

Directrices de Laboratorio para la Detección y el Diagnóstico de la Infección Humana por el Virus de la Encefalitis Equina del Oeste

Actualización, 5 de febrero de 2024 ¹

Contexto y consideraciones generales

La Encefalitis Equina del Oeste es producida por el virus del mismo nombre (VEEO o WEEV por su sigla en inglés), miembro de la familia *Togaviridae*, género *Alphavirus*. Los alfavirus se distribuyen ampliamente en todos los continentes, siendo clasificados en alfavirus del Nuevo y del Viejo Mundo de acuerdo con las primeras áreas endémicas descritas. Los dos grupos se asocian generalmente con diferencias notables en la patogénesis de la infección humana. Los alfavirus del Viejo Mundo como los virus chikungunya (CHIKV), O’Nyong-Nyong (ONNV), Ross River (RRV), Semliki Forest (SFV) y Sindbis (SINV) causan principalmente enfermedades febriles con síndromes artríticos. Por otra parte, los alfavirus del Nuevo Mundo como el WEEV, el virus de la Encefalitis Equina del Este (EEEV) y el virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) causan generalmente encefalitis en equinos, humanos y otros mamíferos. El virus Mayaro (MAYV), alfavirus artrálgico del Nuevo Mundo, constituye una excepción.

El WEEV circula principalmente en las regiones occidentales de Canadá y Estados Unidos y en el cono sur. En Argentina se han identificado brotes en equinos, asociados a caos humanos, en 1972/73 y 1982/1983. Desde finales de noviembre de 2023, se ha observado una circulación intensa del WEEV con un número importante de brotes en equinos en Argentina y Uruguay, y la detección de casos humanos en estos dos países (1, 2). Además, recientemente se ha reportado un caso en equinos en Brasil (3).

Huésped, vector y ciclo de vida

El WEEV se mantiene en un ciclo enzoótico primario entre sus huéspedes vertebrados naturales, las aves, y los mosquitos, en particular *Culex tarsalis*. También se ha descrito un ciclo secundario entre mamíferos lagomorfos y mosquitos *Aedes melanimon*. Otras especies de reservorios (roedores, murciélagos, reptiles) y de mosquitos (*Aedes albifasciatus*, pero también *Culex ocosa*, *Psorophora pallescens* y *Anopheles albitarsis*) podrían contribuir al ciclo de vida, en particular en el cono sur. Los vectores involucrados también pueden infectar a equinos y humanos, huéspedes terminales que no desarrollan una viremia suficiente para infectar a los mosquitos y mantener el ciclo.

Presentación clínica

El período de incubación de la enfermedad es de 2 a 10 días. La infección por WEEV en equinos y humanos puede cursar de forma inaparente. Las infecciones sintomáticas son poco comunes, pero pueden ser graves causando, por ejemplo, meningitis aséptica y encefalitis, y dejando secuelas. La mortalidad en equinos se estima en un 15-20% y en humanos en un 3-4%.

¹ Este documento es una actualización de la primera versión publicada el 20 de diciembre de 2023. Las recomendaciones planteadas en este documento pueden estar sujetas a modificaciones posteriores en función de los avances en el conocimiento sobre la enfermedad y el agente etiológico.

En humanos, la enfermedad tiene un comienzo súbito con dolor de cabeza seguido de decaimiento, escalofrío, fiebre, mialgias y malestar general. Estos síntomas pueden acentuarse en los días siguientes, con vómito, somnolencia, confusión y postración. Los síntomas neurológicos más frecuentes son debilidad y temblores generalizados especialmente de las manos, labios y lengua. Generalmente la mejoría comienza varios días después de la defervescencia, entre 7 a 10 días. No hay vacuna para humanos ni tratamiento antiviral específico. El manejo de los casos incluye reposo, hidratación adecuada y terapia sintomática.

Notificación internacional

La enfermedad en equinos es de notificación obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal. Un evento de infección en humanos debe analizarse haciendo uso del “Instrumento de decisión para la evaluación y notificación de eventos que puedan constituir una emergencia de salud pública de importancia internacional” del Anexo 2 del Reglamento Sanitario Internacional (2005) (4) para su reporte a través de los mecanismos del Reglamento.

Definiciones de caso

Caso sospechoso

Paciente que:

- 1) presente o haya presentado **fiebre de comienzo brusco**, acompañada de cefalea; y
- 2) presente **confusión mental** u otras **manifestaciones neurológicas agudas** (incluyendo postración, temblores, vómitos y somnolencia), **meningitis o encefalitis** sin otra etiología aparente.

En función de la situación epidemiológica, se debe considerar el antecedente de residencia o visita a una localidad o área geográfica con casos confirmados de EEO en animales y/o humanos durante los últimos 10-15 días previos al inicio de los síntomas.

Caso confirmado

Todo caso sospechoso con confirmación por laboratorio, mediante alguno de los siguientes criterios:

- 1) detección del ARN viral por RT-PCR en cualquier tipo de muestra; o
- 2) detección de anticuerpos IgM anti-WEEV por ELISA en una muestra de líquido cefalorraquídeo; o
- 3) seroconversión de anticuerpos IgM anti-WEEV por ELISA en muestras pareadas aguda y convaleciente tomadas con más de 7-10 días de diferencia; o
- 4) seroconversión o aumento en el título de anticuerpos neutralizantes por PRNT (o microneutralización) en muestras pareadas aguda y convaleciente tomadas con más de 7-10 días de diferencia.

Caso probable

Todo caso sospechoso con detección de anticuerpos IgM anti-WEEV por ELISA en una única muestra de suero (sin muestra pareada), y que por tanto no cumple con la definición de caso confirmado.

Caso negativo/descartado

Todo caso sospechoso sin anticuerpos IgM anti-WEEV detectables por ELISA en una única muestra de suero (sin muestra pareada) tomada con más de 10 días después de iniciados los síntomas.

Nota: En aquellos casos en los cuales no se realizó una toma de muestra, o solo se cuenta con una única muestra tomada entre los primeros 10 días desde el inicio de síntomas, con un resultado negativo, y donde no es posible obtener una muestra pareada, no será posible la confirmación o descarte del caso sospechoso. Se deben considerar cuidadosamente la información clínica y epidemiológica para la clasificación final.

Diagnóstico por laboratorio

El diagnóstico de WEEV requiere de la confirmación por técnicas de laboratorio, puesto que el cuadro clínico no es específico. Entre los métodos de laboratorio se destacan los métodos de diagnóstico virológicos (directos) por amplificación del genoma del virus o eventualmente el 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 debe ser tomado 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. 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. La manipulación de materiales o cultivos de alta carga viral y/o alto volumen deberá considerarse solamente después de una evaluación local del riesgo considerando la contención necesaria.

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 WEEV. También pueden usarse protocolos genéricos (pan-alfavirus) seguidos de RT-PCR específica o de secuenciación nucleotídica.

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, la contención necesaria, 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.

En casos fatales, la RT-PCR (o el aislamiento viral) pueden realizarse también en muestras de tejido (en particular, tejido del sistema nervioso).

Un resultado positivo por RT-PCR (o aislamiento viral) **confirma** la infección. Sin embargo, la viremia en las infecciones por WEEV es baja y de corta duración. Además, 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. También se debe considerar el diagnóstico diferencial por métodos moleculares, en particular para otros arbovirus que pueden causar síndromes neurológicos. Según la situación epidemiológica, se podrían considerar otros virus de encefalitis equinas (EEEV y VEEV) así como los flavivirus neurotrópicos (p. ej., virus del Nilo Occidental, virus de la encefalitis de San Luis) (Figura 1).

Si bien la RT-PCR tiene generalmente una baja sensibilidad debido al nivel y a la duración de la viremia (podría ser posible detectar hasta 3 días después del inicio de los síntomas, como máximo 5 días), su alta especificidad y su rapidez la hacen una herramienta importante en la detección de las infecciones por WEEV. En un contexto de brote de casos con sintomatología compatible, la detección por RT-PCR en al menos un caso permite identificar el agente etiológico.

Métodos serológicos

La detección de anticuerpos IgM se realiza por **ELISA** usando metodologías caseras (*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, es probable que la detección de anticuerpos se pueda realizar tempranamente después del inicio de síntomas, en particular neurológicos (Figura 1).

La detección de anticuerpos puede verse limitada por la potencial reactividad cruzada entre WEEV y otros alfavirus y por la persistencia de los anticuerpos tras la infección aguda, por lo tanto, en casos con sospecha clínica y epidemiológica, un resultado positivo para IgM en una muestra única de suero se considera un **caso probable** de infección por WEEV. No obstante, se estima que, en el caso de la infección por WEEV, la especificidad de la detección de IgM es relativamente alta. Un caso con seroconversión por ELISA IgM en muestras pareadas (muestras aguda y convaleciente tomadas con más de 7-10 días de diferencia) se considera un **caso confirmado**.

La potencial reactividad cruzada se puede estudiar realizando pruebas serológicas IgM diferenciales para otros alfavirus, en particular CHIKV, siempre tomando en cuenta el contexto epidemiológico. Ante la positividad para más de un alfavirus, deben usarse criterios clínicos y epidemiológicos adicionales para la interpretación final del caso. Los casos de reactividad cruzada también pueden evaluarse por ensayos de neutralización como la **prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT)** o la

microneutralización, haciendo uso idealmente de muestras pareadas (muestras aguda y convaleciente tomadas con más de 7-10 días de diferencia, muestra convaleciente tomada más de 14 días después del inicio de los síntomas). En función de la situación epidemiológica del área probable de infección del caso, se recomienda detectar en paralelo los anticuerpos neutralizantes contra WEEV, EEEV, VEEV, CHIKV y MAYV (Figura 1). Finalmente, se considera que la detección de anticuerpos específicos en LCR **confirma** la infección por WEEV en un caso con manifestaciones neurológicas.

Por otra parte, un resultado negativo por ELISA IgM en una única muestra solo descarta la infección si la muestra fue tomada con más de 10 días después de iniciados los síntomas. Aquellos casos en los cuales solo se cuenta con una única muestra tomada entre los primeros 10 días desde el inicio de síntomas, con un resultado negativo, y donde no es posible obtener una muestra pareada, no será posible confirmar o descartar el caso sospechoso. Se deben considerar cuidadosamente la información clínica y epidemiológica para la clasificación final.

Reactivos de laboratorio

No existen estuches comerciales validados para la detección molecular o serológica de la infección por WEEV. Se recomienda el uso de protocolos validados por laboratorios de referencia. Para más información contactar a la Oficina Regional de la OPS (correo electrónico: laboratoryresponse@paho.org, ricoj@paho.org).

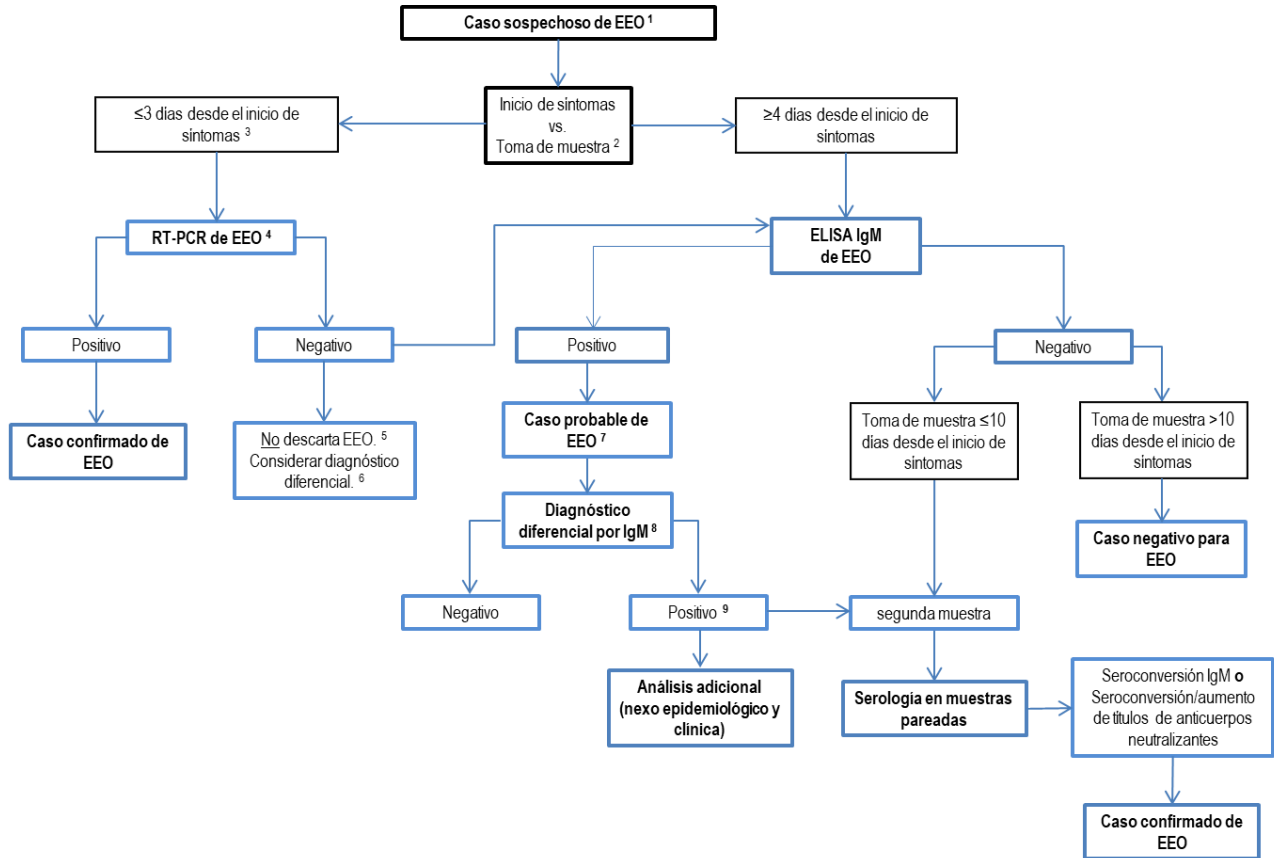
Conservación de la muestra

- Muestras de suero y LCR:
 - 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.
- Muestras de tejido: congelar y enviar en hielo seco.
- Evitar múltiples ciclos de congelación – descongelación.

Envío de la muestra al laboratorio de referencia

- Garantizar la cadena de frío con hielo seco (tejidos) 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, correctamente identificado el tipo de muestra, la fecha de inicio de síntomas y la fecha de toma de muestra.

Algoritmo de laboratorio



¹ Ver definición de caso.

² Los laboratorios que sólo tengan la capacidad de realizar RT-PCR o ELISA IgM deben procesar las muestras con la técnica disponible. Los resultados deben interpretarse de acuerdo al algoritmo.

³ En los primeros 3 días (o hasta 5) desde el inicio de los síntomas, se recomienda utilizar RT-PCR aunque pueda tener baja sensibilidad. La presencia del ARN viral en el LCR puede ser más prolongada.

⁴ También se puede utilizar RT-PCR genérica panalfavirus, seguida de la identificación del agente infeccioso mediante secuenciación.

⁵ Un resultado positivo confirma el caso; sin embargo, un resultado negativo no descarta una infección por WEEV y se recomiendan pruebas serológicas adicionales.

⁶ Considerar otros virus de encefalitis equina, el virus del Nilo Occidental, el virus de la encefalitis de San Luis y otros, según la situación epidemiológica de la zona/país.

⁷ Un resultado positivo por IgM en una muestra única de suero no es confirmatorio. Podría observarse reactividad cruzada serológica con otros alfavirus o persistencia de anticuerpos de una infección reciente. Un resultado positivo por IgM en una muestra de LCR confirma la infección por WEEV.

⁸ Considerar el virus del chikungunya y otros alfavirus, según la situación epidemiológica de la zona/país.

⁹ En casos de reactividad cruzada, los resultados de IgM ELISA no permiten confirmar el agente etiológico. Sin embargo, este resultado no descarta la infección por WEEV. Se deben utilizar criterios clínicos y epidemiológicos adicionales para la interpretación final del caso. También se puede realizar neutralización en un laboratorio de referencia para analizar muestras con reactividad cruzada (idealmente, en muestras pareadas aguda y convaleciente).

Figura 1. Algoritmo para confirmación por laboratorio de la infección por el virus de la Encefalitis Equina del Oeste (WEEV).

LCR: líquido cefalorraquídeo.

Referencias

1. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Actualización Epidemiológica: Encefalitis Equina del Oeste en la Región de las Américas. 10 de enero del 2024. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-encefalitis-equina-oeste-region-americas-10-enero-2024>
2. Ministerio de Salud Pública, Uruguay. Comunicado: Encefalitis equina. 30 de enero del 2024. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/comunicados/encefalitis-equina>
3. Secretaria da Agricultura, Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação, Rio Grande do Sul. Diagnóstico confirma Encefalite Equina do Oeste no Estado. 26 de enero del 2024. Disponible en: <https://www.agricultura.rs.gov.br/diagnostico-confirma-encefalite-equina-do-oeste-no-estado>
4. Organización Mundial de la Salud. Reglamento Sanitario Internacional (2005), 3ª ed. 1 de enero de 2016. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241580496>