geles refrigerantes. Las muestras de tejido fresco también pueden almacenarse en una solución estabilizadora de ARN y enviarse a temperatura ambiente.
- Para el estudio histopatológico y por inmunohistoquímica, la muestra de tejido (aproximadamente 1 cm³) debe ser conservada en formol tamponado y enviada al laboratorio de patología a temperatura ambiente. Las de tejido hepático y renal son las muestras de elección para histopatología e inmunohistoquímica. Muestras de bazo, cerebro, pulmón, corazón y nódulos linfáticos también pueden ser útiles.

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.
- Los tejidos fijados en formalina se deben empaquetar por separado de los tejidos frescos y las muestras de sangre, ya que la formalina es volátil.



Referencias

1. Meister T, Lussy H, Bakonyi T, Sikutov S, Rudolf I, Vogl W, et al. Serological evidence of continuing high Usutu virus (Flaviviridae) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria. *Vet Microbiol* 2008;127:237-48.
2. Bakonyi T, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Csörgo T, Lussy H, et al. Emergence of Usutu virus in Hungary. *J Clin Microbiol* 2007;45: 3870-4.
3. Manarolla G, Bakonyi T, Gallazzi D, Crosta L, Weissenböck H, Dorrestein GM, et al. Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Vet Microbiol* 2010;141:159-63.
4. Tamba M, Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Albieri A, Sambri V, et al. Detection of Usutu virus within a West Nile virus surveillance program in northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:551-7.
5. Calzolari M, Chiapponi C, Bonilauri P, Lelli D, Baioni L, Barbieri I, et al. Co-circulation of two Usutu virus strains in Northern Italy between 2009 and 2014. *Infect Genet Evol* 2017. S1567-1348: 30105-30113.
6. Vazquez A, Jimenez-Clavero M, Franco L, Donoso-Mantke O, Sambri V, Niedrig M, et al. Usutu virus: potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill* 2011;16. pii: 19935.
7. Busquets N, Alba A, Allepuz A, Aranda C. Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Spain Emer Infect Dis* 2008;14:861-3.
8. Höfle U, Gamino V, de Mera IG, Mangold AJ, Ortíz JA, de la Fuente J. Usutu virus in migratory song thrushes, Spain. *Emerg Infect Dis* 2013; 19:1173-5.
9. Ziegler U, Jöst H, Müller K, Fischer D, Rinder M, Tietze DT, et al. Epidemic spread of Usutu virus in southwest Germany in 2011 to 2013 and monitoring of wild birds for Usutu and West Nile viruses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2015;15:481-8. 10
10. Ziegler U, Fast C, Eiden M, Bock S, Schulze C, Hoepfer D, et al. Evidence for an independent third Usutu virus introduction into Germany. *Vet Microbiol* 2016;192:60-6.



11. Nikolay B. A review of West Nile and Usutu virus cocirculation in Europe: how much do transmission cycles overlap? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2015;109:609-18.
12. Nikolay B, Diallo M, Boye CS, Sall AA. Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:1417-23.
13. Lühken, R., Jöst, H., Cadar, D., Thomas, S. M., Bosch, S., Tannich, E., ... & Schmidt-Chanasit, J. (2017). Distribution of Usutu virus in Germany and its effect on breeding bird populations. *Emerging infectious diseases*, 23(12), 1994.
14. García-Bocanegra I, Paniagua J, Gutiérrez-Guzmán AV, Lecollinet S, Boadella M, Arenas-Montes A, et al. Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants. *BMC Vet Res* 2016;12:249.
15. Ashraf U, Ye J, Ruan X, Wan S, Zhu B, Cao S. Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses* 2015;7:219-38.
16. Pauli G, Bauerfeind U, Blümel J, et al: West-Nil-Virus. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 2012;55:1024-1043.
17. Gürtler L, Bauerfeind U, Blümel J, et al: Dengue Fieber Virus (DENV). *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 2011;54:892-904.
18. Allering, L. (2016). Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012.
19. Zannoli S, Sambri V. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms*. 2019;7(7):184. Published 2019 Jun 26.
doi:10.3390/microorganisms7070184
20. Solomon, T. (2004). Flavivirus encephalitis. *New England Journal of Medicine*, 351(4), 370-378.
21. Santini, M., Vilibic-Cavlek, T., Barsic, B., Barbic, L., Savic, V., Stevanovic, V., ... & Savini, G. (2015). First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August–September 2013: clinical and laboratory features. *Journal of neurovirology*, 21(1), 92-97.
22. Odelola HA, Fabiyi A. Antigenic analysis of Nigerian strains of West Nile virus by neutralization test. *Niger Med J*. 1976;6(2):131–134
23. Odelola HA, Fabiyi A. Antigenic relationships among Nigerian strains of West Nile virus by complement fixation and agar gel precipitation techniques. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1976;70(2):138–144



**Organización
Panamericana
de la Salud**



**Organización
Mundial de la Salud**
OFICINA REGIONAL PARA LAS **Américas**

24. Gaibani P, Pierro A, Alicino R, et al: Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012;12:431-433.
25. Odelola HA, Fabiyi A. Antigenic analysis of Nigerian strains of West Nile virus by neutralization test. *Niger Med J.* 1976;6(2):131-134