

Directrices para la Detección y Vigilancia de Arbovirus Emergentes en el Contexto de la Circulación de Otros Arbovirus

18 de abril de 2024 ¹

Contexto y consideraciones generales

Los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) infectan a los seres humanos principalmente a través de la picadura de artrópodos hematófagos (por ejemplo, mosquitos, garrapatas y jejenes). Los arbovirus constituyen un grupo polifilético de virus de varias familias y géneros, e incluyen orthoflavivirus, alphavirus, orthobunyavirus, phlebovirus y coltivirus (1). Los arbovirus de mayor relevancia en las Américas son los orthoflavivirus del dengue (DENV, por su sigla en inglés) y del Zika (ZIKV) y el alfavirus del chikungunya (CHIKV), todos transmitidos por el mosquito *Aedes aegypti* que se encuentra ampliamente distribuido en la Región. Otros arbovirus se han detectado en zonas geográficas más restringidas, como los orthoflavivirus de la fiebre amarilla (YFV), del Nilo occidental (WNV) y de la encefalitis de San Luis (SLEV) y los alfavirus de las encefalitis equinas. Además, algunos arbovirus han causado brotes en un número limitado de países de la Región pero se considera que tienen el potencial de reemerger, en particular, el virus Oropouche (OROV) y el virus Mayaro (MAYV) (1). Este documento se enfoca en estos dos arbovirus quienes respectivamente causan las fiebres de Oropouche y de Mayaro. Sin embargo, las recomendaciones de vigilancia podrían aplicarse a otros arbovirus emergentes o reemergentes.

El **virus OROV** pertenece a la especie *Orthobunyavirus oropoucheense*, familia *Peribunyaviridae*. Fue detectado por primera vez en un trabajador forestal febril en 1955 en Trinidad y Tobago. Desde entonces, en las Américas, se han descrito numerosos brotes de fiebre de Oropouche en comunidades rurales y urbanas de Brasil, Ecuador, Guyana Francesa, Panamá, Perú y Trinidad y Tobago. En los últimos meses se ha observado un aumento de la detección de casos de fiebre de Oropouche en algunas áreas de las Américas, en particular en la región del Amazonas en Brasil (2). El virus OROV tiene un genoma segmentado constituido por los segmentos S (*small*), M (*medium*) y L (*large*) y está sujeto a reordenamiento genómico. Así, se han descritos varios recombinantes dentro de la especie *Orthobunyavirus oropoucheense* como los virus Iquitos, Madre de Dios y Perdões. De estos, solo el virus Iquitos se ha asociado con infecciones en humanos que se ha detectado en Perú y causa una enfermedad similar a la causada por OROV.

El **virus MAYV** pertenece al género *Alphavirus*, familia *Togaviridae* y fue aislado originalmente en Trinidad y Tobago en 1954 del suero de pacientes febriles. Subsecuente a los casos de Trinidad y Tobago, se han reportado casos de la enfermedad en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Haití, México, Panamá, Perú, Suriname y Venezuela, así como casos importados de Bolivia y Perú en Estados Unidos de América (3). El virus MAYV está dividido en tres genotipos: el genotipo D que circula en América del Sur y el Caribe, y los genotipos L y N que se han detectado en Brasil y Perú, respectivamente.

¹ 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.

Huéspedes, vectores y ciclos de vida

OROV se transmite en un ciclo selvático que probablemente involucra como reservorios a primates, perezosos y aves. El vector de dicho ciclo se desconoce, aunque hay evidencia de la participación de mosquitos tales como *Aedes serratus* y *Coquillettidia venezuelensis*. OROV también puede ser transmitido en un ciclo urbano, en el que el ser humano es el huésped amplificador. El vector principal de este ciclo es el jején *Culicoides paraensis*. El mosquito *Culex quinquefasciatus* también puede ser un vector (2).

En los brotes estudiados de fiebre de **Mayaro**, el vector involucrado fue el mosquito del género *Haemagogus* que es de hábito silvestre. No se han descrito los reservorios del MAYV, pero algunos estudios han reportado aislamiento del virus o altos niveles de anticuerpos en huéspedes vertebrados como los primates no humanos (3).

Presentación clínica

La fiebre de **Oropouche** tiene un periodo de incubación de 4 a 8 días (rango: 3-12 días). El inicio es súbito, generalmente con fiebre, cefalea (frecuentemente intensa), artralgia, mialgia, rash, escalofríos, y a veces náuseas y vómitos persistentes hasta 5 a 7 días. La meningitis aséptica y la encefalitis son complicaciones poco frecuentes. La mayoría de los casos se recuperan dentro de los 7 días, sin embargo, en algunos pacientes, la convalecencia puede demorar semanas (2). En algunos casos, puede ocurrir una breve recurrencia de los síntomas.

La fiebre de **Mayaro** tiene un periodo de incubación de 1 a 12 días. El curso de la enfermedad es autolimitado, con una duración de 3 a 5 días. En los primeros días presenta un cuadro clínico inespecífico: fiebre, dolor de cabeza, mialgia, dolor retroocular, escalofríos, fuerte artralgia, mareos, náuseas, fotofobia, anorexia, edema articular muchas veces incapacitante, erupción cutánea principalmente en el pecho, piernas, espalda, brazos y con menor frecuencia en la cara, dolor abdominal, leucopenia y plaquetopenia. Las artralgias pueden permanecer semanas o meses. En algunos casos se ha descrito manifestaciones hemorrágicas y se ha documentado un caso con encefalopatía (3).

Notificación internacional

Dado que se trata de arbovirus emergentes y relativamente poco identificados en las Américas, 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 consecuente notificación a través de los mecanismos del Reglamento.

Diagnóstico por laboratorio

Dada la presentación clínica de las fiebres de Oropouche y Mayaro, y considerando la actual situación del dengue y de otras arbovirosis en la Región de las Américas, el laboratorio es esencial para la confirmación de la circulación viral, para caracterizar los brotes y realizar el seguimiento de las tendencias de estas enfermedades. Entre los métodos de laboratorio se destacan los métodos de diagnóstico virológicos (directos) por amplificación del genoma del virus o aislamiento viral y los métodos serológicos (indirectos) para detectar anticuerpos producidos contra el virus. En general, la muestra para el diagnóstico es el suero (1).

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 (1).

Métodos virológicos

Durante la fase aguda de la enfermedad, puede detectarse el material genético (ARN) de estos virus por métodos moleculares (**RT-PCR** en tiempo real o punto final) haciendo uso de iniciadores (y sondas) específicos para OROV o MAYV. También pueden usarse protocolos genéricos seguidos de RT-PCR específica o de secuenciación nucleotídica.

La detección se realiza generalmente en muestras de suero, aunque también es posible detectar el ARN del OROV en líquido cefalorraquídeo (LCR) en aquellos casos que presentan meningitis o encefalitis. La muestra de LCR solo debe ser tomada por indicación médica.

La mayoría de los métodos moleculares para OROV se basan en la detección del segmento genético conservado S y no diferencian al OROV de otros virus de la especie *O. oropoucheense* (ej., virus Iquitos).

Por otro lado, el **aislamiento viral** de OROV o MAYV se puede hacer con las mismas muestras utilizadas para la RT-PCR mediante inoculación intracerebral en ratones lactantes o en cultivos de células Vero o C6/36. Sin embargo, el aislamiento viral no se considera un método de diagnóstico, sino una herramienta para caracterización e investigación adicional, y por tanto no se aplica de manera rutinaria ni es un requisito para la confirmación del diagnóstico.

Métodos serológicos

Los anticuerpos IgM contra OROV o MAYV son generalmente detectables en suero a partir del día 5 después del inicio de síntomas. Se han usado diversas **pruebas serológicas** caseras (*in house*) para detectar estos anticuerpos, entre ellas, ELISA, inmunofluorescencia, inhibición de la hemaglutinación, fijación de complemento o pruebas de neutralización. En los casos de meningitis o encefalitis asociados

a OROV, los anticuerpos también se pueden detectar en muestras de LCR disponibles colectadas por indicación médica.

La detección de anticuerpos en una muestra única de suero no se considera confirmatoria. La confirmación por serología requiere, en general, 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) para establecer la seroconversión o el aumento del título de anticuerpos.

Se ha descrito reactividad cruzada en pruebas serológicas entre los alfavirus del complejo del virus del bosque de Semliki, que incluye MAYV y CHIKV. Si bien se podría presentar reactividad cruzada entre los orthobunyavirus del serogrupo Simbu al que pertenece el OROV, los únicos miembros que se han asociado con infecciones en humanos son el OROV y el virus Iquitos. Los casos de reactividad cruzada 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.

Dada las limitaciones técnicas y de disponibilidad de reactivos para los métodos serológicos, para la vigilancia, **se recomienda priorizar y utilizar métodos moleculares (RT-PCR) en muestras agudas para la confirmación de la infección por OROV o MAYV** (Figura 1).

Reactivos de laboratorio

No existen estuches comerciales validados para la detección molecular o serológica de la infección por OROV o MAYV. 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).

Vigilancia epidemiológica y algoritmo de laboratorio

Dada la presentación clínica de las fiebres de Oropouche y de Mayaro, se recomienda que estas enfermedades se vigilen a partir de los sistemas ya establecidos para la vigilancia del dengue. Se sugiere procesar muestras representativas de esta vigilancia, que cumplan con las definiciones de caso sospechoso de infección por arbovirus endémicos con alta circulación (principalmente DENV, pero también considerar CHIKV y ZIKV según el contexto epidemiológico) (5), tomando en cuenta en particular, la caracterización clínica y el contexto epidemiológico, incluyendo la edad, sexo, localidad geográfica, e incidencia de la sospecha de arbovirosis endémicas. Como fue indicado anteriormente, se recomienda priorizar la detección de OROV y MAYV por métodos moleculares (RT-PCR) en muestras agudas (hasta máximo 7 días de iniciados los síntomas) que han resultado negativas para la detección molecular del virus del dengue y, eventualmente, de otros arbovirus endémicos que se procesen de forma rutinaria en el laboratorio (CHIKV y ZIKV). Dependiendo de la capacidad del laboratorio y del contexto epidemiológico, se puede seleccionar para la detección molecular de OROV y MAYV un porcentaje de las muestras agudas negativas (que podría variar entre el 10% al 30%) o un número limitado de muestras (Figura 1). Con el fin de optimizar los recursos del laboratorio, se sugiere usar métodos moleculares que detectan simultáneamente los virus OROV y MAYV (6). Finalmente, se recomienda monitorear de forma regular la positividad de las pruebas de laboratorio para el virus del

dengue y otros arbovirus endémicos bajo vigilancia. Por ejemplo, la disminución no explicada de la positividad, en un contexto de aumento en la incidencia de casos sospechosos, deben llevar a un análisis de situación para identificar posibles causas, incluyendo la emergencia o reemergencia de otros arbovirus.

Vigilancia genómica

El número de secuencias disponibles de OROV y MAYV es relativamente limitado, en particular si se consideran solamente los genomas completos.

Como para otros patógenos, los objetivos de la vigilancia genómica de OROV y MAYV son múltiples e incluyen estudiar y describir la evolución viral, caracterizar los virus en linajes y variantes, y determinar las cadenas de transmisión y las fuentes de infección. Además, los datos de vigilancia genómica de OROV y MAYV se pueden utilizar para el desarrollo y evaluación de pruebas diagnósticas, y, eventualmente, de vacunas y opciones terapéuticas (7).

Además, debido a la naturaleza de su genoma, el virus OROV está sujeto a reordenamiento genético, un fenómeno importante que genera diversidad viral dentro de la especie *O. oropoucheense*. Por ejemplo, los virus Iquitos, Madre de Dios y Perdões, contienen los mismos segmentos L y S que el OROV pero segmentos M específicos. De igual forma, el OROV caracterizado en Brasil en el brote actual es el resultado de un reordenamiento entre segmentos de dos virus OROV (8). Por lo tanto, la vigilancia genómica puede ser útil para identificar eventos de reordenamiento que podrían tener un impacto sobre el fenotipo viral.

Por estas razones y para ampliar el conocimiento sobre estos virus, la vigilancia genómica también puede ser implementada donde haya capacidad y sin dejar de lado la prioridad del diagnóstico y la detección oportuna.

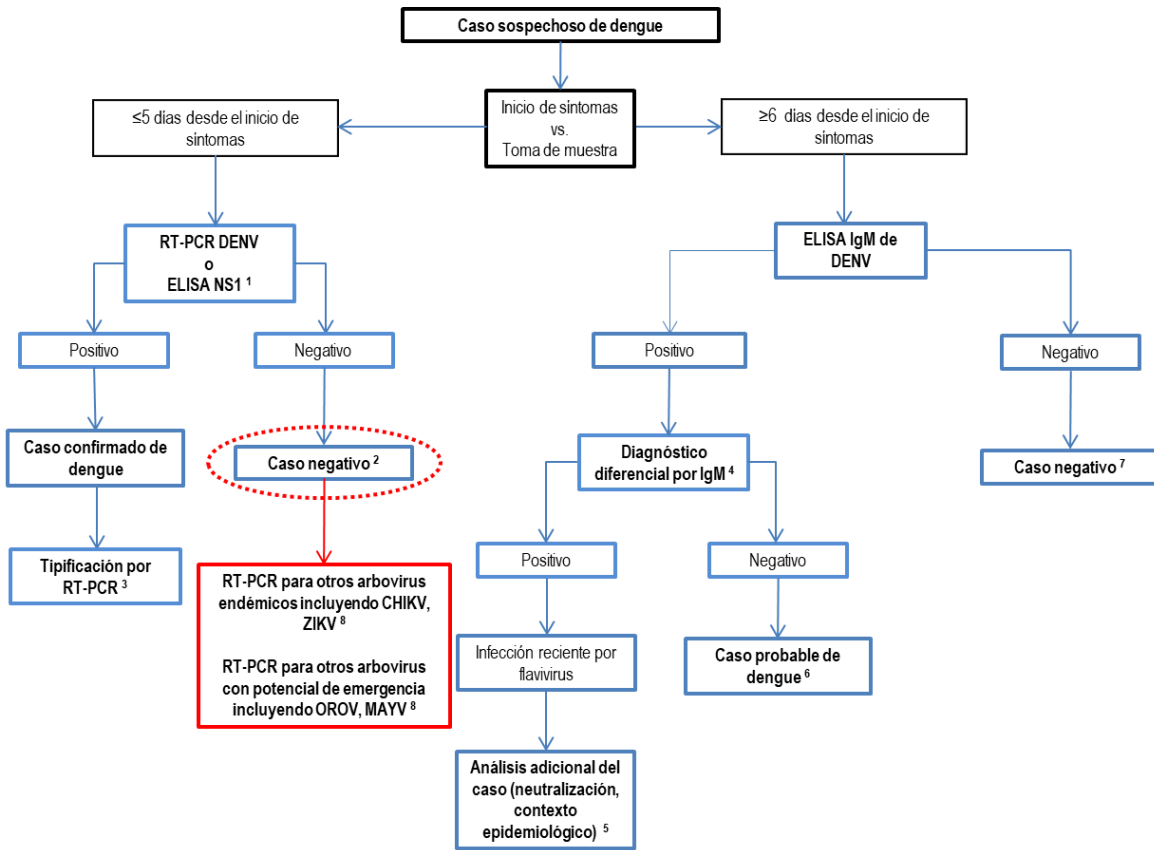
Conservación de las muestras

- 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 procesada 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 las muestras al laboratorio de referencia

- Garantizar la cadena de frío con hielo seco (tejidos) preferiblemente o con geles refrigerantes. Utilizar siempre triple empaque (9).
- 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 La RT-PCR es la técnica recomendada durante la fase aguda de la enfermedad y su sensibilidad permite detectar el ARN viral incluso por más de 5 días desde el inicio de síntomas. Si la RT-PCR no está disponible, se puede considerar la detección del antígeno NS1 por ELISA teniendo en cuenta que su sensibilidad es más baja que la RT-PCR.
- ² En general, se observa un descenso de la viremia con el tiempo transcurrido a partir del inicio de los síntomas, lo que puede afectar la sensibilidad de la detección molecular (RT-PCR) y antigénica (ELISA NS1), en particular en las muestras tomadas después del quinto día desde el inicio de síntomas. En estos casos se puede considerar la detección serológica.
- ³ Este paso se requiere solamente para casos confirmados con ELISA NS1 o un ensayo de RT-PCR que no diferencia los serotipos del virus.
- ⁴ Considerar el virus del Zika, la vacunación reciente para fiebre amarilla, así como otros flavivirus dependiendo de la situación epidemiológica de la zona / país.
- ⁵ 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 dengue. Deben usarse criterios clínicos y epidemiológicos adicionales para la interpretación final del caso. También se puede considerar realizar PRNT en un laboratorio de referencia para analizar las muestras con reactividad cruzada (idealmente, en muestras agudas y convalescentes pareadas).
- ⁶ Un resultado positivo por IgM en una muestra única no es confirmatorio y puede deberse a una infección por dengue en los últimos meses. La seroconversión en muestras pareadas con al menos una semana de diferencia permite inferir la infección por dengue, siempre y cuando no se observe reactividad cruzada con otro(s) flavivirus.
- ⁷ Los niveles de IgM pueden estar por debajo de los límites de detección en algunas infecciones secundarias. Investigar los casos y realizar el diagnóstico diferencial.

- ⁸ La lista de arbovirus endémicos puede variar según el contexto epidemiológico. Algunos laboratorios utilizan ensayos *multiplex* para los virus dengue, chikungunya y Zika.
- ⁹ Dependiendo de la capacidad del laboratorio y del contexto epidemiológico, se podrá procesar un porcentaje (que puede oscilar entre el 10 % y el 30 %) o un número limitado de muestras representativas negativas para DENV por RT-PCR.

Figura 1. Algoritmo para confirmación por laboratorio de la infección por el virus de dengue y para la detección de infecciones por otros arbovirus. El algoritmo para dengue ha sido publicado previamente (10). Las etapas y notas adicionales relacionadas a otros arbovirus se resaltan en rojo. DENV: virus del dengue, CHIKV: virus del chikungunya, ZIKV: virus Zika, OROV: virus Oropouche, MAYV: virus Mayaro.

Referencias

1. Organización Panamericana de la Salud. Recomendaciones para la detección y el diagnóstico por laboratorio de infecciones por arbovirus en la Región de las Américas. Washington, D.C.; 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275325872>
2. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Alerta Epidemiológica: Oropouche en la Región de las Américas. 12 de abril del 2024. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-oropouche-region-americas-12-abril-2024>
3. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Alerta Epidemiológica: Fiebre de Mayaro. 1 de mayo de 2019. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-fiebre-mayaro-1-mayo-2019>
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>
5. Organización Panamericana de la Salud. Definiciones de caso, clasificación clínica y fases de la enfermedad Dengue, Chikunguña y Zika. 13 de septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/definiciones-caso-clasificacion-clinica-fases-enfermedad-dengue-chikunguna-zika>
6. Naveca FG *et al.*, Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017 Jul; 112(7):510-513. Disponible en inglés en: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/hLm3CjXnS4m4R3zfZGqD3XR/>
7. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Estrategia de Vigilancia Genómica Regional para la Preparación y Respuesta a Epidemias y Pandemias. 2022. Disponible en: https://www.paho.org/sites/default/files/csp30-r9-s-vigilancia-genomia-regional_0.pdf
8. Naveca FG *et al.*, Emergence of a novel reassortant Oropouche virus drives persistent outbreaks in the Brazilian Amazon region from 2022 to 2024. *www.virological.org*. Disponible en inglés en: <https://virological.org/t/emergence-of-a-novel-reassortant-oropouche-virus-drives-persistent-outbreaks-in-the-brazilian-amazon-region-from-2022-to-2024/955>
9. Organización Mundial de la Salud. Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas. 25 de febrero de 2021. Disponible en inglés en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019720>
10. Organización Panamericana de la Salud. Nota técnica: Algoritmo para la confirmación por laboratorio de casos de dengue. 1º de diciembre de 2023. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/nota-tecnica-algoritmo-para-confirmacion-por-laboratorio-casos-dengue>