



Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara
Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología
Facultad de Medicina

**Evaluación de la validez y fiabilidad diagnóstica del RT-PCR para
la detección del virus Zika en Villa Clara y Sancti Spíritus**

**Tesis presentada en opción del título de Especialista en
Primer Grado en Microbiología Médica**

Autora: Dra. Arlenys Pérez Valdivia¹

Tutor: Dra. María de Lourdes Sánchez Álvarez²

¹Residente de tercer año en la especialidad de Microbiología Médica. Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología.

²Especialista de Segundo Grado en Microbiología Médica. Profesor Auxiliar. Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología.

Santa Clara
2022

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento infinito a mis padres, a mi hermana y a mi esposo por acompañarme en todos estos años de intenso trabajo y estudio.

Mi más profundo agradecimiento a mi tutora, la Dra. María de Lourdes Álvarez Sánchez por su apoyo incondicional y por su sensibilidad humana insuperable. Por la dedicación, maestría y disciplina en la conducción de mi formación y por motivarme con su ejemplo de dedicación y consagración a la ciencia para formarme profesionalmente.

A mimá, mi abuela, por su cariño y por acogerme siempre que lo necesité.

A mis amigos, Norka y Yoel, por demostrarme que siempre puedo contar con ellos.

DEDICATORIA

A mis padres

Por siempre tenerme como su niña consentida y apoyarme en todas mis decisiones, por los valores que me inculcaron, por su esfuerzo incomparable y sacrificios para mi éxito profesional, por ser los mejores del mundo. A mi papá, por su orgullo infinito de su hija doctora. Especialmente, a mi mamá, que pasó junto a mí cada hora de estudio y desvelo, cada minuto de estrés y expectativa; por nunca dejarme caer, por sus oraciones y por sus bendiciones a diario que me protegen y me llevan por el camino del bien.

A mi hermana del alma

Por sus consejos que me han guiado desde pequeña, por su amor desinteresado y por ser mi ejemplo inquebrantable de superación y lucha.

A mi amado esposo, mi compañero de vida

Por su amor desmedido, su comprensión constante y su apoyo incondicional en todos los sentidos, por hacerme sentir fuerte y capaz de todo, por llenarme de energía positiva y por sus sacrificios y esfuerzos para nuestro futuro.

Porque siempre creen en mí...

RESUMEN

Introducción: La OMS recomienda la detección temprana del virus Zika como parte de la estrategia para su control. Con este fin, Cuba instaló nuevos laboratorios en el centro y oriente del país; sin embargo, no se han realizado estudios para evaluar el rendimiento de estas instalaciones en materia de validez y fiabilidad diagnóstica para la detección del virus Zika. **Objetivo:** Evaluar la validez y fiabilidad diagnóstica del RT-PCR para la detección de virus Zika en Villa Clara y Sancti Spiritus. **Diseño metodológico:** Se realizó un estudio observacional descriptivo transversal que incluyó aquellas muestras que contaron con el resultado del laboratorio de referencia del IPK (n=491). Se determinó la sensibilidad, especificidad, cocientes de probabilidad, valores predictivos y correlación para resultados categóricos y cuantitativos. **Resultados:** Predominaron las pacientes femeninas (431; 88,5%) con una edad media de $28,4 \pm 8,3$ años, de ellas el 80,2% estaban embarazadas y sin síntomas el 59,1%. El RT-PCR mostró una sensibilidad de 94,7% (88,1 a 98,3), especificidad 94,9% (92,3 a 96,9), cociente de probabilidad + 18,7 (12,2 a 28,8), cociente de probabilidad – 0,05 (0,02 a 0,1), valor predictivo positivo 81,9% (74,5 a 87,4), valor predictivo negativo 98,7% (97,0 a 99,4), índice Kappa 0,84 (0,78 a 0,90) **Conclusiones:** Se demostró que RT-PCR para la detección de Zika realizado en el CPHEM para los pacientes de las provincias de Villa Clara y Sancti Spiritus tiene una validez y fiabilidad general excelente. Las muestras de orina mostraron un rendimiento diagnóstico superior a las muestras de suero, tanto en la fase aguda como en la convalecencia de la enfermedad.

Palabras clave: virus Zika; pruebas diagnósticas; PCR.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

RT-PCR: Reverse transcription- polymerase chain reaction.

IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

Antecedentes históricos	Pág. 5
Justificación	Pág. 7
Problema científico	Pág. 10

MARCO TEÓRICO

Situación epidemiológica del Zika	Pág. 11
Factores favorecedores de la emergencia del virus Zika	Pág. 11
Factores de riesgo y condiciones asociadas	Pág. 12
Etiología	Pág. 12
Transmisión	Pág. 13
Patogenia	Pág. 13
Cuadro clínico y complicaciones	Pág. 14
Diagnóstico	Pág. 16
Definiciones de la OPS/OMS	Pág. 19
Recomendaciones y guías para la evaluación y la vigilancia de virus Zika	Pág. 23

OBJETIVOS	Pág. 32
------------------	---------

DISEÑO METODOLÓGICO	Pág. 33
----------------------------	---------

RESULTADOS	Pág. 40
-------------------	---------

DISCUSIÓN	Pág. 54
------------------	---------

CONCLUSIONES	Pág. 65
---------------------	---------

RECOMENDACIONES	Pág. 66
------------------------	---------

REFERENCIAS	Pág. 67
--------------------	---------

ANEXOS	Pág. 75
---------------	---------

INTRODUCCIÓN

El Zika es una enfermedad viral transmitida por la especie *Aedes*, fundamentalmente por *A. aegypti* y *A. africanus*.¹⁻⁴ Los síntomas asociados con la enfermedad usualmente incluyen: rash máculopapular, fiebre, mialgias, artralgias y conjuntivitis. El virus es teratógeno, con un riesgo incrementado de microcefalia, lesiones oculares y pérdidas fetales si la infección ocurre en el primer trimestre del embarazo. Recientemente se presentó un brote epidémico en América, siendo Brasil y Colombia los países con las tasas de incidencia más elevadas.^{1, 2}

Antecedentes históricos

El virus Zika fue aislado por primera vez en 1947 en un mono macaco centinela en el bosque Zika cerca de Entebbe, Uganda. El segundo aislamiento fue en un mosquito *A. africanus* del mismo bosque en 1948. El primer caso de infección humana fue reportado en Nigeria en 1954 y en los siguientes 60 años, el interés en este virus estuvo confinado a unos pocos investigadores especializados.⁵

Existe evidencia inmunológica y virológica de que el virus Zika se extendió desde el este de África hasta el sudeste de Asia alrededor de 1945 y persistió con una endemidad estable en estas dos regiones durante el siglo XX.⁶ **(Anexo-1)** La fiebre Zika no constituyó una enfermedad de preocupación substancial para el ser humano porque solo habían sido documentados 14 casos a nivel mundial antes de 2007; de ellos 13 de transmisión natural y uno de infección adquirida en laboratorio.⁵

A pesar de que el primer reporte de una persona infectada con Zika fue en 1954, investigaciones posteriores indicaron que el patógeno infeccioso estaba estrechamente relacionado con el virus Spondweni, un error de identificación que también ocurrió en un caso de exposición experimental. Por tanto, se considera que la primera infección natural en un humano fue reportada por Simpson, quien describió el propio curso de su enfermedad mientras aislaba virus Zika de mosquitos *A. aegypti* en Uganda entre 1962 y 1963. Posteriormente, otros

investigadores identificaron virus Zika en humanos en Nigeria e Indonesia mediante métodos serológicos.⁵

El primer brote de importancia de fiebre Zika ocurrió en 2007 en la Isla de Yep, que es parte del Estado Federal de Micronesia en el Océano Pacífico occidental. En este brote, se confirmaron 49 casos de infección por virus Zika y fueron sospechados 59.⁵ No fueron documentados muertes por hemorragias pero se estima que 5 005 (73%) de los 6 892 residentes mayores de tres años presentaron la infección durante el brote y que el 82% de ellos lo hicieron de manera asintomática.⁷ El segundo brote de importancia se reportó en Polinesia Francesa en octubre de 2013, con un total de 8 510 casos sospechados.⁸

Otro brote de gran envergadura tuvo lugar en Brasil en 2015. Estudios retrospectivos demostraron que la transmisión comenzó en enero del mismo año en Rio de Janeiro. Probablemente la ruta de entrada fueron viajeros de zonas endémicas como Asia y África durante los juegos deportivos de 2014. Las cepas aisladas pertenecían al linaje asiático y guardaban relación más cercana con las cepas de la Polinesia Francesa.⁹⁻¹¹

La enfermedad se transmitió activamente por toda América con 806 928 casos confirmados o sospechados reportados hasta enero de 2018. El mayor número de casos se presentaron en América del Sur, liderando Brasil con 369 013, Colombia con 108 730 y Venezuela con 62 559.¹² Basado en las tasas de infección asintomática se estima que de 500 000 a 1,5 millones de personas fueron infectadas en 2015.¹³**(Anexo-2)**

Según los datos de vigilancia de GeoSentinel, al menos 93 casos de Zika sospechados o confirmados fueron reportados en viajeros que retornaban de 30 países en su mayoría de América del Sur (59%).¹⁴

Cuba fue uno de los últimos países del Caribe en sucumbir ante la transmisión local de Zika gracias a su sistema de vigilancia epidemiológica y a las medidas sistemáticas de control de vectores derivadas de la experiencia acumulada de 35 años de lucha contra el dengue.¹⁵⁻¹⁷

En diciembre de 2015, el Ministerio de Salud Pública de Cuba emitió una alerta epidemiológica antes de que la enfermedad fuera declarada, en febrero de 2016, como emergencia de salud pública internacional. Se implementó un plan de acción considerando la compleja situación epidemiológica en la región de las Américas por la circulación del virus. Las medidas reforzaron la vigilancia de viajeros internacionales y la disminución de los índices de infestación por mosquitos del género *Aedes* hasta niveles que no permitieran la transmisión.¹⁷ Se instalaron escáneres de temperatura corporal y termómetros digitales en puertos, marinas y aeropuertos. Se organizaron grupos de trabajo multidisciplinarios para actualizar la situación internacional y se realizó el análisis estratificado de indicadores entomológicos epidemiológicos.¹⁷

El primer caso autóctono se diagnosticó en marzo de 2016; y en agosto del mismo año en la isla solo se reportaban 3 casos de transmisión local, lo que contrasta con los 8 766 casos confirmados en el cercano país de Puerto Rico **(Anexo-3)**.¹⁶

18

Justificación

Las estadísticas esbozadas anteriormente dejan al descubierto la magnitud del problema que representa el virus Zika. De ahí que este virus haya pasado de ser prácticamente ignorado por más de medio siglo a estar protagonizando los titulares de todo el mundo luego que la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo declarara una emergencia para salud pública internacional en febrero de 2016.^{5, 16} En abril de ese mismo año se confirma por el *US Centers of Disease Control and Prevention(CDC)* que la infección por virus Zika es una causa confirmada de microcefalia congénita, lo que pudiera conllevar a una enorme carga internacional de morbilidad neurológica infantil.¹⁶ **(Anexo-4)** La magnitud de este problema se ve reflejada en el número de publicaciones científicas destinada a producir conocimiento sobre el tema que permitiera enfrentar la crisis.¹⁹ **(Anexo-5)**

Esta situación dejó al descubierto la necesidad de pruebas diagnósticas confiables para la identificación de los casos, seguimiento de los contactos, localización de

los focos en animales y en la racionalización de las medidas de prevención, control y vigilancia.^{20, 21} Las pruebas diagnósticas típicamente demoran de dos a cinco años en su desarrollo y de cinco a diez años en su evaluación, aprobación de regulación y desarrollo de guías para su aplicación. Estos plazos de tiempo son demasiado extensos para la implementación de pruebas diagnósticas en una epidemia. Durante el brote de Zika, la *US Food and Drug Administration* (FDA) emitió la FDA Emergency Use Authorization (EUA) para acelerar las revisiones regulatorias y aprobaciones para las pruebas diagnósticas necesarias para responder a la emergencia. Por otra parte, tanto el escenario como el tipo de sistema de salud en que se pondrá una prueba diagnóstica debe ser evaluado, ya que en contextos de bajos recursos, los ensayos moleculares e inmuno-enzimáticos sofisticados solo pueden ser usados en laboratorios de referencia.^{22, 23} En Cuba, el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, como Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud/ Organización Panamericana de la Salud para el Dengue y su Control, ha trabajado de manera intensiva en la conformación de una red de laboratorios nacionales para el diagnóstico de arbovirosis y en la capacitación de recursos humanos para su funcionamiento. Cuando apareció el brote de Zika, la experiencia con el dengue permitió adaptar el modelo a esta nueva amenaza para la salud pública. Se establecieron laboratorios de diagnóstico de acuerdo a los protocolos y requisitos de buenas prácticas para la detección de Zika de la OMS en Santiago de Cuba (para la región oriental), en Habana (para la región occidental) y en Villa Clara (para la región central).^{15, 17, 24} Esta medida buscaba la reducción de costos por transportación de las muestras al centro de referencia nacional, la disminución del riesgo de afectación de la calidad de las muestras por el transporte y conservación, así como fortalecer la capacidad diagnóstica de la infección por Zika desde el mismo territorio y por tanto la mejora continua en la estrategia de prevención, manejo y vigilancia de esta entidad en el país en consonancia con el primer objetivo de la estrategia de la

OMS para el virus Zika (**Detect**: detección temprana del virus, sus secuelas y la evolución de la epidemia).²⁵

Sin embargo, a pesar de existir proyectos en conjunto con Estados Unidos para evaluar los kit diagnósticos para Zika^{15, 24} y de constituir una prioridad para la OMS/OPS el control de la calidad externo de los laboratorios que diagnostican arbovirosis^{26, 27}; la producción científica cubana sobre el tema se ha limitado a artículos de revisión, opinión²⁸⁻⁴⁵, intervenciones educativas^{46, 47} y dos de ellos a la descripción de la afectación por el Zika de la provincia de Cienfuegos⁴⁸ y una manzana de Santiago de Cuba⁴⁹. No se han realizado estudios hasta la fecha para evaluar el rendimiento diagnóstico de los nuevos laboratorios en materia de validez y fiabilidad en la detección de virus Zika.

La evaluación de las pruebas médicas, tanto de las nuevas como de las ya existentes, debe realizarse antes y después de su aplicación ya que la precisión diagnóstica de una prueba no es una propiedad invariable del test. La capacidad para identificar a un paciente con una condición determinada está influenciada por el contexto epidemiológico, escenario clínico, el grupo de pacientes, pruebas anteriores, entre otros factores. Estas fuentes de variación son importantes para aquellos que buscan responder preguntas específicas sobre adoptar o no la prueba en su medio. El proceso debe ser riguroso con el fin de reducir el número de consecuencias clínicas no deseadas secundarias a las estimaciones erróneas de la precisión diagnóstica de la prueba, sino que también limita los costes sanitarios, ya que evita la realización de pruebas innecesarias.^{50, 51}

De estos argumentos se infiere la crucial necesidad de la evaluación del rendimiento diagnóstico del RT-PCR para la detección del Zika insertada en el Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) de Villa Clara recientemente. Por lo que se plantea como **problema científico** del presente estudio:

¿Cuál es la validez y fiabilidad diagnóstica del RT-PCR para la detección de virus Zika en Villa Clara y Sancti Spiritus en el período de septiembre a diciembre de 2018?

MARCO TEÓRICO

Situación epidemiológica del Zika

Hasta julio de 2019, un total de 87 países y territorios habían tenido evidencia de transmisión autóctona de virus Zika mediante la picadura de mosquito.⁵²

Recientemente se registró un brote en la India de alrededor de 90 casos desde mayo a julio de 2021 en regiones donde representaban el primer caso de enfermedad por el virus del Zika jamás informado.⁵³

En el reporte de febrero de 2022 de la Plataforma de Información en Salud de las Américas (PLISA), el total de Casos de Zika por la Región y Subregiones era de 587.⁵⁴

La incidencia de esta enfermedad en América alcanzó su pico en 2016 y fue decayendo durante 2017 y 2018. En esta región fueron reportados 31 587 casos sospechosos, probables o confirmados de enfermedad por virus Zika. De estos, 3 473 casos fueron confirmados por pruebas de laboratorio.⁵²

Durante el 2018, en América se mantuvo la transmisión a bajos niveles en algunas áreas, pero no de manera uniforme entre los países. La transmisión de Zika ha sido confirmada en todos los países de América excepto Chile, Uruguay y Canadá. Algunos reportan mayor incidencia como Panamá con 2 752 casos sospechados y Bolivia con 1 736. Cuba reportó 873 casos confirmados, esta cifra fue la mayor del Caribe con una incidencia de 17/100 000 habitantes.⁵²

Factores favorecedores de la emergencia del virus Zika

A pesar de que el potencial epidémico del virus ha cambiado, permitiendo la transmisión epidémica, no queda claro si la virulencia del virus también ha sufrido modificaciones. A causa de las similitudes genéticas y epidemiológicas del virus Zika y el dengue, los mismos factores demográficos, sociales y tecnológicos que llevaron a la pandemia de dengue, probablemente también contribuyeron a la emergencia y diseminación del Zika.⁵⁵

El crecimiento económico de países en desarrollo de regiones tropicales ha sido el mayor impulsor de un crecimiento urbano sin precedentes y sin planificación, lo

que provee las condiciones ecológicas ideales para la proliferación de las poblaciones de mosquitos que viven en íntimo contacto con los grandes asentamientos humanos. Este hecho en conjunto con el transporte moderno y las inefectivas medidas de control de vectores, propiciaron los mecanismos ideales para transportar tanto al mosquito como al virus alrededor del mundo. El incremento resultante en la transmisión del virus expande la probabilidad de cambios genéticos que llevaron a que el Zika emergiera con gran virulencia y potencial epidémico.⁵⁵

Esta teoría aun debe ser confirmada por estudios de secuenciación genética. Sin embargo, otros científicos tienen la hipótesis de que el pobre poder estadístico de los estudios anteriores al 2013 impidió captar los eventos por su rareza. La gran incidencia de la infección en los brotes de la Polinesia Francesa y América, permitió la identificación de síndromes clínicos raros como el Guillain Barré y la microcefalia y su asociación a la infección por virus Zika.⁵⁵

Factores de riesgo¹⁻³

- Viajar o residir a áreas afectadas.
- Exposición a mosquitos.
- Contacto sexual desprotegido con personas que hayan viajado recientemente a áreas de transmisión activa.

Condiciones asociadas

La coinfección con otras enfermedades virales transmitidas por el mismo vector puede ocurrir. En dos cohortes de Nicaragua se comprobó que de 346 pacientes con arbovirosis sospechada, 71 tenían coinfección con dos o tres virus.⁵⁶

Etiología

El Zika es un virus de la familia Flaviviridae, género *Flavivirus* y cuyo material genético es el ARN. Los análisis filogenéticos han permitido identificar dos linajes del virus. El linaje africano se encuentra mayormente restringido a los países de África como Uganda, Kenya, Senegal y Nigeria. El linaje asiático circula por el

sudeste de Asia desde mediados del siglo pasado, en la Polinesia Francesa desde 2013 y en América desde 2015.^{57, 58}

Las cepas de América parecen estar más relacionada con las cepas de la Polinesia Francesa, con una homología de nucleótidos y de aminoácidos de un 99,7% y 99,9% respectivamente.⁵⁷⁻⁵⁹

Transmisión

El virus se transmite principalmente por la picadura de un mosquito *Aedes* infectado. Los principales reservorios son los humanos y los primates. Durante los brotes se produce transmisión antroponótica (de humano a vector a humano), a pesar de que se ha demostrado la transmisión vertical en mosquitos *Aedes aegypti*⁵³. El período de incubación se estima entre 3 y 14 días.¹⁻³

Otros modos de transmisión incluyen:

- Transmisión materna fetal durante el embarazo.
- Transmisión sexual (hombre-mujer, mujer-hombre y hombre-hombre), se ha demostrado la persistencia del ARN viral en el semen del hombre hasta 188 días después del comienzo de los síntomas, sin embargo, la duración exacta del período de infectividad de los fluidos genitales aun es desconocida.^{55, 60} Se ha demostrado tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos y por las vías: oral, genital y anal.⁵⁷
- Transfusiones de sangre o hemoderivados.⁶¹
- Lactancia materna.⁶²

El ARN viral ha sido obtenido de saliva, orina y fluido conjuntival, pero no se ha demostrado transmisión por estas fuentes.^{63, 64}

Patogenia

La patogenia de este virus aun no es totalmente comprendida pero los datos disponibles hasta el momento indican que el virus infecta y se replica en las células de la piel incluyendo los fibroblastos dérmicos, queratinocitos epidérmicos y células dendríticas inmaduras. Los queratinocitos epidérmicos infectados

rápidamente experimentan muerte celular por apoptosis. La replicación del virus induce la activación de la respuesta inmune innata y la producción de interferón tipo I en las células infectadas. El virus ha demostrado neurotrofismo in vitro y en modelos animales y probablemente se disemina a través de la sangre provocando que la persona infectada se mantenga con viremia por unos días.^{2, 65, 66}

El virus Zika infecta las células embrionarias progenitoras de la corteza neural donde inducen la muerte celular, proveyendo evidencia de que las neuronas humanas son susceptibles al virus. Esta afectación se produce principalmente en el cerebro en desarrollo y rara vez en el cerebro adulto.⁵⁵

La patogenia del síndrome de Guillain-Barré asociado a virus Zika permanece desconocida: mecanismos neuropatogénicos directos, respuesta inmune hiperaguda, disregulación inmune y mimetismo molecular contra antígenos del sistema nervioso son las hipótesis hasta el momento consideradas.⁵⁵

Inmunidad contra el virus del Zika

En la infección primaria por este flavivirus, la respuesta de anticuerpos es monotípica, lo que permite la identificación serológica del virus infectante. En el caso de la infección secundaria, la cual es frecuente en zonas endémicas del virus, la respuesta de anticuerpos es heterotópica, causando reacción cruzada con múltiples antígenos de diferentes flavivirus, lo que hace que la identificación confiable del virus mediante ensayos serológicos sea todo un desafío.⁵⁵

Se cree que el virus del Zika, como otros flavivirus, induce una respuesta humoral de anticuerpos que confiere protección durante toda la vida, esta afirmación está pendiente de confirmación. Estudios en monos macacos sugieren que la inmunidad que confiere la infección por virus Zika del linaje africano produce inmunidad heteróloga contra el virus Zika del linaje asiático y vice-versa.⁵⁵

Cuadro clínico

Aproximadamente el 20-25% de las personas infectadas manifiestan síntomas. La frecuencia de los síntomas en los primeros cuatro días de la enfermedad, basados en el estudio de 119 casos confirmados en Rio de Janeiro en 2015, son:^{1-4, 67}

- Erupción maculo papular-97%
- Prurito- 79%
- Astenia-73%
- Cefalea-66%
- Artralgia-63%
- Mialgia-61%
- Conjuntivitis no purulenta-56%
- Dolor retro-ocular-45%
- Adenopatías-41%
- Escalofríos-37%
- Fiebre-36%
- Anorexia-35%
- Fotofobia-34%
- Dolor orofaríngeo-32%
- Edema-29%
- Alteraciones del gusto-27%
- Nauseas-24%
- Petequias o sangramiento-21%
- Sudoraciones-19%
- Diarrea-19%
- Dolor abdominal-17%
- Tos-16%

Complicaciones

Complicaciones en el embarazo

Un número importante de evidencia epidemiológica, anátomo-patológica y experimental, llevó a la conclusión de que la infección por virus Zika tiene relación causal con un síndrome neurológico congénito caracterizado por: microcefalia, calcificaciones intracraneales, disfunción neurológica y anomalías oculares.⁶⁸

El riesgo del síndrome congénito provocado por esta enfermedad parece ser mayor si esta infección se produce durante el primer trimestre del embarazo y menor si ocurre en el tercero.^{55, 69}

Otras morbilidades obstétricas asociadas son: restricción del crecimiento intrauterino, óbito fetal, oligohidramnios, ventriculomegalia, agenesia de cuerpo calloso, hipoplasia de tronco encefálico, hipoplasia cerebelosa, quistes subependimarios, hidropesía fetal, retinopatía pigmentaria, atrofia del nervio óptico, coloboma bilateral del iris, subluxación del cristalino, entre otras.⁷⁰⁻⁷⁵

La evolución clínica y el pronóstico de los niños con microcefalia asociada al SCZ varían significativamente y aún no se ha delineado completamente después de que estos niños alcanzan los dos años de edad. Estudios previos han encontrado importantes retrasos en el desarrollo neurológico de alrededor de 20 meses en niños menores de 2 años de edad con microcefalia asociada a CZS, aunque también se han identificado casos en los que los niños con microcefalia asociada a CZS experimentaron un neurodesarrollo aproximadamente normal. Estos hallazgos heterogéneos sugieren una variación significativa en los resultados del desarrollo de los niños expuestos al ZIKV en el útero. Dado que el neurodesarrollo es un proceso dinámico, es importante seguir a estos niños más allá de los dos años de edad para aprender si estas diferencias persisten en el tiempo. Esta heterogeneidad no ha sido bien descrita, que puede, en parte, deberse a las dificultades para evaluar de manera efectiva las diferencias de desarrollo entre los niños con discapacidades graves. Además, hay poca información sobre los factores asociados a esta heterogeneidad.⁷⁶

Complicaciones neurológicas

La información proveniente de estudios de cohorte indica que existe un incremento de la incidencia de Síndrome de Guillain Barré durante el período de transmisión de la infección de virus Zika en zonas endémicas. La asociación causal es probable; pero no está totalmente confirmada. Algunos ejemplos son:⁷⁷

País	Riesgo Relativo (Intervalo de Confianza 95%)
Venezuela	9,8 (7,6-12,5)
Suriname	5 (1,5-17,3)
Colombia	3,1 (2,5-3,9)
Brasil (Bahia)	2,7 (2-3,7)
Honduras	2,6 (1,7-4,1)

República Dominicana	2,5 (1,5-4,3)
El Salvador	2 (1,6-2,6)

Otras complicaciones menos frecuentes son: hipoacusia neurosensorial transitoria, mielitis aguda, encefalitis, polineuropatía sensitiva, miocarditis y púrpura trombocitopénica.⁷⁸⁻⁸⁰

Diagnóstico

Es obligatorio considerar la enfermedad por virus Zika en todo paciente que presente al menos uno de los siguientes síntomas:¹⁻⁴

- Erupción máculopapular.
- Artralgias.
- Conjuntivitis.
- Fiebre.

También se debe sospechar en los pacientes que residan o hayan viajado a áreas endémicas o de transmisión activa en las dos semanas previas al comienzo de los síntomas. Aquellos pacientes sospechosos de Zika deben ser evaluados para dengue y chikungunya, dado que los síntomas y la distribución geográfica de estas tres enfermedades se solapan.⁴

Se debe realizar hemograma completo y hemoquímica básica, donde son hallazgos frecuentes ligera leucopenia, trombopenia y transaminitis.

Diagnóstico diferencial

Es importante descartar y evaluar la coinfección con dengue y chikungunya:⁸¹

Síntomas	Dengue	Chikungunya	Zika
Fiebre	+++	++	++
Mialgia/artralgia	++	+++	+
Edema en extremidades	-	-	++
Erupción máculopapular	++	++	+++

Dolor retroocular	++	+	++
Conjuntivitis	-	+	++
Adenopatías	++	++	+
Hepatomegalia	-	++	-
Leucopenia/ trombopenia	++	++	-
Hemorragias	++	-	-

Otros diagnósticos diferenciales incluyen: paludismo, leptospirosis, influenza, infección por riketsias, mononucleosis infecciosa, virus de inmunodeficiencia humana, meningococemia, varicela, rubeola, parvovirus B19, enterovirus y otras fiebres hemorrágicas.

Diagnóstico de laboratorio

Serología

Las inmunoglobulinas M (IgM) específicas contra virus Zika aparecen entre el cuarto y quinto día del comienzo de la infección y se mantienen aproximadamente por 12 semanas.⁸² Un resultado negativo de IgM ELISA de una muestra colectada entre las 1-12 semanas es un fuerte argumento en contra de la presencia de infección por virus Zika, sin embargo no siempre la IgM es detectable.⁵⁵

Las IgM específicas para virus Zika y los anticuerpos neutralizantes tienen gran sensibilidad al final de la primera semana del comienzo de los síntomas. Sin embargo, presentan reactividad cruzada con otros virus como dengue y fiebre amarilla. Por tal motivo los resultados de este examen deberían ser interpretados con cautela dado que falsos positivos y falsos negativos pueden ocurrir.^{2, 4, 12, 59} Todas las muestras con IgM ELISA positivos o inconclusos deberían ser confirmadas por una prueba de reducción de placas por neutralización (PRNT), solo disponible en pocos laboratorios.⁵⁵

Un nuevo ensayo europeo ELISA de IgM e IgG para Zika se afirma que es capaz de diferenciar entre las muestras positivas para Zika de muestras con otras infecciones por flavivirus, incluyendo dengue, fiebre amarilla y virus de la hepatitis C.^{82, 83}

También están disponibles ensayos comerciales como ZIKV Detect 2.0 IgM Capture ELISA test (InBios International, Inc.) aprobado por la FDA para detectar anticuerpos contra el virus Zika en muestras de sangre humanas de pacientes con síntomas y signos clínicos consistentes con infección por virus Zika. Previamente disponible a través de una autorización de uso en emergencia de la FDA, puede tener resultados negativos si la muestra se tomó en los primeros cuatro días de la enfermedad.²⁰

Identificación viral

Reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR)

Es capaz de distinguir entre Zika y otras infecciones por flavivirus como el dengue. Se realiza típicamente en suero y orina. Se puede utilizar muestra de sangre completa por algunos RT-PCR que tienen la autorización de emergencia de la FDA en poblaciones especiales:²

- Personas sintomáticas que se presentan hasta los 14 días del comienzo de los síntomas.
- Embarazadas asintomáticas que se presenten hasta los 14 días de la última posible exposición con virus Zika.
- Niños con sospecha de infección congénita por virus Zika.

La experiencia con otras muestras biológicas como líquido amniótico es limitada.² La sensibilidad del RT-PCR varía en los 14 días del comienzo de los síntomas. Por tal motivo se debe realizar RT-PCR en suero y orina si la muestra se toma antes del séptimo día del comienzo de los síntomas, si excede esta fecha pero es menor de 14 días, se realizará en orina.⁸⁴

Según los datos obtenidos de estudios de cohorte se considera que el RT-PCR es más sensible en suero que en orina en los primeros cinco días de la infección.⁸⁵ Como el tiempo exacto de la infección es difícil de establecer, un resultado negativo de RT-PCR no excluye la infección.⁵⁵

De manera general, se puede afirmar que la tasa de éxito de las pruebas de confirmación de la infección por virus Zika está directamente asociada a la elección del tipo de muestra, el momento de la enfermedad en que se colecta y el tipo de prueba.⁸⁶ **(Anexo-5 y 6)**

Definiciones de la OPS/OMS⁸⁷

Estas definiciones de caso son provisionales y fueron elaboradas con base en datos preliminares obtenidos durante el curso de la epidemia en la región de las Américas.

Caso sospechoso de enfermedad por virus del Zika

Paciente que presente exantema* y al menos dos o más de los siguientes signos o síntomas:

- Fiebre, generalmente 38,5°C
- Conjuntivitis (no purulenta/ hiperémica)
- Artralgias
- Mialgia
- Edema periarticular

* habitualmente maculopapular y pruriginoso

Caso sospechoso de enfermedad por virus del Zika en áreas sin casos autóctonos y sin presencia de vectores para la transmisión del virus

Paciente que cumpla los criterios de caso sospechoso de enfermedad por virus del Zika; y

- que en las 2 semanas anteriores a la aparición de los síntomas tenga antecedente de residencia o viaje a un área con transmisión local del virus del Zika o con presencia de vectores; o
- tenga antecedente de contacto sexual sin protección en las 2 semanas previas a la aparición de los síntomas, con una persona que en las 8 semanas previas al contacto sexual tenga antecedente de residencia o viaje a un área con transmisión local del virus del Zika o con presencia de vectores.

Caso probable de enfermedad por virus del Zika

Paciente que cumpla los criterios de caso sospechoso y presente también anticuerpos IgM anti-ZIKV, sin hallazgos de laboratorio que indiquen infección por otros flavivirus.

Caso confirmado de enfermedad por virus del Zika

Paciente que cumpla los criterios de caso sospechoso y cuente con confirmación de laboratorio de infección reciente por el virus del Zika, es decir, presencia de:

- RNA o antígeno del virus del Zika en muestras de suero o de otro tipo (por ejemplo, orina, saliva, tejidos o sangre entera); o bien
- anticuerpos IgM anti-ZIKV positivos y prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT90) para ZIKV a títulos >20, y cuatro o más veces mayores que para otros flavivirus; y exclusión de otros flavivirus; o
- en fallecidos, detección molecular del genoma viral a partir de tejido de autopsia, fresco o en parafina, o detección específica de antígeno viral a partir de tejido de la autopsia mediante prueba inmunohistoquímica.

Síndrome de Guillain-Barré (SGB) asociado a la infección por el virus del Zika

Caso de SGB sospechoso de estar asociado a la infección por virus del Zika

Paciente

- con antecedente de residencia o viaje reciente a un área con presencia de vectores para el virus del Zika, o
- que haya tenido contacto sexual sin protección con persona con antecedente de residencia o viaje reciente a un área de circulación de vectores para el virus del Zika;

y que presente los siguientes signos y síntomas (nivel 3 de los criterios de Brighton):

- Debilidad bilateral y flácida de los miembros; y
- Reflejos tendinosos profundos disminuidos o ausentes en los miembros con debilidad; y
- Enfermedad monofásica; intervalo entre el inicio y el nadir de la debilidad entre 12 horas y 28 días; y posterior fase de meseta clínica; y
- Ausencia de una causa alternativa que justifique la debilidad.

Caso de SGB confirmado de estar asociado a la infección por virus del Zika

Caso sospechoso de SGB asociado a la infección por virus del Zika y con confirmación de laboratorio de infección reciente por el virus del Zika.

Síndrome congénito asociado a la infección por el virus del Zika

Caso de síndrome congénito sospechoso de estar asociado a la infección por el virus del Zika

Recién nacido vivo que presente

- microcefalia (medida de circunferencia craneal occipitofrontal por debajo de -2 desviaciones estándar a las 24 horas después de nacer, según referencias estandarizadas de acuerdo a edad gestacional y sexo), o
- alguna malformación congénita del sistema nervioso central; y cuya madre, durante el embarazo,
- haya tenido antecedente de residencia o viaje a un área con presencia de vectores del virus del Zika, o
- haya tenido relaciones sexuales sin protección con una pareja con antecedente de residencia o viaje a un área con presencia de vectores del virus del Zika.

Caso de síndrome congénito probable de estar asociado a la infección por el virus del Zika

Recién nacido vivo que cumpla con los criterios de caso de síndrome congénito sospechoso de estar asociado a la infección por el virus del Zika; y

- presente alteraciones morfológicas intracraneales diagnosticadas por cualquier método de imagen, excluidas otras posibles causas conocidas; o
- cuya madre haya presentado exantema durante el embarazo.

Caso de síndrome congénito confirmado de estar asociado a la infección por el virus del Zika

Recién nacido vivo de cualquier edad gestacional que cumpla con los criterios de caso de síndrome congénito sospechoso de estar asociado a la infección por el virus del Zika; y en quien se haya confirmado por laboratorio la infección por virus del Zika, independiente de la detección de otros agentes.

Aborto o muerte fetal asociado a la infección por el virus del Zika

Aborto o muerte fetal con sospecha de asociación a la infección por el virus del Zika

Producto de un aborto o muerte fetal de una gestante que durante el embarazo haya presentado exantema, y que

- tenga antecedente de residencia o viaje a un área con presencia de vectores para el virus del Zika; o
- haya tenido relaciones sexuales sin protección durante el embarazo con una pareja con antecedente de residencia o viaje a un área con presencia de vectores para el virus del Zika.

Aborto o muerte fetal con confirmación de asociación a la infección por el virus del Zika

Todo caso sospechoso en el que se confirme la infección por el virus del Zika a partir de muestras de sangre u orina de la gestante o puérpera o de tejidos del producto de aborto o muerte fetal.

Transmisión vertical del virus del Zika sin síndrome congénito

Sospecha de transmisión vertical del virus del Zika sin síndrome congénito

Recién nacido vivo de cualquier edad gestacional que no cumpla con los criterios de la definición de caso sospechoso de síndrome congénito asociado al virus del Zika, y cuya madre haya sido clasificada como caso sospechoso, probable o confirmado de enfermedad por el virus del Zika durante el embarazo.

Probable transmisión vertical sin síndrome congénito

Recién nacido vivo que cumpla con los criterios de caso sospechoso de infección del virus Zika por transmisión vertical y en cuya muestra de sangre de cordón haya sido detectada IgM anti-ZIKV por ELISA o ARN del virus por PCR.

Caso confirmado de transmisión vertical o perinatal sin síndrome congénito

Recién nacido vivo que cumpla con los criterios de caso sospechoso de infección del virus del Zika por transmisión vertical y en cuya muestra de suero haya sido detectada IgM anti-ZIKV por ELISA.

Recomendaciones y guías para la evaluación y vigilancia de virus Zika

Actualmente existe un número considerable de recomendaciones y guías de países, sociedades científicas y organismos sanitarios internacionales en cuanto al manejo diagnóstico y vigilancia de esta infección emergente. Dentro de ellas destacan:

País	Título
Canadá	Canadian Paediatric Society (CPS) guideline on Zika virus in Canada. ⁸⁸
Canadá	Canadian recommendations on the prevention and treatment of Zika virus: Update ⁸⁹
Cuba	Recomendaciones para la atención a hijos recién nacidos de madres con diagnóstico de virus Zika en Cuba. ⁴²
Estados Unidos	Dengue and Zika Virus Diagnostic Testing for Patients with a Clinically Compatible Illness and Risk for Infection with Both Viruses. ⁹⁰
Estados Unidos	American College of Obstetrics and Gynecologist (ACOG): Management of patients in the context of Zika virus. ⁹¹
Estados Unidos	Centers for Disease Control and Prevention (CDC) interim guidelines for Zika virus testing of urine - United States. ⁹²
Estados Unidos	CDC survey of blood collection centers and implementation of guidance on prevention of transfusion-transmitted Zika virus infection in Puerto Rico. ⁹³
Estados Unidos	CDC interim guideline on evaluation and testing of infants with possible congenital Zika virus infection. ⁹⁴
Estados Unidos	CDC interim guidance for Zika virus antibody testing and interpretation of test results. ⁹⁵
Europa	Direção-Geral da Saúde guideline on Zika virus disease. ⁹⁶
Organización Mundial de la Salud	Zika virus (ZIKV) surveillance in the Americas: 2015 interim guidance for laboratory detection and diagnosis ⁹⁷
Organización Mundial de la Salud	Preliminary guideline on surveillance of microcephaly in newborns in setting with risk of circulation of Zika virus. ⁹⁸

Por su relevancia, a continuación se detallan las directrices del CDC para la realización de pruebas diagnósticas para Zika.

Directrices de 2016 del CDC para laboratorios donde se realicen pruebas para la detección del virus del Zika⁹⁵

Tipo de muestra

- se requiere suero para todas las pruebas diagnósticas

- si se indica, se pueden examinar otros tipos de muestras, como orina, sangre total o líquido cefalorraquídeo.

Exámenes recomendados para la detección del virus del Zika

Para personas sintomáticas que acuden a consulta < 2 semanas después del inicio de los síntomas.

- realizar prueba de RT-PCR en suero y orina para detección del virus del Zika.
- si los resultados de la RT-PCR son negativos, realizar pruebas de IgM del virus del Zika
- si los resultados de las pruebas de IgM del virus del Zika y el dengue son positivos o dudosos, realizar PRNT.

Para personas sintomáticas que acuden a consulta \geq 2 semanas después del inicio de los síntomas.

- realizar pruebas de IgM del virus del Zika.
- si los resultados de las pruebas serológicas son positivos o dudosos, realizar PRNT.
- se puede valorar la realización de RT-PCR en muestras de orina y sangre total.

Directrices provisionales de los CDC sobre la realización de pruebas de anticuerpos del virus del Zika e interpretación de los resultados

Realizar pruebas de anticuerpos IgM en suero para el Zika y el dengue cuando el resultado de la PCR en tiempo real es negativo.

Si el resultado de las pruebas para anticuerpos IgM es negativo

- en muestras de suero recogidas < 7 días a partir del inicio de la enfermedad.
- la combinación de resultado IgM negativo y RT-PCR negativa sugiere la ausencia de infección reciente.
- un resultado IgM negativo sin realizar la prueba RT-PCR no descarta la infección.
- en muestras recogidas entre 7 días y 12 semanas, un resultado IgM negativo para virus del Zika y el dengue descarta una infección reciente con los dos virus.

Si las pruebas de anticuerpos IgM del Zika o el dengue muestran resultados positivos, dudosos o no concluyentes, realizar pruebas PRNT contra el Zika, el dengue u otros flavivirus endémicos.

- un resultado positivo para Zika en la PRNT (títulos ≥ 10) con PRNT negativa contra otros flavivirus (títulos < 10) confirma una infección reciente por el virus del Zika
- títulos de la PRNT ≥ 10 para virus del Zika y el dengue (u otro flavivirus) sugiere infección reciente por flavivirus.
- la interpretación de una PRNT negativa para el Zika es similar a la de un resultado negativo en las pruebas de anticuerpos IgM.

Directrices provisionales del CDC sobre la atención a las embarazadas y las mujeres en edad reproductiva durante un brote del virus del Zika - Estados Unidos 2016^{99, 100}

En cada visita prenatal, indagar sobre posible exposición de la embarazada al virus del Zika.

Una posible exposición al virus del Zika incluye:

- residencia o viaje a una zona de transmisión activa del virus del Zika.
- contacto sexual no protegido con una persona que vive o ha viajado a una zona de transmisión activa del virus del Zika

Pesquisaje y evaluación de embarazadas sintomáticas:

☐ examinar a las embarazadas con posible exposición al virus del Zika que presenten ≥ 1 de los siguientes síntomas

- fiebre
- erupción cutánea maculopapular
- artralgias
- conjuntivitis

☐ realizar pruebas de IgM del virus del dengue a todas las embarazadas sintomáticas

☐ pruebas del virus del Zika recomendadas según el momento de la evaluación

Para las que acuden a consulta < 2 semanas después del inicio de los síntomas

- RT-PCR para virus del Zika en suero y orina

- si los resultados de la RT-PCR son negativos, realizar prueba de IgM del virus del Zika
- si los resultados de las pruebas de IgM del virus del Zika y el dengue son positivos o dudosos, realizar PRNT.

Para las que acuden a consulta 2-12 semanas después del inicio de los síntomas

- realizar pruebas de IgM del virus del Zika
- si los resultados de las pruebas serológicas son positivos o dudosos, realizar RT-PCR a todas las muestras apropiadas disponibles (preferiblemente de suero u orina)
- si los resultados de la RT-PCR son negativos y los resultados de las pruebas de IgM de virus del Zika y el dengue son positivos o dudosos, realizar prueba de PRNT.

Para las que viven en zonas sin transmisión activa y se presentan < 2 semanas después de la última exposición posible

- ofrecer la realización de RT-PCR de todas las muestras apropiadas disponibles (preferiblemente de suero u orina).
- si los resultados de la RT-PCR son negativos, realizar prueba de IgM del virus del Zika 2-12 semanas después de la exposición.
- si los resultados de la prueba de IgM del virus del Zika son positivos o dudosos, realizar PRNT.

Para las que viven en zonas sin transmisión activa y se presentan 2-12 semanas después de la última exposición posible.

- ofrecer la realización de pruebas de IgM del virus del Zika.
- si los resultados de las pruebas serológicas son positivos o dudosos, realizar RT-PCR en todas las muestras apropiadas disponibles (preferiblemente de suero u orina).
- si los resultados de la RT-PCR son negativos, realizar PRNT.

Para las que estén en riesgo de exposición al virus del Zika (porque viven o viajan frecuentemente a una zona de transmisión activa)

- ofrecer la realización de pruebas de IgM del virus del Zika como parte de la atención obstétrica de rutina en el primer y segundo trimestres.
- si los resultados de las pruebas serológicas son positivos o dudosos, realizar RT-PCR en suero y orina.
- si los resultados de la RT-PCR son negativos, realizar PRNT.
- en zonas de transmisión activa la decisión de realizar las pruebas la deben tomar las autoridades de salud.

Pesquisaje y evaluación de embarazadas sintomáticas y asintomáticas que acuden a consulta > 12 semanas después del inicio de la enfermedad o la posible exposición

- se pueden realizar pruebas de IgM del virus del Zika
- si se detectan anomalías fetales, realizar prueba RT-PCR en muestras de suero y orina maternos.
- los resultados negativos en las pruebas de IgM o RT-PCR no descartan una infección reciente por el virus del Zika.
- valorar la realización de ultrasonidos fetales seriados para monitorear el crecimiento y la anatomía del feto.

Pruebas fetales para mujeres con diagnóstico establecido o sospecha de infección por el virus del Zika u otros flavivirus

- realizar ultrasonidos seriados cada 3-4 semanas para monitorear el crecimiento y la anatomía del feto.
- analizar los riesgos y beneficios de la realización de pruebas fetales; la decisión de examinar el líquido amniótico mediante RT-PCR dependerá de las características de cada caso individual.
- todas las mujeres con pruebas positivas o resultados de microcefalia o calcificaciones intracraneales en el ultrasonido fetal deben remitirse a un especialista de medicina materno-fetal.
- valorar la realización de evaluación patológica para infección por el virus del Zika, por ej. RT-PCR o tinción inmunohistoquímica en tejido fetal, incluida la placenta y el cordón umbilical, en casos de pérdida fetal o parto de un feto muerto.

Para los recién nacidos de mujeres que tuvieron infección por el virus del Zika durante el embarazo o fetos diagnosticados con el virus del Zika durante el embarazo

- obtener histopatología de la placenta y el cordón umbilical.
- examinar tejido congelado de la placenta y el cordón umbilical para detectar ARN del virus del Zika.

La guía práctica del Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos y la Sociedad de Medicina Materno-Fetal con directrices provisionales para el cuidado de pacientes obstétricos y mujeres en edad reproductiva durante un brote del virus del Zika concuerda con las recomendaciones de los CDC.¹⁰¹

Directrices provisionales de los CDC para la evaluación y el manejo de recién nacidos con posible infección congénita por el virus del Zika - Estados Unidos 2016
Pruebas de laboratorio para recién nacidos con posible infección congénita por el virus del Zika

Indicar pruebas a:

- recién nacidos con microcefalia o calcificaciones intracraneales nacidos de madres con posible exposición durante el embarazo.
- recién nacidos de madres con resultados positivos o no concluyentes para infección por el virus del Zika.

Opciones de pruebas de laboratorio si las mismas son indicadas, realizar las dos pruebas siguientes:

☐ RT-PCR en muestras de suero y orina del recién nacido

- un resultado positivo en la prueba RT-PCR en suero u orina del recién nacido confirma la infección congénita por el virus del Zika.
- un resultado negativo no descarta la infección.

☐ anticuerpos IgM en muestras de suero del recién nacido

- un resultado positivo en la prueba de IgM con resultado negativo en la RT-PCR indica una probable infección congénita por el virus del Zika.

De ser posible, recoger una muestra inicial del cordón umbilical o directamente del recién nacido dentro de los dos días siguientes al nacimiento. Si se cuenta con líquido cefalorraquídeo, el mismo debe examinarse mediante RT-PCR y pruebas de IgM. Se pueden realizar exámenes de sangre total mediante algunas pruebas RT-PCR que cuentan con una Autorización de Uso en Situaciones de Emergencia emitida por la FDA. No se recomienda examinar sangre del cordón umbilical pues puede estar contaminada con sangre materna.

En algunos casos se recomienda también la realización de PRNT

- realizarla en muestra inicial del recién nacido si la misma es positiva para IgM, pero obtuvo resultados negativos en la RT-PCR y no se realizó la PRNT en muestra materna.
- realizarla a ≥ 18 meses si la muestra inicial del recién nacido es positiva para IgM y el recién nacido o la madre tuvieron resultados positivos en la PRNT
- se puede valorar su realización a los 18 meses si la muestra inicial del recién nacido es negativa tanto en la IgM como en la RT-PCR, pero se mantienen los signos clínicos (por ej. microcefalia con resultados negativos para otras causas conocidas)

Un resultado negativo en la PRNT a los 18 meses descarta la infección congénita por el virus del Zika. Un resultado positivo en la PRNT indica una posible infección congénita por el virus del Zika y no descarta una infección postnatal, sobre todo en niños que viven en una zona de transmisión activa del virus del Zika.

Si no se realizaron pruebas maternas durante el embarazo, o las mismas se realizaron más de 12 semanas después de la exposición, o los resultados no son concluyentes, se puede realizar la prueba RT-PCR de la placenta para confirmar la infección materna.

Directrices provisionales de los CDC para la evaluación y manejo de recién nacidos y niños < 18 años con posible infección aguda por el virus del Zika¹⁰²

Sospechar la presencia de infección aguda por el virus del Zika en recién nacidos ≥ 2 semanas y niños < 18 años con:

- antecedentes de viaje o residencia en una zona afectada durante las dos semanas anteriores

- ≥ 2 de los siguientes síntomas: fiebre, erupción cutánea, conjuntivitis, artralgia
- en los recién nacidos y niños pequeños, pueden ser manifestaciones de artralgia
 - ☐ irritabilidad
 - ☐ cojera (en niños que caminan)
 - ☐ dificultad para moverse
 - ☐ negativa a moverse
 - ☐ dolor a la palpación
 - ☐ dolor con movimiento pasivo o activo de la articulación afectada

Sospechar la presencia de infección aguda por el virus del Zika en recién nacidos
< 2 semanas con:

- madre con antecedentes de viaje o residencia en una zona afectada durante las dos semanas anteriores al parto.
- ≥ 2 de los siguientes síntomas: fiebre, erupción cutánea, conjuntivitis, artralgia

Opciones de pruebas de laboratorio:

- analizar muestra de suero del paciente para detectar.
- ARN e IgM y anticuerpos neutralizantes del virus del Zika.
- IgM y anticuerpos neutralizantes del virus del dengue.
- también se puede analizar líquido cefalorraquídeo si se cuenta con el mismo.

Las evidencias de laboratorio para el diagnóstico de la infección por el virus del Zika incluyen cualquiera de las siguientes en cualquiera de las muestras clínicas

- virus del Zika detectable en cultivo.
- ARN o antígeno del virus del Zika.
- títulos de anticuerpos neutralizantes IgM del virus del Zika ≥ 4 veces mayor que los títulos de anticuerpos neutralizantes del virus del dengue.

El objetivo principal de las vacunas contra el virus del zika (ZIKV) es prevenir tanto la infección materno-fetal como el síndrome de Zika congénito.

Recientemente, el Walter Reed Army Institute of Investigación (WRAIR) ha desarrollado una vacuna del virus inactivado purificado del Zika (ZPIV). La vacuna está coformulada con aluminio adyuvante de hidróxido. Estudios preclínicos en ratones y Rhesus macacos han demostrado que los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacuna protegen contra la viremia después de una infección con ZIKV y la inmunidad protectora persistió durante al menos 1 año. Además, ZPIV ha sido demostrado ser seguro e inmunogénico en humanos en la fase clínica 1 de los ensayos e indujo respuestas de células B de protección cruzada en humanos contra los virus Zika y dengue. Sin embargo, la protección y la eficacia de ZPIV no se ha establecido en la población, mujeres en edad fértil y mujeres embarazadas.¹⁰³

OBJETIVO

- Evaluar la validez y fiabilidad diagnóstica del RT-PCR para la detección de virus Zika en Villa Clara y Sancti Spíritus.

DISEÑO METODOLÓGICO

Diseño, población y muestra

Se realizó un estudio observacional descriptivo transversal en el Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) de Villa Clara en el período de septiembre a diciembre de 2018. El objetivo fue evaluar el rendimiento diagnóstico de la RT-PCR para la detección de Zika recientemente introducida en el Laboratorio de Biología Molecular del centro, se procedió al análisis de los resultados obtenidos por la plataforma de amplificación Rotor-Gene® Q MDx del CPHEM y los resultados del control de la calidad en la plataforma Applied Biosystems 7500 Fast RT PCR System del centro de referencia nacional, IPK.¹⁵

La población estuvo constituida por todas las muestras que fueron procesadas en el CPHEM con la sospecha diagnóstica de caso Zika o por concepto de vigilancia epidemiológica, provenientes de los municipios de Villa Clara y Sancti Spiritus en el período de estudio (N=4 683). Fueron excluidos aquellas muestras para las que se encontraba incompleta la información epidemiológica. Se incluyeron en el estudio solo aquellas muestras a las que se les realizó de manera secuencial RT-PCR para Zika en el IPK (n=491).

Patrón de referencia (Estándar de oro)

Se tomó como patrón de referencia los resultados reportados por el IPK. Como parte del proceso continuo de control de la calidad, fueron enviadas al IPK el 100% de las muestras que resultaron positivas, 100% de las muestras de pacientes embarazadas y el 10% de las muestras negativas en el CPHEM.

El IPK es el Centro Colaborador de la OMS para el Dengue y su Control y es el centro de referencia nacional para las enfermedades infecciosas. Cuenta con una basta experiencia y experticia en el diagnóstico molecular de arbovirosis reconocida internacionalmente y es piedra angular en el enfrentamiento a las enfermedades virales emergentes en América.^{15, 16, 24, 104-106}

Procedimientos

Extracción de ARN de las muestras clínicas

Se realizará la extracción del ARN de las muestras clínicas mediante el estuche comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), a partir de un volumen de 140 µL de la muestra, siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN obtenido se almacenará de 4 - 8 °C hasta la realización de la RT-PCR en tiempo real. Como control interno de la extracción de ARN de las muestras clínicas se utilizará el Internal Control proporcionado en el estuche comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN).

Amplificación del ácido nucleico: RT-PCR en tiempo real

Programa de amplificación

Se aplicará un programa de amplificación para una RT-PCR para ARN del ZIKV, ver tabla 1.

Tabla 1: Programa para la RT-PCR para ARN del ZIKV

	Fase	Ciclo Repeticiones	Obtención	Temperatura °C	Tiempo
Transcripción inversa	Retención	1	-	50	30 minutos
Desnaturalización	Retención	1	-	95	2 minutos
Amplificación	Ciclo	45	-	95	15 segundos
			Sí (Cycling A on Green)	60	60 segundos

Mezcla de reacción

La mezcla de reacción con un volumen final de 20 μL contendrá 0.25 μL de cada cebador (C_x (1 μM)), Rxn Mix (C_x (2X)) 12.5 μL , Enzima 0.5 μL , ZIKA1107Probe 0.15 μL y Agua 1.35 μL . El volumen de ARN de cada muestra será de 5 μL .

Análisis de los productos de ARN amplificados

Los productos de ARN amplificados por la RT-PCR en tiempo real serán analizados mediante las curvas de fluorescencia detectadas simultáneamente a la amplificación.

Recolección de los datos y variables

Los datos fueron obtenidos del registro de muestras biológicas del laboratorio de Biología Molecular del CPHEM e incluyeron la retroalimentación de los resultados del IPK. Se trabajó con las siguientes variables:

Variable	Definición conceptual	Definición operacional
Edad	Según años cumplidos en el momento de la toma de muestra.	<ul style="list-style-type: none"> Media y desviación estándar. Grupos etéreos: 0-17 18-64 ≥ 65
Sexo	Según sexo biológico.	<ul style="list-style-type: none"> Masculino Femenino
Embarazada	Según estuviera la paciente embarazada en el momento de toma de la muestra.	<ul style="list-style-type: none"> Sí No

Edad gestacional	Edad gestacional en semanas al momento de toma de la muestra.	<ul style="list-style-type: none"> • Media y desviación estándar. • Grupos: 1-12 13-27 ≥28
Tipo de caso	Según cuadro clínico.	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermo • Embarazada sintomática • Embarazada asintomática
Impresión diagnóstica	Según interés epidemiológico.	<ul style="list-style-type: none"> • Vigilancia • Sospechoso de Zika
Tipo de muestra	Según muestra biológica aportada.	<ul style="list-style-type: none"> • Suero • Orina
Tiempo de evolución de la enfermedad	Según el tiempo en días transcurrido entre el comienzo de los síntomas y la fecha de toma de muestra.	<ul style="list-style-type: none"> • Media y desviación estándar.
Fase de la enfermedad	Según el tiempo transcurrido de la enfermedad en el momento de la toma de muestra, tal que: ¹⁰⁷ ≤5 días: aguda ≥6 días: convalecencia	<ul style="list-style-type: none"> • Aguda • Convalecencia
Resultado	Según resultado del	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo

CPHEM	RT-PCR para Zika en el CPHEM.	<ul style="list-style-type: none"> • Negativo
Resultado IPK	Según resultado del RT-PCR para Zika en el IPK.	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
C_T CPHEM	Según valor del C_T con el cual se detectó el ARN del virus del Zika en el RT-PCR en CPHEM	<ul style="list-style-type: none"> • Media y desviación estándar
C_T IPK	Según valor del C_T con el cual se detectó el ARN del virus del Zika en el RT-PCR en IPK.	<ul style="list-style-type: none"> • Media y desviación estándar
Provincia de residencia	Según provincia de residencia.	<ul style="list-style-type: none"> • Villa Clara • Sancti Spíritus
Municipio de residencia	Según municipio de residencia.	<ul style="list-style-type: none"> • Santa Clara • Ranchuelo • Sancti Spíritus • Camajuaní • Remedios • Sagua la Grande • Placetas • Encrucijada • Trinidad • LS • Caibarién

		<ul style="list-style-type: none"> • Jatibonico • Cabaiguán • Corralillo • Santo Domingo
--	--	--

Análisis estadístico

Para caracterizar la muestra según variables cualitativas se utilizaron frecuencias absolutas y relativas expresadas en número y por ciento. Para las variables cuantitativas se utilizó media y desviación estándar. Los resultados se presentan en tablas y gráficos.

Para evaluar la validez del RT-PCR del CPHEM se utilizaron los indicadores: sensibilidad, especificidad, cociente de probabilidad +, cociente de probabilidad -, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.^{108, 109}

La interpretación global de los valores absolutos de los cocientes de probabilidad fue:¹¹⁰

Valor absoluto del cociente de probabilidad	Interpretación	Comentario
≥ 10	Excelente	Es un resultado prácticamente concluyente e influirá de manera decisiva en la probabilidad posprueba.
5-10	Buena	Este resultado provocará un cambio moderado desde la probabilidad preprueba a la posprueba.
2-5	Regular	El cambio provocado será pequeño.
1-2	Pobre	Prácticamente no influirá en la variación de la probabilidad pretest, siendo el valor 1 el que determinará que la prueba no aporta información alguna.

Con el fin de simplificar y representar los cocientes de probabilidad resultantes de la aplicación del RT-PCR del CPHEM y la probabilidad pre y postprueba de presentar infección por virus Zika de los pacientes en estudio, se empleó el método gráfico de Nomograma de Fagan utilizando una calculadora on-line diseñada por Alan Schwartz y disponible gratuitamente en:^{108, 109, 111}

<http://araw.mede.uic.edu/cgi-bin/testcalc.pl>

Como medida de fiabilidad se evaluó la concordancia entre los resultados de la detección de Zika en CPHEM y el IPK mediante el índice de Kappa de Cohen. Para evaluar la concordancia entre los resultados del C_T entre ambos centros se utilizó el coeficiente de correlación interclases y el método de Bland y Altman.¹⁰⁹

Los valores del índice Kappa y del coeficiente de correlación interclases pueden ser interpretados como:¹¹²

Valor	Fuerza de la concordancia
< 0,20	Pobre
0,21 - 0,40	Aceptable
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Buena
0,81 - 1,00	Excelente

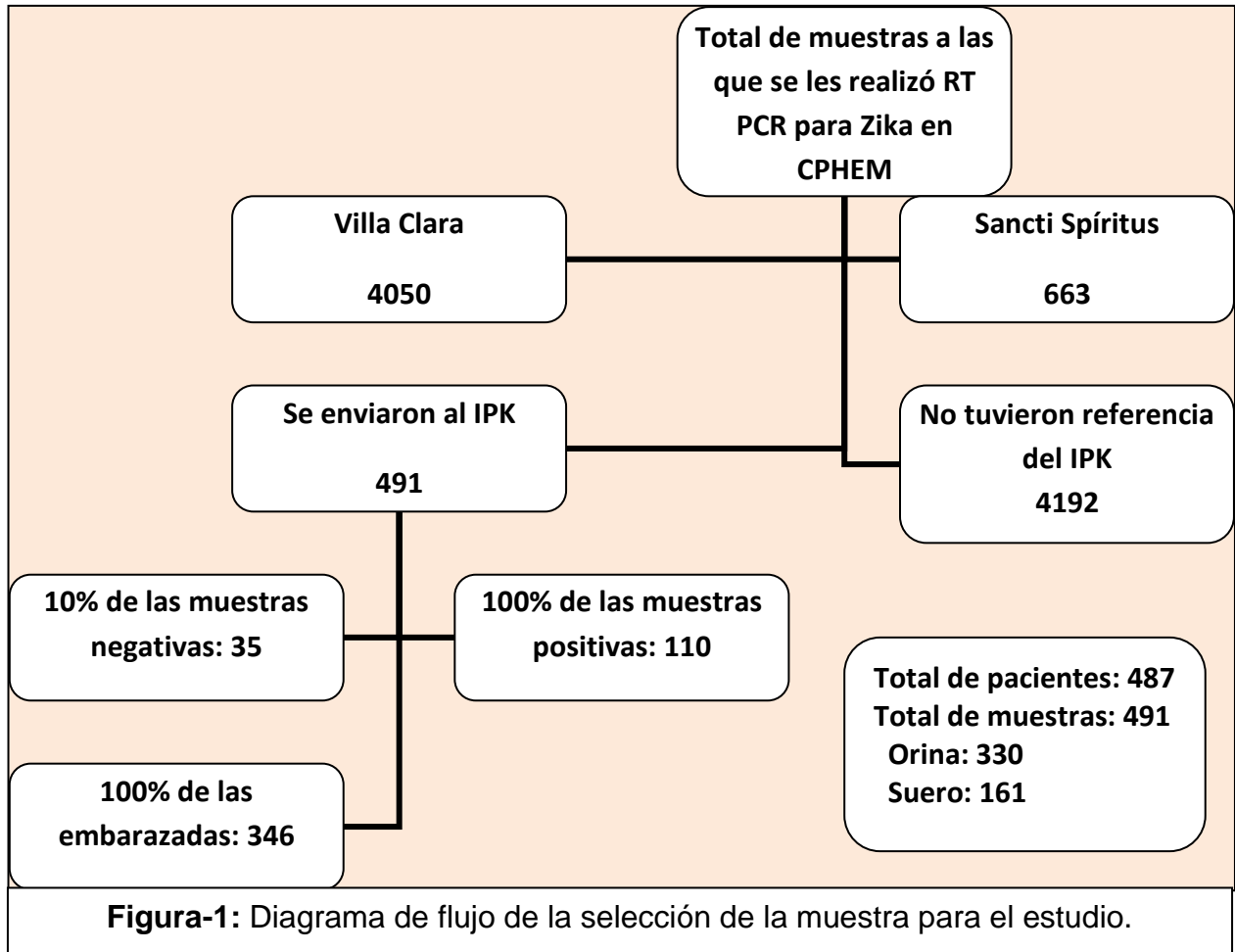
Para el almacenamiento y procesamiento de los datos se utilizaron los programas estadísticos MedCalc versión 19.0.7 y EpiDat versión 3.1. Se trabajó con una confiabilidad del 95%.

Aspectos éticos

La investigación fue aprobada por el del Comité de ética del CPHEM de Villa Clara y por la Comisión Científica Especializada de Microbiología. Se utilizaron datos procedentes de los Registros Provinciales de Salud Pública, por lo que el consentimiento informado de los pacientes no fue necesario.

Se cumplieron estrictamente las buenas prácticas de laboratorio, junto con las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo y manipulación de microorganismos según los niveles de riesgo establecidos por la Comisión Nacional de Seguridad Biológica en la Resolución 38/2006 (CITMA, 2006). Los datos de identidad fueron conocidos solo por el investigador principal. Se cumplieron los principios de la ética médica de beneficencia, no maleficencia, respeto y autonomía.

RESULTADOS



En la **Figura 1** se observa el proceso de selección de la muestra, la cual quedó conformada por 487 pacientes y 491 muestras ya que a 4 de ellos se les tomó dos muestras distintas (orina y suero).

Las características generales de los pacientes en estudio se pueden observar en la **Tabla 1**. Destaca el predominio de pacientes femeninas (88,5%) con una edad media de 28,4 años. De ellas el 80% fueron embarazadas en su mayoría asintomáticas (59,1%). Las muestras fueron tomadas mayoritariamente en la fase aguda (media de evolución de la enfermedad 3,4 días) con el objetivo de vigilancia (56,1%) y las de orina constituyeron el 67,2%.

Tabla-1: Características generales de los pacientes en estudio.	
Variables	
Edad media (DE)*	28,4 (8,3)
Sexo (%)	
Masculino	56 (11,5)
Femenino	431 (88,5)
Embarazadas (%) *	346 (80,2)
Edad gestacional media (DE)*	23,1 (8,4)
Tipo de caso (%)	
Enfermo	141 (28,7)
Embarazada sintomática	60 (12,2)
Embarazada asintomática	290 (59,1)
Impresión diagnóstica (%)	
Sospechoso de Zika	214 (43,9)
Vigilancia	273 (56,1)
Tipo de muestra (%) **	
Suero	161 (32,8)
Orina	330 (67,2)
Tiempo de evolución de la enfermedad en días (DE)***	3,4 (2,5)
Positivos CPHEM (%) **	110 (22,4)
Positivos IPK (%) **	95 (19,3)
Media de CT CPHEM (DE)****	32,2 (4,1)
Media de CT IPK (DE)*****	33,4 (3,46)

DE: desviación estándar.

*Calculado en base al total de pacientes femeninas, n=431

**Calculado en base al total de muestras, N=491.

***Calculado en base a las muestras de pacientes enfermos y embarazadas sintomáticas, n=201.

****Calculado en base a las muestras positivas cuyo valor de CT se encontraba disponible, n=91.

*****Calculado en base a las muestras positivas cuyo valor de CT se encontraba disponible, n=48.

Tabla-2: Distribución de las muestras según provincia y municipio.			
	Total*	Positivas CPHEM	Positivas IPK
Provincia (%)			
Villa Clara	426(86,7)	102(23,9)	87 (20,4)
Sancti Spíritus	65 (13,2)	8 (12,3)	8 (12,3)
Municipio (%)			
Santa Clara	284 (57,8)	91 (32,0)	79 (29,8)
Ranchuelo	69 (14,0)	6 (8,7)	2 (2,9)
Sancti Spíritus	50 (10,1)	5 (10,0)	5 (10,0)
Camajuaní	32 (6,5)	1 (3,1)	1 (3,1)
Remedios	12 (2,4)	0	0
Sagua la Grande	10 (2,0)	3 (30,0)	3 (30,0)
Placetas	6 (1,2)	1(16,7)	2 (33,3)
Encrucijada	6 (1,2)	0	0
Trinidad	6 (1,2)	0	0
Caibarién	5 (1,0)	0	0
Jatibonico	3 (0,6)	1 (33,3)	1 (33,3)
LS	3 (0,6)	1 (33,3)	1 (33,3)
Cabaiguán	3 (0,6)	1 (33,3)	1 (33,3)
Corralillo	1 (0,002)	0	0
Santo Domingo	1 (0,002)	0	0

*Total de muestras, N=491.

La provincia con mayor número de muestras fue Villa Clara con 426, de las cuales fueron positivas el 23,9% y el 20,4% según CPHEM e IPK respectivamente. De los 15 municipios, Santa Clara, Ranchuelo, Sancti Spíritus y Camajuaní aportaron el 88,3% del total de muestras.

**Tabla-3: Detección del virus Zika en suero y orina
según edad, sexo y edad gestacional.**

Variable	Positivas CPHEM			Positivas IPK		
	Total*	Suero	Orina	Total*	Suero	Orina
Edad en años (%)						
0 a 17	19 (17,2)	12 (23,1)	7 (12,1)	15(45,8)	7 (17,5)	8 (14,5)
18 a 64	83 (75,5)	36 (69,2)	47 (81,0)	71(74,7)	28 (70,0)	43 (78,2)
≥ 65	8 (7,2)	4 (7,7)	4 (6,9)	9 (9,5)	5 (12,5)	4 (7,3)
Total	110 (100)	52 (47,2)	58 (52,7)	95 (100)	40 (42,1)	55 (0,57)
Sexo (%)						
Femenino	73 (66,4)	31 (59,6)	42 (72,4)	65 (68,4)	25 (62,5)	40 (72,7)
Masculino	37 (33,6)	21 (40,4)	16 (27,6)	30 (31,6)	15 (37,5)	15 (27,3)
Total	110 (100)	52 (47,2)	58 (52,7)	95 (100)	40 (42,1)	55 (0,57)
Edad gestacional en semanas (%)						
13 a 27	6 (60,0)	1 (33,3)	5 (71,4)	5 (62,5)	2 (66,7)	3 (60,0)
≥ 28	4 (40,0)	2 (66,7)	2 (28,6)	3 (37,5)	1 (33,3)	2 (40,0)
Total	10 (100)	3 (30,0)	7 (70,0)	8 (100)	3 (37,5)	5 (62,5)
C_T medio						
(desviación estándar)	32,2 (4,1)	32,8 (3,8)	31,7 (4,3)	33,4 (3,4)	33,9 (2,6)	33,0 (3,9)

*Total de muestras, N=491.

En la Tabla 3 se observa que predominaron las muestras de positivas para Zika en los pacientes con edades comprendidas entre 18-64 años (75,5%) y del sexo femenino (66,4%). En estos grupos, la mayor positividad se observó en las muestras de orina. No existieron casos positivos de mujeres embarazadas con edad gestacional entre 1-12 semanas. Estos porcentajes son similares a los resultados del IPK.

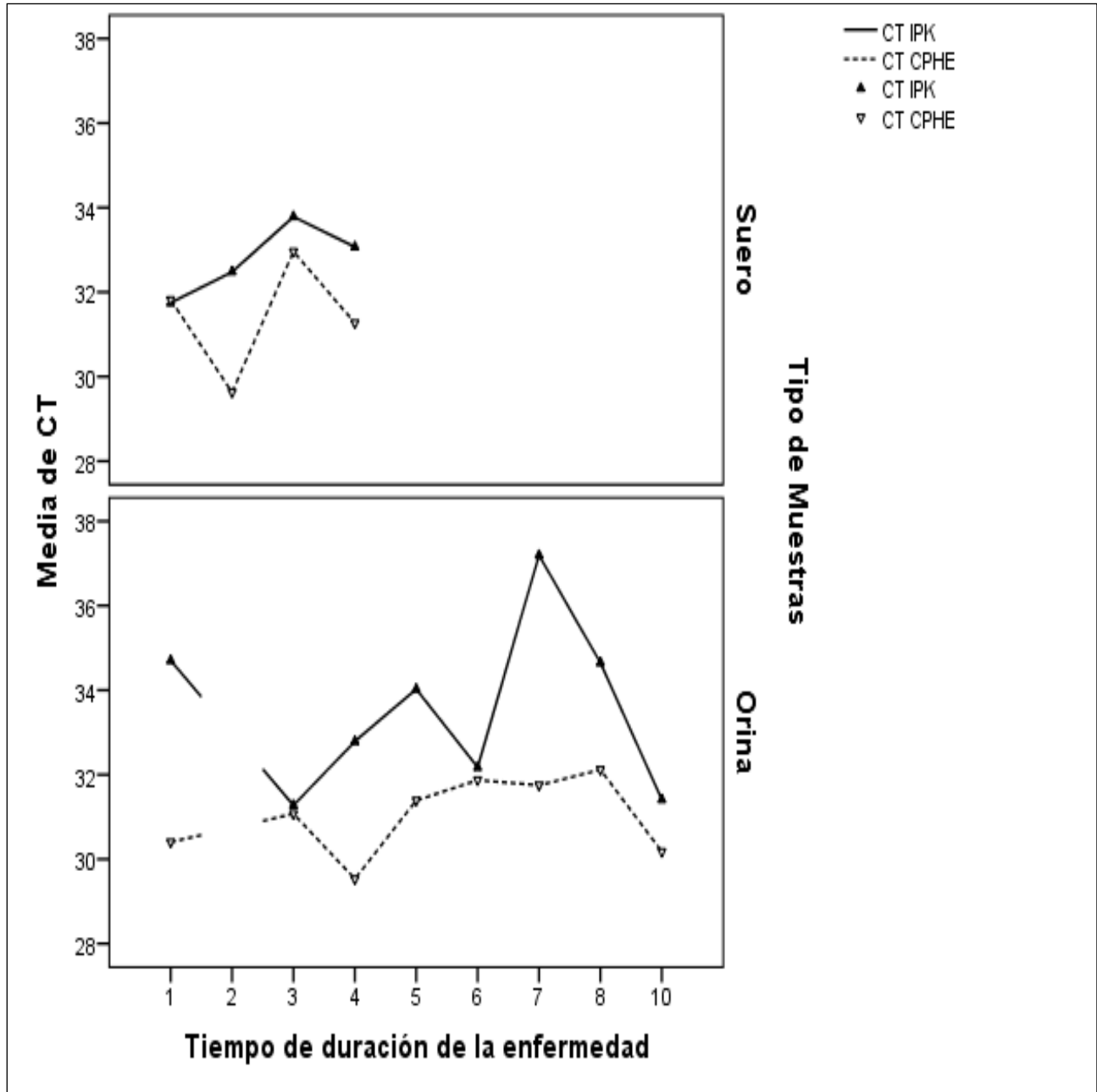


Gráfico-2: Relación entre la media de C_T y el tiempo de duración de la enfermedad.

En el **Gráfico 2** se observa que la media de C_T obtenido en las muestras positivas del IPK se mantuvo superior al C_T obtenido en CPHEM durante los primeros diez días de la enfermedad, independientemente del tipo de muestra.

Tabla-4: Detección de virus Zika en CPHEM e IPK.		Resultados IPK		
		Negativo	Positivo	Total
Resultados CPHEM	Negativo (%)	376 (94,9)	5 (5,2)	381 (77,6)
	Positivo (%)	20 (5,1)	90 (94,7)	110 (22,4)
	Total	396 (100)	95 (100)	491(100)

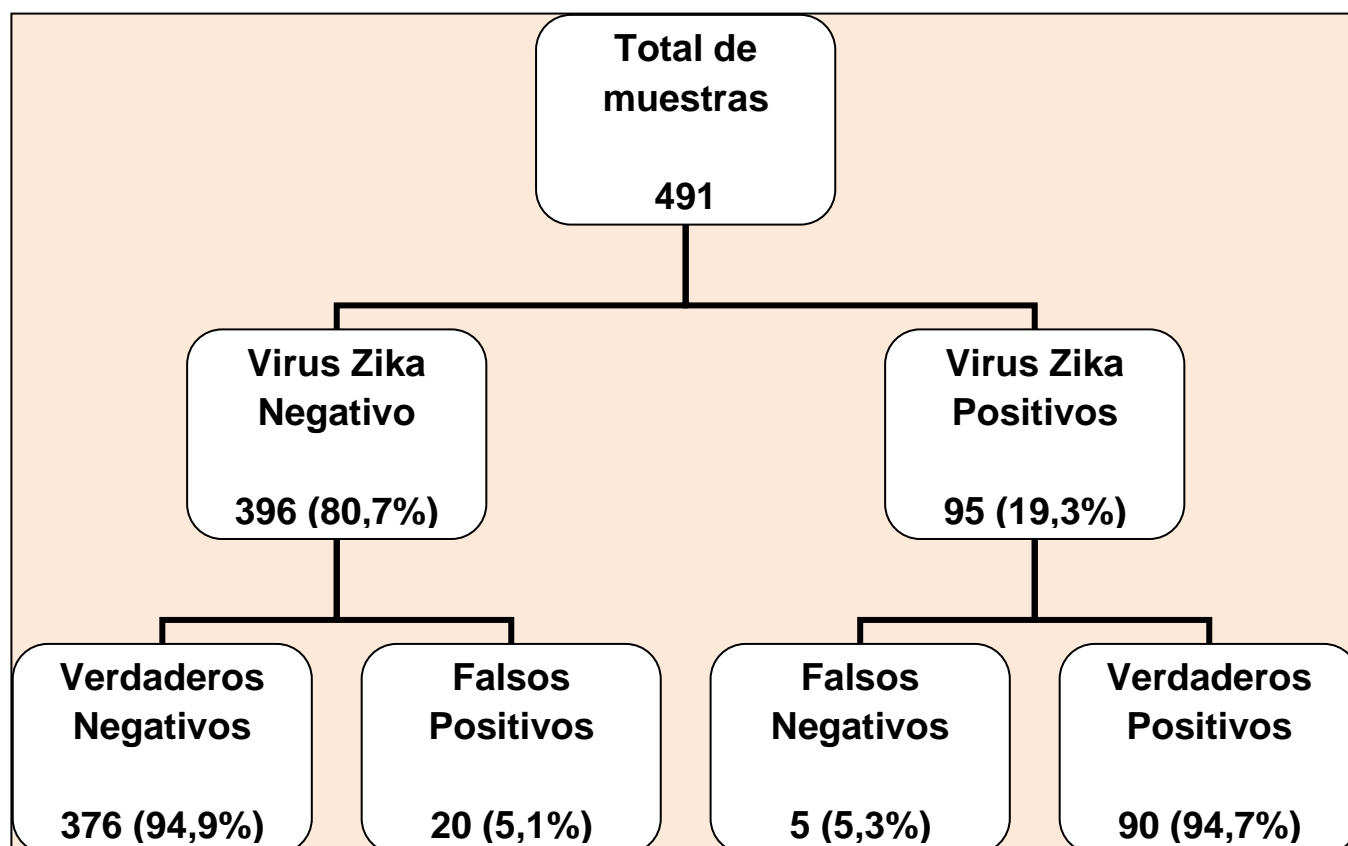
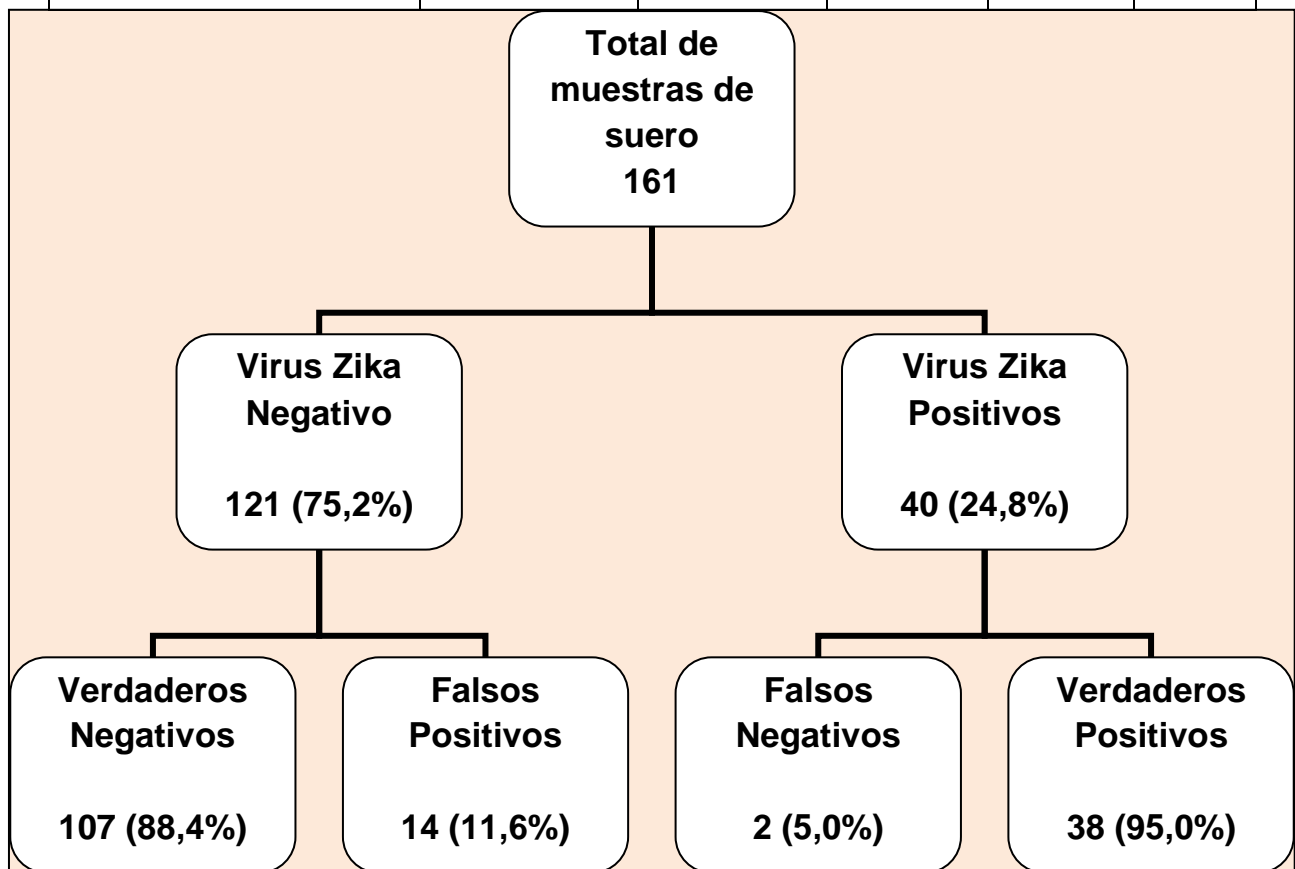
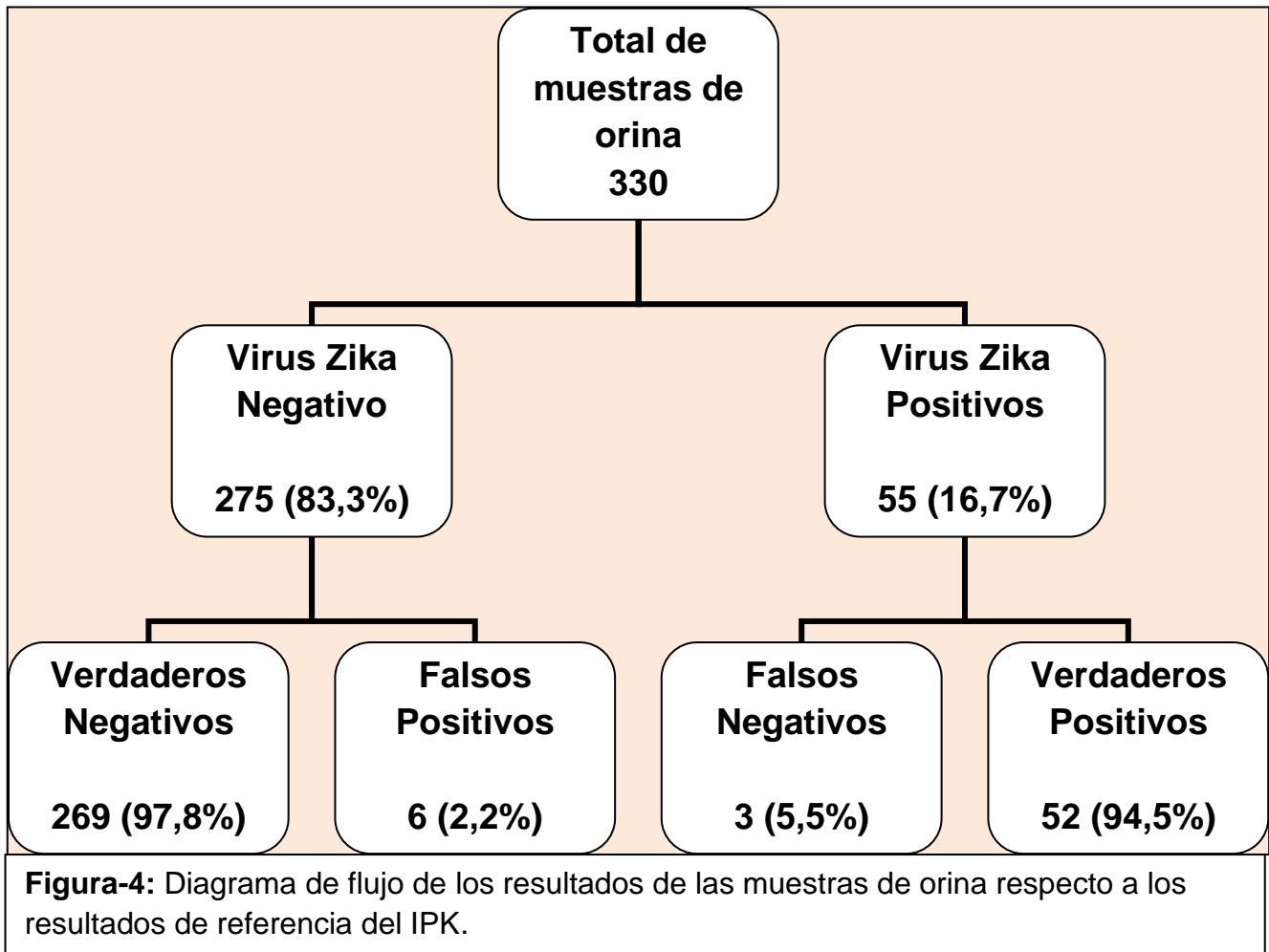


Figura-2: Diagrama de flujo de los resultados del total de las muestras respecto a los resultados de referencia del IPK.

La **Tabla 4** muestra que en el CPHEM se clasificaron erróneamente 25 muestras, de ellas 20 falsos positivos y 5 falsos negativos.

Tabla-5: Detección de virus Zika en CPHEM e IPK según tipo de muestra.		Tipo de Muestra	Resultados IPK		
			Negativo	Positivo	Total
Resultados CPHEM	Negativo	Suero	107 (98,2)	2 (1,8)	109 (100)
		Orina	269 (98,9)	3 (1,1)	272 (100)
	Positivo	Suero	14 (26,9)	38 (73,1)	52 (100)
		Orina	6 (10,3)	52 (89,7)	58 (100)





La **Tabla 5** muestra que fue mayor el número de casos mal clasificados en las muestras de suero, con 16 casos. Sin embargo, en las muestras de orina se logró un mayor acierto con solo 6 casos falsos positivos y 3 falsos negativos.

Tabla-6: Indicadores de validez del RT PCR para la detección de virus Zika realizado en CPHEM según tipo de muestra y fase de la enfermedad.						
Indicadores de validez	General	Suero		Orina		
		General	≤5 días	General	≤5 días	>5 días
Sensibilidad (IC 95%)	94,74 (88,1 a 98,3)	95,00 (83,1 a 99,4)	94.74 (82.3 a 99.4)	94,55 (84,9 a 98,9)	96,77(88,9 a 100)	90,0 (74,3 a 100)
Especificidad (IC 95%)	94,95 (92,3 a 96,9)	88,43 (81,3 a 93,5)	79.10 (67.4 a 88.1)	97,82 (95,3 a 99,2)	91,67 (78,5 a 100)	92,3 (73,9 a 100)
Cociente de probabilidad + (IC 95%)	18,76 (12,2 a 28,8)	8,21 (5,0 a 13,5)	4.53 (2.8 a 7.3)	43,33 (19,6 a 95,9)	11,6 (3,08 a 43,8)	11,7 (1,77 a 77,3)
Cociente de Probabilidad – (IC 95%)	0,055 (0,02 a 0,1)	0,057 (0,01 a 0,2)	0.067 (0.02 a 0.3)	0,056 (0,02 a 0,2)	0,04 (0,01 a 0,24)	0,11 (0,03 a 0,41)
Valor predictivo positivo (IC 95%)	81,8 (74,5 a 87,4)	73,1 (62,3 a 81,7)	72.0 (61.6 a 80.5)	89,7 (79,7 a 95,0)	93,75 (83,8 a 100)	94,7 (82,0 a 100)
Valor predictivo negativo (IC 95%)	98,7 (97,0 a 99,4)	98,2 (93,3 a 99,5)	96.4 (87.2 a 99.0)	98,9 (96,8 a 99,6)	95,6 (85,4 a 100)	85,7 (63,8 a 100)

De manera general se demostró que los resultados del RT-PCR del CPHEM son concluyentes con un cociente de probabilidad + de 18,76. Sin embargo al analizar ambos tipos de muestra, queda en evidencia que los resultados en la orina clasifican de manera excelente las muestras tanto en la fase aguda como en la convalecencia (cociente de probabilidad + >10), mientras que los resultados en el suero pueden ser calificados como buenos (cociente de probabilidad + 8,21).

En el Nomograma de Fagán (**Figura-5**) se observa que la probabilidad preprueba fue 19,3%, y luego de aplicado el RT-PCR, la probabilidad de que un paciente presentara Zika con una prueba positiva fue de 81,8% y que no tuviera esta enfermedad con un resultado negativo fue de 98,7%.

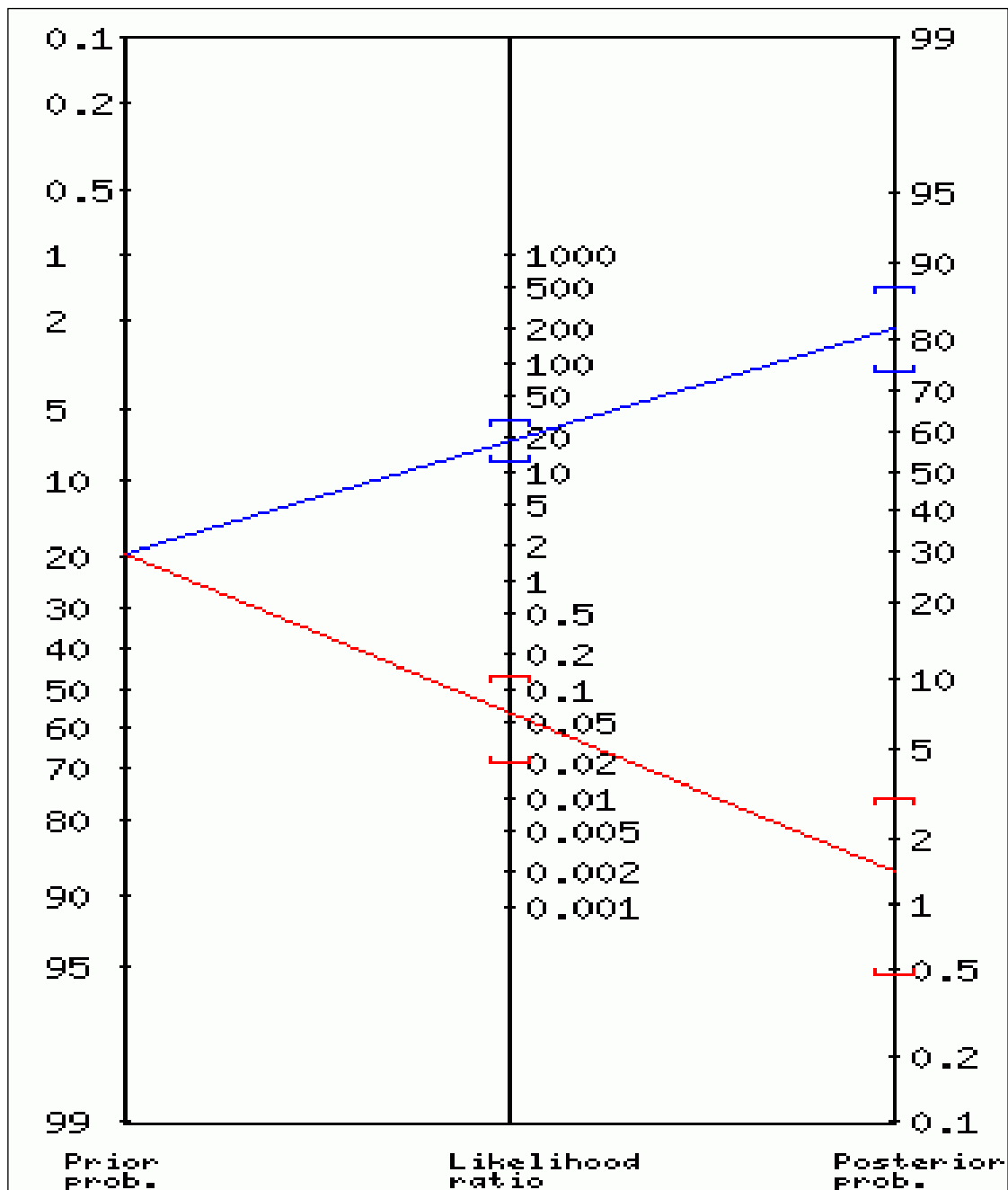


Figura-5: Nomograma de Fagán de los cocientes de probabilidad y la probabilidad pre y pos-test del RT-PCR para detección de virus Zika en CPHEM.

Tabla-7: Concordancia del RT PCR para la detección de virus Zika del CPHEM e IPK según tipo de muestra y fase de la enfermedad.						
Indicador de fiabilidad	General	Suero		Orina		
		General	≤5 días	General	≤5 días	>5 días
Kappa de Cohen	0,846	0,758	0,691	0,903	0,888	0,812
Kappa mínimo	-0,023	-0,052	-0,082	-0,013	-0,028	-0,047
Kappa máximo	0,898	0,083	0,702	0,945	0,891	0,819
Error estándar	0,029	0,056	0,069	0,031	0,062	0,103
Intervalo de confianza 95%	0,787 a	0,647 a	0,555 a	0,842 a	0,766 a	0,610 a
	0,904	0,868	0,826	0,965	1,00	1,00
Estadístico Z	18,828	9,782	7,280	16,428	6,594	4,674
<i>p</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

En la Tabla 7 se aprecia que la concordancia entre los resultados del RT-PCR en el CPHEM con los del IPK fue excelente (k : 0,846). Existió mayor concordancia entre los resultados obtenidos de las muestras de orina que en los de suero.

Tabla-8: Fiabilidad en la determinación del ciclo umbral para la detección del virus Zika entre CPHEM e IPK, según tipo de muestra y fase de la enfermedad.

Indicador de fiabilidad	General n=36	Suero n=12	Orina		
			General n=24	≤5 días n=7	>5 días n=15
Coefficiente de correlación interclases	0,731	0,722	0,747	0,553	0,298
Intervalo de confianza mínimo	0,472	0,034	0,416	-0,330	-3,082
Intervalo de confianza máximo	0,863	0,920	0,891	0,850	0,879

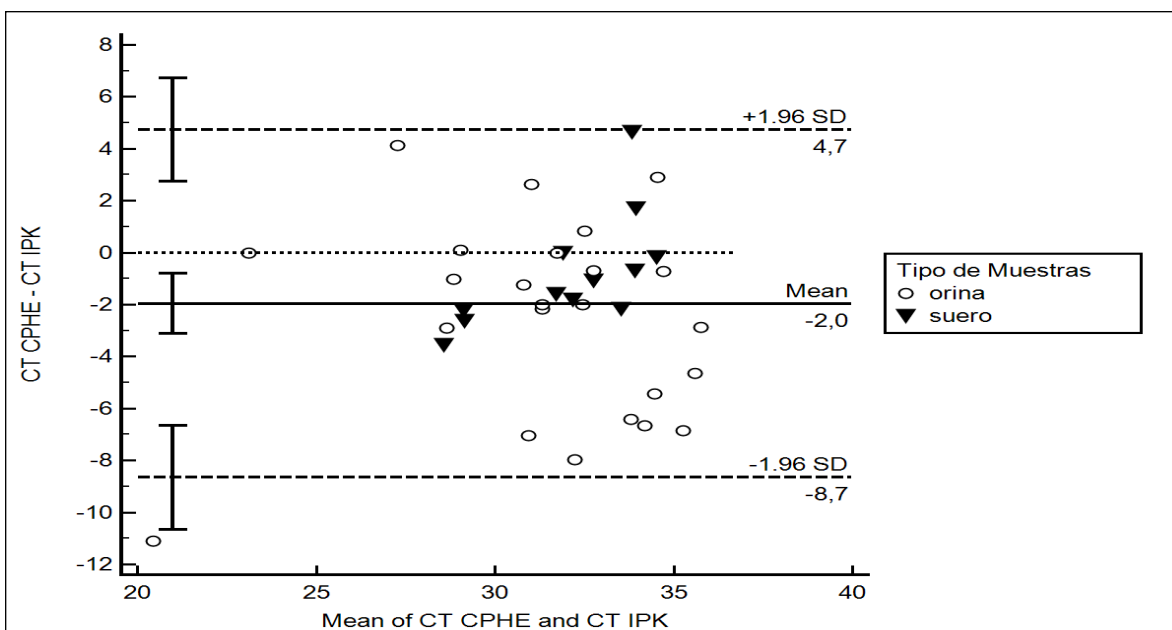
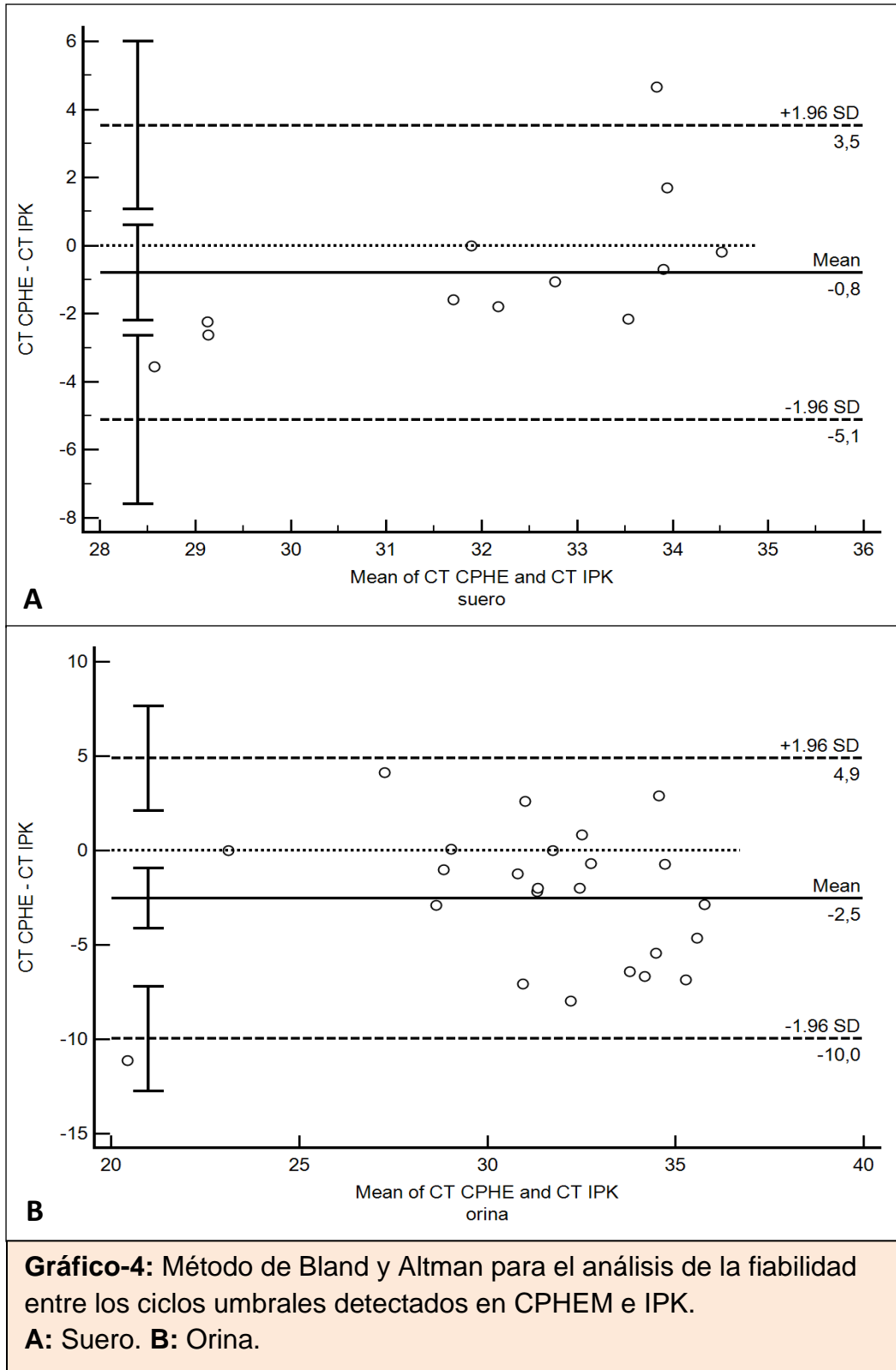


Gráfico-3: Método de Bland y Altman para el análisis de la fiabilidad entre los ciclos umbrales detectados en CPHEM e IPK.



La concordancia entre los resultados del C_T en ambas muestras fue bueno (0,731). Sin embargo, el análisis del tipo de muestras según fases de la enfermedad, revela que esta concordancia fue solo aceptable (0,298) en las muestras de orina de la fase convalecencia.

DISCUSIÓN

En los últimos dos años se han realizado estudios significativos respecto al entendimiento del virus Zika, incluyendo su biología, los múltiples modos de transmisión, la clínica de la enfermedad y las secuelas potencialmente devastadoras asociadas a la enfermedad neonatal. La rapidez con que los ensayos diagnósticos fueron desarrollados y puestos a disposición de la salud pública son testamento de esta dedicación, del esfuerzo colaborativo y del ingenio de investigadores y desarrolladores de ensayos. A pesar de ello, persiste la necesidad de investigaciones que de manera independiente evalúen el desempeño de los ensayos diagnósticos para el virus Zika en la práctica clínica ya que continúa existiendo incertidumbre sobre la utilidad, eficacia, validez, fiabilidad e interpretación de estas pruebas.^{23, 57, 113}

Se presenta el primer estudio cubano enfocado en evaluar el desempeño del RT-PCR para la detección del virus Zika recientemente introducido en la provincia de Villa Clara en el contexto del brote de enfermedad por este virus.

La media de edad entre los pacientes incluídos en este estudio fue de $28,4 \pm 8,3$ años. Otros investigadores reportan medias de edad superiores: *Pessôa R et al*¹¹⁴ 35 años (rango 1-80), *L'Huillier A et al*¹⁰⁷ 33,9 años (rango intercuartílico de 28,5 a 44,3) mientras que *Romer Y et al*¹¹⁵ obtiene como resultado que el grupo de edad más afectado fue el de 20-29 años.

Estas discordancias en la media de edad en los diferentes estudios pudieran explicarse por su diferente diseño, definición de los casos y criterios de inclusión y exclusión para conformar la muestra. En la presente investigación, al obtenerse la información de los registros de CPHEM y buscar aquellos pacientes que tuvieran confirmación del centro de referencia, se ven representados en mayor medida las mujeres embarazadas. Esto está en relación con protocolos nacionales de control de la calidad que establecen que se debe enviar al centro de referencia el 100% de las muestras de embarazadas, lo que pudiera determinar una media de edad menor al tratarse de mujeres en edad fértil.

El 88,5%(431) de la muestra estuvo constituida por mujeres. Este predominio femenino también fue detectado en otros estudios a pesar de la heterogeneidad de sus diseños.^{107, 113, 116} Es evidente que la mayor preocupación internacional respecto al virus Zika es su potencial efecto teratógeno por lo que se han estipulado programas de vigilancia en zonas de transmisión endémica destinados a identificar de manera precoz aquellas embarazadas que pudieron estar expuestas al virus y por tanto en riesgo de desarrollar el síndrome congénito asociado al Zika.

Weilg C et al estudió 1 116 muestras de embarazadas asintomáticas en el Norte de Perú durante el 2016, de ellas 36 fueron positivas para Zika por RT-PCR.¹¹⁷ *St. George K et al* en New York reporta que el 17%(9) de las mujeres en su serie estaban embarazadas y fueron positivas a Zika en suero u orina.¹¹³ Por las razones metodológicas ya expuestas, en la presente investigación se observó que el 80,2% de las mujeres estaban embarazadas. A pesar de no contar con los datos de seguimiento del embarazo de los casos positivos, según reportes de la OMS, Cuba no había presentado hasta la semana estadística 35 de 2017, casos sospechosos o confirmados de síndrome congénito asociado a la infección por virus Zika.¹¹⁸

Romer Y et al le dieron seguimiento a 115 embarazadas mexicanas en busca de signos de infección reciente por virus Zika, estimaron que la incidencia acumulada fue de 0,31 con una razón entre pacientes sintomáticas y asintomáticas de 1,7 (rango 1,3-4 en dependencia del grupo etáreo)¹¹⁵. Otro estudio reciente reporta solo un 6% de embarazadas asintomáticas en su serie.¹¹³ En la presente investigación el 82% de las embarazadas estaban asintomáticas, lo que está en correspondencia con que el 56,1% de la muestra fueron pacientes a los que se les realizó el test por el concepto de vigilancia epidemiológica.

*Balmaseda A et al*¹¹⁹ encontró en su cohorte de pacientes pediátricos nicaragüenses, que la media de duración de la enfermedad antes de la toma de muestra en la fase aguda fue de 1,8 días (desviación estándar 0,9), *L'Huillier A et*

*al*¹⁰⁷ reporta una media de 3 días (intervalo intercuartílico de 2 a 4 días), mientras que *Tozetto-Mendoza et al* reporta una media de comienzo de los síntomas de 3 días en aquellos que resultaron positivos y de 4 días en los que fueron negativos.¹¹⁶ En el presente estudio el tiempo de evolución de la enfermedad antes de la toma de muestra fue de 3,4 (desviación estándar 2,5 días). Hay que tener en cuenta que este valor se calculó solo en aquellos pacientes que fueron sintomáticos, a diferencia de otros estudios que tienen en cuenta para el tiempo de evolución de la enfermedad de los pacientes asintomáticos, la fecha del último viaje a zona de activa transmisión de Zika, método que no es aplicable a los pacientes cubanos.¹¹³

Los valores del CT pueden estar influenciados por la carga viral, así como por los primer Diana utilizados, por lo que sus valores medios difieren según los diferentes estudios, tipo de espécimen analizados y tiempo de evolución de la enfermedad. *Pessôa R et al*¹¹⁴ reporta que no encontró diferencias significativas entre los valores medios de C_T entre las muestras de orina y suero con un mismo tiempo de duración de la enfermedad. Las muestras de suero en el estudio de *L'Huillier A et al* presentaron un C_T medio de 36,5 para el gen prM como diana y de 35,9 para el gen E.¹⁰⁷ Mientras que en este estudio la media de C_T fue de 32,2.

Si bien no se han publicado estudios exhaustivos sobre la carga de la infección por virus Zika en Cuba según provincias y municipios, existen reportes aislados que brindan alguna información. *Mancebo Bueno et al*⁴⁹ describe la afectación de una manzana de Santiago de Cuba donde se encontraron 155 casos confirmados y estudiaron las determinantes sociales de la aparición de este foco. Los riesgos intradomiciliarios influyeron negativamente en la aparición del brote de Zika, pues solo 40,2 % del fondo habitacional fue evaluado de bueno; mientras que 59,8 % en mal estado; igualmente predominaron las malas condiciones higiénicas en 112 viviendas. En cuanto a los riesgos extradomiciliarios resulta válido destacar el número de salideros, macrobasural y deficiente periodicidad de la recogida de los desechos sólidos. Existió incumplimiento del control sanitario internacional.

Resultados similares fueron encontrados por *Solano Puig et al*⁴⁷ en San Miguelito, Camagüey.

En la presente investigación el municipio con la mayor positividad fue Santa Clara, hecho que es comprensible dado que es el de mayor urbanización y densidad poblacional de los analizados, además de estar ubicado en el centro del país con gran afluencia de viajeros nacionales e internacionales y donde ha existido históricamente transmisión de otras arbovirosis como el dengue a pesar de las medidas de salud pública. Es posible que los determinantes sociales y ambientales encontrados en los estudios citados también hayan contribuido a la transmisión del Zika en este municipio. Estos resultados coinciden con los reportados por *Delgado Acosta HM*, autora que describe la afectación de la provincia de Cienfuegos por el virus Zika durante el 2016-2017 y resalta que los casos se concentraron mayoritariamente en la zona urbana residencial del municipio cabecera con mayor densidad poblacional e índice de infestación por *Aedes aegypti*.⁴⁸

La media de edad de los 80 pacientes de New York positivos a Zika en el estudio de *St. George K et al*¹⁰⁹ fue de 37 años (rango de 7 a 73 años). Nueve de las 80 pacientes estaban embarazadas. En este estudio el grupo etáreo que predominó entre los pacientes positivos fue el de 18 a 64 años por la mayor representación de mujeres en edad fértil. Estudios prospectivos han encontrado que los efectos adversos sobre la gestación y el producto de la concepción fue observado en el 55% de las embarazadas con infecciones por Zika en el primer trimestre, 52% en el segundo trimestre y 29% en las que sufrieron la infección en el tercer trimestre.¹¹⁷

En esta serie no se encontraron pacientes positivas en el primer trimestre del embarazo, lo que pudiera en parte explicar la ausencia de síndrome congénito asociado a la infección del virus Zika en nuestros pacientes.

Weilg C et al en su estudio de embarazadas asintomáticas en el Norte de Perú, encontró que la media de edad de los pacientes que fueron positivos a Zika fue de

29,6 años y de ellos el 8,3% tenía menos de 18 años de edad. En relación con la edad gestacional, el 19,4% se encontraban en el primer trimestre, el 36,1% en el segundo y el 44% en el tercer trimestre del embarazo. Ninguna de los recién nacidos presentó microcefalia.¹¹⁷

Romer Y et al reportan desde México una cohorte de 115 mujeres embarazadas de las cuales 36 resultaron positivas para Zika, 8 durante el primer trimestre, 23 durante el segundo, y 5 durante el tercer trimestre de la gestación. No se encontró evidencia de síndrome congénito asociado a infección por virus Zika.¹¹⁵

En Rio de Janeiro, Brasil, en contraste con estudios previos se observó que los efectos adversos sobre el embarazo de la infección por virus Zika se presentaron independientemente del trimestre en el que ocurrió la infección.⁵⁵ La viremia persistente en la madre puede actuar como un factor pronóstico, ya que el ARN viral ha sido detectado en la sangre materna hasta 107 días después del comienzo de los síntomas y puede ser el resultado de la replicación viral en el feto o la placenta.⁵⁵

Indudablemente, el éxito en la confirmación de laboratorio de la infección por virus Zika está directamente asociada a la selección de la muestra y al momento en que se toma.⁸⁶

En este estudio resulta evidente que la mayor frecuencia de detección se observó en las muestras de orina y que este hecho fue independiente de la fase de la enfermedad en que se encontraba el paciente. *L'Huillier A et al* reporta que en las muestras de sangre la positividad del RT-PCR para Zika se mantuvo estable desde el comienzo de los síntomas hasta el cuarto día cuando comenzó a decrecer. Entre las muestras de orina el intervalo desde el comienzo de los síntomas varió desde 1 hasta 11 días.¹⁰⁷ *St. George K et al* afirma que en su serie el promedio de detección de virus Zika fue mayor en orina que en suero y atribuye esto a un periodo más prolongado de viriuria que de viremia, exceptuando a las pacientes embarazadas que tienen una viremia más prolongada.¹¹³

El virus del Zika puede ser detectado en plasma o en suero solo durante un breve período de tiempo durante la fase aguda de la enfermedad. Comparado con el suero, la orina incrementa la tasa de detección de ARN viral en la primera semana después del inicio de los síntomas y amplía la ventana de detección hasta 39 días. Sin embargo, algunas investigaciones han encontrado resultados discrepantes: una investigación de Puerto Rico reporta una mayor sensibilidad en sangre que en orina.^{55, 114} Otros estudios recientes muestran una frecuencia de detección y un tiempo de persistencia del ARN mayor en suero que en orina, con una media de aclaramiento del ARN de 14 y 8 días respectivamente. Algunos autores atribuyen estos resultados a la degradación del ARN viral en las muestras de orina que no están debidamente almacenadas y recomiendan la refrigeración a 4°C y la adición de un estabilizador de ácidos nucleicos y así disminuir el riesgo de falsos negativos.²³

La orina y la saliva resultan muestras atractivas dada la inocuidad de su obtención y su potencial aplicación en niños y recién nacidos.⁵⁹ Por otra parte existen estudios que sugieren que la sangre entera pudiera ser una mejor opción que suero o plasma dado que la carga viral en esta muestra es más elevada, sin embargo las condiciones especiales para su almacenamiento y extracción han limitado su uso.²³

Si bien el periodo de viremia aún no ha sido plenamente establecido, el virus ha sido detectado en suero con mayor frecuencia hasta el día 5 tras iniciados los síntomas y en algunos casos hasta el día 7. Por otro lado, en algunos casos registrados en las Américas se ha podido detectar RNA viral en orina hasta 15 días después de iniciado los síntomas. Esto es consistente con la detección de altas cargas virales en orina durante un tiempo prolongado de la fase aguda. Por todo esto y para aumentar la sensibilidad del diagnóstico, se recomienda tomar muestra de suero en conjunto con orina (máximo hasta el día 15) para ser procesadas por RT-PCR o por serología, teniendo en cuenta la dinámica de infección.¹²⁰

Algunos autores informan que durante la fase aguda la detección en suero es mayor que en orina. Si bien la base de esta discrepancia no ha sido aclarada, algunas hipótesis son: escasa muestra de los estudios; factores inmunológicos y genéticos pueden influir en la carga viral en diferentes fluidos corporales y esto puede variar entre los individuos; infecciones previas o coinfecciones con otros flavivirus puede alterar la replicación del virus Zika en diferentes órganos. Ninguna de estas hipótesis ha sido confirmada.¹¹⁴

En este estudio se observó que de manera general el C_T fue menor en la fase aguda que en la convalecencia, y en la orina comparado con el suero. Estos resultados pudieran corresponder con la relación inversamente proporcional entre el C_T con la carga viral, siendo esta mayor en la fase aguda y en los especímenes de orina. Estos resultados coinciden con los de *St. George K et al* quien reporta que los C_T en orina fueron significativamente menores en orina que en suero (32,5 vs 35,2) en ambas fases de la enfermedad.¹¹³

Charrel RN et al reporta que la carga viral en la orina es mayor que en la sangre, alcanzado su pico entre los días cinco y siete, en la cual parece que dura más, ya que ha sido posible la detección de ARN viral en esta muestra hasta el día 20 después del comienzo de los síntomas.⁵⁹

De manera general se demostró que los resultados del RT-PCR del CPHEM son concluyentes con un cociente de probabilidad + de 18,76. Sin embargo al analizar ambos tipos de muestra, queda en evidencia que los resultados en la orina clasifican de manera excelente las muestras tanto en la fase aguda como en la convalecencia (cociente de probabilidad + >10), mientras que los resultados en el suero pueden ser calificados como buenos (cociente de probabilidad + 8,21). Estos resultados son similares que los de *L'Huillier A et al* al evaluar el desempeño de Altona Diagnostics RealStar Zika Virus RT-PCR, ya que encontró una mayor sensibilidad en orina que en suero. Otros investigadores han señalado que la sangre entera pudiera ser una muestra superior al suero ya que alberga una

mayor carga viral durante un mayor período de tiempo, estos datos necesitan más investigación antes de ser introducidos a la práctica.^{107, 116}

Es importante descartar que como parte de la incertidumbre inherente al desconocimiento del desempeño diagnóstico de las pruebas de laboratorio según tipo de muestra al comienzo del brote de Zika, en Cuba se recomendó la toma de suero en aquellos pacientes que se presentaran en la fase aguda de la enfermedad y en orina a los que lo hicieran en la convalecencia. Por tal motivo fue imposible evaluar la validez del suero en aquellos pacientes que presentaban más de cinco días del comienzo de los síntomas. Esta situación no fue exclusiva de Cuba y ha sido reportada previamente en la literatura internacional.^{107, 116}

Independientemente del método utilizado, existe suficiente evidencia para asegurar que las técnicas de RT-PCR para la detección de virus Zika son sensibles y específicas en la fase aguda, lo que concuerda con los resultados de este estudio.^{119, 121}

Un estudio reciente realizó una evaluación externa sobre la detección de virus Zika en múltiples laboratorios brasileños. Los resultados sugieren una falta en la sensibilidad y especificidad, sobre todo en muestras con una carga viral baja (10^3 – 10^4 copias/mL), fenómeno que es muy común en los pacientes con Zika.¹¹⁸ A pesar de ello, estos laboratorios mostraron un desempeño similar a laboratorios europeos, sin que la sensibilidad ni la especificidad difiriera significativamente entre ellos. Estos estudios demuestran que el diagnóstico de esta enfermedad es difícil de manera universal y resaltan la necesidad de combinar RT-PCR con los métodos serológicos en el diagnóstico de virus Zika a pesar de las limitaciones que les son inherentes.^{118, 119}

La falta de sensibilidad afecta directamente la estimación del riesgo absoluto del síndrome congénito asociado a la infección por virus Zika entre las mujeres que tienen la infección durante el embarazo. Los resultados falsos positivos tienen consecuencias potencialmente devastadoras para los pacientes y para la salud pública, lo que se ve reflejado en el incremento que sufrieron las solicitudes de

abortos ilegales en América Latina durante la epidemia de Zika de 2016. Por tanto es necesario enfatizar en la necesidad de la evaluación continua de la calidad del diagnóstico de la infección por virus Zika de manera global.^{122, 123}

La concordancia general entre los resultados del CPHEM y el IPK fue excelente. Al analizar la concordancia según tipo de muestra, se evidenció que fue mayor en las muestras de orina que en las de suero, y que esta concordancia se mantuvo en la fase aguda y en la convalecencia. En la literatura revisada se encuentran estudios que evalúan la fiabilidad entre ensayos diagnósticos, pero pocos entre laboratorios.^{119, 124}

Otros investigadores han estudiado qué tan reproducible son los resultados de Altona RealStar ZIKV PCR comparados con el CDC-designed dual-target ZIKV rRT-PCR. Sus resultados muestran excelente concordancia inter e intraensayo. Los datos aportados por este estudio confirman la fiabilidad del kit Altona RealStar ZIKV PCR y permiten la implementación segura de este ensayo y su utilización en muestras clínicas de orina y sangre.¹⁰⁷

Una fuente de variación que puede explicar los casos discordantes son los valores de corte del C_T por encima de los cuales se considera un caso como positivo. Así, *Waggoner JJ et al* encontraron una concordancia moderada (kappa: 0,47) cuando consideraron $C_T < 38,5$ y una concordancia excelente cuando tuvieron en cuenta como positivos valores del $C_T > 38,5$ (kappa: 0,81).¹²⁵ En otro estudio *Elias Colombo T, et al* reporta una concordancia buena (kappa: 0,67) entre Green RT-qPCR y TaqMan® RT-qPCR en diferentes laboratorios.¹²⁶

La baja carga viral tiene impacto directo sobre la interpretación de los resultados negativos de PCR. Estos resultados negativos no excluyen la infección por virus Zika o la presencia del virus en el espécimen. Para incrementar la posibilidad de detección de virus Zika, se recomienda la toma de muestra simultánea de suero y orina así como el análisis serológico.¹²¹

La concordancia entre los resultados del C_T en ambas muestras fue bueno (0,731). Sin embargo, el análisis del tipo de muestras según fases de la

enfermedad, revela que esta concordancia fue solo aceptable (0,298) en las muestras de orina de la fase convalecencia.

Balmaseda A et al reporta que las muestras discordantes en su estudio tenían C_T tardío.¹¹⁵ En este sentido, *Rousset D et al* indica que a pesar de que existió una buena correlación entre los valores de C_T obtenidos entre RealStar Zika Virus RT-PCR Kit y Lanciotti E PCR, las muestras discordantes presentaron un C_T elevado (> 35.7), lo que se corresponde con cargas virales bajas.^{121, 125}

Este estudio presenta como limitación que no se conoció si existía coinfección con otros virus como el dengue, el cual se encontraba en transmisión activa en el período de estudio. En la semana estadística 25 de 2017, un total de 270 casos probables de dengue habían sido reportados en el país (2 casos por cada 100 000 habitantes). No se han reportado casos autóctonos de chikungunya en Cuba.¹¹⁸

Otra limitación inherente a la fuente de los datos de este estudio es el sesgo de verificación diagnóstica, ya que las muestras con una prueba negativa en el CPHEM tuvieron menor posibilidad de que se les realizara el patrón de referencia y por tanto menos probabilidad de entrar en el estudio.¹⁰⁸ Este aspecto también influyó en que la muestra fuera heterogénea. El valor del C_T no estuvo disponible para todas las muestras positivas, por lo que las conclusiones referentes a los resultados de los análisis realizados con este parámetro deben ser interpretadas con cautela.

A pesar de las limitaciones enunciadas, este es el primer estudio cubano dedicado a evaluar la validez y fiabilidad diagnóstica de las nuevas técnicas de RT-PCR en la práctica clínica en un centro diferente del IPK. Los estudios dedicados a la evaluación interna y externa de los laboratorios de diagnóstico son cada vez más necesarios. Un estudio reciente de evaluación externa de la calidad en laboratorios europeos concluyó que el 60% de los laboratorios necesitaban mejorar la detección molecular del virus Zika.¹²²

El acceso a los reactivos más avanzados en laboratorios en las regiones afectadas y los controles externos de la calidad, son unos componentes claves

aun no resueltos de la respuesta al brote de Zika. Por ello, agencias nacionales e internacionales deben apoyar los laboratorios públicos en las regiones de transmisión activa donde se enfrenta a una enorme carga de pruebas diagnósticas sin el suministro adecuado.¹²³

Según expertos, una necesidad más urgente que la vacuna para el Zika, es una prueba diagnóstica confiable que se pueda realizar en el lugar de atención del paciente (point-of-care-test) y que cumpla los criterios ASSURED (*Affordable*: accesible para los que tienen riesgo de infección; *Sensitive*: pocos falsos negativos; *Specific*: pocos falsos positivos; *User friendly*: fácil de realizar con mínimo entrenamiento; *Rapid*: que permita iniciar el tratamiento en la primera visita; *Robust*: resistente, que no requiera refrigeración; *Equipment free*: sin necesidad de equipos; *Delivered to those who need it*: a disposición de los que lo necesitan) de la OMS.^{23, 127}

Eve Lackritz, quien dirige el Grupo Operativo para el Zika de la Organización Mundial de la Salud, dijo que una de sus principales tareas es dejar claro que se trata de una emergencia. “Mi temor más grande es el exceso de despreocupación y la falta de interés de la comunidad global”, comentó. **“No es alarmista decir que ningún lugar donde vive este mosquito está a salvo del siguiente brote”**. “No se trata de saber si habrá otro brote o no, sino cuándo ocurrirá”, comentó Ernesto T. A. Marques, investigador de salud pública en la Fundación Oswaldo Cruz en Río de Janeiro.¹²⁸

Esta investigación demuestra que el RT-PCR disponible en el CPHEM de Villa Clara es válido y fiable para la detección del virus Zika en la región central del país, lo que asegura la vigilancia epidemiológica y el enfrentamiento efectivo ante la real amenaza de futuros brotes de esta enfermedad en Cuba.

CONCLUSIONES

Se demostró que RT-PCR para la detección de Zika realizado en el CPHEM para los pacientes de las provincias de Villa Clara y Sancti Spíritus tiene una validez y fiabilidad general excelente. Las muestras de orina mostraron un rendimiento diagnóstico superior a las muestras de suero, tanto en la fase aguda como en la convalecencia de la enfermedad. Estos resultados confirman la calidad de las determinaciones realizadas en el territorio para el diagnóstico rápido y certero de enfermedad por virus Zika con la nueva plataforma de RT-PCR.

RECOMENDACIONES

Reevaluar las recomendaciones nacionales en cuanto al tipo de muestra a recolectar en la fase aguda de la enfermedad. Se sugiere la toma de suero y orina simultáneamente dada la superioridad en el rendimiento diagnóstico de esta última demostrada en el presente estudio.

Realizar futuras investigaciones que comprendan una muestra más grande, con una mayor representación de pacientes enfermos y que permitan la disponibilidad del C_T para todas las muestras positivas. Estos datos posibilitarán la obtención de evidencia más sólida que facilite la evaluación del posible origen de los resultados discordantes entre el laboratorio del CPHEM y el IPK.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pan American Health Organization/World Health Organization. Zika virus infection Washington, D.C 2016 [cited 2019 4 Ago]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=427&Itemid=41484&lang=es.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Zika virus Oct 2018 [cited 2019 5 Ago]. Available from: <https://www.cdc.gov/zika/index.html>.
3. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Zika virus infection Oct 2017 [cited 2019 Ago 4]. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika_virus_infection/Pages/index.aspx.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC Health Advisory: Recognizing, Managing, and Reporting Zika Virus Infections in Travelers Returning from Central America, South America, the Caribbean, and Mexico 2016 [cited 2019 Ago 5]. Available from: <http://emergency.cdc.gov/han/han00385.asp>.
5. Wikan N, Smith D. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:e119–26.
6. Gatherer D, Kohl A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *J Gen Virol*. Feb 2016 97(2):269.
7. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. Jun 2009;360(24):2536.
8. Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* Jun 2014;20(6):1085-6.
9. Scassi Salvador F, Minoru Fujita D. Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. *Travel Med Infect Dis* Feb 2016;14(1):49-51.
10. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* Oct 2015;21(10):1887.
11. Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis* Abr 2016;10(4):e0004636.
12. Pan American Health Organization. Zika update Ene 2018 [cited 2019 4 Ago]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=43296&lang=en.
13. Dyer O. Zika virus spreads across Americas as concerns mount over birth defects. *BMJ* Dic 2015;23(351):h6983.
14. Hamer DH, Barbre KA, Chen LH, Grobusch MP, Schlagenhauf P, Goorhuis A, et al. A GeoSentinel Analysis Zika Virus Disease Acquired in the Americas Through February 2016. *Ann Intern Med* Ene 2017;166(2):99.
15. Conner Gorry MA. Confronting Arboviruses: María Guadalupe Guzmán MEDICC Review. Ene 2019;21(1):6-9.
16. Conner Gorry MA. Cuba Confronts Zika: All Hands on Deck. MEDICC Review. Abr 2016;18:1-2.

17. Verdasquera Corcho D, Ramos Valle I, Borroto Gutiérrez S, Rumbaut Castillo R, Pérez Ávila LJ, Alfonso Berrio L, et al. Capacidad de respuesta y desafíos del sistema de salud cubano frente a las enfermedades transmisibles. *Rev Panam Salud Publica*. 2018;42:1-9.
18. Reardon S. Cuba's epic battle with Zika. *Nature*. 2016;536:257.
19. Albuquerque P, Castro M, Santos Gandelman J, Oliveira A, Peralta J, Rodrigues M. Bibliometric Indicators of the Zika Outbreak. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1): e0005132.
20. FDA authorizes marketing of first diagnostic test for detecting Zika virus antibodies 2019. Available from: <http://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-authorizes-marketing-first-diagnostic-test-detecting-zika-virus-antibodies>.
21. Chan JF-W, Yip CC-Y, Tee K-M, Zhu Z, Tsang JO-L, Chik KK-H, et al. Improved detection of Zika virus RNA in human and animal specimens by a novel, highly sensitive and specific real-time RT-PCR assay targeting the 5'-untranslated region of Zika virus. *Tropical Medicine & International Health*. 2017;22:594-603.
22. Peeling R, Murtagh M, Olliaro P. Epidemic preparedness: why is there a need to accelerate the development of diagnostics? *Lancet Infect Dis* 2019;19:e172-78.
23. Theel ES, Hata DJ. Diagnostic Testing for Zika Virus: a Postoutbreak Update. *J Clin Microbiol*. Abr 2018;56:e01972-17.
24. Pérez-Ávila J, Guzmán-Tirado M, Fraga-Nodarse J, Gray Handley F, Meegan J, Pelegrino-Martínez J, et al. US and Cuban Scientists Forge Collaboration on Arbovirus Research. *MEDICC Review*. Abr 2018;20(2):32-4.
25. Pan American Health Organization/World Health Organization. Strategy for Enhancing National Capacity to Respond to Zika virus Epidemic in the Americas 2016. Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/18605>.
26. OMS/OPS. La OPS apunta a alcanzar un diagnóstico más rápido y una mayor integración en el combate contra el zika, dengue y chikungunya Washington, D.C 2016 [updated 15 Feb 2016]. Available from: https://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=694:la-ops-apunta-a-alcanzar-un-diagnostico-mas-rapido-y-una-mayor-integracion-en-el-combate-contra-el-zika-dengue-y-chikungunya&Itemid=1005.
27. OMS/OPS. Países de las Américas acuerdan acciones para combatir los virus transmitidos por mosquitos como el zika y el dengue 2016 [updated 21 Oct 2016]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12665:americas-acuerdan-acciones-para-combatir-virus-transmitidos-mosquitos-zika-dengue&Itemid=135&lang=es.
28. Méndez Brito M, Alcalde Rojas JM, González Gámez S, Fernández Toledo AG. Algunas especificidades sobre la enfermedad por el virus del Zika. *MEDISAN*. 2017;21(2):243-53.
29. Álvarez Lam I. Alerta en las Américas, infección por virus Zika. *Rev Cub Ped*. 2016;88(4):403-5.
30. Camps Jeffers M, Belón Calderín R, Nordet Torres M, Villanueva Salinas M. A propósito de una enfermedad llamada Zika. *Rev Inf Cient*. 2016;95(5):808-17.
31. Álvarez Escobar MdC, Torres Álvarez A, Torres Álvarez A, Semper González A, Romeo Almanza D. Dengue, chikungunya, Virus de Zika. Determinantes sociales. *Rev Méd Electrón Ene* 2018;40(1).
32. Barreto Argilagos G, Barreto Rodríguez H, Rodríguez Torrens H. Elementos para un diagnóstico serológico rápido y preciso de Zika. *Rev Arch Med Camagüey*. 2018;22(3).

33. González Rodríguez R. Enfermedad viral Zika. Revista Cubana de Medicina General Integral. 2016;32(3).
34. Serra Valdés MA. Fiebre por virus Zika: una alerta necesaria. Revista Habanera de Ciencias Médicas. 2016;15(1):1-3.
35. Miranda Hernández I, Río Torres M. Impacto de la infección por virus ZIKA en Oftalmología. Revista Cubana de Oftalmología. 2017;30(1).
36. Cabrera Hernández Y, Vega Jiménez J, Miranda Folch J, Martínez Rodríguez S, García Cuervo D, Martínez Abreu J. Infección por virus Zika como un reto para la Salud Pública. Rev Méd Electrón. Abr 2017;39(2).
37. Lugones Botell M, Ramírez Bermúdez M. Infección por virus zika en el embarazo y microcefalia. Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología. 2016;42(1):398-411.
38. Roque L, Alfonso Y, González M, Pérez N. Influencia del cambio climático en la emergencia del Zika. 16 de Abril. 2018;57(270):284-8.
39. López Lazo SE. La epidemia de Zika y lo que el anestesiólogo debe saber. Rev Arch Med Camagüey. 2018;22(2):126-9.
40. González Rodríguez R, Cardentey García J. Preservación de la salud humana ante la enfermedad por virus Zika. Revista Habanera de Ciencias Médicas 2016;15(2):310-2.
41. González Rodríguez R, Cardentey García J. Promoción sobre la enfermedad viral Zika desde la educación médica. Educación Médica Superior. 2016;30(4):267-9.
42. Morilla Guzmán AA, Álvarez Fumero R. Recomendaciones para la atención a hijos recién nacidos de madres con diagnóstico de virus Zika en Cuba. Revista Cubana de Pediatría. 2017;89(4).
43. Rivero Jiménez RA. Transfusión sanguínea y agentes biológicos emergentes y reemergentes: Zika, Dengue y Chikungunya. Rev Cub Hematol Inmunol y Hemoter. 2016;32(4):529-32.
44. González Rodríguez R, Cardentey García J. Vigilancia y prevención de la enfermedad viral Zika desde la Atención Primaria de Salud. Revista Electrónica Dr Zoilo E Marinello Vidaurreta. Feb 2016;41(2).
45. Licourt Otero D, Saíenz Padrón L. Virus Zika: una alerta para la prevención. Rev Ciencias Médicas de Pinar del Río. Jun 2018;22(3):623-45.
46. González Rodríguez R, Cardentey García J, Corbillón Correa J, Hernández Izquierdo A. Intervención educativa sobre enfermedad viral zika en residentes de medicina general integral. Revista de Ciencias Médicas La Habana. 2016;23(2).
47. Solano Puig D, González Morales Y, Wilson Donet M. Intervención de enfermería durante la aparición del Zika en San Miguelito, Camagüey. Convención Internacional de Salud, Cuba Salud 2018; Habana 2018.
48. Delgado Acosta HM, Monteagudo Díaz S. Caracterización de la enfermedad por virus zika. Cienfuegos 2016-2017. Convención Internacional de Salud, Cuba Salud 2018; Habana 2018.
49. Mancebo Bueno W, Estrada Rodríguez G, Ruiz Salazar D, Martínez Álvarez L, Cardona Rojas Y. El virus del Zika y determinantes sociales en un área de salud de Santiago de Cuba. MEDISAN. 2019;23(3):468-82.
50. Altman D, Bossuyt PMM. Estudios de precisión diagnóstica (STARD) y pronóstica (REMARK). Med Clin (Barc). 2005;125(Supl. 1):49-55
51. Cohen J, Korevaar D, Altman D. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. BMJ Open. 2016;6:e012799.
52. World Health Organization. Zika Epidemiology Update. July 2019. Washington, D.C: 2019.

53. World Health Organization, World Health Organization. Zika Virus Disease – India. 14 Oct. 2021. Available from: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/zika-virus-disease-india>.
54. “Paho/Who Data - Reporte De Casos Por Región: OPS/OMS.” Pan American Health Organization / World Health Organization. Gutiérrez, Luis A. Feb. 2022. Available from: https://www3.paho.org/data/index.php/es/?option=com_content&view=article&id=529%3Azika-subregions-es&Itemid=353.
55. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. *Lancet*. 2017;390:2099–109.
56. Waggoner JJ, et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clin Infect Dis* 2016;63(12):1584-90.
57. Cordeiro MT, Pena LJ, Brito CA, Gil LH, Marques ET. Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *Lancet Ene* 2016;387(10015):1811-2.
58. Naccache SN, Thézé J, Sardi SI, Somasekar S, Greninger AL, Bandeira AC, et al. Distinct Zika Virus Lineage in Salvador, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* Oct 2016;22(10):1788.
59. Charrel RN, Leparç-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;94:574-84D.
60. Feldmann H. Virus in Semen and the Risk of Sexual Transmission. *N Engl J Med* Abr 2018;378(15):1440-1.
61. Saá P, Proctor M, Foster G, Krysztof D, Winton C, Linnen JM, et al. Investigational Testing for Zika Virus among U.S. Blood Donors. *N Engl J Med* May 2018;378(19):1778
62. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* Ene 2016;65(3):55.
63. Sun J, Wu D, Zhong H, Guan D, Zhang H, Tan Q, et al. Presence of Zika Virus in Conjunctival Fluid. *JAMA Ophthalmol* Nov 2016;134(11):1330.
64. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. *N Engl J Med* Sep 2018;379(13):1234.
65. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* Sep 2015;89(17):8880.
66. Solomon IH, Milner DA. Neuropathology of Zika Virus Infection. *J Neuroinfect Dis* Jun 2016;7(2).
67. Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis* Abr 2016;10(4):e0004636.
68. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med* May 2016;374(20):1981.
69. Driggers RW, Ho CY, Korhonen EM, Kuivanen S, Jääskeläinen AJ, Smura T, et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med* Jun 2016;372(22):2142-51.
70. Sun J, Wu D, Zhong H, Guan D, Zhang H, Tan Q, et al. Presence of Zika Virus in Conjunctival Fluid. *JAMA Ophthalmol* Feb 2016;134(11):1330-2.
71. de Fatima Vasco Aragao M, van der Linden V, Brainer-Lima AM, Coeli RR, Rocha MA, Sobral da Silva P, et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus

related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *BMJ* 2016 Abr 2016;353:i1901.

72. Besnard M, Eyrolle-Guignot D, Guillemette-Artur P, Lastère S, Bost-Bezeaud F, Marcelis L, et al. Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Euro Surveill* 2016;21(13):30181.

73. Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* 2016;375(24):2321.

74. Guillemette-Artur P, Besnard M, Eyrolle-Guignot D, Jouannic JM, Garel C. Prenatal brain MRI of fetuses with Zika virus infection. *Pediatr Radiol* Jun 2016;46(7):1032.

75. Hennessey M, Fischer C, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65(3):59.

76. Aguilar Ticona JP, Nery N Jr, Doss-Gollin S, Gambrah C, Lessa M, et al. (2021) Desarrollo heterogéneo de niños con microcefalia asociada al síndrome de Zika congénito. *PLOS UNO* 16(9): e0256444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256444>

77. dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, Sanhueza A, Ramon P, de Oliveira WK, et al. Zika Virus and the Guillain–Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. *N Engl J Med* Oct 2016;375(16):1598.

78. Musso D, de Pina JJ, Nhan T-X, Deparis X. Uncommon presentation of Zika fever or co-infection? *Lancet* Abr 2016;387(10030):1812-3.

79. Chraïbi S, Najioullah F, Bourdin C, Pegliasco J, Deligny C, Résière D, et al. Two cases of thrombocytopenic purpura at onset of Zika virus infection. *J Clin Virol* Oct 2016;83:61.

80. Aletti M, Lecoules S, Kanczuga V, Soler C, Maquart M, Simon F, et al. Transient Myocarditis Associated With Acute Zika Virus Infection. *Clin Infect Dis* Mar 2017;64(5):678.

81. Iloos S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect.* Jul 2014;44(7):302-7.

82. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). New CDC Laboratory Test for Zika Virus Authorized for Emergency Use by FDA: U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; 2016 [updated Feb 26 2016]. Available from: <https://www.cdc.gov/media/releases/2016/s0226-laboratory-test-for-zika-virus.html>.

83. Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *Euro Surveill* Abr 2016;21(16):30203.

84. Errata-“Reduced Incidence of Chikungunya Virus Infection in Communities with Ongoing Aedes Aegypti Mosquito Trap Intervention Studies — Salinas and Guayama, Puerto Rico, November 2015–February 2016,”. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* May 2016;65(18):484.

85. Pessôa R, Patriota JV, de Souza MdL, Abd El Wahed A, Sanabani SS. Detection of Zika virus in Brazilian patients during the first five days of infection – urine versus plasma. *Euro Surveill* Jul 2016;21(30):30302.

86. de Vasconcelos ZFM, Azevedo RC, Thompson N, Gomes L, Guida L, Moreira MEL. Challenges for molecular and serological ZIKV infection confirmation. *Child's Nervous System.* 2018;34:79-84.

87. OPS/OMS. Recursos de Zika: Definiciones de caso. Washington, D.C: Oficina Regional para las Américas de la Organización Mundial de la Salud; 2016. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11117:zika-resources-case-definitions&Itemid=41532&lang=es.

88. Robinson JL. Zika virus: What does a physician caring for children in Canada need to know? *Paediatrics & Child Health*. Mar 2017;22(1):48-55.
89. Zika Working Group. Canadian recommendations on the prevention and treatment of Zika virus: Update. *CCDR*. May 2016;42(5):101-11.
90. Sharp TM, Fischer M, Muñoz-Jordán JL, Paz-Bailey G, Staples JE, Gregory CJ, et al. Dengue and Zika Virus Diagnostic Testing for Patients with a Clinically Compatible Illness and Risk for Infection with Both Viruses. *MMWR Recomm Rep*. Jun 2019;68(1).
91. Committee opinion. Management of patients in the context of Zika virus. *Obstetrics Gynecology*. Sep 2019;174(3).
92. Interim Guidance for Zika Virus Testing of Urine — United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65.
93. Vasquez A, Sapiano M, Basavaraju S, Kuehnert M, Rivera-Garcia B. Survey of Blood Collection Centers and Implementation of Guidance for Prevention of Transfusion-Transmitted Zika Virus Infection--Puerto Rico, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. Abr 2016;65(14):375-8.
94. Staples JE, Dziuban EJ, Fischer M, Cragan JD, Rasmussen SA, Cannon MJ, et al. Interim Guidelines for the Evaluation and Testing of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection - United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. Ene 2016;65(3):63-7.
95. Rabe IB, Staples JE, Villanueva JM, Hummel K, Johnson JA, Rose L, et al. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* Jun 2016;65(21):543.
96. Infecção por vírus Zika. Lisboa-Portugal: Direção-Geral da Saúde 2016.
97. Pan American Health Organization. Zika virus (ZIKV) Surveillance in the Americas: Interim guidance for laboratory detection and diagnosis 2015. Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/18602>.
98. Pan American Health Organization. Preliminary guidelines for the surveillance of microcephaly in newborns in settings with risk of Zika virus circulation Washington, D.C.: Organización Mundial de la Salud. Oficina Regional para las Américas; 2016. Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/28229>.
99. Petersen EE, Polen K, Meaney-Delman D, Ellington SR, Oduyebo T, Cohn A. Update: Interim Guidance for Health Care Providers Caring for Women of Reproductive Age with Possible Zika Virus Exposure — United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* Abr 2016;65(12):315.
100. Oduyebo T, Igbinosa I, Petersen EE, Polen K, Pillai SK, Ailes EC, et al. Update: Interim Guidance for Health Care Providers Caring for Pregnant Women with Possible Zika Virus Exposure — United States, July 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. Jul 2016;65(29):739.
101. American College of Obstetricians and Gynecologists. FLASOG, ACOG, SOGC Statement Regarding Zika Virus. Washington, DC Mar 2016.
102. Fleming-Dutra KE, Nelson JM, Fischer M, Staples JE, Karwowski M, Mead P, et al. Update: Interim Guidelines for Health Care Providers Caring for Infants and Children with Possible Zika Virus Infection — United States, February 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* Feb 2016;65(7):182.
103. Kim, JJ., Lanthier, P.A., Clark, M.J. et al. Efficacy of an inactivated Zika vaccine against virus infection during pregnancy in mice and marmosets. *npj Vaccines* 7, 9 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00426-0>
104. Portal Miranda JA. El Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", antecedentes y desafíos en su 80 Aniversario. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2018;70(2).

105. Fraser B. IPK—Cuban—US collaboration targets arboviruses. *Lancet*. 2017;390:18.
106. Pan American Health Organization / World Health Organization. Zika - Epidemiological Report Cuba. December 2016 Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2016. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599:regional-zika-epidemiological-update-americas&Itemid=41691&lang=en.
107. L'Huillier A, Lombos E, Tang E, Perusini S, Eshaghi A, Nagra S, et al. Evaluation of Altona Diagnostics RealStar Zika Virus Reverse Transcription-PCR Test Kit for Zika Virus PCR Testing. *J Clin Microbiol*. Mar 2017;55:1576–84.
108. Ochoa Sangrador C. Aprender a entender e interpretar las pruebas diagnósticas. Herramientas y aplicaciones. In: AEPap, editor. *Curso de Actualización Pediatría Madrid: Lúa Ediciones 3.0*; 2015. p. 255-63.
109. Ochoa Sangrador C. Estudios sobre pruebas diagnósticas. In: AEPap, editor. *Curso de Actualización Pediatría 2006*; Madrid: Exlibris Ediciones; 2006. p. 43-55.
110. Bellmunt-Montoya S. Validación de pruebas diagnósticas. *ANGIOLOGÍA*. 2007;59(6): 433-8.
111. Schwartz A. Diagnostic Test Calculator 2002. Available from: <http://araw.mede.uic.edu/cgi-bin/testcalc.pl?DT=&Dt=&dT=&dt=&2x2=Compute>.
112. Altman DG. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hal; 1991.
113. St. George K, Sohi IS, Dufort EM, Dean AB, White JL, Limberger R, et al. Zika Virus Testing Considerations: Lessons Learned from the First 80 Real-Time Reverse Transcription-PCR-Positive Cases Diagnosed in New York State. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017;55:535-44.
114. Pessôa R, Patriota JV, de Souza MdL, Abd El Wahed A, Sanabani SS. Detection of Zika virus in Brazilian patients during the first five days of infection – urine *versus* plasma. *Eurosurveillance*. 2016;21.
115. Romer Y, Valadez-Gonzalez N, Contreras-Capetillo S, Manrique-Saide P, Vazquez-Prokopec G, Pavia-Ruz N. Zika Virus Infection in Pregnant Women, Yucatan, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. 2019;25:1452-60.
116. Tozetto-Mendoza TR, et al. Zika virus infection among symptomatic patients from two healthcare centers in Sao Paulo State, Brazil: prevalence, clinical characteristics, viral detection in body fluids and serodynamics. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2019;61:e19.
117. Weilg C, Troyes L, Villegas Z, Silva-Caso W, Mazulis F, Febres A, et al. Detection of Zika virus infection among asymptomatic pregnant women in the North of Peru. *BMC Research Notes*. 2018;11.
118. Pan American Health Organization/World Health Organization. Regional Zika Epidemiological Update (Americas) August 25, 2017 Washington, D.C2017 []. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599:regional-zika-epidemiological-update-americas&Itemid=41691&lang=en.
119. Balmaseda A, Zambrana JV, Collado D, García N, Saborío 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):e01785-17.
120. Vigilancia del virus Zika (ZIKV) en las Américas: Detección y diagnóstico por laboratorio. Washington D.C.: Pan American Health Organization/World Health Organization. p. 1-9.
121. Rousset D, Kazanji M, Zaruba M, Enfissi A, Ölschläger S. Diagnostic Validation of the RealStar® Zika Virus Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Kit for Detection of Zika Virus RNA in Urine and Serum Specimens. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017;97:1070-1.

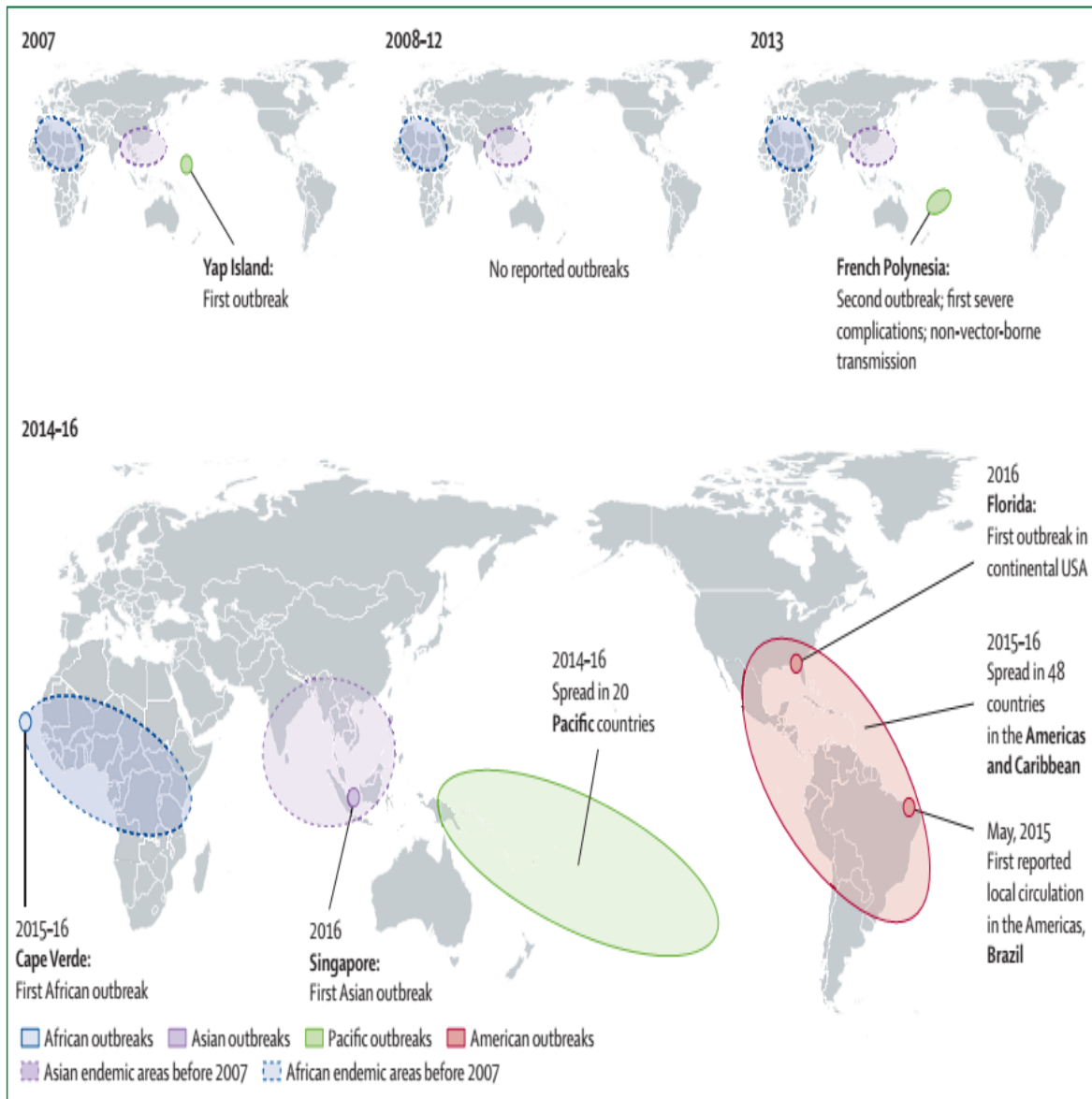
122. Fischer C, Pedroso C, Mendrone A, Bispo de Filippis AM, Vallinoto ACR, Ribeiro BM, et al. External Quality Assessment for Zika Virus Molecular Diagnostic Testing, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2018;24:888-92.
123. Fischer C, Drosten C, Drexler JF. The difficulties in obtaining reliable Zika virus diagnostics. *The Lancet*. Mar 2019;19:240.
124. Basile AJ, et al. Multi-laboratory comparison of three commercially available Zika IgM enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Virological Methods* 2018;260:26–33.
125. Waggoner JJ, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Ballesteros G, Davila MJV, Tellez Y, et al. Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22:1295-7.
126. Elias Colombo T, et al. Zika detection: comparison of methodologies. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018;49:144–7.
127. Maurice J. WHO meeting thrashes out R&D strategy against Zika. *The Lancet*. 2016;387:1147.
128. (Tomado de The New York Times). El zika no ha desaparecido: ¿por qué hoy la situación puede ser peligrosa? Habana: Cubadebate; 2019 [9 Sep 2019]. Available from: <http://www.cubadebate.cu/especiales/2019/07/05/el-zika-no-ha-desaparecido-esto-es-lo-que-los-expertos-saben/>.

ANEXOS

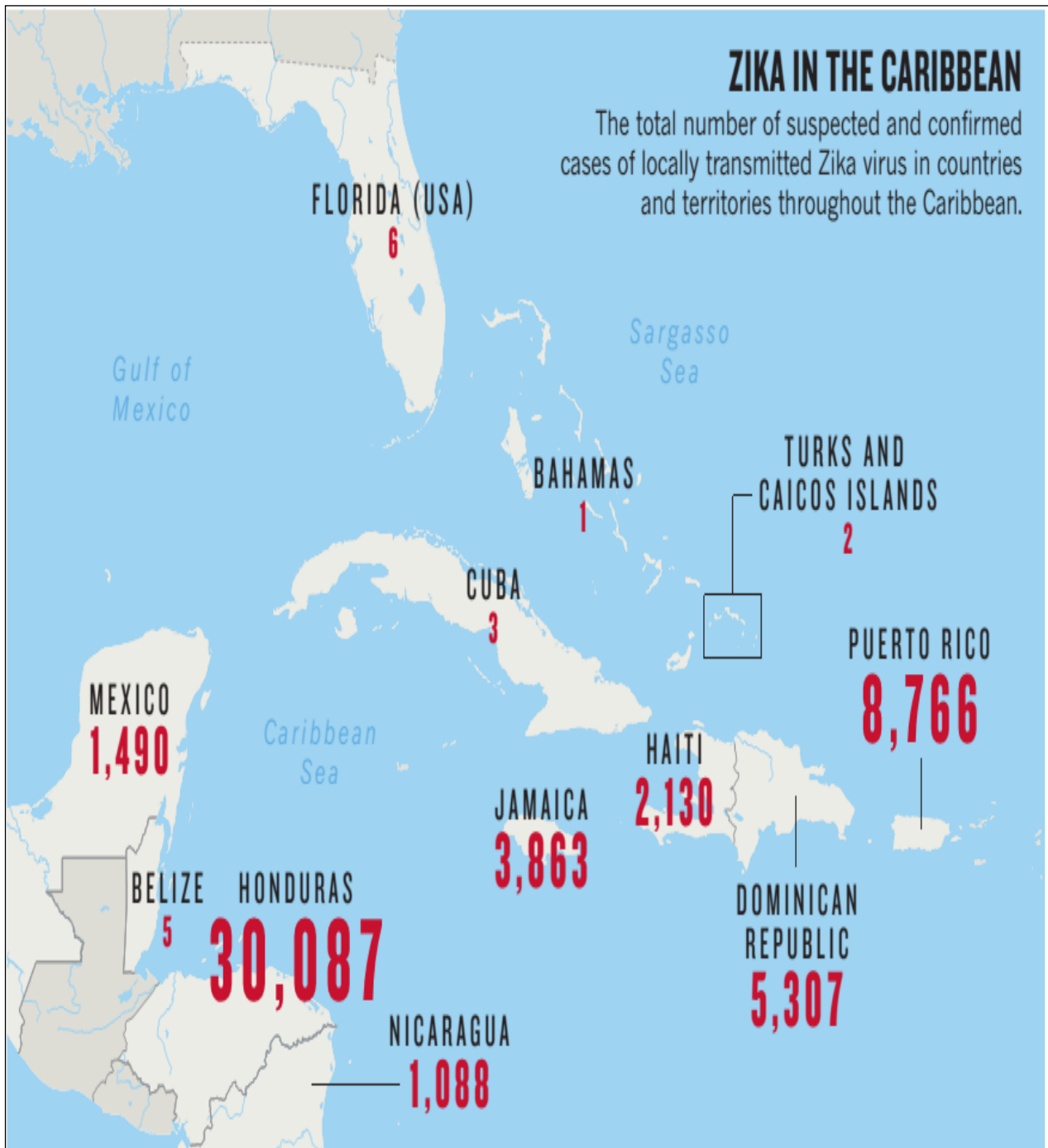
Anexo-1: Distribución estimada del virus Zika antes de 2007.⁵



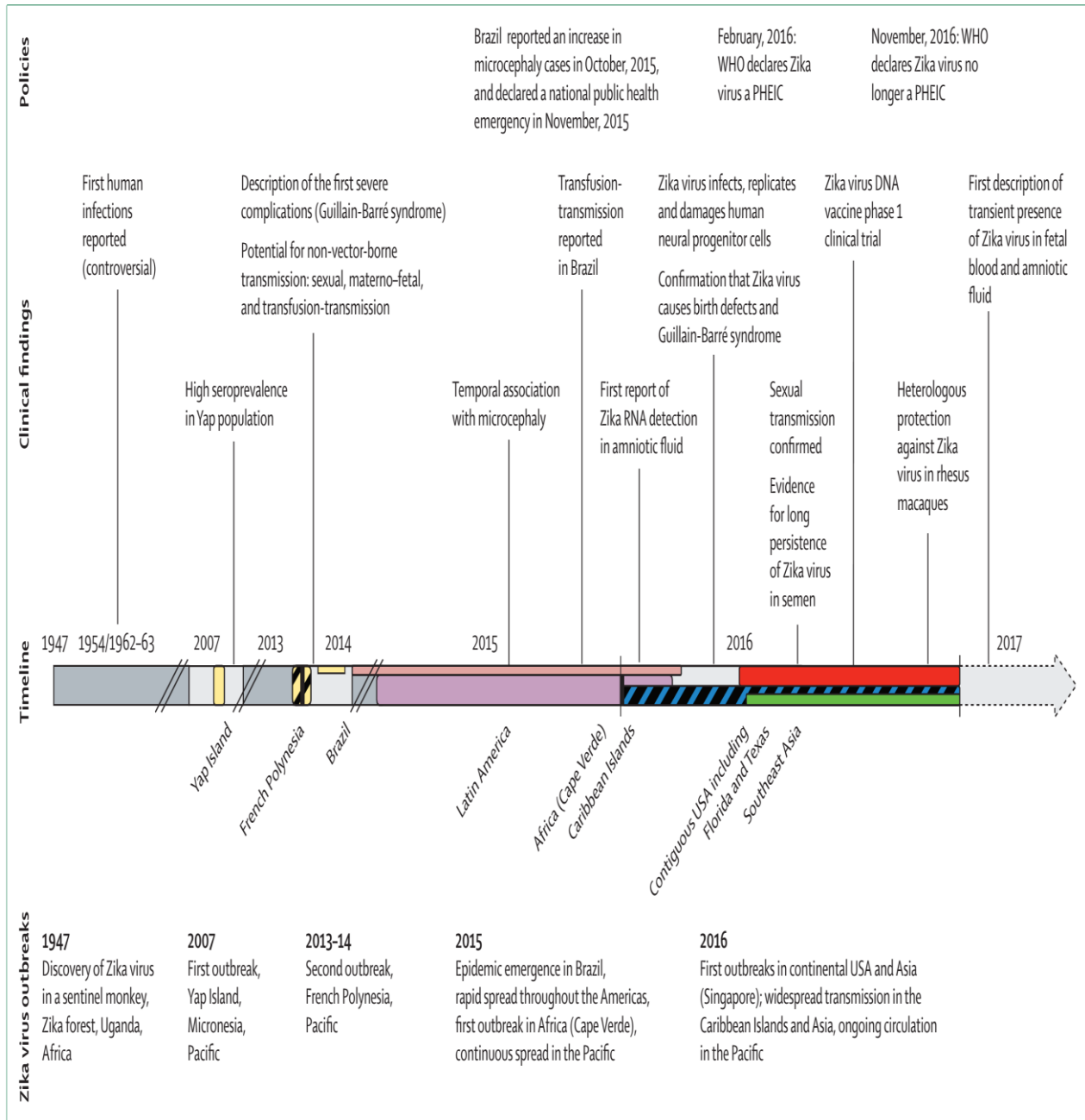
Anexo-2: Brotes de virus Zika 2007-2016.⁵⁵



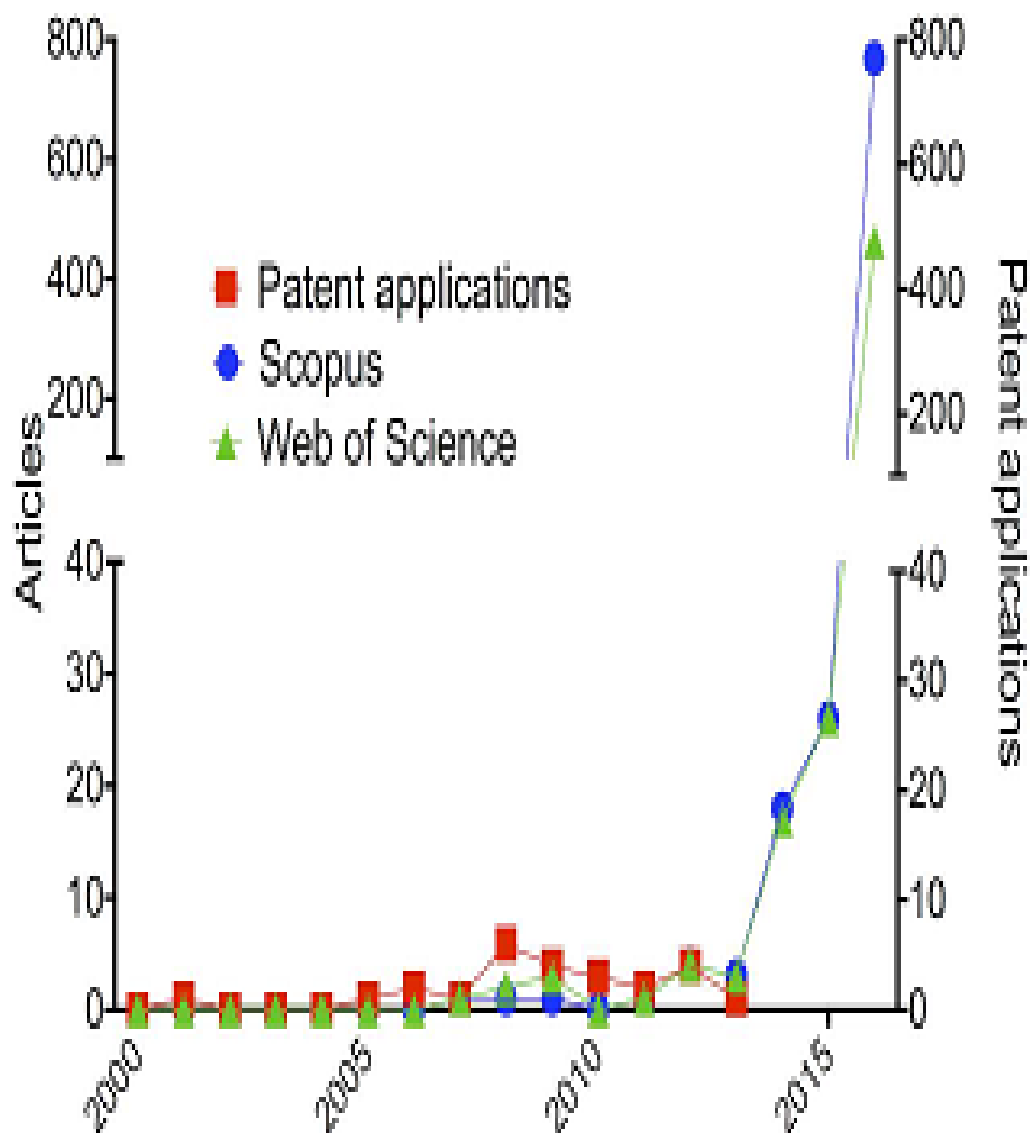
Anexo-3: Total de casos de Zika en el Caribe. Agosto 2016.¹⁸



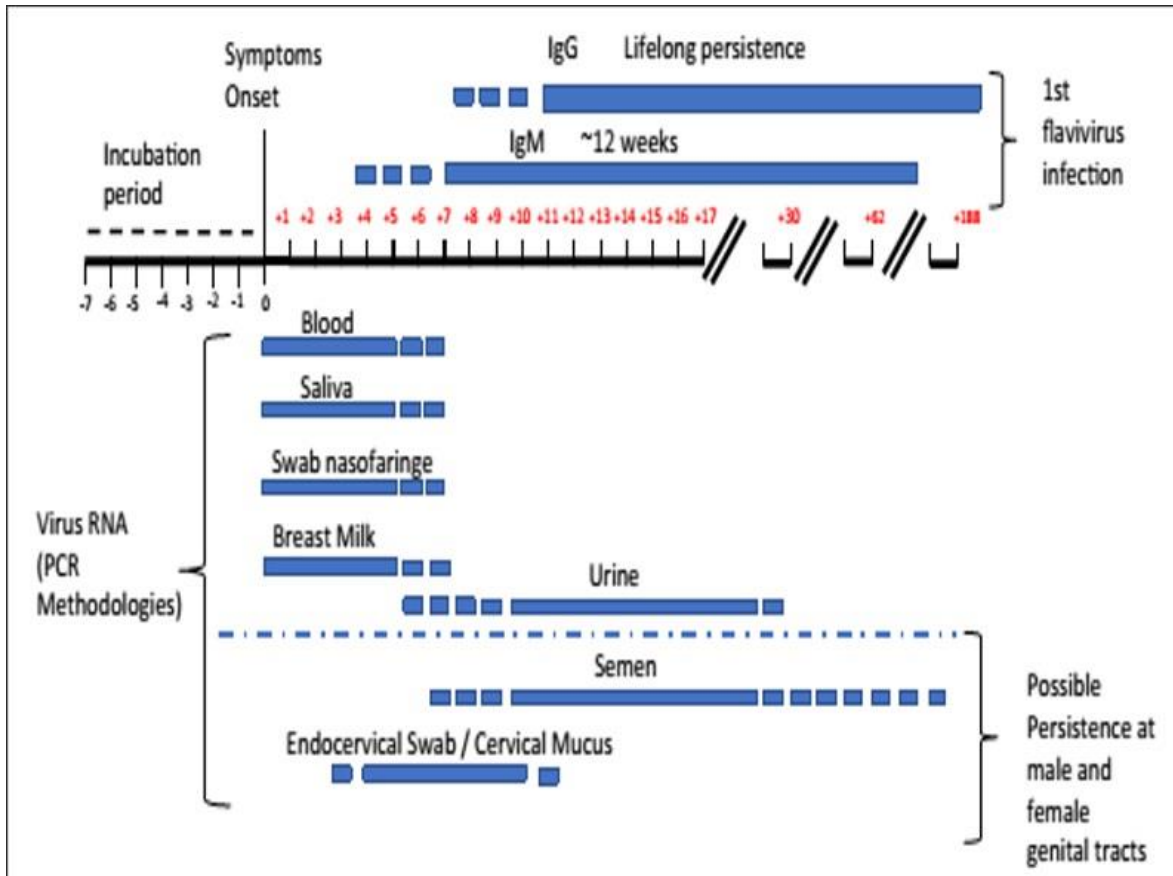
Anexo-4: Línea del tiempo del virus Zika.⁵⁵



Anexo-5: Artículos y patentes con la palabra clave “virus Zika”.2000-2015.



Anexo-6: Desarrollo de anticuerpos según el comienzo de los síntomas y período promedio de identificación de ARN viral en diferentes fluidos corporales.⁸⁶



Anexo-6: Muestras recomendadas, días tras inicio de síntomas y ensayos de laboratorio indicados para la detección del virus.

Muestra	Días tras inicio de síntomas	Cantidad	Medio de transporte	Condiciones de transporte	Conservación >1 semana	Ensayo de laboratorio
Suero	1 a 5	5-7 mL	Sin aditivos	4 / 8 °C	-20 / -70 °C	PCR
Suero	5 a 7	5-7 mL	Sin aditivos	4 / 8 °C	-20 / -70 °C	PCR, ELISA IgM
Suero	7 en adelante	0,5-1mL	Sin aditivos	4 / 8 °C*	-20 / -70 °C	ELISA IgM
Orina	5 a 15	5-7 mL	Sin aditivos	4 / 8 °C	-20 / -70 °C	PCR
LCR**		0,5 mL	Sin aditivos	4 / 8 °C	-20 / -70 °C	PCR, ELISA IgM
* La refrigeración de la orina resulta crítica para evitar sobrecrecimiento bacteriano						
** Bajo indicación médica para diagnóstico de enfermedad neurológica						

Muestra	Cantidad	Medio de transporte	Condiciones de transporte	Conservación >1 semana	Ensayo de laboratorio
Suero de la madre	5-7 mL	Sin aditivos	4 / 8 °C	-20 / -70 °C	PCR, ELISA IgM, PRNT, otros
Sangre de cordón	0,5-1mL	Sin aditivos	4 / 8 °C	-20 / -70 °C	PCR, ELISA IgM, PRNT, otros
Placenta	3 x 3 cm (aprox)	Formol tamponado	4 °C - Ta*	4 °C - Ta*	Inmunohistoquímica
Placenta	3 x 3 cm (aprox)	Solución salina	4 / 8 °C	-20 / -70 °C	PCR
Cordón umbilical (tejido)		Formol tamponado	4 °C - Ta*	4 °C - Ta*	Inmunohistoquímica
Cordón umbilical (tejido)		Solución salina estéril o tubo seco	4 / 8 °C	-20 / -70 °C	PCR
Suero recién nacido	0,5-1mL	Sin aditivos	4 / 8 °C	-20 / -70 °C	PCR, ELISA IgM, PRNT, otros
Líquido amniótico**	0,5-1mL	Sin aditivos	4 / 8 °C	-20 / -70 °C	PCR
LCR recién nacido**	0,5 mL	Sin aditivos	4 / 8 °C	-20 / -70 °C	PCR, ELISA IgM, PRNT, otros
Sangre total de la madre	5-7 mL	EDTA, otros	4 / 8 °C	4 °C	Bioquímica, otros
Sangre total recién nacido	2-5 mL	EDTA, otros	4 / 8 °C	4 °C	Bioquímica, otros
Tejido***	3 x 3 cm (aprox)	Formol tamponado	4 °C - Ta*	4 °C - Ta*	Inmunohistoquímica
Tejido***	3 x 3 cm (aprox)	Solución salina estéril o tubo seco	4 / 8 °C		PCR
*Temperatura ambiente					
** Bajo indicación médica por sospecha de síndrome neurológico					
***Casos fatales: Cerebro, hígado, riñón, producto de aborto, otros					