

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL**  
**"PEDRO KOURÍ"**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN, DIAGNÓSTICO Y**  
**REFERENCIA**

**TÍTULO: EVALUACIÓN DE ESTUCHES DIAGNÓSTICOS**  
**COMERCIALES PARA LA DETECCIÓN DE**  
**ANTICUERPOS IGM CONTRA VIRUS ZIKA**

**TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MASTER**  
**EN VIROLOGÍA**

**CARLOS MIGUEL TORRES ORTIZ**

**LA HABANA**

**2018**

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL**

**"PEDRO KOURÍ"**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA**

**TÍTULO: EVALUACIÓN DE ESTUCHES DIAGNÓSTICOS  
COMERCIALES PARA LA DETECCIÓN DE  
ANTICUERPOS IGM CONTRA VIRUS ZIKA**

**TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MASTER EN  
VIROLOGÍA**

**AUTOR**

**LIC. CARLOS MIGUEL TORRES ORTIZ**

**TUTORES**

**LIC. DIDYÉ RUIZ AMORES. DRC.**

**LIC. MAYLING ÁLVAREZ VERA. DRC.**

**ASESORA**

**DRA. MARÍA G. GUZMÁN TIRADO. DRCS.**

**LA HABANA**

**2018**

**"UNA CIENCIA ES TANTO MÁS ÚTIL CUANTO MÁS UNIVERSALMENTE  
PUEDEN COMPENDERSE SUS PRODUCCIONES; Y, AL CONTRARIO, LO SERÁN  
MENOS EN LA MEDIDA EN QUE ÉSTAS SEAN MENOS COMUNICABLES"**

**LEONARDO DA VINCI**

**Después de tanto esfuerzo y sacrificio por fin he llegado a la meta propuesta, y que esto sirva para seguir adelante y recorrer todo el camino, vencer todos los obstáculos que pudieran aparecer.**

**Quiero darle las gracias a toda mi familia en especial a mi madre que me ha apoyado y brindado fuerzas para continuar y nunca rendirme.**

**A mi abuela Cuca que me ha convertido en su ídolo, espero que esto le confirme su opinión y ponga siempre su fe en mí.**

**A mi hermana del alma Yuya que siempre ha creído en mí y ha estado para mí siempre que la he necesitado sin importar lo que cueste.**

**A Alex Williams y Anthony que esto sea un ejemplo y que estudien y sean hombres de ciencia que ser útil a la sociedad es brindar todo lo que tienes a la humanidad y ella sabrá recompensártelo.**

**A mis amigos Noralis, Gisselle, Alan y David que a pesar de la distancia siempre me han dado aliento y fuerzas para no cejar ni un instante.**

**A mi tutores Didye y Mayling gracias por tanta dedicación y paciencia y al resto del grupo de Arbovirus.**

**A mis compañeras del laboratorio de Diagnóstico Yahisel, Yani y Angelita.**

**A Oney, Aimé, Yuli, Laura, Rodnier, Aina que siempre me han alentado a continuar.**

**Al departamento de Virología en especial a la Bartutis, la Muné, la Rosme, a Quetica mi vida, Dayesi, Elias, Valdéz y a todo aquel de una forma u otra me han ayudado a todos gracias por estar para mí.**

**A Alemán por siempre arreglarme la computadora y brindarme sus concejos desde su experiencia.**

**A la Clara Savón gracias por estar siempre detrás de mí, para que no dejara de lado este trabajo, gracias a su trabajo.**

**Al Instituto de Medicina Tropical por darme la oportunidad de hacer este posgrado tan importante para mi superación personal en el mundo de la ciencia y la tecnología.**

**A todos los profesores que he tenido a lo largo de las enseñanzas por las que he pasado, este es el producto de su dedicación y entrega.**

**A todos gracias.**

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

Abreviaturas	Significado
<b>AcM</b>	Anticuerpo Monoclonal
<b>AcP</b>	Anticuerpo Policlonal
<b>ADA</b>	Amplificación Dependiente de anticuerpos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AP61</b>	Células de mosquito <i>Aedes pseudoscutellaris</i>
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>BHK21</b>	Células de riñón de Hámster
<b>C</b>	Proteína del Core
<b>C636</b>	Células de mosquito <i>Aedes albopictus</i>
<b>CD</b>	Células dendríticas
<b>CO</b>	Valor de corte
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>CSI</b>	Casos sin Inmunidad
<b>CCI</b>	Casos con Inmunidad
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>E</b>	Proteína de envoltura
<b>ECP</b>	Efecto citopático
<b>ELISA</b>	Ensayo Inmunoenzimático sobre fase sólida, del inglés: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>Fc</b>	Receptor celular
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia Indirecta
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

<b>IPK</b>	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>Kb</b>	Kilo base
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>LLCMK2</b>	Células de riñón de mono Verde Africano
<b>LNR</b>	Laboratorio Nacional de Referencia
<b>L T</b>	Linfocitos T
<b>L B</b>	Linfocitos B
<b>M</b>	Proteína de Membrana
<b>MAC-ELISA</b>	ELISA de Captura de anticuerpos IgM, del inglés: <i>IgM antibody capture ELISA</i>
<b>MEI</b>	Método de ELISA de Inhibición
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>M</b>	Macrófago
<b>NK</b>	Células asesinas
<b>NS</b>	Proteína no estructural
<b>NTR</b>	Región no traducida de genoma del dengue
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés: <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
<b>PCR-TR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real
<b>PM</b>	Peso Molecular
<b>PNRP</b>	Prueba de Neutralización por reducción de placas
<b>PR</b>	Prueba Rápida
<b>prM</b>	Precursor de la proteína M
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>Th</b>	Células T helper
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral

## *LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS*

---

<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>VERO</b>	Células de riñón de mono
<b>VCHIK</b>	Virus Chikungunya
<b>VDEN</b>	Virus Dengue
<b>VEJ</b>	Virus Encefalitis Japonesa
<b>VFA</b>	Virus Fiebre Amarilla
<b>VHA</b>	Virus Hepatitis A
<b>VNO</b>	Virus Nilo Occidental

**RESUMEN**

El diagnóstico serológico del Virus Zika es un gran desafío, debido a la alta reactividad cruzada entre los Flavivirus y a la necesidad de contar con diagnósticos precisos y de alto rendimiento que sostengan una vigilancia en grupos de riesgo, principalmente cuando se sospecha de infección en mujeres embarazadas, donde la probabilidad de complicaciones fetales es muy elevada. Actualmente no existe un sistema serológico de referencia para el diagnóstico de esta arbovirosis y se han desarrollado varios estuches comerciales, los cuales no han sido aprobados por la Organización Mundial de la Salud. En el presente trabajo se realiza un estudio de las características funcionales y operacionales de cinco estuches comerciales, de ellos 3 con formato ELISA, 1 definido como prueba rápida y 1 como Western Blot. Un panel de 200 muestras de suero, caracterizado por los ensayos de referencia en el IPK fue utilizado para la evaluación. Los sistemas de formato ELISA mostraron las mejores características funcionales, siendo el sistema DIAPRO la propuesta de selección para el diagnóstico serológico de las infecciones recientes a VZIK. La prueba rápida Artron no mostró utilidad y el sistema Mikrogen aunque con características funcionales aceptables debe mejorar en sensibilidad y reactividad cruzada frente a casos confirmados a VDENV. La prueba rápida Artron mostró las mejores características operacionales del estudio pero no es aceptable su definición de casos con infección a VZIK. Los resultados obtenidos en esta evaluación deben ser informados a aquellos laboratorios que lleven el diagnóstico de vigilancia para la infección por VZIK.

ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS: .....</b>	<b>4</b>
Objetivo General: .....	4
Objetivos específicos: .....	4
<b>CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>6</b>
1.1 Agente infeccioso.....	6
1.2 Organización genómica. ....	6
1.3 Características de las proteínas estructurales. ....	7
1.4 Características de las proteínas virales no estructurales (NS).....	8
1.5 Manifestaciones clínicas. ....	9
1.5.1 Síndrome Neurológico asociado a VZIK. ....	10
1.5.2 VZIK y Embarazo.....	10
1.5.3 VZIK y Microcefalia. ....	11
1.6 Patogénesis de la infección por VZIK. ....	11
1.7 Respuesta inmune innata. ....	12
1.8 Respuesta de anticuerpos. ....	13
1.9 Respuesta de células T.....	14
1.10 Respuestas inmunes reactivas cruzadas de Flavivirus. ....	14
1.11 Formas de transmisión de VZIK.....	15
1.11.1 Transmisión vectorial del VZIK. ....	15

1.11.2 Transmisión no vectorial.....	15
1.12 Diagnóstico virológico de la infección por VZIK.....	16
1.12.1 Pruebas moleculares.....	17
1.12.2 Diagnóstico serológico.....	18
1.13 Tratamiento.....	19
1.14 Prevención y control.....	19
1.15 Utilidad de los métodos diagnósticos para la investigación.....	20
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
2.1 Universo de estudio.....	24
2.2 Panel de sueros.....	24
2.3 Pruebas Formato ELISA.....	25
2.3.1 ELISA indirecto para la detección de Anticuerpos IgM a VZIK de EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG (Euroimmun-ELISA).....	25
2.3.2 ELISA indirecto para la detección de Anticuerpos IgM a VZIK de Diagnostic Bioprobes Srl (DIA.PRO-ELISA).....	29
2.3.3 ELISA de Captura para la detección de Anticuerpos IgM a VZIK de IBL International GMBH (IBL-ELISA).....	32
2.4 Prueba Rápida.....	35
2.4.1 Prueba rápida para la determinación de anticuerpos IgM a VZIK de Artron Laboratories Inc( Artron-PR).....	35
2.5 Prueba Formato Western Blot.....	37

2.5.1 Ensayo de Inmunoblot para la determinación de anticuerpos IgM contra VZIK de Mikrogen Diagnostik (Mikrogen-Blot).....	37
2.6 Análisis estadístico.....	39
2.7 Aspectos éticos.....	40
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
3.1 Sistemas comerciales con formato ELISA para la detección de anticuerpos IgM a VZIK.....	43
3.1.1 Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial Euroimmun-ELISA.....	43
3.1.2 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM del sistema comercial Euroimmun-ELISA frente a sueros positivos a VZIK con o sin inmunidad a VDEN.....	47
3.1.3 Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial DIAPRO-ELISA.....	48
3.1.4 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM del sistema comercial DIAPRO-ELISA frente a sueros positivos a VZIK con o sin inmunidad a VDEN.....	50
3.1.5 Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial IBL-ELISA.....	51
3.1.6 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM del sistema comercial IBL-ELISA frente a sueros positivos a VZIK con o sin inmunidad a VDEN.....	55
3.2 Sistema comercial formato Prueba Rápida (PR) para la detección de anticuerpos IgM a VZIK.....	56
3.2.1 Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial de tira rápida Artron-PR.....	56

3.2.2 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM del sistema comercial de tira rápida Artron-PR frente a sueros positivos a VZIK con o sin inmunidad a VDEN.....	58
3.3 Sistema comercial formato Western Blot (WB) para la detección de anticuerpos IgM a VZIK.....	59
3.3.1 Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial Mikrogen-Blot.....	59
3.3.2 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM del sistema comercial de <i>Mikrogen-Blot</i> frente a sueros positivos a VZIK con o sin inmunidad a VDEN. ....	60
3.4 Evaluación de la reactividad cruzada de los cinco sistemas comerciales frente al panel de sueros negativos del estudio.....	61
3.5 Análisis de las características operacionales de los sistemas en estudio.....	65
<b>CONCLUSIONES.</b> ....	<b>68</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>70</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>72</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>87</b>

# *INTRODUCCIÓN*

### INTRODUCCIÓN

El virus Zika (VZIK) es un flavivirus emergente transmitido por mosquitos que recientemente ha causado grandes epidemias en América del Sur y Central, así como en el Caribe, representando una emergencia mundial de salud pública (1). Está estrechamente relacionado con otros miembros patógenos humanos de la familia *Flaviviridae*, como los virus del complejo dengue (VDEN), el virus del Nilo Occidental (VNO), el virus de la encefalitis japonesa (VEJ) y el virus de la fiebre amarilla (VFA).

Los síntomas clínicos asociados con la infección por VZIK incluyen fiebre, erupción cutánea, artralgia, mialgia y conjuntivitis, y normalmente son autolimitados. Las infecciones por VZIK pueden provocar complicaciones importantes y secuelas a largo plazo, que incluyen defectos de nacimiento congénitos, trastornos neurológicos y un riesgo prolongado de transmisión sexual de este virus (2).

En la fase aguda de la infección por VZIK se hace difícil la diferenciación clínica, principalmente respecto a las infecciones por DENVs (3), de ahí que uno de los mayores retos en la actualidad para el diagnóstico de VZIK sea la detección y confirmación de casos en todo un entorno donde la infección por VDEN se ha extendido grandemente y cada año aparecen más países en condiciones endémicas de esta enfermedad (4-6).

Por más de cinco décadas VZIK causó brotes esporádicos en países como Gabón, Nigeria, Senegal, Malasia, Cambodia, Indonesia y Micronesia. Posteriormente en 2013 se originó un segundo brote en la Polinesia Francesa, con más de 30 000 casos confirmados (7). Un tercer brote fue identificado en Brasil en mayo de 2015, desde donde se produjo una rápida expansión por América del Sur y el resto del mundo, reportándose casos autóctonos en 62 países (8).

En la actualidad ningún nuevo país o territorio de las Américas confirmó transmisión autóctona vectorial de Zika; por lo que se mantiene en 48 el número de países y territorios

de las Américas que confirmaron casos autóctonos por transmisión vectorial de Zika y en cinco el número de países que notificaron casos de Zika transmitidos sexualmente (9).

Desde enero de 2016 y ante la inminente presencia de VZIK en América Latina y el Caribe, se implementó en nuestro país un sistema de Vigilancia Epidemiológica Especial con el objetivo de detectar la presencia de casos positivos. Desde esta fecha el presente Cuba reportó un total de 245 casos confirmados, de ellos 187 son casos autóctonos y 58 importados (9), todo este diagnóstico soportado sobre los métodos moleculares de PCR en tiempo real.

El diagnóstico actual de la infección por el VZIK es un reto por una variedad de razones. Generalmente se considera una infección leve en la mayoría de los casos. Aproximadamente el 80% de las infecciones por VZIK son asintomáticas (10). Varias organizaciones internacionales encabezadas por la OMS evaluaron disímiles formas para establecer un protocolo diagnóstico para la infección por VZIK basándose en los protocolos ya establecidos para el diagnóstico de otros flavivirus, con el objetivo de identificar las muestras idóneas y la técnica más confiable con mayor especificidad y sensibilidad. Los ensayos moleculares para la identificación rápida del ARN del VZIK fueron los primeros evaluados como el protocolo descrito por Lanciotti y luego el trioplex en el cual se diagnosticaba los virus Zika, Dengue y Chikungunya (VCHIK) (11). No obstante, estos ensayos son costosos para soportar una vigilancia activa en el año, por lo que la búsqueda de metodologías rápidas, menos complejas y menos costosas continua siendo un objetivo actual.

Los ensayos serológicos comenzaron a evaluarse pero continúan siendo un gran desafío debido a la alta reactividad cruzada entre los Flavivirus y a la necesidad de contar con diagnósticos precisos y de alto rendimiento sobre todo a la hora de diagnosticar una sospecha de infección por VZIK en mujeres embarazadas con una elevada posibilidad de complicaciones fetales, y además mantener una vigilancia a largo plazo en este grupo de riesgo, considerado como el principal (12). En la actualidad no existe un ensayo serológico

de referencia para el uso de los diferentes laboratorios evaluadores ya que el ensayo de neutralización, técnica de referencia serológica, ha mostrado reactividad cruzada así como los ELISAs que vienen usando la OMS, lo que hace más difícil el proceso de clasificación de los casos y el propio proceso de evaluación de nuevos estuches comerciales que salen al mercado.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, en el presente estudio nos disponemos a evaluar cinco estuches comerciales (1 Prueba Rápida (Artron, Canada), 2 ELISA Indirecto (DIA.PRO, Italia y Euroimmun, Alemania), 1 ELISA de Captura (IBL. Alemania), 1 Prueba tipo Western Blot (MIKROGEN. Alemania)), disponibles en el mercado internacional para la detección de anticuerpos IgM anti VZIK.

### **OBJETIVOS:**

#### **Objetivo General:**

Evaluar las características funcionales y operacionales de sistemas diagnósticos comerciales para la detección de anticuerpos IgM anti-Zika.

#### **Objetivos específicos:**

- ❖ Evaluar las características funcionales de tres sistemas diagnósticos con formato ELISA para la detección de anticuerpos IgM anti-Zika.
- ❖ Evaluar las características funcionales del sistema diagnóstico definido como prueba rápida para la detección de anticuerpos IgM anti-Zika.
- ❖ Evaluar las características funcionales del sistema diagnóstico con formato Western Blot para la detección de anticuerpos IgM anti-Zika.
- ❖ Analizar las características operacionales de los cinco sistemas diagnósticos evaluados.

*CAPÍTULO 1:*  
*REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

## CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Agente infeccioso.

El virus del Zika (VZIK), es un flavivirus transmitido por la picadura del mosquito ,causante de la fiebre del Zika, un síndrome de artralgia febril autolimitada y exantemática muy parecido a las manifestaciones producidas por los virus del complejo Dengue. Con una mayor frecuencia, los signos y síntomas que aparecen son erupción máculopapular, fiebre, artralgia, mialgia, dolor de cabeza y conjuntivitis; edema, dolor de garganta, tos y los vómitos ocurren con una menor frecuencia (13).

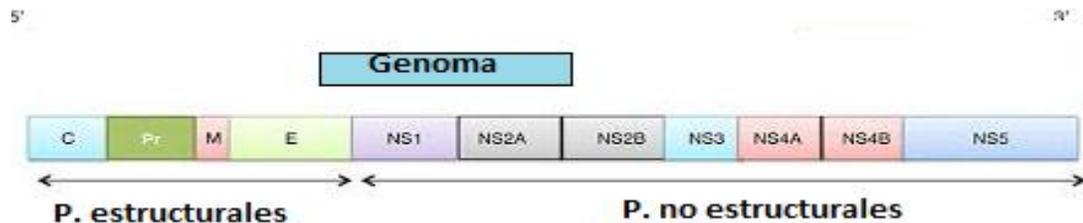
Los virus pertenecientes al género *Flavivirus* circulan como genotipos o linajes diferentes (14). El análisis filogenético muestra que ZIKV puede ser clasificado en dos distintos linajes: africano y asiático, ambos emergidos de África del Este. El genotipo Asiático se originó durante la migración del virus desde África hasta el sudeste de Asia (15, 16). Ambos presentan una diferencia del 5 % en la composición aminoacídica (14). Dowd y colaboradores en 2016 demostraron que los anticuerpos originados después de una infección por ZIKV de linaje asiático pueden neutralizar una infección por genotipo africano; esto indica que los diferentes genotipos de ZIKV existen como un solo serotipo (14, 17).

Recientemente, se ha convertido en el principal sospechoso causal de una inusual y completamente inesperada epidemia de microcefalia y otras complicaciones fetales exponiendo las necesidades urgentes de conocimiento sobre esta enfermedad (18).

### 1.2 Organización genómica.

El genoma de VZIK es un virus simple polaridad positiva, monocatenario (ss) (+) ARN de ~ 10,7 k bases de longitud que codifica para siete proteínas no estructurales (NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, 5) y tres proteínas estructurales (Cápside, membrana precursora, envoltura) (19) . El ARN genómico de VZIK (gRNA) está flanqueado por regiones no traducidas 5 'y 3' altamente estructuradas (UTR) de aproximadamente 107-428 nucleótidos de tamaño (20).

Los 5'UTR contiene una estructura metilada de caperuza en el extremo 5', mientras que la 3'UTR carece de cola poli (A) y termina con CUoh al final de un ARN conservado en forma de horquilla (21) (**figura 1.1**).



**Figura 1.1. Descripción esquemática de las características contenidas en el ARN genómico del VZIK. Tomado de Goertza et al., 2017.**

### 1.3 Características de las proteínas estructurales.

La proteína C es el componente básico de la nucleocápsida debido a la presencia de residuos aminoacídicos de lisina y arginina, lo cual hace posible que interactúe con el ARN viral. Es el primer polipéptido viral sintetizado durante la traducción, con un peso molecular de unos 11 kD. La nascente proteína presenta un extremo C-terminal hidrofóbico que funciona como péptido señal para la translocación que sufre prM en el retículo endoplasmático (RE). La proteína C madura se pliega formando un dímero compacto, en el cual cada monómero contiene cuatro  $\alpha$ -hélices. La asociación de C a la membrana es mediada por una región hidrofóbica interna (22).

La glicoproteína de membrana (prM) (26kD) es el precursor de la proteína de membrana (M) madura, la cual se origina mediante su escisión proteolítica por la enzima celular furina. Una de las principales funciones de prM es evitar que E sufra una reorganización estructural, catalizada por la acidez (23, 24).

E es la mayor proteína en la superficie de los viriones de *Flavivirus* (53 kD) y también la más conservada del género. E es una proteína de fusión que media tanto la unión a receptor celular como la fusión de membranas (22). Cada proteína E contiene tres

dominios: DI) expresados en la siguiente manera barril de hojas y es el dominio central; DII) un dominio de dimerización y DIII) un dominio inmunoglobulínico (25). El Dominio I está involucrado en la organización estructural de la envoltura, Dominio II y Dominio III están relacionados con la interacción entre los monómeros y en la unión al receptor respectivamente (22).

### 1.4 Características de las proteínas virales no estructurales (NS).

La proteína NS1 (46 kD) forma homodímeros estables y adquiere afinidad por las membranas. Se ha planteado que juega un papel en la replicación temprana (26).

La proteína NS2 está constituida por dos proteínas: NS2a y NS2b. NS2a es una proteína hidrofóbica de unos 22kD, que se origina en el citoplasma debido a la escisión por NS2b-NS3. Puede estar relacionada en función con el reclutamiento de los ARN moldes para la replicasa, así como inhibir la señalización vía interferón (27). NS2b forma un complejo estable con NS3 y sirve para anclar este complejo a las membranas celulares, además de actuar como un cofactor necesario para la actividad serina -proteasa del complejo NS2b-NS3 (28).

La proteína NS3 tiene un peso molecular de 70 kD. Está altamente conservada en los *Flavivirus* y es un componente de la maquinaria enzimática de la replicación del ARN viral, llevando a cabo funciones importantes requeridas para el procesamiento de la poliproteína y la replicación del ARN. Funciona como proteasa, helicasa y ARN-trifosfatasa, esta última actividad es necesaria para la formación de la caperuza en el extremo 5' del genoma viral (28). Además de su papel en la replicación viral, el dominio helicasa de NS3 se encuentra implicado en el ensamblaje de las partículas virales (29).

La proteína NS4 se modifica post-traduccionalmente y da lugar a NS4a y NS4b, proteínas hidrofóbicas pequeñas (16kD y 27kD respectivamente). NS4a está implicada en la replicación del ARN viral a través de su interacción con NS1 (30). NS4b es una proteína de membrana que se localiza con NS3 en los presuntos sitios de replicación de ARN(31).

La proteína NS5 es la proteína de mayor tamaño (103 kD), altamente conservada y multifuncional con actividades necesarias para la formación de la caperuza del ARN como metiltransferasa y ARN polimerasa-ARN dependiente (RpRd). NS3 y NS5 funcionan juntas durante la formación de la caperuza del ARN viral (32).

### 1.5 Manifestaciones clínicas.

La infección por VZIK puede cursar de forma asintomática, que es la manera más frecuente, o con sintomatología presentando: fiebre, conjuntivitis no purulenta, cefalea, mialgia y artralgia, astenia, exantema máculopapular, edema en miembros inferiores, y, menos frecuentemente, dolor retro-orbitario, anorexia, vómito, diarrea, o dolor abdominal. Los síntomas de la enfermedad producida por el VZIK son similares a los de otras enfermedades transmitidas por el mosquito *Aedes aegypti*, tales como Chikungunya y Dengue, y similar a otras enfermedades infecciosas como paludismo, la rubéola, parvovirus B19, adenovirus, enterovirus, leptospirosis, rickettsia, y las infecciones por estreptococos del grupo A.

En algunos casos los síntomas cursan entre los 4 a 7 días, y son autolimitados. La hospitalización y los casos fatales son raros. En el brote registrado en la Polinesia Francesa en octubre de 2013, se identificaron casos con complicaciones neurológicas (síndrome de Guillain Barré, meningoencefalitis) o autoinmunes (púrpura trombocitopénica, leucopenia) (33, 34).

El Ministerio de Salud de Brasil, en el marco del brote iniciado en mayo de 2015, identificó un aumento inusitado de casos de microcefalia en la región Nordeste del país coincidiendo con la circulación del virus VZIK en esa región. Esta última situación plantea un nuevo desafío para la implementación de un sistema de vigilancia destinado a la prevención y control de la infección congénita por virus VZIK (35).

### **1.5.1 Síndrome Neurológico asociado a VZIK.**

Se conoce como Síndrome de Guillain Barré (SGB) a una serie heterogénea de neuropatías periféricas de alivio espontáneo mediadas inmunológicamente. El hallazgo común en ellas es la polirradiculo-neuropatía de evolución rápida que se desencadena casi siempre después de un proceso de tipo infeccioso. Se manifiesta más frecuentemente con parálisis motora simétrica, con o sin pérdida de la sensibilidad, y en ocasiones con alteraciones de tipo autonómico. El SGB suele afectar a personas de cualquier edad y sexo con 2 picos de presentación: uno en la etapa adulta joven y otra en ancianos, es rara en niños menores de un año de edad. El SGB tiene una incidencia mundial de 1-4 por 100,000 personas (36).

Durante la aparición de VZIK en la Polinesia Francesa, entre 2013 y 2014, fueron diagnosticados con SGB un elevado número de pacientes. Se realizó un estudio donde un grupo de pacientes que presentaban SGB se les realizó la detección de anticuerpos neutralizantes específicos para VZIK detectándose entonces la presencia de anti-VZIK IgM o IgG, lo cual sugiere que la infección por VZIK puede desencadenar el SGB. A diferencia del resto de las enfermedades infecciosas que pueden desencadenar el síndrome, en el caso de VZIK no se origina durante la etapa de convalecencia sino durante la etapa aguda de la infección (37).

### **1.5.2 VZIK y Embarazo.**

Los conocimientos sobre las mujeres embarazadas infectadas con VZIK son limitados. Las embarazadas pueden infectarse con VZIK en cualquier trimestre, y los síntomas reportados durante embarazo son similares a los de cualquier individuo. No existen evidencias que sugieran que en el embarazo las mujeres son más susceptibles a la infección por el virus per se o más severamente afectadas.

La transmisión materno-fetal de VZIK se ha demostrado a lo largo del embarazo principalmente en el período embrionario (aproximadamente hasta la semana 9 de edad

gestacional) el cual se considera como el de mayor riesgo. El completo espectro de resultados que podría estar asociado con infección congénita de VZIK es desconocido; sin embargo, microcefalia, atrofia cerebral, dilatación ventricular, y calcificaciones intracraneales se han reportado en los recién nacidos que han dado positivo para la infección por VZIK. Otras manifestaciones que se han informado son: defectos oculares, rugosidades en el cuero cabelludo y patología articular. La manifestación más sobresaliente de la infección congénita por VZIK en recién nacidos sería la microcefalia (35, 38).

### **1.5.3 VZIK y Microcefalia.**

Uno de los aspectos más graves de la aparición de VZIK es la infección en mujeres embarazadas, debido al riesgo de microcefalia en recién nacido (39). Estudios recientes confirman que la introducción de VZIK en el noreste de Brasil coincidió con un considerable aumento de malformaciones congénitas en recién nacidos (40).

El neurotropismo de VZIK es acompañado por una importante degeneración neuronal, infiltración celular y áreas de reblandecimiento. La infección entonces resulta en un incremento de la muerte celular y una desregulación del ciclo celular (39, 41).

### **1.6 Patogénesis de la infección por VZIK.**

En la actualidad se conoce poco acerca de la patogénesis de la infección por VZIK, sin embargo, se presume que ocurre replicación viral en las células dendríticas (CD) cercanas al sitio de infección después de la inoculación del virus por la picadura de un mosquito, se produce entonces una subsecuente propagación hacia los nódulos linfáticos y luego hacia el torrente sanguíneo. La viremia se observa generalmente de tres a cuatro días de la aparición de los síntomas. El virus es detectable en sangre días antes de la aparición de los síntomas y hasta once días después. El virus ha sido también detectado en muestras de orina, saliva y espermatozoides de individuos infectados (42, 43).

Cuando un mosquito *Aedes* pica a un individuo infectado, este ingiere sangre que contiene VZIK. Como en el caso de otros *Flavivirus*, en el mosquito, VZIK puede replicarse en las células epiteliales y subsecuentemente en glándulas salivares. Después de un período de incubación de 5-10 días, VZIK se encuentra en la saliva del mosquito, de esta manera puede infectar a otro humano. Cuando el mosquito infectado con VZIK introduce su saliva dentro de la piel del humano, el virus puede infectar a los queratinocitos epidérmicos, fibroblastos de la piel en las capas subcutáneas y a las células de Langerhans. Los queratinocitos y fibroblastos contienen AXL, tirosina quinasa y TIM-1, los cuales pueden funcionar como factores de adhesión o receptores para VZIK. Las células de Langerhans contienen DC-SIGN, el cual funciona como receptor permitiendo la entrada del virus. La infección de los fibroblastos primarios de la piel es asociada con la regulación de la expresión de ARN mensajero y potencia la transcripción de RIG-1 y MDA5, los cuales son reconocidos en la respuesta inmune innata que se origina a raíz de la infección por virus ARN. Esto es seguido por la potenciación de la expresión de interferón  $\alpha$  y  $\beta$ . Los interferones tipo I y II pueden suprimir la carga viral de las células infectadas. Además, VZIK es capaz de incrementar su replicación por inducción de autofagos en células hospederas. De este modo los autofagos inhibidores pueden disminuir la carga viral en células infectadas. Las células de la piel que están infectadas pueden presentar vacuolación citoplasmática y edema en el estrato granuloso. Después de la replicación en células del tejido local y en la región de los nódulos linfáticos, VZIK puede entonces diseminarse por vía sanguínea hacia otros órganos y tejidos incluyendo el sistema nervioso central, los músculos esqueléticos y el miocardio. El virus es altamente neurotrópico, puede causar degeneración neuronal e infiltración celular. El neurotropismo y la persistencia de VZIK explican determinadas anomalías fetales como la microcefalia y las complicaciones neurológicas (44, 45)

### **1.7 Respuesta inmune innata.**

La expresión del receptor de reconocimiento de patógenos (RRP) s, receptor de tipo TLR, RIG-1 y MDA-5, que posteriormente desencadena la expresión de tipo 1-IFN, genes

estimulados por IFN, incluidos OAS2, ISG-15 y MX -1, y las citocinas inflamatorias se regulan positivamente por la infección de fibroblastos dérmicos con el VZIK. Ambos tipos de IFN inhiben la replicación del VZIK en fibroblastos humanos. El papel de estas citocinas en los mecanismos de defensa del huésped se confirma aún más en el modelo murino, en el que los ratones deficientes en el receptor tipo 1-IFN (A129) o tipo 1 y tipo 2-IFN (AG129) son altamente susceptibles al VZIK infección, con viremia y mortalidad dependiente de la edad. Las células dendríticas de sangre de pacientes con infección convaleciente del VZIK, demostraron funciones de captura de antígenos similares a las de donantes sanos, lo que indica que la recuperación de la enfermedad por el VZIK podría estar relacionada con la restauración de la función normal de células presentadoras de antígeno (CPA). Se informa que algunos pacientes con la enfermedad del VZIK tienen monocitosis durante la fase aguda, pero se vuelven normales durante la fase de convalecencia. A diferencia de la infección DENV, no se identificaron "efectos de las tormentas de citoquinas" en el suero durante la fase aguda de pacientes con enfermedad VZIK con una elevación más pronunciada de las quimiocinas que las citoquinas inflamatorias. Por lo tanto, el papel de los monocitos en la infección por el VZIK permanece indefinido.

### **1.8 Respuesta de anticuerpos.**

Las proteínas estructurales E y PrM junto con la proteína secretada NS1 representan los objetivos principales para anticuerpos específicos de flavivirus (46, 47). Los estudios iniciales muestran que la respuesta de anticuerpos específicos de VZIK se ajusta a este patrón (48), aunque serían útiles los experimentos adicionales de mapeo exhaustivo.

Los estudios han demostrado que los anticuerpos específicos de VZIK son cruciales para el control viral en modelos de infección en ratones. Una vacuna de ADN que comprende VZIK PrM y E fue capaz de proteger a los ratones del desafío viral, dando como resultado una ausencia de viremia detectable. Esta protección fue mediada por la proteína de envoltura E-anticuerpos específicos, como lo demuestran los experimentos de

transferencia pasiva (49). Esta misma vacuna también se encontró que es protectora en macacos rhesus (50).

### **1.9 Respuesta de células T.**

Los estudios que investigan las respuestas de las células T durante la infección por VZIK humana son escasos en la actualidad. Las células T CD4 + que proliferan en respuesta a la estimulación con E y NS1 se han identificado en humanos que han experimentado una infección por VZIK reciente (48), y el análisis in silico se ha usado para predecir los epítopes de células T de VZIK (51). Por lo tanto, es necesaria una investigación adicional sustancial requerida para confirmar un papel protector de las células T durante la infección por VZIK en humanos.

### **1.10 Respuestas inmunes reactivas cruzadas de Flavivirus.**

La transmisión de VZIK se lleva a cabo en áreas donde otros flavivirus están circulando. Por lo tanto, las infecciones por VZIK ocurren en poblaciones con inmunidad previa a flavivirus. Siendo importante entender cómo dicha inmunidad tiene un impacto en el resultado de la infección por VZIK. Prestándole especial atención a la reactividad cruzada entre VDEN y VZIK, ya que las proteínas E están estrechamente relacionadas. Además, la inmunopatogenia se ha visto implicada en la contribución a los síntomas graves de la infección por VDEN.

Varios estudios han identificado anticuerpos que tienen reactividad cruzada entre VDEN y VZIK (52, 53). Además, se ha demostrado que los anticuerpos específicos de VDEN son capaces de mejorar la infección de células portadoras de receptores de Fc con VZIK in vitro (54, 55). Por el contrario, la inmunidad VDEN preexistente no dio como resultado una enfermedad más grave por VZIK en los macacos Rhesus(55).

Por lo tanto, si el mecanismo de ADA está o no en juego durante la infección natural requiere más investigación, y en particular el desarrollo de reactivos serológicos para

distinguir las infecciones previas de VZIK y VDEN es esencial para sondear las cohortes epidemiológicas. Se han identificado anticuerpos específicos VDEN con la capacidad de neutralizar la infección por VZIK in vitro, y se ha descubierto que los anticuerpos monoclonales aislados de pacientes con dengue protegen a los ratones durante el desafío a VZIK (56).

### **1.11 Formas de transmisión de VZIK.**

El VZIK es transmitido por vectores especialmente por mosquitos *Aedes*; se han reportado otras vías de transmisión no vectorial (57), como la vía sexual (semen), la sangre, los trasplantes, orina, saliva, la perinatal, y la transplacentar (58).

#### **1.11.1 Transmisión vectorial del VZIK.**

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector del VZIK en América. Los seres humanos se infectan por picaduras de hembras infectadas. Este mosquito es el mismo que transmite el dengue, Chikungunya y la fiebre amarilla. *Aedes aegypti* es un vector doméstico que de preferencia se alimenta y descansa en el intra-domicilio (endofagia y endofilia, respectivamente), su fuente de alimento primordial son los seres humanos (antropofilia), y puede alimentarse en varias ocasiones durante su ciclo de reproducción, transmitiendo el virus si se trata de una hembra infectada. También se ha atribuido transmisión de VZIK a *Aedes albopictus*, que es una especie originaria de la selva asiática, que se ha adaptado a entornos rurales, suburbanos y urbanos habitados por personas, pero que aún no logra tener la gran competencia vectorial de *Aedes aegypti* para la transmisión de Arbovirus en el continente (59).

#### **1.11.2 Transmisión no vectorial.**

En el período de febrero 6 al 22 del 2016, Los Centros de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) publicaron 14 casos en Estados Unidos en los que se sospechaba transmisión sexual de VZIK en mujeres cuyo único factor de riesgo era el de haber tenido contacto sexual con una pareja masculina sintomática o que su pareja hubiese viajado

recientemente a una zona de transmisión activa del virus (60). Se ha descrito que el VZIK puede estar presente en el semen por más tiempo que en la sangre, pero no se sabe con certeza por cuánto tiempo (61). Tampoco se sabe si los hombres infectados que nunca han presentado síntomas pueden tener el VZIK en su semen o si pueden transmitir el VZIK mediante el contacto sexual, o si una mujer puede transmitir el VZIK a sus parejas sexuales, o si el VZIK puede contagiarse a través del sexo oral (62). Se ha descrito que existe el riesgo de otras vías de transmisión del VZIK entre las que se incluye las transfusiones de sangre y hemoderivados, lactancia materna, gotas de Flügge y por mordeduras (63). La posible transmisión de VZIK por transfusiones de sangre se magnifica al considerar que, alrededor de un 80% de las infecciones agudas por este virus son asintomáticas, y hasta el momento 11 no se realizan pruebas de tamizaje para este virus en ningún banco de sangre del mundo. Por tal motivo, la OPS/OMS(64), emitió en el 2016 una serie de recomendaciones a los servicios de sangre tendientes a disminuir el impacto del VZIK en la seguridad de los suministros de sangre (65).

### **1.12 Diagnóstico virológico de la infección por VZIK.**

Debido a que la infección por VZIK puede causar signos y síntomas similares a los observados en pacientes con infecciones por otros arbovirus, incluido VDEN y virus VCHK (66), es necesaria la realización de pruebas diagnósticas que permitan discernir entre todos estos agentes. Un resultado positivo para uno de estos virus no descarta una infección con los demás. Las co-infecciones de VZIK con VDEN o VCHK, no son frecuentes pero son posibles, particularmente en aquellas áreas donde estos virus circulan en conjunto (67, 68). Por ello, a la hora de emitir un diagnóstico, convendría tener en cuenta la realización de pruebas moleculares para otros arbovirus/ flavivirus circulantes (69).

De manera general, se propone el suero como la muestra clínica empleada para la detección de la infección por VZIK, pero es importante destacar que se ha encontrado baja carga viral de corta duración del VZIK en este tipo de muestra, y que en neonatos y niños

se dificulta la colecta de la misma (70). A la luz de los conocimientos actuales, se ha demostrado que también se pueden utilizar otros tipos de muestras y entre ellas se pueden citar la orina, sangre total, semen, saliva, tejidos como placenta y cordón, líquido cefalorraquídeo (LCR) y líquido amniótico (LA) (66). Aunque el período de viremia aún no está plenamente establecido, el ARN viral se ha detectado en suero y saliva de 3-5 días y hasta 20 días en orina después de iniciados los síntomas (71). El diagnóstico virológico a partir de estas muestras clínicas se realiza mediante detección directa de ARN viral o por serología, importante destacar que aunque no es factible como diagnóstico de rutina. También se puede realizar el aislamiento viral, ya sea por inoculación intracerebral en ratones o por inoculación en varias líneas celulares dentro de las que se incluyen Vero, LLC-MK2, MOS61 ó AP61 y C6/36 (72).

### **1.12.1 Pruebas moleculares.**

Durante el período de viremia se recomienda la realización de la RT-PCR, dado que es una prueba altamente sensible, específica y es considerada la prueba de oro para la detección de VZIK (73). Existen diferentes metodologías para llevar a cabo esta prueba molecular. Entre ellas podemos citar los ensayos TaqMan® RT-PCR, SYBR® Green RT-PCR y el PCR convencional (74). Un estudio realizado por Colombo y colaboradores en 2017, en el que comparan las 3 metodologías antes mencionadas, encontró mayor especificidad y sensibilidad al realizar los ensayos TaqMan® RT-PCR y SYBR® Green RT-PCR, pero señalan que las diferencias entre las cepas circulantes y la baja viremia pueden constituir factores que comprometan el diagnóstico (74). Debido al gran impacto de la infección por VZIK y su cocirculación con otros arbovirus, la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA -del inglés- Food and Drug Administration) autorizó el uso de una RT-PCR en tiempo real que incluye las sondas de hidrólisis TaqMan®, la prueba del Trioplex RT-PCR en tiempo real (TrioplexrRT-PCR) (73). Esta, tiene como objetivo la detección y diferenciación cualitativa del ARN de VDENV, VCHK y VZIK, en suero, sangre total o líquido cefalorraquídeo; además de la detección cualitativa del ARN del VZIK en orina y líquido amniótico (66).

La prueba se ha concebido para utilizarse con las muestras obtenidas de personas que cumplen los criterios clínicos y epidemiológicos del Centro para el control de enfermedades de los Estados Unidos (CDC -del inglés- Control Disease Center) para el VZIK y solo durante el período de emergencia internacional. Es válido señalar, que existen otros RT-PCR en tiempo real que emplean, por ejemplo, 5-FAM como fluorocromo y que aunque solo detectan VZIK, son altamente sensibles (75).

### **1.12.2 Diagnóstico serológico.**

Debido a la naturaleza temporal de la viremia del VZIK en suero y orina, una prueba molecular negativa no excluye una infección por VZIK reciente (66). La detección serológica de la infección por el VZIK puede ayudar a confirmar la exposición al virus en casos de personas que no hayan estado expuestas a VZIK con anterioridad. Los anticuerpos (IgM/IgG) suelen detectarse después de que el ARN viral comienza a disminuir (66). Es importante destacar que los flavivirus comparten una característica que dificulta el diagnóstico serológico, y es que existe un alto grado de reactividad cruzada entre los anticuerpos generados frente a distintos virus. Así, las reactividades positivas deben ser cuidadosamente evaluadas en el contexto de infecciones recientes o pasadas, por otros flavivirus (VDEN, VNO, entre otros), o de vacunaciones previas frente al VFA, virus de la encefalitis japonesa (VEJ) o virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (VEG). De todos estos patógenos con reacción cruzada, el que causa mayores problemas en la interpretación de los resultados de laboratorio es, sin dudas, VDEN, muy prevalente en las zonas afectadas por VZIK en la epidemia actual (71). También es importante señalar que solo mediante pruebas de biología molecular se puede detectar el genotipo que circula en una determinada región, ya que los anticuerpos que se producen tras la infección con linajes asiáticos o africanos protegen contra la infección de cepas de VZIK homólogas y heterólogas, no pudiendo así discriminar entre ellas (76).

La detección de anticuerpos IgM específicos para ZIKV es posible por ensayos de ELISA o inmunofluorescencias a partir del día 5 de iniciados los síntomas. Ya que un suero único

en fase aguda es presuntivo, se recomienda la toma de una segunda muestra entre una y dos semanas después de la primera muestra para demostrar seroconversión (negativo a positivo) o un incremento hasta cuatro veces el título de anticuerpos (con un ensayo cuantitativo).

La interpretación de los ensayos serológicos tiene relevancia para el diagnóstico de ZIKV. En infecciones primarias (primera infección con un *Flavivirus*) se ha demostrado que las reacciones cruzadas con otros virus genéticamente relacionados son mínimas. Sin embargo se ha demostrado que algunos sueros de individuos con historia previa de infección por otros *Flavivirus* (especialmente dengue, fiebre amarilla y virus del Nilo Occidental) pueden cruzar con estos ensayos. La técnica de neutralización por reducción de placas (PRNT), ofrece mayor especificidad para la detección de anticuerpos neutralizantes IgG, la reacción cruzada también ha sido documentada; de hecho, se han encontrado pacientes con historia previa de infección por otros *Flavivirus* que ante infección por ZIKV elevan hasta cuatro veces los títulos de anticuerpos neutralizantes.

### **1.13 Tratamiento.**

No se dispone de tratamiento específico para ZIKV. El tratamiento es de soporte e incluye reposo, controlar la hidratación, analgésicos y antipiréticos (indicados sólo por el médico) OPS/OMS. Infección por virus Zika. (64).

### **1.14 Prevención y control.**

No hay disponibles vacunas para la prevención de esta enfermedad. La prevención consiste en reducir las poblaciones de mosquitos y evitar las picaduras, que suelen ocurrir principalmente durante el día. Con la eliminación y el control de los criaderos del mosquito *Ae aegypti*, disminuyen la posibilidad de transmisión de ZKV, CHIKV y DENV. Para ello son necesarias no solo las medidas y acciones de los organismos de salud sino la colaboración de toda la población (64).

### **Para controlar las poblaciones de mosquitos se debe:**

- Evitar conservar el agua en los recipientes en el exterior (macetas, botellas, envases que puedan acumular agua) que pueden convertirse en criaderos de mosquitos.
- Tapar los tanques o depósitos de agua de uso doméstico para no permitir la entrada de mosquitos.
- Evitar acumular basura, y tirarla en bolsas plásticas cerradas y mantener en recipientes cerrados.
- Destapar los desagües que pueden dejar el agua estancada.
- Utilizar mallas/mosquiteros en ventanas y puertas también contribuye a disminuir el contacto del mosquito con las personas.
- Además debemos evitar la picadura del mosquito y para ello se recomienda tanto a personas que habitan en zonas donde hay casos como a los viajeros y especialmente a embarazadas a usar repelentes recomendados por las autoridades de salud y aplicar como indica las etiquetas.
- Dormir en lugares que estén protegidos con mosquiteros.
- Tratar de cubrir el cuerpo con camisas de manga larga, pantalones y sombreros
- No automedicarse, y ante la aparición de un cuadro febril acudir a la consulta médica.

### **1.15 Utilidad de los métodos diagnósticos para la investigación.**

Una amplia variedad de métodos diagnósticos están disponibles en la actualidad para el diagnóstico de las diferentes infecciones virales y las investigaciones básicas correspondientes que evalúan la respuesta de los distintos marcadores de la enfermedad tanto en modelos animales como en el humano.

Durante la fase febril aguda, el diagnóstico puede ser definido por el aislamiento viral, detección del genoma o de antígenos virales de la muestra. El aislamiento puede realizarse mediante la inoculación del mosquito o cultivos celulares. También puede utilizarse la inoculación intracerebral de ratones (77). El virus puede ser recuperado de muestras de suero, plasma, sangre total o tejidos seleccionados de autopsia. La inoculación del mosquito es el método de aislamiento más sensible, pero no es utilizado como diagnóstico rutinario debido a los requerimientos especializados y alto costo de mantenimiento (78). Los cultivos celulares tienen un amplio uso con preferencia de las líneas celulares de mosquito C6/36 o EB66. Otras líneas menos sensibles incluyen cultivos de mamíferos como Vero, LLC-MK2, y BHK-21. Una de las grandes utilidades del aislamiento es la caracterización del virus aislado mediante estudios *in vitro* como: secuenciación genómica, neutralización viral y estudios de infección (79). Aunque en la práctica el aislamiento es altamente específico tiene su principal propósito para la vigilancia epidemiológica de las arbovirosis y no el diagnóstico habitual.

Por otra parte, las técnicas de detección del ácido nucleico viral se llevan a cabo en muestras agudas, ofreciendo una mejor sensibilidad con un tiempo mucho más rápido de desarrollo. El ácido nucleico viral puede ser detectado durante unos días adicionales, más allá del período de viremia y mediante los métodos de RT-PCR, PCR-TR y la amplificación isotérmica. Todos estos métodos involucran tres pasos básicos: extracción del ARN viral, amplificación, y detección y caracterización del producto amplificado (80). Hay una amplia variedad de muestras que pueden ser procesadas por el PCR donde incluye sangre, suero, plasma, y tejidos fijados en parafina. La orina procesada por el PCR-TR proporciona una ventana más grande para la detección viral pasado el período de viremia. El RNA de VZIK puede ser detectado en orina hasta un día 16 de inicio de los síntomas comparado a un día 8 en muestras de sangre (81). El PCR-TR en relación al PCR convencional, es una metodología más rápida, de baja contaminación, elevada sensibilidad y especificidad y que eventualmente puede reemplazar al aislamiento y el RT-

PCR como mejor ensayo de referencia para el diagnóstico rápido en muestras agudas (82).

La amplificación isothermal (LAMP del inglés: Loop-mediated isothermal amplification) es un método de amplificación de DNA que puede combinarse con el RT-PCR para la detección de RNA. Es un método rápido y específico que utiliza 6 primers diferentes que reconocen 8 regiones distintas del gen diana. Entre sus ventajas se encuentra su desarrollo a una temperatura constante (60-65°C) por lo que no requiere de termociclador y todo ocurre en una sola reacción con una elevada sensibilidad de detección. Por su rapidez y sensibilidad este método sería extremadamente útil en la toma de medidas de acción rápida, incluyendo el manejo temprano del paciente (83-85)

Después del período de viremia, la mejor estrategia de diagnóstico sería la detección de los anticuerpos, lo que es indicativo de una respuesta inmunológica del hospedero frente al virus infectante. Sin embargo, la gran desventaja de estos métodos es que los individuos residentes en áreas endémicas con circulación de varios arbovirus, frecuentemente presentan niveles inmunológicos a estos, contribuyendo a una respuesta cruzada de anticuerpos que no permite la definición del agente infectante (86). Entre los métodos serológicos incluyen los ELISA, la inmunofluorescencia indirecta (IFI), IH y la PNRP. Estos métodos son comúnmente empleados para la detección de anticuerpos IgM e IgG, y para este último se utilizan generalmente pares de sueros para lograr una confirmación serológica del caso. Los ensayos IH y PNRP actualmente no son muy utilizados como métodos diagnósticos de rutina por la complejidad de los procedimientos, pero son aplicados en estudios seroepidemiológicos. Por otra parte estos ensayos serológicos pudieran ser aplicados en estudios de evaluación de inmunógenos vacunales, en el seguimiento de la respuesta humoral presentada ante la inoculación, inclusive la caracterización de la respuesta neutralizante generada ante tales candidatos.

*CAPÍTULO 2:  
MATERIALES Y MÉTODOS*

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Universo de estudio.**

Como parte de los objetivos del presente trabajo, cinco estuches diagnósticos comerciales fueron evaluados en cuanto a la detección de anticuerpos IgM frente a la infección por VZIK. Un total de 200 muestras de suero fueron procesadas por estos ensayos, las cuales habían sido conservadas a -20 °C hasta su utilización.

### **2.2 Panel de sueros.**

El panel de suero estaba constituido por 200 muestras procedentes todas de los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) de las Enfermedades Virales en el IPK. Un primer grupo de 100 muestras de suero correspondieron al panel de sueros positivos colectados de casos por infección a VZIK confirmados mediante el ensayo de referencia PCR en tiempo real desarrollado en el IPK (10) y procedentes del actual brote de este agente en el período del año 2017. Un segundo grupo de 100 sueros validados como negativos a infección por VZIK fueron caracterizados de la siguiente manera: 40 muestras de sueros de individuos donantes de sangre supuestamente sanos, chequeados previamente por los ensayos serológicos de referencia (MAC-ELISA y MEI) para la confirmación de infección por VDEN (87, 88); 30 sueros con infección a los serotipos 2, 3 y 4 del complejo VDEN, identificados mediante serotipificación de anticuerpos IgM (MAC-ELISA) y confirmación serológica IgM/IgG (MAC-ELISA/MEI) (87, 88); 8 sueros de individuos vacunados contra VFA y con inmunidad serológica IgM/IgG desarrollada (MAC-ELISA/MEI FA-IPK) (89); 8 sueros con infección a VCHIK determinada por serología de IgM mediante el protocolo diagnóstico obtenido por la OPS (MAC-ELISA-OPS) (90); 7 sueros agudos confirmados con infección a virus de Hepatitis A (VHA) mediante el MAC-ELISA-VHA desarrollado por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de Hepatitis Virales del IPK (91) y 7 sueros confirmados con infección a Rubeola mediante los sistemas

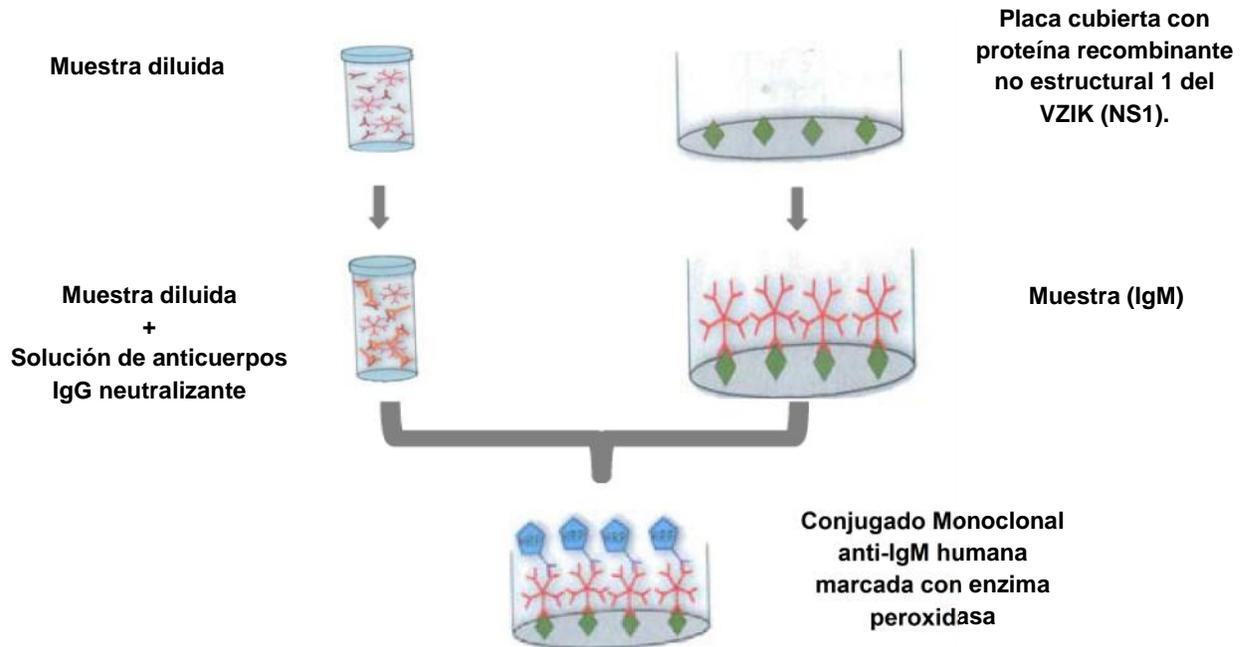
serológicos comerciales SIEMENS (92) utilizados por el LNR para la confirmación de las infecciones por Parotiditis, Rubeola y Sarampión (PRS).

Los sueros confirmados a VZIK y VDEN que constituyeron el panel fueron colectados entre los días 5 y 7 de inicio de los síntomas. Respecto a los casos positivos a VZIK y como parte del análisis de las características funcionales de los estuches comerciales del estudio, fue evaluada su inmunidad previa a VDEN mediante los ensayos serológicos de referencia (MAC-ELISA y MEI-VDEN) para este agente en el IPK. Estos casos fueron clasificados en 15 casos sin inmunidad (CSI) previa a VDEN, con una IgM e IgG negativas por los ensayos serológicos de referencia y 85 casos con inmunidad (CCI) previa a VDEN, los cuales mostraron IgG positiva con títulos  $\geq 1280$  en una fase convaleciente temprana (entre 5 y 7 días de inicio de los síntomas), identificando al VZIK como segunda infección por Flavivirus. Todos los sueros que conformaron el panel negativo a VZIK para la evaluación de la especificidad del sistema, fueron colectados en un periodo anterior al 2016, además con excepción de los casos con infección a VDEN, fueron chequeados por los ensayos serológicos de referencia para la infección por VDEN, descartando infección reciente o pasada de esta enfermedad y resultando negativos a IgM e IgG.

### **2.3 Pruebas Formato ELISA.**

#### **2.3.1 ELISA indirecto para la detección de Anticuerpos IgM a VZIK de EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG (Euroimmun-ELISA).**

El estuche de prueba ELISA proporcionó un ensayo de detección semicuantitativo in vitro para el anticuerpo humano de la clase IgM contra el VZIK en muestras de suero o plasma humano para el diagnóstico de esta enfermedad (figura 2.1).



**Figura 2.1. Representación esquemática del ELISA Indirecto para la detección de anticuerpos IgM a VZIK (Euroimmun-ELISA).**

El sistema comercial Euroimmun-ELISA se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante para la utilización de un procesador automatizado de microplacas de ELISA. Antes de comenzar el procedimiento, se estableció la distribución e identificación de las muestras de los pacientes, así como los controles positivos, negativos y el calibrador del ensayo, como se muestra en el siguiente protocolo (figura 2.2)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C											
B	P											
C	N											
D	1											
E												
F												
G												
H												93

**Figura 2.2. Protocolo para la distribución de las muestras de suero y controles del ensayo. A1: Calibrador (C), B1: Control positivo (P), C1: Control negativo (N), D1 a H12: Muestras de suero enumeradas consecutivamente.**

Dispuesto dicho protocolo, se realizó el procedimiento de dispensado de los reactivos de la siguiente manera: sobre la placa sensibilizada con antígeno recombinante de la proteína NS1 del VZIK se adicionaron 100  $\mu$ L del calibrador, controles positivo y negativo y las muestras de los pacientes diluidas en 1: 101 en solución conteniendo anticuerpos neutralizantes anti-anticuerpos humanos del tipo IgG y factor reumatoideo (FR). Posterior, se incubó la placa por 60 min a una temperatura de 37°C. Al finalizar la incubación se realizaron 3 lavados con una solución tamponada y se adicionaron 100  $\mu$ L de un conjugado anti IgM humana marcado con enzima peroxidasa, el cual se incubó por 30 min a temperatura ambiente (TA). Culminada esta segunda incubación se realizó nuevamente los 3 ciclos de lavado, adicionándose posteriormente 100  $\mu$ L de una solución cromógena de sustrato conteniendo 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a todos los pocillos e incubando la reacción por 15 min a TA. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción adicionando 100  $\mu$ L de una solución de parada ( $H_2SO_4$  al

0.5M) y se realizó la lectura de la microplaca a una longitud de onda de 450 nm y con filtro de referencia de 620 nm.

### **Cálculo de resultados**

El ensayo determina un valor de corte calculado a partir del calibrador de la prueba, donde valores por encima de este límite son considerados como casos positivos y por debajo casos negativos.

También los resultados pueden evaluarse de forma semicuantitativa donde se establece un radio o proporción conteniendo el valor de extinción del control o las muestras de los pacientes y del calibrador como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Extinción del control o muestra del paciente}}{\text{Extinción del calibrador}} = \text{Proporción}$$

**Extinción del calibrador**

El sistema de **Euroimmun-ELISA** recomienda interpretar los resultados de la siguiente manera:

**Proporción <0.8 negativo**

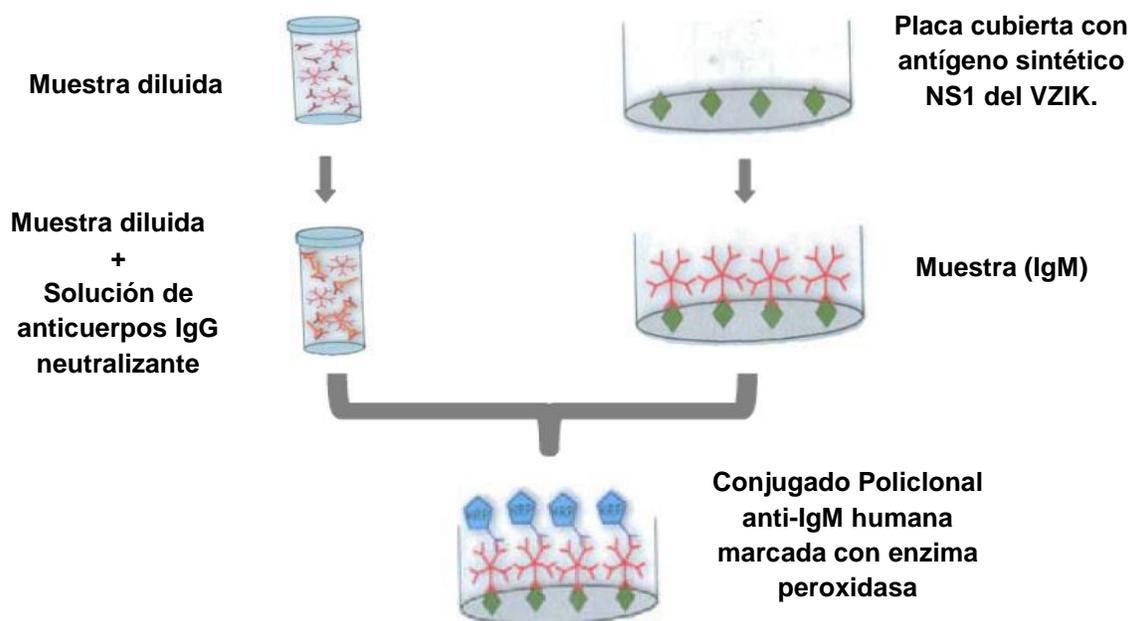
**Proporción 0.8 a <1.1 borderline**

**Proporción 1.1 positivo**

Para determinaciones duplicadas, se debe tomar la media de los dos valores. Si los dos valores se desvían sustancialmente entre sí, **Euroimmun-ELISA** recomienda volver a procesar las muestras.

### 2.3.2 ELISA indirecto para la detección de Anticuerpos IgM a VZIK de Diagnostic Bioprobes Srl (DIA.PRO-ELISA).

El sistema proporciona un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM contra VZIK en muestras de suero o plasma humano (figura 2.3).



**Figura 2.3. Representación esquemática del ELISA Indirecto para la detección de anticuerpos IgM a VZIK (DIA.PRO-ELISA).**

El sistema comercial DIA.PRO-ELISA se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante para la utilización de un procesador automatizado de microplacas de ELISA. Antes de comenzar el procedimiento, se estableció la distribución e identificación de las muestras de los pacientes, así como los controles positivos, negativos y el calibrador del ensayo, como se muestra en el siguiente protocolo (figura 2.4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B											
B	N											
C	P											
D	1											
E												
F												
G												
H												93

**Figura 2.4. Protocolo para la distribución de las muestras de suero y controles del ensayo. A1: Blanco de la prueba (B), B1: Control negativo (N), C1: Control positivo (P), D1 a H12: Muestras de suero enumeradas consecutivamente.**

Dispuesto dicho protocolo, se realizó el procedimiento de dispensado de los reactivos de la siguiente manera: sobre la placa sensibilizada con antígeno sintético de la proteína NS1 del VZIK y con excepción del primer pocillo (A1) considerado como blanco de la prueba se adicionaron 50  $\mu$ L de una solución conteniendo anticuerpos neutralizantes anti-anticuerpos humanos del tipo IgG en 2 % de caseína, solución de citrato de sodio a 10mM y pH 6.0 y asida de sodio al 0.09%. Seguidamente se añadió 100  $\mu$ L por triplicado del control negativo y simple el control positivo, incluyendo las muestras de los pacientes diluidas en 1: 101 en solución conteniendo 2 % caseína, citrato de sodio al 10mM y pH 6.0, asida de sodio al 0.09% y Tween 20 al 0.2 %. Posterior, se incubó la placa por 60 min a una temperatura de 37°C. Al finalizar la incubación se realizaron 5 lavados con una solución tamponada (Tween 20, pH 7.0) y se adicionaron 100  $\mu$ L de un conjugado policlonal anti IgM humana marcado con enzima peroxidasa (ABS 5%, 10mM Tris pH 6.8 y 0.02 de sulfato de gentamicina), con excepción del primer pocillo (A1), lo cual se incubó por 60 min a una temperatura de 37°C. Culminada esta segunda incubación se repitieron los 5 ciclos de lavado, adicionándose posteriormente 100  $\mu$ L de una solución cromógena de sustrato

conteniendo 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) al 0.03%, 50 mM de solución fosfato-citrato, 4 % de dimetilsulfoxido y 0.02 % de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a todos los pocillos sin excepción e incubando la reacción por 20 min a TA. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción adicionando 100 µL de una solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.3M) y se realizó la lectura de la microplaca a una longitud de onda de 450 nm y con filtro de referencia de 620 nm.

### Cálculo de los resultados

Los resultados de las pruebas se calculan mediante un valor de corte (Co) determinado con la siguiente fórmula en el valor medio de densidad óptica 450nm del control negativo (NC):

$$\text{NC} + 0.250 = \text{Valor de corte (Co)}$$

**El fabricante recomienda que:** cuando el cálculo del resultado es realizado por un sistema operativo de una estación de trabajo automatizada ELISA, el operador debe asegurarse de utilizar la formulación adecuada para generar la interpretación correcta de los resultados.

### Interpretación de los resultados

Los resultados de las pruebas son interpretados como una relación del valor de la muestra OD450nm (S) y el valor de corte (Co), o S/Co, de acuerdo con la siguiente (**tabla 2.1**):

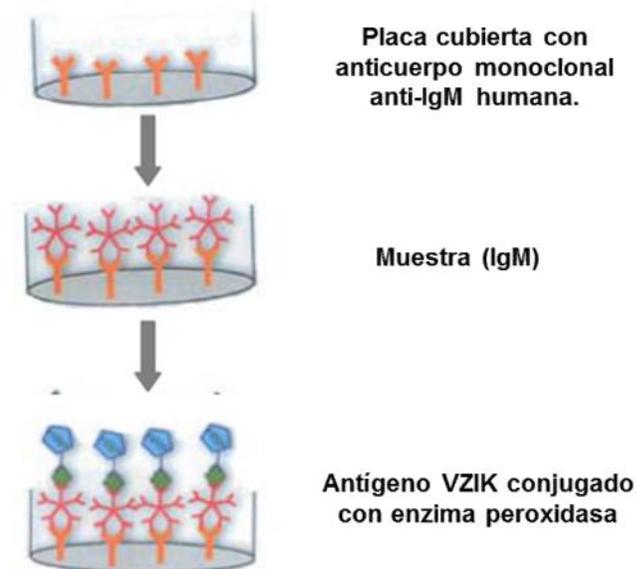
**Tabla 2.1. Interpretación de los resultados para el sistema DIA.PRO-ELISA**

.S/Co	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 – 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no ha desarrollado anticuerpos IgM contra VZIK mientras que un resultado positivo es indicativo de una infección por VZIK en curso.

### **2.3.3 ELISA de Captura para la detección de Anticuerpos IgM a VZIK de IBL International GMBH (IBL-ELISA).**

El sistema de ELISA de captura de IBL fue desarrollado para la determinación cualitativa de anticuerpos de clase IgM contra VZIK en muestras de suero o plasma humano (figura 2.5).



**Figura 2.5. Representación esquemática del ELISA de captura de anticuerpos IgM a VZIK (IBL-ELISA).**

El sistema comercial IBL-ELISA se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante para la utilización de un procesador automatizado de microplacas de ELISA. Antes de comenzar el procedimiento, se estableció la distribución e identificación de las muestras de los pacientes, así como los controles positivos, negativos y el calibrador del ensayo, como se muestra en el siguiente protocolo (figura 4.6)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B											
B	C											
C	N											
D	P											
E	1											
F												
G												
H												92

**Figura 4.6 Protocolo para la distribución de las muestras de suero y controles del ensayo. A1: Blanco, B2: Calibrador, C1 Control negativo, D1: Control positivo, E1-H12: Muestras de suero enumeradas consecutivamente.**

Dispuesto dicho protocolo, se realizó el procedimiento de dispensado de los reactivos de la siguiente manera: sobre la placa sensibilizada con anticuerpos anti-IgM humana y con excepción del primer pocillo (A1) considerado como blanco de la prueba se adicionaron 100 µL de los controles y calibradores de la prueba, además de las muestras de los pacientes diluidas en 1: 101 en solución de fosfato salina en 10 mM. Posterior, se incubó la placa por 60 min a una temperatura de 37°C. Al finalizar la incubación se realizaron 3 lavados con una solución tamponada al 0.2 M y se adicionó 100 µL una solución de conjugado que contiene al VZIK unido a la enzima peroxidasa, con excepción del pocillo A1. Este paso fue incubado a una temperatura de 37°C por un tiempo de 30 minutos. Culminada esta segunda incubación se repitieron los 3 ciclos de lavado, adicionando posteriormente 100 µL de una solución cromógena de sustrato conteniendo TMB y 5 % de N-metilpirrolidona, reacción que se incubó por 15 min a TA. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción adicionando 100 µL de una solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.2M) y se

realizó la lectura de la microplaca a una longitud de onda de 450 nm y con filtro de referencia de 620 nm.

### **Cálculo de los resultados**

El sistema IBL-ELISA reconoce como criterios de validez del ensayo los siguientes:

- Sustrato en blanco: Valor de absorbancia < 0.100
- Control negativo: Valor de absorbancia < Cut-off
- Cut-off Control: Valor de absorbancia 0.150- 1.300
- Control Positivo: Valor de absorbancia > Cut-off

Si estos criterios no se cumplen. La prueba no es válida y debe repetirse.

El valor de corte es considerado el promedio de las densidades ópticas (DO) obtenidas para el calibrador de la prueba y el sistema recomienda que los resultados se expresen en unidades (U) mediante la fórmula siguiente:

**Medias de las DOs de la muestra X 10= Unidades(U)**

### **Valor de corte**

En la tabla 2.2 se representa la interpretación de los resultados en funciones de las unidades determinadas para cada muestra.

**Tabla 2.2. Interpretación de los resultados para el sistema IBL-ELISA.**

Unidad ( 10 U)	Interpretación
< 9 U	Negativo
9 – 11 U	Equívoco
> 11 U	Positivo

## 2.4 Prueba Rápida

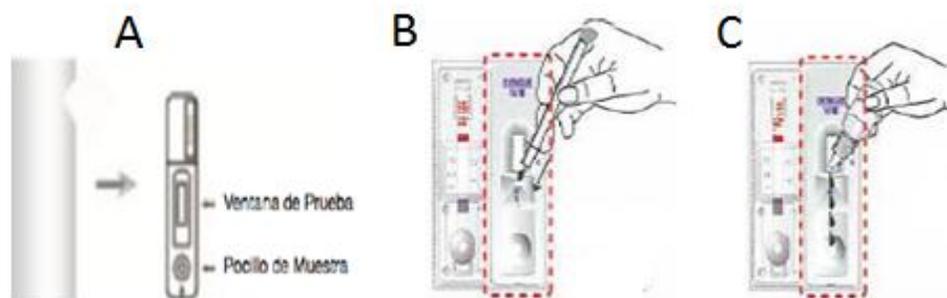
### 2.4.1 Prueba rápida para la determinación de anticuerpos IgM a VZIK de Artron Laboratories Inc( Artron-PR)

Artron es un ensayo inmunocromatográfico *in vitro* para la determinación de anticuerpos IgM a VZIK de forma cualitativa y utilizando muestras sueros, plasma o sangre total. Este sistema viene presentado en formato de cassette y solo proporciona un resultado preliminar.

#### Procedimiento

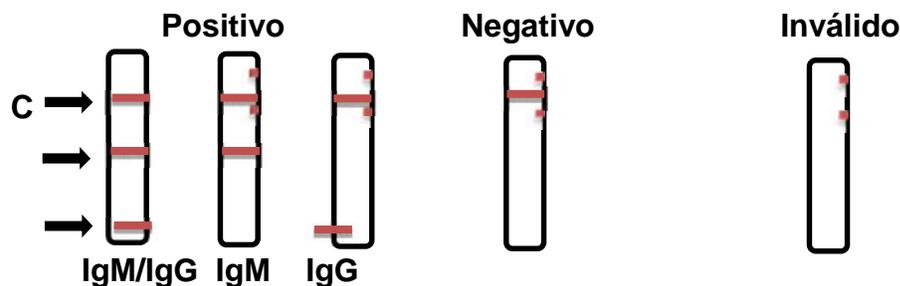
El sistema comercial Artron-PR fue utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante. La metodología de la prueba y la interpretación de los resultados se describieron de la forma siguiente:

Se retiró el dispositivo de prueba de la bolsa sellada rasgando la muesca y colocándolo sobre una superficie plana **(A)**. Se agregó 5  $\mu$ L de la muestra de suero con la pipeta en la ventana correspondiente a la muestra (área inferior cerca de la ventana de prueba) **(B)**. Inmediatamente se agregaron 2 gotas (80  $\mu$ L) de la solución tamponada del ensayo en el mismo pozo donde se añadió la muestra **(C)** (figura 2.7).



**Figura 2.7. Representación del procedimiento del sistema comercial Artron-PR.**

Se leyeron los resultados a los 10 minutos de manera cómo se mostró en la interpretación de los resultados (figura 2.8).



**Figura 2.8. Interpretación de los resultados para el sistema Artron-PR:**

### **Negativo**

Una sola banda de color rosa aparece en el área de control (C), lo que indica un resultado negativo para la infección por VZIK.

### **Positivo**

Bandas de color rosa aparecerán en el área de control (C) y las áreas T1 y/o T2.

1. Positivo a IgG e IgM, aparecen bandas visibles en las áreas T1 y T2, indicando un resultado positivo para una posible infección primaria tardía o infección secundaria aguda.
2. Positivo a IgM, aparece una banda visible en el área T2, lo cual indica un resultado positivo para una posible infección primaria.
3. Positivo a IgG, aparece una banda visible en el área T1, lo cual indica un resultado positivo para una posible infección secundaria o previa del Zika.

### **Inválidado**

No hay banda visible en la región de control (C). Repita el procedimiento con un nuevo dispositivo de prueba. Si la prueba sigue fallando, póngase en contacto con el distribuidor con el número de lote.

### **2.5 Prueba Formato Western Blot.**

#### **2.5.1 Ensayo de Inmunoblot para la determinación de anticuerpos IgM contra VZIK de Mikrogen Diagnostik (Mikrogen-Blot).**

Mikrogen-Blot es un Inmunoensayo cualitativo de detección de bandas o líneas. El principio de análisis permite una alineación de cada uno de los antígenos por separado, a diferencia de las pruebas tipo ELISA, lo que facilita la identificación de los anticuerpos específicos contra los antígenos individuales de los virus ZIK, DEN y CHIK. El ensayo utiliza los antígenos recombinantes siguientes correspondientes a cada virus: VZIK (NS-1 y proteína E), VDEN (NS-1 y proteína E) y VCHIK (proteína E1).

Aunque el ensayo fue diseñado para la discriminación entre 3 infecciones diferentes utilizando una muestra de suero, como parte del estudio y los objetivos seguidos, el sistema fue evaluado para la identificación de la infección por VZIK mediante la determinación de anticuerpos IgM específicos y principalmente en respuesta al antígeno recombinante de NS1.

### **Procedimiento de análisis**

El procedimiento del ensayo se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Se colocaron las tiras de análisis en 2 ml de solución tampón de lavado, luego se le añadió 20 µL de la muestra de suero incubándose luego por una hora sacudiéndose ligeramente. Posteriormente se pipeteo en cada concavidad 2 ml de tampón de lavado para lavar las tiras durante 5 minutos sacudiendo ligeramente, se le añadió 2 ml de conjugado incubándose de igual manera durante 45 minutos para luego de la incubación se la

añadiera el sustrato y su posterior solución de parada de la reacción. Se colocaron las tiras en papel secante para luego ser leída por método visual y por el software recomScan.

### Resultados

La evaluación de las tiras de análisis puede tener lugar visualmente o mediante ordenador utilizando el software de evaluación de tiras de análisis llamado recomScan. El software recomScan se utiliza para facilitar la evaluación de las tiras de análisis. También el sistema incluye una modelos de hojas (Anexo) donde se disponen las tiras después de secada que ayuda tanto para el análisis visual como el automatizado. La evaluación del análisis puede tener lugar, si se cumplen los siguientes criterios:

1. Las bandas de control de reacción (línea superior) están claramente coloreadas, se reconocen las bandas oscuras.
2. La clase anticuerpo (segunda banda): la banda control de conjugado IgG o IgM debe tener una clara coloración.
3. Control (tercera banda): debe mostrar una débil pero visible coloración.

El sistema recomienda una evaluación de la intensidad de las bandas como se muestra en la Tabla 2.3.

. **Tabla 2.3. Evaluación de la intensidad de las bandas referida a la banda de corte.**

Intensidad de la coloración de las bandas	Evaluación
No hay reacción	-
Intensidad muy débil (menor que la banda Cut-off)	+/-
Intensidad débil (igual que la banda Cut-off)	+
Intensidad fuerte (mayor que la banda Cut-off)	++
Intensidad muy fuerte	+++

No obstante, como objetivo en nuestro estudio los resultados obtenidos de todos los sistemas tenían que ser homogenizados, por lo que en el análisis de la respuesta de anticuerpos IgM frente a la proteína recombinante NS1 utilizada del VZIK se dispuso una interpretación de los resultados bajo un análisis visual y donde una no reacción fue considerada como un caso negativo, una banda visible débil o fuerte superando en intensidad a la respuesta frente a la recombinante NS1 del VDEN como un caso positivo y una banda visible débil o fuerte que no supera en intensidad la respuesta frente a la recombinante NS1 del VDEN como un caso equivoco.

### **2.6 Análisis estadístico.**

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico Epidat 3.1 con el cual se determinó la sensibilidad, especificidad, índice de validez, valor predictivo positivo y negativo y el índice de Kappa de los sistemas comerciales comparándolo con la técnica de referencia y clasificándolos según la tabla 4.4. También fue utilizado en la comparación de proporciones para la determinación de la significación (p) con intervalo de confianza del 95% en el análisis según el tipo inmunidad a VDEN.

**Tabla 2.4: Criterio de fuerza de concordancia según el valor de Kappa obtenido.**

Valoración del Índice Kappa	
Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0.40	No Aceptable
0.40 - 0.75	Aceptable
> 0.75	Excelente

Para la evaluación de las características operacionales de los diferentes sistemas comerciales fue tomado como referencia el protocolo utilizado por el TDR/OMS/PDVI en el proyecto de evaluación de sistemas diagnósticos (93). En este protocolo se evaluaron las diferentes características: claridad de las instrucciones, complejidad técnica e interpretación de resultados, dándole valores desde 0 al 3 en función de su complejidad, donde una puntuación de **0** fue tomada como la mayor dificultad y complejidad, **1** como bastante claro, **2** como muy claro y **3** una clasificación de excelente (Anexo 1). Para esta evaluación participaron tres operadores, donde cada uno llenó el protocolo establecido para cada estuche comercial, señalando de forma individual su criterio de las diferentes características de los sistemas en estudio. También se incluyó cualquier comentario que quisieron realizar.

### **2.7 Aspectos éticos.**

El estudio se realizará de acuerdo a los principios éticos expresados en la Declaración de Helsinki. Así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba. Predominarán los principios de voluntariedad, beneficencia y confidencialidad en la recogida de los datos obtenidos en la base de datos de la vigilancia de VZIK.

*CAPÍTULO 3:  
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.*

### **CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Una prueba diagnóstica para un agente infeccioso puede ser usada para demostrar la presencia o ausencia de infección o para detectar evidencia de infecciones previas, lo cual es crucial en el manejo clínico del paciente y por lo tanto para el control de la enfermedad. Los métodos diagnósticos deben ser simples, fáciles de ejecutar y además deben brindar un resultado lo más temprano posible.

Con el avance tecnológico, diferentes firmas comerciales han desarrollado nuevos ensayos, los cuales pudieran contribuir a un mejor diagnóstico. Sin embargo, estas pruebas, deben ser evaluadas bajo un rango de condiciones, las cuales serán similares a las encontradas en la práctica diaria.

Los métodos serológicos han sido de gran utilidad para el diagnóstico de las infecciones virales así como para el seguimiento epidemiológico de estas, principalmente mediante la detección de anticuerpos de IgM en la etapa aguda tardía o convaleciente temprana y una posterior confirmación por IgG utilizando sueros pareados. No son considerados métodos diagnósticos tempranos, pero en la actualidad son una de las principales herramientas en todos los laboratorios que realizan este tipo de actividad.

Para la infección por VZIK se plantea que la respuesta más temprana de anticuerpos es detectable de 4 a 7 días después del inicio de los síntomas. Los anticuerpos IgM llegan a su máxima expresión después de dos a tres semanas permaneciendo detectables por varios meses, mientras que los anticuerpos IgG persisten toda la vida (48).

### **3.1 Sistemas comerciales con formato ELISA para la detección de anticuerpos IgM a VZIK.**

#### **3.1.1 Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial Euroimmun-ELISA.**

Los sistemas inmunoenzimáticos sobre fase sólida conocidos como ELISA se han convertido en las pruebas más usadas para el diagnóstico serológico de infecciones virales, por su elevada especificidad, sensibilidad y fácil ejecución.

Para la evaluación de los indicadores de desempeño del sistema comercial Euroimmun-ELISA se trabajó un total de 100 muestras de sueros confirmadas a VZIK y 100 negativas pertenecientes a pacientes con infecciones no relacionadas a este agente. De las 200 muestras utilizadas para la evaluación, 8 (4 correspondientes al panel positivo y 4 al panel negativo) resultaron equívocos, los cuales el fabricante recomienda la toma de una segunda muestra con 2 ó 3 días de diferencia para una nueva evaluación. Para el estudio solo contábamos con 200 determinaciones por lo que no fue posible un nuevo procesamiento de los casos equívocos y estos no fueron tomados en cuenta para el análisis del desempeño del sistema.

En la tabla. 3.1 se muestran los resultados obtenidos en la comparación entre los ensayos de referencia y el sistema comercial Euroimmun-ELISA, donde se encontró una coincidencia de 15 sueros positivos y 96 negativos. Un total de 81 sueros fueron discordantes, resultando positivos por los ensayos de referencia pero negativos por el sistema en evaluación.

**Tabla 3.1 Comparación entre el sistema Euroimmun-ELISA y las Técnicas de Referencia.**

	Técnicas de Referencias*	
	+	-
+	15	0
EURO-ELISA		
-	81	96

\* PCR-TR, MAC-ELISA y MEI

En el análisis comparativo se obtuvo una sensibilidad de 15,63 % (IC 95%: 7,84-23,41), una especificidad del 100 % (IC 95%: 99,48-100) y un índice de validez de 57,81 % (IC 95%: 50,57-65,06). El valor predictivo positivo fue de 100 % (IC 95 %: 96,67-100) y el negativo de 54,24 % (IC 95 %: 42,62-61,86). El índice Kappa fue de 0,15 (IC 95%: 0,08-0,23), mostrando una fuerza de concordancia de no aceptable para el sistema Euroimmun-ELISA en comparación con las pruebas de referencia, lo que indica una limitación de su utilidad para el diagnóstico de la infección reciente por VZIK.

Varias han sido las evaluaciones realizadas para el sistema Euroimmun-ELISA donde se muestran valores de sensibilidad muy variables en la detección de los anticuerpos IgM a VZIK, aunque la especificidad del ensayo se ha mantenido robusta, con porcentajes superiores al 95 % y logrando en ocasiones hasta un 100%. En un estudio realizado por Steinhagen y cols. 2016 (94) donde trabajaron con un panel de 27 casos confirmados por RT-PCR y 252 casos con otras patologías no relacionadas a VZIK, observaron una sensibilidad en la detección de anticuerpos IgM del 58,8 % con una especificidad del 99,8 %. En esta evaluación 4 de las 27 muestras de sueros positivas por PCR fueron colectadas en días menores al 5to día de inicio de los síntomas, por lo que un resultado negativo de IgM en estas muestras era de esperarse, ya que en este periodo de la

infección estos anticuerpos aún no pudieran ser detectables. Kadkhoda y cols. 2017 (95), utilizando 13 muestras de suero confirmadas de infección a VZIK mediante el PCR (4) o PRNT (9) y 153 correspondientes a pacientes con otras patologías no relacionadas a VZIK, obtuvieron una sensibilidad de 53,84 % y una especificidad del 98,7 %. En este estudio, las muestras confirmadas por PCR (4) también fueron colectadas con menos de 4 días de inicio de los síntomas, resultando negativas en la detección de anticuerpos IgM mediante Euroimmun-ELISA. Dos evaluaciones realizadas en el mismo año 2017 por Granger y cols. (12) y L'Huillier y cols. (96), muestran sensibilidades mucho más bajas para este sistema, utilizando como técnicas de referencia sistemas MAC-ELISAs que detectan el mismo marcador serológico IgM y apoyados también por el ensayo de PRNT. Granger y cols. mostraron sensibilidades de 20,7 % y 17,9 % frente a los MAC-ELISAs del CDC y InBios, permaneciendo las especificidades robustas con valores de 95,7 % y 91,7 % respectivamente. Con respecto a L'Huillier y cols. la sensibilidad de IgM frente al MAC-ELISA fue de 28,9 % con una especificidad del 96,6 %.

Como se puede observar hay una tendencia de decrecimiento en la sensibilidad para la detección de anticuerpos IgM encontrada para el estuche Euroimmun-ELISA en las diferentes evaluaciones realizadas, lo que habla de su poca utilidad en la determinación de casos de infección reciente por VZIK.

El sistema Euroimmun es un ELISA indirecto que utiliza como recubrimiento un antígeno recombinante NS1 de VZIK, el cual ofrece mayor especificidad en el reconocimiento de los anticuerpos policlonales IgM anti NS1 presentes en el suero de pacientes infectados con VZIK, además utiliza un conjugado monoclonal anti IgM humana que garantiza la captura específica de la IgM que conforma el inmunocomplejo NS1 recombinante-IgM humana anti-NS1.

Para evitar que anticuerpos IgG presentes en el suero de individuos con una previa infección por otros Flavivirus, se unan a la proteína recombinante, ejerciendo así una competencia con la IgM por los sitios de reconocimientos, es utilizado un tratamiento de las muestras con solución absorbente de anticuerpos IgG, lo que debe garantizar solo la

unión de los anticuerpos IgM anti VZIK a esta proteína. Aunque en el presente estudio se contó con un panel de casos confirmados a VZIK, representado por un 85 % de casos con inmunidad elevada de anticuerpos IgG a VDEN, el sistema no mostró una sensibilidad adecuada a la detección de anticuerpos IgM.

De tal manera, consideramos que el bajo porcentaje de IgM obtenido por el ensayo de Euroimmun-ELISA, no está influenciado por los altos niveles de IgG presentes en las muestras de sueros, pero si por alguno de los componentes que conforman el estuche diagnóstico (Anexo 2), teniendo en cuenta que el laboratorio cumplió con las temperaturas de conservación de los estuches, la fecha de caducidad de los reactivos y los requisitos de procesamiento indicados por el fabricante.

Una posible explicación pudiera estar dada ya que los epítopes conformacionales presentes en la proteína recombinante utilizada como recubrimiento en el sistema, son usualmente más sensibles antes la desnaturalización bajo el efecto de temperaturas de recubrimiento. No obstante esta hipótesis solo pudiera ser demostrada por los productores pues las placas son comercializadas con el paso de recubrimiento procesado, pero, de alguna manera, un fenómeno como este pudiera explicar el decrecimiento de la sensibilidad en la detección de los anticuerpos IgM, mostradas en las sucesivas evaluaciones realizadas para este estuche diagnóstico.

Contrario a la sensibilidad, la alta especificidad expresada refiere una posible utilidad en la confirmación de casos con infección pasada de VZIK pero a través de la detección de anticuerpos IgG y apoyada mediante el ensayo de PRNT. La combinación de estos ensayos pudiera tener una elevada utilidad en estudios de seroprevalencia de anticuerpos a VZIK en poblaciones de riesgo y no riesgo.

Con respecto a los valores de kappa encontrados para este sistema, se muestra un decrecimiento desde un valor de 0,61 considerado de aceptable y obtenido en el estudio de Kadkhoda y cols. 2017, hasta un valor no aceptable de 0,15 encontrado por L'Huillier y cols. 2017. En nuestra investigación se muestra también un valor no aceptable de kappa (0,15) y similar al encontrado por L'Huillier y cols. 2017, lo que pudiera estar indicando la

no utilidad de Euroimmun-ELISA, en nuestras condiciones, como sistema diagnóstico serológico para la detección de infección reciente por VZIK.

### **3.1.2 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM del sistema comercial Euroimmun-ELISA frente a sueros positivos a VZIK con o sin inmunidad a VDEN.**

De los 100 sueros positivos a VZIK en el panel desarrollado, 15 no presentaron una inmunidad a VDEN y 85 les fue determinado la presencia de anticuerpos IgG a VDEN con títulos elevados mediante los ensayos de referencia del Laboratorio Arbovirus IPK. De igual manera, 4 sueros quedaron clasificados como equívocos sin ser incorporados en el análisis realizado, de ellos 2 correspondían a casos sin inmunidad (CSI) y los otros 2 a casos con inmunidad (CCI) a VDEN. El total de casos analizados fueron 96.

El sistema Euroimmun-ELISA fue capaz de detectar un 15.4 % (2/13) de los CSI y un 15.7 % (13/83) de los CCI a VDEN, lo que plantea que el sistema no discrimina en la detección de ambos tipos de casos ( $p= 0.7002$ ), infiriendo que la producción de anticuerpos ante otros flavivirus, no representa una influencia en los niveles de detección del sistema como se había planteado anteriormente.

Para un sistema diagnóstico serológico, en la definición de un caso de infección reciente por VZIK, sería este un resultado ventajoso, pero los bajos niveles de sensibilidad presentado por Euroimmun-ELISA frente al panel de evaluación lo muestran como un sistema no útil.

Frente a infecciones por otros Flavivirus como VDEN, ha sido observado que la reactividad cruzada de los anticuerpos IgM es mucho menor a la presentada por los anticuerpos IgG, de manera que se ha podido utilizar esta característica para la posible identificación serológica del serotipo infectante (VDEN 1-4) en un brote epidémico utilizando un grupo de muestras de suero procedente de una misma transmisión y en un área geográfica determinada (87, 97, 98).

Un estudio realizado por Yang Tsai y cols. 2017 (99), utilizando el sistema Euroimmun IgM ZIKA para distinguir entre casos con infección por VZIK y VDEN, mostraron una baja

reactividad de los anticuerpos IgM frente a casos de infección por VDEN, con porcentajes de detección de 0% en primarios y 4 % en secundarios. A su vez observaron un porcentaje de 90 % para casos primarios de VZIK y de 55 % para casos con inmunidad previa a VDEN. En este estudio, a diferencia de nuestro trabajo, el sistema muestra valores de sensibilidad y especificidad aceptables de 72.5 % y 97.4 % respectivamente.

### 3.1.3 Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial DIAPRO-ELISA.

De las 200 muestras de suero utilizadas para la evaluación, 6 (2 correspondientes al panel positivo y 4 al panel negativo) resultaron equívocos, las cuales no se tuvieron en cuenta para el análisis de los parámetros de desempeño del sistema.

En la tabla. 3.2 se muestran los resultados obtenidos en la comparación entre los ensayos de referencia y el sistema comercial DIAPRO-ELISA, donde se encontró una coincidencia de 86 sueros positivos y 95 negativos. Un total de 13 sueros resultaron discordantes por el sistema evaluado, 12 de los casos positivos y 1 de los negativos.

**Tabla 3.2. Comparación entre el sistema DIAPRO-ELISA y las Técnicas de Referencia.**

	Técnicas de Referencias*	
	+	-
+	86	1
-	12	95

\* PCR-TR, MAC-ELISA y MEI

En el análisis comparativo se obtuvo una sensibilidad de 87,76 % (IC 95%: 80,75-94,76), una especificidad de 98,96 % (IC 95%: 96,41-100) y un índice de validez de 93,30 % (IC 95%: 89,52-97,08). El valor predictivo positivo fue de 98,85 % (IC 95 %: 96,04-100) y el negativo de 88,79 % (IC 95 %: 82,34-95,23). El índice kappa fue de 0,8661 (IC 95%: 0,7963-0,9360), mostrando una fuerza de concordancia de excelente para el sistema en evaluación en comparación con las pruebas de referencia, lo que valida su utilidad para el diagnóstico de la infección por VZIK.

El sistema DIAPRO-ELISA es un estuche comercial que salió recientemente al mercado y ha sido poco evaluado. De este estuche solo se reporta un único trabajo del año 2017 desarrollado por Pasquier y cols. (100), donde fueron comparados los parámetros diagnósticos entre los sistemas comerciales de formato ELISA indirecto: DIAPRO y Euroimmun, utilizando un método molecular como referencia para la confirmación de la infección por VZIK en las muestras de suero positivas usados en el panel de evaluación. El sistema DIAPRO mostró un mayor porcentaje de sensibilidad en la detección de anticuerpos IgM que el sistema Euroimmun (73,3 % vs 53,3 %) y una mayor duración en el tiempo en muestras convalecientes colectadas en días mayores al 10<sup>mo</sup> día de infección (100 % vs 60%). Las especificidades mostradas para ambos sistemas fueron las máximas (100%).

En el presente estudio los porcentajes de especificidad en ambos ensayos indirectos fueron excelentes (98,9% y 100%) y el sistema DIAPRO mostró una mayor sensibilidad que el sistema Euroimmun (87,76 % y 15,6 %) en la detección de anticuerpos IgM a VZIK, aunque para este último la sensibilidad obtenida fue mucha más baja que en el estudio de Pasquier y cols. 2017 (100).

Una posible explicación de la alta sensibilidad obtenida por DIAPRO pudiera estar dada por el uso de antígenos sintéticos en el recubrimiento de las placas, ya que a diferencia de las proteínas recombinantes, estos péptidos presentan una conformación lineal y ha sido planteado su mayor estabilidad ante cambios de temperatura en el proceso de recubrimiento (101). De igual manera ha sido reportado en varios trabajos la elevada

capacidad de unión de anticuerpos policlonales procedentes de muestras de suero a estas secuencias de péptidos lineales, así como el eficiente incremento de esta unión cuando las secuencias son franqueadas en sus extremos con aminoácidos adicionales (102, 103).

Otra característica que pudiera favorecer al sistema DIAPRO en el nivel de sensibilidad presentado, puede ser el uso de un conjugado policlonal anti IgM humana lo que incrementa la probabilidad de reconocimiento de los anticuerpos IgM humanos del suero por varios epítopes presentados por esta inmunoglobulina de gran tamaño, por lo que el número de IgM capturada por el conjugado pudiera ser mucho mayor.

Como parte de las pruebas de validación del ensayo, presentes en el instructivo brindado por el estuche (Anexo 3), se muestra porcentajes de sensibilidad y especificidad ambos del 98 %, utilizando un panel de 28 muestras positivas por MAC-ELISA del CDC y 400 muestras de sueros procedentes de individuos sanos y donantes de sangres supuestamente sanos. Como limitante no presenta un panel de sueros para la evaluación de la reactividad cruzada frente a otras infecciones por Flavivirus o patologías que pudieran influir en una respuesta inespecífica del sistema.

En cuanto a los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos observar que el sistema DIAPRO muestra los mejores parámetros de sensibilidad y especificidad de los cinco sistemas evaluados, además del índice kappa, el cual fue considerado de excelente, indica su utilidad como sistema diagnóstico serológico en la detección de infecciones recientes a VZIK.

### **3.1.4 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM del sistema comercial DIAPRO-ELISA frente a sueros positivos a VZIK con o sin inmunidad a VDEN.**

Para el sistema DIAPRO-ELISA fueron detectados 2 casos considerados como equívocos, los cuales ambos pertenecían al grupo de CCI a VDEN. Por esa razón, el total de casos analizados fueron 98.

El sistema DIAPRO-ELISA fue capaz de detectar un 87.0 % (13/15) de los CSI y un 88.0 % (73/83) de los CCI a VDEN, lo que habla que el sistema no discrimina en la detección de ambos tipos de casos ( $p=7732$ ), infiriendo que la producción de anticuerpos ante otros flavivirus, no representa una influencia en los niveles de detección del sistema.

En el estudio presentado por Pasquier y cols. 2017, de las 15 muestras de suero procedentes de pacientes confirmados con infección a VZIK, el 86,7 % (13/15) presentaban anticuerpos a VDEN de una infección previa y solo 2 casos fueron considerados primarios de infección a VZIK sin respuesta de anticuerpos a Flavivirus, reafirmando el criterio de casos primarios con una IgM positiva a VZIK mediante el ensayo MAC-ELISA del CDC. También el 26,7 % (4/15) de estos casos presentó una IgG reactiva correspondientes a una previa infección a VCHIK. A pesar de la presencia de una inmunidad previa a otras Arbovirosis, incluida el VDEN con la cual se ha reportado los mayores niveles de reactividad cruzada dada la similitud genética entre ambos virus de la misma familia (*Flaviviridae*), el sistema presentó una sensibilidad mayor del 73,3 % en comparación al sistema Euroimmun en muestras de pacientes confirmados con colecta al 7<sup>mo</sup> día de inicio de los síntomas, la cual alcanzó el 100 % de detección de anticuerpos IgM al 11<sup>no</sup> día de colecta para los mismos casos.

### **3.1.5 Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial IBL-ELISA.**

Para el estuche comercial IBL-ELISA contábamos con 174 determinaciones, por lo que solo pudimos ensayar igual número de casos, correspondiendo a 100 positivos y 74 negativos. De las 174 muestras, 7 casos (6 del panel positivo y 1 del panel negativo) resultaron equívocos, los cuales no se tuvieron en cuenta para el análisis de los parámetros de desempeño del sistema.

En la tabla. 3.3 se muestran los resultados obtenidos en la comparación entre los ensayos de referencia y el sistema comercial IBL-ELISA, donde se encontró una coincidencia de 61 sueros positivos y 68 negativos. Un total de 38 sueros resultaron discordantes por el

sistema evaluado, 33 de los casos positivos y 5 de los negativos clasificados por las técnicas de referencia.

**Tabla 3.3. Comparación entre el sistema IBL-ELISA y las Técnicas de Referencia.**

	Técnicas de Referencias*	
	+	-
+	61	5
IBL-ELISA		
-	33	68

\* PCR-TR, MAC-ELISA y MEI

En el análisis comparativo se obtuvo una sensibilidad de 64,89 % (IC 95%: 55,71-75,07), una especificidad de 93,15 % (IC 95%: 86,87-99,63) y un índice de validez de 77,25 % (IC 95%: 70,79-83,90). El valor predictivo positivo fue de 92,42 % (IC 95 %: 85,28-99,57) y el negativo de 67,33 % (IC 95 %: 57,68-76,97). El índice kappa fue de 0,5566 (IC 95%: 0,4393-0,6739), mostrando una fuerza de concordancia aceptable para el sistema en evaluación en comparación con las pruebas de referencia, lo que valida su posible utilidad para el diagnóstico de la infección reciente por VZIK.

El sistema IBL-ELISA es un ensayo de captura de anticuerpos IgM que aún no ha salido al mercado y se encuentra en el proceso de evaluaciones en los diferentes laboratorios certificados para la evaluación de estuches diagnósticos. No han sido reportados estudios anteriores de este estuche por lo que contamos con las evaluaciones correspondientes realizadas por el productor como parte de los parámetros de desempeño del sistema y la

reactividad cruzada frente a un panel especificado, presentados en el instructivo disponible (Anexo 4).

Varios sistemas MAC-ELISA han sido evaluados con el objetivo de lograr un sistema serológico para la detección de infecciones recientes a VZIK, principalmente sobre los grupos de riesgo como las mujeres embarazadas. Safronetz y cols. 2017 (104) evaluaron 3 sistemas MAC-ELISAs observando elevados niveles de especificidad (> 90 %) de estos ensayos con la excepción de InBios MAC-ELISA que mostró una elevada respuesta cruzada frente a casos de infección por VDEN, mientras que los porcentajes de sensibilidad fueron bajos (37%-65%), nuevamente con la excepción del sistema InBios que logro un 100% de detección de los casos confirmados por VZIK. Granger y cols. 2017 (12), utilizando como prueba de referencia el MAC-ELISA del CDC, evaluó el sistema InBios MAC-ELISA, mostrando excelentes parámetros de desempeño tanto en muestras colectadas de un estudio retrospectivo (sensibilidad: 93,1% y especificidad: 95,7%) como muestras colectadas en un estudio prospectivo (sensibilidad: 87,5% y especificidad: 98,5 %). Los parámetros de kappa para este estudio, se mantuvieron en el rango de aceptable y excelente (0,52-0,83). En un estudio más reciente Balmaseda y cols. (2018) (105) evaluaron 2 sistemas MAC-ELISA: CNDR y NIAID, mostrando sensibilidades desde 70 % a 94 % y especificidades mayores a un 80 %.

En general, los sistemas MAC-ELISA pudieran lograr buenos parámetros de sensibilidad y especificidad y a su vez ser más eficientes con posibles mejoras, las cuales podrían ser realizadas sobre reactivos que componen el sistema como antígeno y conjugado.

El sistema IBL-ELISA utiliza una variante de captura donde conjuga directamente el antígeno con la enzima, y 2 pasos que son comunes en este tipo de ensayo (antígeno y conjugado) se resumen en uno solo. De esta manera este conjugado debe ser lo más específico y purificado posible para establecer un eficiente reconocimiento con los anticuerpos capturados del suero. IBL-ELISA utiliza un antígeno de VZIK no especificado por el fabricante, por lo que otras variantes de antígenos pudieran ser utilizadas, logrando mayores niveles de reconocimiento y especificación por el ensayo.

Stettler y cols. (2016) (48) trabajando con un panel de 119 anticuerpos monoclonales (AcMs) procedentes de 4 pacientes infectados con VZIK, encontraron dos sitios antigénicos (S1 y S2) específicos en la proteína NS1 de VZIK y sin reactividad cruzada por parte del resto de los AcMs. Aunque derivado de este estudio fueron utilizados los AcMs NS1 para la construcción de sistemas diagnósticos de detección de la proteína NS1 circulante en pacientes con infección aguda temprana, debería pensarse la posibilidad que proteínas recombinantes que expresen los dos sitios de reconocimiento NS1 específicos, pudieran utilizarse para el mejoramiento de la especificidad de sistemas MAC-ELISAs, como el presentado en nuestro trabajo, así también como la posibilidad de conjugarse a enzimas sin perder estructura conformacional y afinidad con los anticuerpos específicos en sueros de individuos infectados por VZIK.

En un estudio anterior, realizado por Cleton y cols. (2015) (106), evaluando la respuesta de varios sueros de pacientes con infecciones a diferentes Flavivirus frente a proteínas NS1 recombinantes construidas a estos virus y montadas sobre un sistema de microarreglos de proteínas (**del inglés: protein microarray**), observaron una elevada sensibilidad de anticuerpos IgM/IgG a las proteínas individuales con los sueros correspondientes y muy limitada reactividad cruzada, lo que denota la utilización de estas proteínas recombinantes en el desarrollo de sistemas diagnósticos serológicos.

Más reciente Mishra y cols. (2018) (103) trabajando con péptidos sintéticos y exclusivamente péptidos correspondientes a la proteína NS2B del VZIK, desarrollaron un sistema ELISA, donde conjugando estos péptidos con un sistema biotinilado y enfrentándolo posteriormente a sueros de pacientes con infección a VZIK en la etapa convaleciente temprana (entre los 5 y 7 días de inicio de los síntomas), observaron excelentes porcentajes de sensibilidad (96%) y especificidad (94%) del ensayo.

Otra alternativa a tener en cuenta pudiera estar dada en el estudio realizado por Rockstroh y cols. (2017) (107), donde trabajando con la proteína E bajo una mutación en el dominio conservado II del lazo de fusión (**del inglés: fusion loop**), mediante la cual desarrollaron un sistema de formato ELISA, encontrando elevados niveles de reconocimientos de

anticuerpos procedentes de sueros de pacientes infectados por VZIK (sensibilidad: 87.5 % y especificidad: 94.2%).

### **3.1.6 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM del sistema comercial IBL-ELISA frente a sueros positivos a VZIK con o sin inmunidad a VDEN.**

Para el sistema IBL-ELISA fueron detectados 6 casos considerados como equívocos, los cuales todos pertenecían al grupo de casos con inmunidad a VDEN. El total de casos analizados fueron 94.

El sistema IBL-ELISA fue capaz de detectar un 93,3 % (14/15) de los CSI y un 59,5 % (47/79) de los CCI a VDEN, con una significación de  $p=0.0263$ , lo que habla que el sistema disminuye su detección frente a casos con inmunidad previa a otros flavivirus, en este caso VDEN.

En el estudio realizado por Balmaseda y cols (2018), donde se evaluaron dos sistemas de captura (MAC-ELISA: CNDR y NIAID), se obtuvieron mayores niveles de detección de IgM frente a casos VZIK sin inmunidad que en los casos VZIK con inmunidad previa a VDEN. Estos resultados son coincidentes a los encontrados en nuestro estudio con el sistema IBL-ELISA. Una de las posibles explicaciones pudiera estar dada en los niveles de anticuerpos IgM presentes frente a infecciones primarias y secundarias a Flavivirus. Algunos autores han observado ante infecciones por VDEN que la respuesta de anticuerpos IgM puede ser observada baja o nula en casos con infección secundaria (108, 109). Pudiera ser posible que para los sueros de casos confirmados a VZIK, donde este agente representa una infección secundaria por Flavivirus, los niveles de anticuerpos IgM en suero sean más bajos que los presentados frente a los CSI a VZIK.

Otra posibilidad sería la presencia de anticuerpos IgM procedentes de clones de células B de memoria producidos a una infección previa a otro Flavivirus, en este caso VDEN. Ha sido planteado por algunos investigadores la existencia de células B de memoria expresando anticuerpos IgM ante respuestas inmunes secundarias y con alta afinidad por

el agente infectante (110-112). De esta manera, teniendo en cuenta la baja reactividad cruzada que se reporta de los anticuerpos IgM con respecto a la IgG (87, 97, 98), la presencia de anticuerpos IgM referentes a una inmunidad previa a VDEN, en un sistema ELISA de captura donde niveles totales de IgM son capturados del suero por el anticuerpo monoclonal anti IgM humana recubierto sobre la placa , pudiera generarse una baja detección de los anticuerpos IgM correspondientes a la reciente infección por VZIK, en una etapa temprana para la producción de anticuerpos

### **3.2 Sistema comercial formato Prueba Rápida (PR) para la detección de anticuerpos IgM a VZIK.**

#### **3.2.1 Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial de tira rápida Artron-PR.**

Los ensayos inmunocromatográficos como sistemas diagnósticos se muestran como una alternativa rápida, de fácil procedimiento y que no requieren de un conocimiento técnico específico, ni de equipamiento para su procesamiento (113).

Para el estuche comercial Artron-PR se procesaron 200 muestras, correspondiendo a 100 casos positivos y 100 casos negativos. Ninguna de las pruebas fue invalidada, por lo que se tuvieron en cuenta para el análisis de los parámetros de desempeño del sistema el total de las muestras que conformaban el panel.

En la tabla. 3.4 se muestran los resultados obtenidos en la comparación entre los ensayos de referencia y el sistema comercial Artron-PR, donde se encontró una coincidencia de 18 sueros positivos y 84 negativos. Un total de 98 sueros resultaron discordantes por el sistema evaluado, 82 de los casos positivos y 16 de los negativos clasificados por las técnicas de referencia.

Tabla 3.4. Comparación entre el sistema Artron-PR y las Técnicas de Referencia.

	Técnicas de Referencias*	
	+	-
+	18	16
-	82	84

\* PCR-TR, MAC-ELISA y MEI

En el análisis comparativo se obtuvo una sensibilidad de 18,00 % (IC 95%: 9,97-26,03), una especificidad de 84,00 % (IC 95%: 76,31-91,69) y un índice de validez de 51,00 % (IC 95%: 43,82-58,18). El valor predictivo positivo fue de 52,94 % (IC 95 %: 34,69-71,19) y el negativo de 50,60 % (IC 95 %: 42,70-58,51). El índice kappa fue de 0,020 (IC 95%: -0,0841-0,1241), mostrando una fuerza de concordancia no aceptable para el sistema en evaluación en comparación con las pruebas de referencia, limitando su utilidad para el diagnóstico serológico de la infección reciente por VZIK.

Experiencias previas obtenidas de la evaluación de estuches comerciales para la detección de anticuerpos IgM entre sistemas de formato ELISA e inmunocromatográficos, han mostrado niveles de sensibilidad y especificidad menores para estos últimos (93).

El sistema comercial Artron es un ensayo inmunocromatográfico de reciente fabricación y no ha tenido evaluaciones anteriores (Anexo 5). Solo un estudio realizado por Bosch y cols (2017) (114) ha sido reportado en el desarrollo de un sistema inmunocromatográfico pero para la detección de la proteína viral NS1 a VZIK, en sueros de pacientes con infección confirmada a este agente viral y mostrando porcentajes de sensibilidad y especificidad de 81% y 86 % respectivamente, porcentajes aceptables para un sistema de detección rápida. La novedad de este sistema es que además de utilizar anticuerpos monoclonales

anti NS1 específicos incluye como marcador nanopartículas de oro las cuales no solo permiten la señalización sino una cuantificación del analítico capturado (proteína NS1 libre).

La combinación de la nanotecnología con los sistemas diagnósticos de tira rápida pudiera lograr mejoras en los niveles de detección y especificación de estos ensayos, una eficiente unión covalente frente al elemento de captura, niveles de cuantificación del marcador a capturar, menor contaminación en el ensayo, así como una fácil y rápida detección.

### **3.2.2 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM del sistema comercial de tira rápida Artron-PR frente a sueros positivos a VZIK con o sin inmunidad a VDEN.**

Mediante el sistema Artron-PR fueron procesados los 100 sueros positivos a VZIK que conformaron el panel positivo del estudio. Este sistema no fue capaz de detectar ninguno de los 15 casos que no presentaron inmunidad a VDEN contrario a los casos con inmunidad, de los cuales solo detectó un 21.2 % (**18/85**) y sin significación alguna ( $p=0.1088$ ). Estos resultados hablan acerca de que el sistema no discrimina entre ambos tipos de suero pero también que las concentraciones de anticuerpos que detecta el ensayo deben ser demasiado elevadas para lograr niveles de positividad aceptables por este.

El sistema Artron presenta ventajas y desventajas con respecto al resto de los sistemas. Entre sus ventajas se encuentran la rapidez en el procesamiento (10 minutos), la no complejidad de su procedimiento, y la posibilidad de no disponer de equipamiento especializado y condiciones de laboratorio, lo cual permite su desarrollo a niveles primarios y secundarios de salud. Entre las limitaciones pudieran encontrarse el corto tiempo de contacto de los componentes, principalmente antígeno-anticuerpo, el cual puede verse afectado por interacciones estéricas con otros componentes que puedan estar presentes en la muestra; la temperatura de incubación donde en este caso ocurrió bajo las condiciones de temperatura ambiente de laboratorio (22-24°C) y como se conoce a temperaturas mayores (37°C) se garantiza rapidez y efectividad en la unión antígeno-

anticuerpo; y por último el volumen de muestra empleado en función de los grandes volúmenes de reactivo que son utilizados en la fijación sobre la membrana de nitrocelulosa para lograr una captura rápida en un tiempo bastante corto.

### 3.3 Sistema comercial formato Western Blot (WB) para la detección de anticuerpos IgM a VZIK.

#### 3.3.1 Evaluación de los indicadores de desempeño para el sistema comercial Mikrogen-Blot

Para el estuche comercial Mikrogen-Blot se contaron con 200 determinaciones, correspondiendo a 100 casos positivos y 100 casos negativos. Ninguna de las pruebas fue invalidada, por lo que se tuvieron en cuenta para el análisis de los parámetros de desempeño del sistema el total de muestras del panel

En la tabla. 3.5 se muestran los resultados obtenidos en la comparación entre los ensayos de referencia y el sistema comercial Mikrogen-Blot, donde se encontró una coincidencia de 52 sueros positivos y 93 negativos. Un total de 55 sueros resultaron discordantes por el sistema evaluado, 48 de los casos positivos y 7 de los negativos definidos por las técnicas de referencia.

**Tabla 3.5. Comparación entre el sistema Mikrogen-Blot y las Técnicas de Referencia.**

	Técnicas de Referencias*	
	+	-
<b>+</b> <b><u>Mikrogen-Blot</u></b>	<b>52</b>	<b>7</b>
<b>-</b>	<b>48</b>	<b>93</b>

\* PCR-TR, MAC-ELISA y MEI

Para el análisis comparativo se obtuvieron una sensibilidad de 52,00 % (IC 95%: 41,71-62,29), una especificidad de 93,00 % (IC 95%: 87,50-98,50) y un índice de validez de 72,50 % (IC 95%: 66,06-78,94). El valor predictivo positivo fue de 88,14 % (IC 95 %: 79,04-97,23) y el negativo de 65,96 % (IC 95 %: 57,78-74,13). El índice kappa fue de 0,45 (IC 95%:0,0569-0,069), mostrando una fuerza de concordancia aceptable para el sistema en evaluación en comparación con las pruebas de referencia, lo que indica su posible utilidad para un diagnóstico reciente de infección por VZIK.

El sistema comercial\_Mikrogen es un ensayo de inmunoblot de reciente salida al mercado y similar a los sistemas IBL y Artron PR no ha tenido evaluaciones anteriores en laboratorios evaluadores certificados. Como única evaluación solo contamos con las pruebas correspondientes realizadas por el fabricante como parte de los parámetros de desempeño del sistema y la reactividad cruzada frente a un panel especificado en el instructivo disponible por el estuche (Anexo 6). El sistema mostró una sensibilidad y una especificidad diagnóstica de 72.7% y 100 % respectivamente, valores aceptables para un sistema de este tipo.

En el desarrollo del sistema fueron observados bandas de intensidades bajas en la detección de los anticuerpos IgM, a veces visibles pero que no superaban la intensidad de banda de corte establecida por el ensayo. Esto puede dar una medida de pérdidas de casos (falsos negativos) cuando el sistema es leído por el software recomScan, aunque el sistema fue interpretado visualmente.

### **3.3.2 Evaluación de la respuesta de anticuerpos IgM del sistema comercial de Mikrogen-Blot frente a sueros positivos a VZIK con o sin inmunidad a VDEN.**

Por el sistema Mikrogen-Blot se procesaron los 100 casos confirmados a VZIK que conformaron el panel positivo de estudio.

El ensayo fue capaz de detectar un 87.3 % (13/15) de los CSI y un 45.8 % (39/85) de los CCI a VDEN, siendo la detección más significativa para el primer grupo ( $p=0.0084$ ). Estos

resultados hablan que el sistema disminuye su detección frente a casos con inmunidad previa a otros flavivirus, en este caso VDEN.

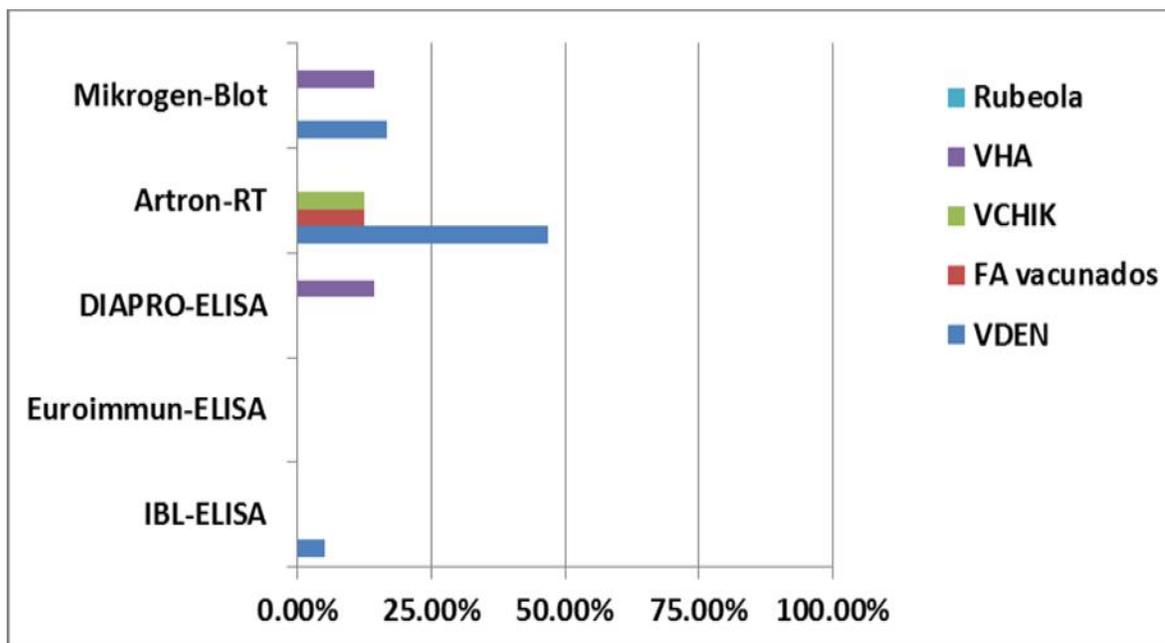
Podemos destacar que de los 39 casos detectados por el sistema con inmunidad previa a VDEN, 24 (62 %) tuvieron un reconocimiento cruzado mucho más bajo frente a la proteína recombinante de NS1 del VDEN, lo que pudiera evidenciar la presencia de anticuerpos IgM, posiblemente de memoria, pertenecientes a una infección previa a VDEN en estos casos confirmados a infección por VZIK. Por otra parte también podemos sugerir que los niveles de anticuerpos IgM en estos casos pudieran ser más bajos que en casos sin inmunidad previa como ha sido anteriormente explicado.

Contrario a los resultados obtenidos en el presente estudio, el instructivo del estuche comercial no muestra discriminación en la detección entre casos confirmados a VZIK con o sin inmunidad previa a VDEN (100% de detección para ambos).

### **3.4 Evaluación de la reactividad cruzada de los cinco sistemas comerciales frente al panel de sueros negativos del estudio.**

Uno de los principales problemas que pueden presentar los sistemas para el diagnóstico serológico es la reactividad cruzada con anticuerpos producidos contra otro agente infeccioso, dando lugar a lo que se conoce como falsos positivos. Varios factores pueden estar influyendo en este tipo de respuesta, aquellos propios del ensayo como el principio del método empleado, componentes del sistema como conjugado y antígeno; los de tipo individual como la presencia de enfermedades autoinmunes y los que dependen del agente infeccioso.

En la figura 3.1 se muestra el análisis de la reactividad cruzada de los cinco estuches comerciales serológicos evaluados en el presente estudio frente al panel de sueros negativos a infección por VZIK.



**Figura 3.1 Reactividad cruzada en los diferentes sistemas comerciales diagnósticos frente al panel negativo del estudio.**

Como se puede observar, la mayor reactividad cruzada y por ende, el mayor número de falsos positivos los está generando el sistema comercial Artron PR frente a casos con infección confirmada por VDEN con un porcentaje de 46.7%(14/30) en individuos vacunados contra VFA y un 12.5 % (1/8) y en casos sospechosos de infección por VCHIK con un 12.5 % (1/8) Este sistema muestra una reactividad cruzada frente a las principales Arbovirosis que se encuentran circulando en los últimos años en la región (115-117), por lo que la utilidad de este ensayo como sistema diagnóstico para la detección de casos con infección reciente por VZIK se ve grandemente limitada. El resto de los estuches presentaron una reactividad baja frente al panel negativo: IBL solo obtuvo un 5 % (1/20) en casos confirmados a VDEN, DIAPRO solo mostro un 14.3 % (1/7) en casos confirmados con Hepatitis A viral y Mikrogen- un 16.7 % (5/30) frente a casos de VDEN y un 14.3 (1/7)

en casos Hepatitis A Viral. El sistema Euroimmun no mostro reactividad cruzada frente al panel negativo.

La marcada reactividad cruzada de los anticuerpos es un hecho presente y es observable principalmente entre virus de una misma familia. La presencia de epítopes compartidos entre estos agentes virales es la mayor fuente que genera anticuerpos de reactividad cruzada, dando como resultado un incremento en el número de falsos positivos en los diferentes ensayos serológicos.

Un estudio realizado por Xiaojun y cols 2016 (51), evidencia este fenómeno al concretar alineamientos del genoma del VZIK con respecto a otros flavivirus como VFA, VNO, VEJ y VDEN, donde observaron similitudes antigénicas entre todos los agentes virales, pero siendo mayor entre VZIK y VDEN (98% - 99%) que entre VIZK y el resto de los flavivirus evaluados (55% - 56%).

Por otra parte otros estudios muestran la reactividad cruzada asociada al análisis de paneles de muestras frente a diferentes sistemas diagnósticos serológicos. Dejnirattisai y cols., 2016 (54), utilizando sueros de pacientes con infección secundaria a VDEN, encontraron que todos los casos cruzaron con VZIK al utilizar un sistema de ELISA de captura para el análisis. Félix y cols., 2017 (118), utilizando tres sistemas serológicos de formato ELISA (2 Captura y 1 Indirecto) de VDEN para evaluar reactividad cruzada frente a muestras de suero de pacientes con infección confirmada a VZIK, muestra una reactividad para anticuerpos IgM entre 4.9 % y 16.4 % en muestras colectadas en días menores al 7mo día de inicio de los síntomas y entre 13.1 % y 37.7 % en muestras con más de 14 días. Respecto al sistema Euroimmun IgM, Steinhagen y col., 2016 (94) utilizando un panel de sueros con casos de infecciones confirmadas a: VDEN, VFA, VNO, VEJ y VCHIK, observaron solo una reactividad cruzada de 2.9 % en sueros de VNO. Otro estudio desarrollado por Berlioz-Arthaud y Gurusamy,(119) en el año 2008 muestra a dos sistemas serológicos de detección de IgM para infección por VDEN con los mayores porcentajes de falsos positivos relacionados con muestras de pacientes con VHA. Conociendo la elevada homología entre los virus DEN y ZIK, se pudiera decir que la

reactividad cruzada frente a casos de infección por VHA en sistemas serológicos para VZIK pueden ser esperados.

En general, los sistemas de formato ELISA mostraron los menores porcentajes de reactividad cruzada y entre ellos los Indirectos (Euroimmun y DIAPRO) no mostraron reactividad cruzada frente a las muestras con inmunidad serológica a otros flavivirus del panel negativo, como son: los casos con infección a VDEN e inmunidad a VFA por vacunación. Esto pudiera estar dado a la utilización de antígenos altamente purificados y específicos que utilizan como base la proteína NS1 de VZIK. Como ha sido anteriormente reportado, el reconocimiento de anticuerpos neutralizantes frente a proteínas no estructurales se presenta del tipo virus específico contrario a lo observado frente a las proteínas estructurales, fundamentalmente la proteína de envoltura (E), considerada como el mayor blanco de anticuerpos neutralizantes por ser la proteína más externa del virión. No obstante, dado que los niveles de sensibilidad del sistema Euroimmun fueron los más bajos del estudio, su utilidad para el diagnóstico queda descartada, no siendo así para el sistema DIAPRO que ha mostrado los mejores parámetros funcionales del presente trabajo. El elevado nivel de especificidad de este último sistema pudiera ser aprovechado para la confirmación serológica de casos de infección por VZIK con la combinación en la detección de anticuerpos IgG.

Por parte del sistema IBL, aunque tuvo reactividad frente a los casos de VDEN, fue la menor con solo un 5 % (1/20) y única mostrada por el ensayo, por lo que en futuras evaluaciones y complementándose mejoras sobre su sensibilidad pudiera valorarse como un posible sistema diagnóstico a utilizar.

El sistema Mikrogen debe mejorar un poco más en su reactividad frente a casos de infección por VDEN, así como en incrementar su sensibilidad en la detección de anticuerpos IgM a VZIK.

### 3.5 Análisis de las características operacionales de los sistemas en estudio.

Uno de los aspectos de gran importancia para los sistemas diagnósticos comerciales es tener en cuenta las características operacionales de los mismos, como son: la claridad de las instrucciones, la complejidad técnica y la interpretación de resultados.

En este estudio realizamos una evaluación de las características operacionales (93), dándole valores del 0 al 3 a los diferentes estuches por parte de los tres operadores participantes y en función de su mayor o menor claridad, complejidad e interpretación. En la tabla 3.6 se presentan los resultados obtenidos de esta evaluación.

**Tabla 3.6. Características operacionales de las pruebas evaluadas**

	<u>ELISAs</u>			<u>PR</u>	<u>Western Blot</u>
	<u>Euroimmun</u>	<u>DIAPRO</u>	<u>IBL</u>	<u>Artron</u>	<u>Mikrogen</u>
<b>Claridad de las instrucciones</b>	2	2	2	3	2,5
<b>Complejidad técnica</b>	2	2	2	2,5	0
<b>Interpretación de los resultados</b>	1,5	1,5	2	2,5	0
<b>Equipamiento requerido</b>	1	1	1	1	1
<b>Puntuación Total</b>	<b>6,5</b>	<b>6,5</b>	<b>7,0</b>	<b>9,0</b>	<b>3,5</b>

Como se puede observar los sistemas de formato ELISA recibieron similar puntuación por los operadores respecto a la claridad de las instrucciones y complejidad de los ensayos de muy claro. Con respecto a la claridad de las instrucciones no obtuvieron la calificación de excelente (3) pues los instructivos solo fueron redactados en los idiomas de inglés y alemán, y si se desea comercializar estos sistemas en la región latinoamericana, debería incluirse el idioma Español, dado el número elevado de países de habla hispana.

Contrario a estos sistemas, el ensayo en formato de prueba rápida Artron obtuvo las mayores calificaciones operacionales por la buena presentación en su instructivo y la simplicidad en el desarrollo del sistema e interpretación de los resultados. Como experiencia en otras evaluaciones (120, 121), los sistemas inmunocromatográficos muestran como limitación los niveles de intensidad de bandas, observando en ocasiones bandas débiles que no superan los niveles de intensidad de la banda control o corte, así como problemas en la corrida de la muestra que lleva a no observar en determinados casos la banda control del sistema, quedando este invalidado. En el caso del sistema Artron-PR estas limitaciones no fueron observadas.

Respecto al sistema Mikrogen, las puntuaciones operacionales fueron las más bajas obtenidas principalmente en el análisis de complejidad de la técnica y la facilidad de interpretación de los resultados. En cuanto a la complejidad, el ensayo muestra múltiples etapas en su desarrollo, principalmente asociado a los múltiples lavados de las membranas de nitrocelulosa, lo cual hace que se incremente el tiempo de duración de la técnica y ocupe la jornada completa de trabajo para emitir los resultados finales. También en este punto, la manipulación de las membranas con las pinzas suministradas por el estuche se hace un poco difícil por los operadores. En la interpretación de los resultados el mayor problema encontrado estuvo relacionado con la baja intensidad en la banda de IgM de las muestras las cuales no superaban los niveles de la banda de corte establecida por el sistema, dando la muestra negativa al ser leídas las tiras con el programa recomScan automatizado.

*CONCLUSIONES*

### CONCLUSIONES.

- ❖ Los sistemas de formato ELISA mostraron las mejores características funcionales dentro de la evaluación, siendo el sistema ELISA indirecto DIAPRO la propuesta de selección para el diagnóstico serológico de las infecciones recientes a VZIK, por los elevados indicadores de desempeño, así como la no reactividad cruzada frente a casos con inmunidad a Flavivirus.
- ❖ El sistema de prueba rápida Artron no mostró buenas características funcionales para su utilidad en el diagnóstico serológico de las infecciones recientes a VZIK.
- ❖ El sistema de formato Western Blot Mikrogen mostró características funcionales aceptables, pero con niveles de sensibilidad en la detección de anticuerpos IgM y reactividad cruzada frente a casos con infección a VDEN no adecuados, limitando su utilidad como diagnóstico serológico para la infección reciente por VZIK.
- ❖ Los sistemas ELISA indirecto Euroimmun y DIAPRO no mostraron reactividad cruzada frente a la inmunidad de Flavivirus presente en el panel negativo, lo que permitirá su uso en la caracterización serológica a VZIK en la población cubana.
- ❖ Las características operacionales de la Prueba Rápida de tipo inmunocromatográfico Artron supera a las observadas en los demás sistemas, pero la dificultad en definir un caso de infección por VZIK la hacen no apta para su uso.

*RECOMENDACIONES*

### **RECOMENDACIONES**

- ❖ Informar los resultados obtenidos en esta evaluación a aquellos laboratorios que lleven a cabo un sistema de vigilancia para el diagnóstico serológico del VZIK.
- ❖ Evaluar la respuesta de anticuerpos IgG en los diferentes sistemas comerciales, valorando confirmación serológica del caso con infección a VZIK.
- ❖ Promover la evaluación de nuevos sistemas comerciales para el diagnóstico serológico de la infección a VZIK.

*REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Chen J, Yang YF, Chen J, Zhou X, Dong Z, Chen T, et al. Zika virus infects renal proximal tubular epithelial cells with prolonged persistency and cytopathic effects. *Emerging microbes & infections*. 2017;6(8):e77.
2. Louise W, Frédéric G, Philippe L, Jean-Philippe N, Stéphane M, Fournier E. Guillain-Barre´ Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia. *Medicine*. 2016;95(14).
3. Plourde A, Bloch A E. Literature Review of Zika Virus. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(7).
4. Castanha PM, Cordeiro MT, Martelli CM, Souza WV, Marques ET, Jr., Braga C. Force of infection of dengue serotypes in a population-based study in the northeast of Brazil. *Epidemiology and infection*. 2013;141(5):1080-8.
5. Wikan N, Smith DR. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *The Lancet infectious diseases*. 2016;16(7):e119-e26.
6. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, et al. Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control. *Antiviral research*. 2016;130:69-80.
7. Fellner C. Zika Virus: Anatomy of a Global Health Crisis. 2016;41:242-53.
8. Bharucha T, Breuer J. Review: A neglected Flavivirus: an update on Zika virus in 2016 and the future direction of research. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2016;42(4):317-25.
9. OPS/OMS. Zika - Actualización Epidemiológica. 25 de agosto de 2017. . Washington, D.C  
OPS/OMS; 2017.

10. Chua A, Prat I, Nuebling CM, Wood D, Moussy F. Update on Zika Diagnostic Tests and WHO's Related Activities. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(2):e0005269.
11. Charrel RN, Leparc-Goffart I, Pas S, de Lamballerie X, Koopmans M, Reusken C. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. *Bulletin of the World Health Organization*. 2016;94(8):574-84D.
12. Granger D, Hilgart H, Misner L, Christensen J, Bistodeau S, Palm J, et al. Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(7):2127-36.
13. Tappe D, Nachtigall S, Kapaun A, Schnitzler P, Gunther S, Schmidt-Chanasit J. Acute Zika virus infection after travel to Malaysian Borneo, September 2014. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(5):911-3.
14. Dowd KA, DeMaso CR, Pelc RS, Speer SD, Smith ARY, Goo L, et al. Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. *Cell reports*. 2016;16(6):1485-91.
15. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(2):e1477.
16. Plourde AR, Bloch EM. A Literature Review of Zika Virus. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(7):1185-92.
17. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology journal*. 2013;10:311.
18. Paixao ES, Barreto F, Teixeira Mda G, Costa Mda C, Rodrigues LC. History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review. *American journal of public health*. 2016;106(4):606-12.

19. Ozawa T, Masaki H, Takasaki T, Aoyama I, Yumisashi T, Yamanaka A, et al. Human monoclonal antibodies against West Nile virus from Japanese encephalitis-vaccinated volunteers. *Antiviral research*. 2018;154:58-65.
20. Narong N, Kumchol C, Supoth R, Kanya P, Kusuma C, Norapath P, et al. Complete Genome Sequence of a Zika Virus Strain Isolated from the Serum of an Infected Patient in Thailand in 2006. *American Society for Microbiology*. 2018.
21. Göertza GP, Abboa SR, Frosa JJ, Pijlmana GP. Functional RNA during Zika virus infection. 2017.
22. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, et al. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. 2016;536(7614):48-53.
23. Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U, Bowman VD, Holdaway HA, Zhang W, et al. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *Journal of virology*. 2010;84(16):8353-8.
24. Plevka P, Battisti AJ, Junjhon J, Winkler DC, Holdaway HA, Keelapang P, et al. Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. *EMBO reports*. 2011;12(6):602-6.
25. Mazumder R, Hu ZZ, Vinayaka CR, Sagripanti JL, Frost SD, Kosakovsky Pond SL, et al. Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. *Virus genes*. 2007;35(2):175-86.
26. Clyde K, Harris E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *Journal of virology*. 2006;80(5):2170-82.
27. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. *The New England journal of medicine*. 2012;366(15):1423-32.

28. Wu KP, Wu CW, Tsao YP, Kuo TW, Lou YC, Lin CW, et al. Structural basis of a flavivirus recognized by its neutralizing antibody: solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(46):46007-13.
29. Kummerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *Journal of virology*. 2002;76(10):4773-84.
30. Burke SA, Wen L, King NJ. Routes of inoculation and the immune response to a resolving genital flavivirus infection in a novel murine model. *Immunology and cell biology*. 2004;82(2):174-83.
31. Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *Journal of virology*. 2005;79(13):8004-13.
32. Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *Journal of virology*. 2005;79(17):11053-61.
33. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 2016.
34. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(6):1085-6.
35. Barros FC. Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? . *The Lancet*. 2016.
36. Aguilar C, Medina M, Hernández R, Amador C, Matamoros M, Lara J. Caracterización clínica y neurofisiológica del síndrome de Guillain-Barrè en el Hospital Escuela. *Revista Ciencia y Tecnología*.,. 2009(5).

37. Secchim L, Marques R, Ribeiro A, Pacheco R, Martins M. Zika crisis in Brazil: challenges in research and development. *Current opinion in virology*. 2016;18::76-81. .
38. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(13).
39. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(3):59-62.
40. Cavalheiro S, Lopez A, Serra S, Da Cunha A, da Costa MD, Moron A, et al. Microcephaly and Zika virus: neonatal neuroradiological aspects. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2016;32(6):1057-60.
41. Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-Artur P, Eyrolle-Guignot D, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. *Lancet*. 2016;387(10033):2125-32.
42. Priya SP, Sakinah S, Ling MP, Chee HY, Higuchi A, Hamat RA, et al. Micro-anatomical changes in major blood vessel caused by dengue virus (serotype 2) infection. *Acta tropica*. 2017;171:213-9.
43. Gupta N, Randhawa RK, Thakar S, Bansal M, Gupta P, Arora V. Knowledge regarding Zika virus infection among dental practitioners of tricity area (Chandigarh, Panchkula and Mohali), India. *The Nigerian postgraduate medical journal*. 2016;23(1):33-7.
44. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of virology*. 2015;89(17):8880-96.
45. Jasper F, Garnet K, Cyril C, Vincent C. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *Journal of Infection*. 72:507-24. .

46. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral research*. 2013;98(2):192-208.
47. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;55(4):289-95.
48. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016;353(6301):823-6.
49. Larocca RA, Abbink P, Peron JP, Zanotto PM, Iampietro MJ, Badamchi-Zadeh A, et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*. 2016;536(7617):474-8.
50. Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, Bricault CA, Moseley ET, Boyd M, et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science*. 2016;353(6304):1129-32.
51. Xu X, Vaughan K, Weiskopf D, Grifoni A, Diamond MS, Sette A, et al. Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika Virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species. *PLoS currents*. 2016;8.
52. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(28):7852-7.
53. Sapparapu G, Fernandez E, Kose N, Bin C, Fox JM, Bombardi RG, et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature*. 2016;540(7633):443-7.
54. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nature immunology*. 2016;17(9):1102-8.

55. Pantoja P, Pérez-Guzmán E, Rodríguez I. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. *Nature communications*. 2017;8:15674. .
56. Robbiani DF, Bozzacco L, Keeffe JR, Khouri R, Olsen PC, Gazumyan A, et al. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. *Cell*. 2017;169(4):597-609 e11.
57. Dickson LB, Sanchez-Vargas I, Sylla M, Fleming K, Black WCt. Vector competence in West African *Aedes aegypti* Is Flavivirus species and genotype dependent. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(10):e3153.
58. Nishiura H, Kinoshita R, Mizumoto K, Yasuda Y, Nah K. Transmission potential of Zika virus infection in the South Pacific. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2016;45:95-7.
59. Schaffner F, Mathis A. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *The Lancet infectious diseases*. 2014;14(12):1271-80.
60. Oster AM, Brooks JT, Stryker JE, Kachur RE, Mead P, Pesik NT, et al. Interim Guidelines for Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus - United States, 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(5):120-1.
61. Hills SL, Russell K, Hennessey M, Williams C, Oster AM, Fischer M, et al. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(8):215-6.
62. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(2):359-61.
63. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French

Polynesia, November 2013 to February 2014. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2014;19(14).

64. OPS/OMS. Infección por virus Zika. 2016.

65. Tsunoda I, Omura S, Sato F, Kusunoki S, Fujita M, Park AM, et al. Neuropathogenesis of Zika Virus Infection : Potential Roles of Antibody-Mediated Pathology. Acta medica Kinki University. 2016;41(2):37-52.

66. CDC. Updated Guidance for US Laboratories Testing for Zika Virus Infection. 2017.

67. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. Emerging infectious diseases. 2015;21(2):381-2.

68. Villamil-Gomez WE, Rodriguez-Morales AJ, Uribe-Garcia AM, Gonzalez-Arismendy E, Castellanos JE, Calvo EP, et al. Zika, dengue, and chikungunya co-infection in a pregnant woman from Colombia. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2016;51:135-8.

69. Cabral-Castro MJ, Peralta RHS, Cavalcanti MG, Puccioni-Sohler M, Carvalho VL, da Costa Vasconcelos PF, et al. A Luminex-based single DNA fragment amplification assay as a practical tool for detecting and serotyping dengue virus. Journal of virological methods. 2016;236:18-24.

70. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. Clinical microbiology reviews. 2016;29(3):487-524.

71. Caylà J, Domínguez A, Rodríguez VE, de Orya F, Vázquez A, Fortuny C. La infección por virus Zika: una nueva emergencia de salud pública pública con gran impacto mediático. GacSanit. 2016.

72. Waggoner JJ, Pinsky BA. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. Journal of clinical microbiology. 2016;54(4):860-7.

73. Mauk M, Song J, Bau H, Liu C. Point-of-Care Molecular Test for Zika Infection. Clin Lab Int. 2017;41:25-7.

74. Colombo TE, Estofolete CF, Reis AFN, da Silva NS, Aguiar ML, Cabrera EMS, et al. Clinical, laboratory and virological data from suspected ZIKV patients in an endemic arbovirus area. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2017;96:20-5.
75. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases*. 2008;14:1232-9.
76. Dowd KA, Ko SY, Morabito KM, Yang ES, Pelc RS, DeMaso CR, et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science*. 2016;354(6309):237-40.
77. Chen Y, Liu T, Zhang Z, Chen M, Rong L, Ma L, et al. Novel genetically stable infectious clone for a Zika virus clinical isolate and identification of RNA elements essential for virus production. *Virus research*. 2018;257:14-24.
78. Dibernardo A, Turell M, Lindsay L, Loomer C, Iranpour M. Vector Competence of Some Mosquito Species From Canada For Zika Virus. *J Am Mosq Control Assoc*. 2017;33(4):276-81. .
79. Nikolay A, Léon A, Schwamborn K, Genzel Y, Reichl U. Process intensification of EB66® cell cultivations leads to high-yield yellow fever and Zika virus production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018.
80. Mansuy JM, Mengelle C, Pasquier C, Chapuy-Regaud S, Delobel P, Martin-Blondel G, et al. Zika Virus Infection and Prolonged Viremia in Whole-Blood Specimens. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(5):863-5.
81. De Moraes Gomes PAT, Pena LJ, Leite ACL. Isatin derivatives and their antiviral properties against arboviruses, a Review. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2018.
82. Huits R, Okabayashi T, Cnops L, Barbe B, Van Den Berg R, Bartholomeeusen K, et al. Diagnostic accuracy of a rapid E1-antigen test for chikungunya virus infection in a reference setting. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018;24(1):78-81.

83. Parida MM. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *Journal of biosciences*. 2008;33(4):617-28.
84. Guo C, Zhou Z, Wen Z, Liu Y, Zeng C, Xiao D, et al. Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990-2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:317.
85. Guo X, Zhou Y, Li Q, Wangm W, Wen J, Zheng L, et al. Rapid and reliable diagnostic method to detect Zika virus by real-time fluorescence reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *AMB Express*. 2018;18(1)::60.
86. Mani S, Tan C, Wang L, Anderson D. Serological Cross Reactivity between Zika and Dengue Viruses in Experimentally Infected Monkeys. . *Viol Sin*. 2018.
87. Vazquez S, Lozano C, Perez AB, Castellanos Y, Ruiz D, Calzada N, et al. Dengue specific immunoglobulins M, A, and E in primary and secondary dengue 4 infected Salvadorian children. *Journal of medical virology*. 2014;86(9):1576-83.
88. Vazquez S, Acosta N, Ruiz D, Calzada N, Alvarez AM, Guzman MG. Immunoglobulin G antibody response in children and adults with acute dengue 3 infection. *Journal of virological methods*. 2009;159(1):6-9.
89. Vazquez S, Valdes O, Pupo M, Delgado I, Alvarez M, Pelegrino JL, et al. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *Journal of virological methods*. 2003;110(2):179-84.
90. /OMS O. Preparedness and response for chikungunya virus introduction in the Americas. CDC 2011. 2011.
91. Rodriguez-Lay L, Quintana A, Montalvo-Villalba M, Lemos G, Bello M, Gutierrez A, et al. Dual Infection With Hepatitis A and E Viruses in Outbreaks and in Sporadic Clinical Cases: Cuba 1998–2003. *Journal of medical virology*. 2008;80:798-802.

92. Marina A, Yermalovich G, Semeiko E, Samoilovich E, Svirchevskaya C, Muller J, et al. Etiology of Maculopapular Rash in Measles and Rubella Suspected Patients from Belarus. *PloS one*. 2014;9(10):e111541.
93. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(3):436-40.
94. Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van Esbroeck M, et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(50).
95. Kadkhoda K, Gretchen A, Racano A. Evaluation of a commercially available Zika virus IgM ELISA: specificity in focus. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2017;88(3):233-5.
96. L'Huillier AG, Hamid-Allie A, Kristjanson E, Papageorgiou L, Hung S, Wong CF, et al. Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus Serologic Testing. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(8):2462-71.
97. Vazquez S, Perez AB, Ruiz D, Rodriguez R, Pupo M, Calzada N, et al. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2005;33(2):132-7.
98. Delgado I, Vasquez S, Bravo JR, Guzman MG. [Prediction of serotypes of dengue virus by response to IgM antibodies]. *Revista cubana de medicina tropical*. 2002;54(2):113-7.
99. Wen-Yang T, Han Ha Y, Carlos B, Jih-Jin T, Tyson J, Pedroso C, et al. Distinguishing secondary dengue virus infection from Zika virus infection with previous

dengue by a combination of three simple serological tests. Infectious Diseases Society of America.

100. Pasquier C, Joguet G, Mengelle C, Chapuy-Regaud S, Pavili Lynda PN, Izopet J, et al. Kinetics of anti-ZIKV antibodies after zika infection using two commercial enzyme-linked immunoassays. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2017;S0732-8893(17)30275-4.

101. Crowther JR. *The ELISA Guidebook*. Press H, editor. Totowa, New Jersey: The International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. ; 2002.

102. Buus S, Rockberg J, Forsström B, Nilsson P, Uhlen M, Schafer N. High-resolution mapping of linear antibody epitopes using ultrahigh-density peptide microarrays. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2012;11:1790-800. .

103. Mishra N, Caciula A, Price A, Thakkar R, Ng J, Chauhan LV, et al. Diagnosis of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *mBio*. 2018;9(2).

104. Safronetz D, Sloan A, Stein DR, Mendoza E, Barairo N, Ranadheera C, et al. Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(9):1577-80.

105. Balmaseda A, Zambrana JV, Collado D, Garcia N, Saborio S, Elizondo D, et al. Comparison of Four Serological Methods and Two Reverse Transcription-PCR Assays for Diagnosis and Surveillance of Zika Virus Infection. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(3).

106. Cleton NB, Godeke GJ, Reimerink J, Beersma MF, Doorn HR, Franco L, et al. Spot the difference-development of a syndrome based protein microarray for specific serological detection of multiple flavivirus infections in travelers. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(3):e0003580.

107. Rockstroh A, Moges B, Barzon L, Sinigaglia A, Palu G, Kumbukgolla W, et al. Specific detection of dengue and Zika virus antibodies using envelope proteins with mutations in the conserved fusion loop. *Emerging microbes & infections*. 2017;6(11):e99.
108. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(3):480-96.
109. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1989;40(4):418-27.
110. Shi Y, Agematsu K, Och sHD, Suganea K. Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD CD27 B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clinical immunology*. 2003;108:128-37.
111. Klein KR, and Ralf Küppers. Human Immunoglobulin (Ig)M 1IgD 1 Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells. *J Exp Med*. 1998;118(9).
112. White H, Gray D. Analysis of Immunoglobulin (Ig) Isotype Diversity and IgM/D Memory in the Response to Phenyl-Oxazolone. *J Exp Med*. 2000;188(9): 0022-1007/98/11/679/11 \$2.00.
113. Phommason K, Sengvilaipaseuth O, de Lamballerie X, Vongsouvath M, Phonemixay O, Blacksell SD, et al. Temperature and the field stability of a dengue rapid diagnostic test in the tropics. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(1):33-9.
114. Bosch I, de Puig H, Hiley M, Carre-Camps M, Perdomo-Celis F, Narvaez CF, et al. Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum. *Science translational medicine*. 2017;9(409).

115. Rothan HA, Bidokhti MRM, Byrareddy SN. Current concerns and perspectives on Zika virus co-infection with arboviruses and HIV. *Journal of autoimmunity*. 2018;89:11-20.
116. Singer M. The spread of Zika and the potential for global arbovirus syndemics. *Global public health*. 2017;12(1):1-18.
117. Musso D, Aubry M, Brout J, Stassinopoulos A, Green J. Zika virus: new emergencies, potential for severe complications, and prevention of transfusion-transmitted Zika fever in the context of co-circulation of arboviruses. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2017;15(3):272-3.
118. Clara Felix A, Santiago Souza NC, Figueiredo WM, Costa AA, Inenami M, da Silva RM, et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection†. *Journal of medical virology*. 2017.
119. Berlioz-Arthaud A, Gurusamy A. Comparison of PanBio dengue IgM ELISA assay with pentax dengue IgM particle agglutination assay to evaluate factors affecting false positive results. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2008;39(1):55-61.
120. Valdez Sandoval JJ. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DIAGNÓSTICO SD DENGUE DUO PARA LA DETECCIÓN DE NS1/IgM/IgG”. La Habana, Cuba: Medical Sciences University; 2010.
121. Morejón García G. Evaluación de estuches diagnósticos comerciales para la detección de anticuerpos IgM contra el virus dengue. Pedro Kouri Tropical Medicine Institute: Medical Sciences University; 2009.

*ANEXOS*

Anexo 1:

Nombre de la prueba: .....

Fabricante: .....

Fecha de evaluación: .....

**1. Claridad de las instrucciones.**

<b>Difícil de seguir</b>	<b>0</b>	<input type="radio"/>
<b>Bastante claro</b>	<b>1</b>	<input type="radio"/>
<b>Muy claro</b>	<b>2</b>	<input type="radio"/>
<b>Excelente</b>	<b>3</b>	<input type="radio"/>

**3. facilidad de interpretación de los resultados.**

**Difícil 0** (en caso de sí, por qué)

. Baja intensidad de la señal

. Variación del color de la señal

**Bastante claro 1**

**Muy claro 2**

**Excelente 3**

**2. Complejidad técnica**

**Complejo 0** (en caso de sí, por qué)

. Pequeños volúmenes

. Múltiples etapas

. Cortos intervalos de tiempo entre las etapas .

. Dificultad de manipulación

. No espacio para rotular

. Migración incompleta de las muestras.

. Otras

**Bastante claro 1**

**Muy claro 2**

**Excelente 3**

**4. Equipamiento requerido pero no suministrado ej.: pipetas.**

**Sí 0**

**No 1**

Si no, ¿qué es requerido?

.....

.....

.....

**Comentarios:**

.....

.....

.....

.....