

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León

Facultad de Ciencias Médicas

Departamento de Microbiología y Parasitología

Carrera de Bioanálisis Clínico



Tesis para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico.

**Desarrollo de la técnica de Inmunofluorescencia para la detección de
antígeno del virus de Zika en semen.**

Autores: Br. Luis Hernán Vanegas Solís.

Br. Jinnett Toruño Morales

Tutor: Dr. Filemón Bucardo Rivera.
Profesor Titular de Microbiología.
PhD Virología

Co-Tutor: MSc. Fredman González.
Profesor Adjunto de Microbiología y Parasitología
Máster en Microbiología Médica

León, Marzo del 2018.

¡A la libertad por la universidad!



DEDICATORIA

A Dios, porque sin su infinito amor todo esto no sería posible.

A nuestros padres, por brindarnos su amor, trabajo, apoyo, comprensión y educación durante toda nuestra formación.

A nuestros profesores, quienes compartieron sus conocimientos con nosotros.



AGRADECIMIENTO

A Dios, por tu amor y bondad, que nos llena de sabiduría para alcanzar nuestras metas. Gracias por estar presente no solo en esta etapa tan importante de nuestras vidas, sino en todo momento ofreciéndonos lo mejor.

A nuestros padres, por ser quienes día a día nos impulsan a luchar por nuestros sueños, por ser guías en nuestros caminos y ser nuestros mejores amigos. Ustedes son el mejor regalo que hemos recibido.

A nuestro tutor Dr. Filemón Bucardo Rivera, quien ha sido el motor de esta investigación, gracias por el conocimiento científico brindado, por su paciencia, tiempo y dedicación para que este proyecto finalizará de manera exitosa; además de proporcionarnos los materiales, equipos y reactivos necesarios para el desarrollo de la técnica.

A nuestro co-tutor MSc. Fredman González, por sus observaciones y asesoría en el estudio.

Al equipo de virología; MSc. Yaoska Reyes, MSc. Marlen Morales y Lic Omar Zepeda quienes de una u otra forma contribuyeron a la culminación de este estudio, en especial al Lic. Edwin C. Cuadra, por su paciencia, ayuda y explicaciones.

A la Lic. Jayrintzina Palacios, quien nos enseñó a realizar espermogramas.

Al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la UNAN-León, por permitirnos la utilización del área de investigación.

Gracias a los Doctores: Natalie Bowman, Matthew Collins, Aravinda de Silva y Helen Lazear de la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, quienes nos apoyaron con fondos para la realización de este estudio.

A los Doctores: Marie Hagbom y Lennart Svensson de la Universidad de Linköpings de Suecia, por el asesoramiento en el desarrollo del método.



RESUMEN

Desarrollo de la técnica de Inmunofluorescencia para la detección de antígeno del virus de Zika en semen.

Luis Hernán Vanegas Solís Br, Jinnett Toruño Morales Br, Fredman González MSc, Filemón Bucardo PhD

Carrera de Bioanálisis Clínico, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-León.

La principal forma de transmisión del Zika es mediante la picadura de mosquitos, pero la transmisión materno-fetal y sexual también se ha demostrado mediante la detección del ARN viral y partículas potencialmente infecciosas en semen. El diagnóstico confirmatorio de la infección se basa únicamente en la detección del ARN viral mediante RT-PCR. El objetivo de este estudio fue optimizar una técnica de inmunofluorescencia para la detección de antígeno del virus de Zika en semen. Este estudio involucro, la optimización de los siguientes parámetros técnicos de la Inmunofluorescencia: 1) Conservación de la muestra (tiempo, temperatura y tipo de solución buffer). 2) Celularidad (recuento de células por campo). 3) Solución de fijación de la muestra (acetona, metanol o para-formaldehído al 4%). 4) Titulación del anticuerpo anti-Flavivirus (4G2) y el anticuerpo conjugado (Alexa 488 mouse). 5) Titulación de la solución de contraste (azul de Evans). 6) Tiempos de lavado (1, 2 o 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X); y los parámetros de calidad mediante un panel a ciegas de 32 muestra semen y para obtener los cálculos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razón de verosimilitud de la técnica se comparó con los resultados de RT-PCR como Gold Estándar. Los resultados indican que la conservación ideal del semen es a temperaturas de -20°C y -80°C en todas las soluciones y a 4°C en las soluciones de formalina al 37% y paraformaldehído al 4% ya que en ellas los espermatozoides permanecen permeables y se conserva su estructura. La celularidad óptima por campo (objetivo de 100X) se obtiene diluyendo la muestra 1:2 con PBS 1X para obtener un promedio de 94 ± 10 espermatozoides en un campo de 100X. La fijación ideal es paraformaldehído al 4% por 5 minutos a una temperatura de 4°C . La titulación para ambos anticuerpos es 1/200 y 30 minutos de incubación en cámara humedad a una temperatura de 37°C . Se utilizó como



tinción de contraste azul de Evans a una concentración de 0.312gr/ml por 3 minutos a temperatura ambiente y 3 lavadas por 5 minutos con PBS 1X en una cubeta coplin. Una vez optimizados todos los parámetros técnicos se procedió a realizar el panel a ciego donde se analizaron 32 muestra de semen obteniendo 9 (28.1%) muestras positivas por inmunofluorescencia, 11 (34.4%) muestra positivas por RT-PCR y 5 (15.6%) muestras positivas por ambos métodos. El promedio de células espermáticas infectadas por el virus del Zika fue de 1.26% con una Desviación Estándar de 4.51. La excreción de partículas virales en dos pacientes fue detectada hasta el día 28 después de iniciados los síntomas. La Sensibilidad de la prueba es de 62.5% y la Especificidad 83.3%. La Razón de Verosimilitud Positiva es de 3.74 y La Razón de Verosimilitud Negativa es de 0.45. El Valor Predictivo Positivo es de 55.5%, El Valor Predictivo Negativo es de 86.95% y el Valor Predictivo Global es de 78.12%. En conclusión hemos logrado optimizar todos los parámetros técnicos para identificar antígenos del virus del Zika en células espermáticas mediante inmunofluorescencia. Esta técnica es una alternativa a los métodos moleculares y serológicos utilizados en la investigación de la infertilidad por el virus del Zika.



Lista de abreviaturas

Abreviaturas	Significado
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
DENV	Virus del Dengue
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción ligada a enzima
IFD	Inmunofluorescencia Directa
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
Log	Logaritmo
MINSA	Ministerio de Salud
ml	Mililitro
Nm	Nanómetro
NP	Motilidad no progresiva
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PR	Motilidad progresiva
Rpm	Revoluciones por minuto
RS	Royal Society
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa
SD	Desviación estándar
UVI	Luz ultravioleta invisible
WNV	Virus del Nilo Occidental
YFV	Virus de la fiebre amarilla
ZIKV	Virus del Zika



Índice

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACIÓN	6
PROBLEMA	7
OBJETIVOS	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
MARCO TEÓRICO	9
El virus del Zika	9
Historia y Epidemiología	9
Taxonomía y estructura.....	9
Replicación.....	11
Transmisión	12
El semen	12
El espermatograma	16
El inmunoensayo	19
La técnica de Inmunofluorescencia	19
La Fluoresceína	20
Historia de la Inmunofluorescencia	20
Aplicación de la Inmunofluorescencia.....	20
Tipos de Inmunofluorescencia	21
MATERIAL Y MÉTODO	23
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXOS	60



INTRODUCCIÓN

El virus del *Zika* (ZIKV), es un virus de Ácido ribonucleico (ARN) de cadena positiva que pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus*, posee un genoma de aproximadamente 11 kilo bases, tiene forma esférica y mide de 40 – 60 nanómetros (nm) de diámetros. ^(1,2) Éste fue aislado por primera vez en 1947 en los monos Rhesus que viven en el bosque Zika en Uganda. ⁽³⁾ La infección por el ZIKV se transmite por la picadura de mosquitos infectados, pero existe evidencia de transmisión no vectorial, tales como: por transfusiones sanguíneas, sexual y materno / fetal. ^(4, 5, 6)

Debido a la posibilidad de transmisión sexual del ZIKV, se han realizado esfuerzos para demostrar tanto, la presencia de ARN viral en semen como partículas virales en los espermatozoides, la evidencia científica en infecciones naturales todavía es limitada. Estudios de ARN viral en semen indican latencia hasta 3 meses después de haber iniciado los síntomas, sin embargo el aislamiento viral a partir de muestras de semen es todavía un desafío. ⁽⁷⁾ Un único estudio reporta la presencia de partículas virales en espermatozoides en ratones de laboratorio, en donde encontraron que el ZIKV puede inducir inflamación en los testículos y el epidídimo, inducir un daño testicular y después de 60 días llegar a una atrofia testicular y después de cierto tiempo puede llegar a la misma funcionalidad. ⁽⁸⁾

El diagnóstico confirmatorio de la infección por el ZIKV, se basa principalmente en la detección del ARN del virus en sangre, suero, orina, saliva, semen y secreciones vaginales, mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) ⁽⁹⁾. Dadas las limitaciones del PCR al evaluar muestras complejas como el semen, es necesario la introducción de técnicas de bajo costo y fácil realización, que permitan confirmar la persistencia de la infección.



Las pruebas serológicas, pueden detectar anticuerpos de fase aguda como la IgM anti-Zika y en la fase convaleciente anticuerpos IgG anti-ZIKV, pero presenta alta reactividad cruzada en pacientes infectados con Dengue. Nicaragua es un país endémico en Dengue y siendo la enfermedad del ZIKA similar al Dengue, el uso de pruebas serológicas como el ELISA tendría grandes limitaciones como herramienta de diagnóstico ⁽⁹⁾. La mejor alternativa de las pruebas serológicas, es la detección de anticuerpos neutralizantes, pero esta prueba tiene limitaciones; como alto costo, tiempo prolongado, equipamiento especializado (cultivo celular) y personal calificado.

En este estudio pretendemos desarrollar la técnica de Inmunofluorescencia para la detección de antígenos del ZIKV en muestras de semen, dicha prueba surge como posible método de diagnóstico y herramienta de investigación, que permitiría evaluar la infección dentro de la célula.



ANTECEDENTES

La fiebre del Zika era desconocida en América, sin embargo desde 1954 hasta el año 2006 solo se habían reportados pocos casos de infección en humanos en el continente africano y asiático, en el año 2007 se estimó una epidemia en Yap, Estados Federados de Micronesia en la región del pacífico, donde < 70% de población había sido infectada al encontrarse anticuerpos contra el ZIKV en los habitantes. ⁽¹⁰⁾

En los años 2013-2014 se detectó por primera vez partículas replicativas del ZIKV en muestra de semen durante el brote en la Polinesia Francesa. En este tiempo, las autoridades sanitarias empezaron a advertir sobre la posibilidad de transmisión sexual del virus. ⁽¹¹⁾

Un estudio realizado por Barry Atkinson y cols, en el año 2016 en Reino Unido, donde evaluaron 23 muestras de semen, se logró detectar altos niveles de ARN del ZIKV en 13 muestras (56.5%), no fue detectado en 9 muestras (39.1%) y fue indeterminado en 1 muestra (4.4%), después de la infección sintomática en una proporción de hombres fueron detectadas altas copias de ARN durante la etapa de convalecencia, sugiriendo alto riesgo para la transmisión sexual. ⁽⁷⁾

Un estudio publicado por Musso D y cols, en el año 2015 realizado en la Polinesia Francesa analizaron un total de 1,067 muestras entre sangre y saliva, el número total de muestras positivas para ZIKV por RT-PCR fue 210 de 748 (28.1%) en sangre y 182 de 319 (57.1%) en saliva. El ARN ZIKV se detectó más frecuentemente en la saliva que en las muestras de sangre. ⁽¹²⁾



Nicastri E y cols en Enero del año 2016, estudiaron a un hombre con historia clínica de fiebre, astenia y erupción eritematosa durante su estancia en Haití. A su regreso a Italia se detectó en su orina y saliva ARN del ZIKV 91 días después de haber iniciado los síntomas, y en su semen 188 días que equivalen a 6 meses después de la aparición de los síntomas.⁽¹³⁾

Mansuy j y cols publicaron de un paciente con 32 años de edad, quien regresando de Guyana Francesa, el hombre presentó algunos síntomas como: fiebre moderada, erupción maculopapular, mialgia y artralgia, y fue diagnosticado con Zika al detectarse ARN del virus en plasma y orina 2 días después del inicio de los síntomas. Luego se le recolectaron 11 muestras de semen prospectivamente durante 141 días, siendo la carga viral de la primera muestra de 8,6 logaritmos (log) de copias por mililitro (ml) y en la última de 3,5 log de copias por ml.⁽¹⁴⁾ También se investigaron cinco hombres que presentaron la enfermedad de Zika, se evaluaron sus muestras de semen; en dos pacientes el ARN se detectó 69 días y 115 días después del inicio de los síntomas, pero en los otros tres no se detectó en el día 20. Esto datos sugieren que la duración de la excreción del virus varía dependiendo de las características del virus y del huésped.⁽¹⁴⁾

El mismo estudio realizó la técnica de inmunohistoquímica en muestra de semen para la detección del ZIKV, teniendo como resultado la visualización del virus en la cabeza de los espermatozoides. La proporción de espermatozoides infectados se estimó en 3.52% con una Desviación Estándar (SD) de 0.71. Se utilizó microscopia confocal permitiendo la demostración del antígeno dentro de los espermatozoides.⁽¹⁴⁾

Joguet G y cols el 21 de Agosto del 2017, a través de un estudio observacional prospectivo que recluto 15 hombres con infección aguda de Zika con una edad media de 35 años, en un brote entre Abril y Noviembre del año 2016 en la Isla Guadalupe. Se recolectaron muestras de sangre, orina y semen a los 7, 11, 20, 30, 60, 90 y 120 días, además se les realizó espermatograma y concentración de hormonas reproductivas como: testosterona, hormona



folículo estimulante y luteinizante. El ARN del virus fue detectado por RT-PCR y se encontraron partículas replicativas de este. ⁽¹⁵⁾

En los pacientes el recuento total de espermatozoides disminuyó de la mediana de 119×10^6 espermatozoides al día 7 a 45×10^6 el día 30 y se recuperó el recuento total de espermatozoides a los 120 días después de la infección. Se encontró ARN del virus en 3 de 14 pacientes al día 7, cuatro de los 15 al día 11 y 20. ⁽¹⁵⁾

En Nicaragua no se han encontrado estudios, que apliquen la técnica de Inmunofluorescencia para la detección de antígenos del ZIKV, la confirmación del virus se ha estado realizando en RT-PCR en las distintas muestras biológicas. La Inmunofluorescencia en nuestro país se utiliza en el diagnóstico de virus respiratorios y DENV.



JUSTIFICACIÓN

La infección por el ZIKV representa un desafío para la salud pública de los países tropicales, debido a la similitud con otras arbovirosis como Dengue y las complicaciones neurológicas que este puede causar; además del reto en el diagnóstico clínico debido a las reacciones serológicas cruzadas con otros Flavivirus. El cultivo viral no se realiza rutinariamente y el diagnóstico de la fase aguda depende de técnicas de biología molecular que tiene un alto costo.

Con este estudio pretendemos desarrollar una técnica de Inmunofluorescencia que permita observar el antígeno viral en el espermatozoide, dado que la persistencia viral se ha detectado en el semen hasta 3 meses después de haber presentado la enfermedad.

El conocimiento generado ayudará a obtener información de cómo se puede realizar la técnica de Inmunofluorescencia en muestras de semen, siendo útil en el diagnóstico de la infección aguda y latente del virus, con la finalidad de que esta técnica sirva para screening y herramienta de investigación.



PROBLEMA

¿Cuáles son los parámetros técnicos óptimos y los parámetros de calidad, de un ensayo de Inmunofluorescencia para detectar antígenos de Zika en semen?



OBJETIVOS

Objetivo general

- ✓ Desarrollar la técnica de Inmunofluorescencia para la detección de antígeno del virus de Zika en semen.

Objetivos específicos

- ✓ Optimizar los parámetros técnicos intra-laboratorio de un ensayo de Inmunofluorescencia (conservación de las muestras, fijación, titulación de anticuerpos, titulación de la tinción de contraste y tiempos de lavados) que permitan la identificación de antígenos de Zika en muestras de semen.
- ✓ Determinar los parámetros de calidad (sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud y valores predictivos) de la prueba de Inmunofluorescencia en comparación con el RT-PCR en tiempo real.



MARCO TEÓRICO

El virus del Zika

Es el *Arbovirus* más reciente que circula en nuestro país y ha sido una de las principales causas de preocupación del Ministerio de Salud (MINSA) por su rápida transmisión explosiva y complicaciones clínicas, en particular, las complicaciones neurológicas durante la etapa fetal y el potencial de transmisión sexual.

Historia y Epidemiología

Desde 1954 se han registrado casos esporádicos de infección en los continentes de África y Asia. ⁽¹⁶⁾ la primera gran epidemia fue reportada en la Isla de Yap, en el año 2007 en esta se estimó que el 73% de la población estuvo expuesta al virus y desarrollaron erupción cutánea, conjuntivitis y artralgia. ⁽¹⁷⁾ A finales del año 2013, la misma cepa se había diseminado a las islas de la Polinesia Francesa, infectando al 11% de la población y llegando a la Isla Este, ubicada a 3.700 km de la costa de Chile. ^(18, 19)

En Brasil, se detectó el virus en marzo del 2015 en muestras de sangre de pacientes con síntomas similares al DENV. Esto confirmó que el virus se había propagado de Bahía a Natal, Río Grande del Norte. ⁽²⁰⁾ Brasil fue el primer país en reportar muertes confirmadas por laboratorio causadas por el ZIKV. ⁽²¹⁾ La infección se ha convertido en una enfermedad infecciosa emergente, con transmisión detectada en más de 30 países. ⁽²²⁾

Taxonomía y estructura

El ZIKV ha sido clasificado como miembro de la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. La mayoría de los virus de esta familia se transmiten por picaduras de mosquitos, causando infecciones leves o graves como: encefalitis, mielitis y hemorragias reportadas en los virus de la Fiebre Amarilla (YFV), DENV y Nilo Occidental (WNV). ^(23, 24)

La partícula viral tiene la misma estructura general que otras especies de *Flavivirus*. Es esférico que mide de 40 – 60 nm de diámetro. ^(1, 2) Su envoltura está formada por una bicapa lipídica en 180 unidades de glicoproteínas E y M para la unión a una variedad de receptores celulares. La glicoproteína E tiene una estructura típica de tres dominios. ⁽²⁵⁾ En las cepas del ZIKV de África, se ha observado pérdida de los sitios de glicosilación, estos se ha relacionado en infecciones que no causan daños neurológicos, mientras que en cepas asiáticas que tiene glicosilación causan síndrome de Guillain – Barré y microcefalia. ⁽²⁶⁾

La nucleocápside está formada por la proteína C asociada con una molécula de ARN viral de cadena sencilla en sentido positivo, la cual codifica tres proteínas estructurales (premembrana: prM, envoltura: E y core: C) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). La proteína prM es el precursor en el citoplasma de la proteína M en el virus. Luego se encuentra la proteína de envoltura E, que permite la unión del virión con los receptores de la membrana de la célula huésped. Las proteínas no estructurales son responsables de la infección del virus. La proteína NS1, NS3, NS5 forman un complejo proteico NS1-NS3-NS5 que está implicado en el proceso de replicación del virus. ⁽²⁷⁾



Fig. 1 Organización de las proteínas del ZIKV. ⁽²⁷⁾

La figura muestra las tres proteínas estructurales del ZIKV: premembrana (prM), envoltura (E) y core (C) y las siete proteínas no estructurales NS1-NS5.



La proteína NS3 desempeña un papel esencial en el procesamiento de polipéptidos virales y la replicación genómica, con un dominio de proteasa en su extremo N-terminal y un dominio de helicasa en el extremo C-terminal. Tras la unión del ARN, el dominio helicasa exhibe actividad nucleósido trifosfatasa intrínseca, que proporciona la energía química para desenrollar el ARN viral. ⁽²⁷⁾

Replicación

Los virus de ARN de cadena positiva, cuyos viriones contienen ARN monocatenario de sentido ARNm, representan la mayor clase genética de virus, incluyendo muchos patógenos humanos, animales y vegetales. Estos virus completan todo su ciclo de replicación en el citoplasma de la célula huésped. ⁽²⁸⁾

Para generar sitios para su replicación de ARN genómico, estos virus se expanden y reordenan las membranas celulares del huésped. Se cree que tales sitios de replicación de ARN asociados a membrana, concentran factores esenciales tanto virales y del huésped y además organizan etapas sucesivas para una síntesis eficaz del ARN viral. ⁽²⁸⁾

Una vez unido el virión a los receptores de membrana de las células huésped, hay una fusión de ambas membranas y el genoma del virus se libera en el citoplasma de la célula, se traduce una poli proteína precursora de gran tamaño que es producida por ARNm, está es desdoblada para formar proteínas estructurales y no estructurales. En el retículo endoplásmico hay como resultado un genoma de ARN de doble cadena. El ARN bicatenario se transcribe lo que resulta en genomas adicionales de ARN de cadena simple, después se produce el ensamblaje en las vesículas intracelulares y los nuevos viriones se transportan al aparato de Golgi para ser excretados en el espacio intracelular. ⁽²⁹⁾



Transmisión

Se ha asumido en el pasado que el virus era transmitido únicamente por picaduras de mosquitos del género *Aedes*. Esta noción fue cuestionada con otros modos de transmisión que fueron identificados. Muchas de las especies del género *Aedes* pueden propagar el virus en diferentes regiones geográficas en entornos rurales y urbanos; sin embargo, su potencial como vector transmisor es del 20-50% y las hembras portan partículas virales en la saliva. (26)

La saliva y la orina se aceptan ahora como vehículos para la transmisión del ZIKV, ya que las partículas virales fueron aisladas en estas muestras. El virus se cultivó en células Vero, induciendo la citopatía típica y el aumento de la posibilidad de transmisión de un paciente infectado a un huésped no inmune. (30) También puede transmitirse sexualmente, la evidencia inicial provino de un paciente que presentaba hematoespermia y su esposa que no había dejado su lugar, presento artralgia, exantema y úlceras oral. (31)

Recientemente, se encontró ARN del ZIKV en la leche materna de tres madres con infección y dos de los recién nacidos fueron diagnosticados con infección por ZIKV. Aunque la transmisión perinatal es posible en estos casos, el papel de la lactancia materna no estaba clara. (32)

El semen

Es una mezcla de espermatozoides suspendidos en las secreciones del testículo y el epidídimo que en el momento de la eyaculación, se combinan con secreciones de la próstata, vesícula seminal y glándulas. La composición final es un fluido viscoso que comprende el eyaculado. (33)

Descubrimiento de los espermatozoides

En 1676, la Royal Society (RS) recibió una carta de Antonie van Leeuwenhoek, en la que el microscopista había descrito sus descubrimientos más relevantes: como es la observación de pequeñas partículas vivas, siendo el primero en observar células espermáticas. ⁽³⁴⁾

La célula germinal masculina se produce en la gónada (testículo) mediante un proceso de permanente división de las células germinales. El proceso de división meiótica denominado espermatogénesis está controlado hormonalmente por el eje hipófisis- hipotálamo-gónada. A partir de cada espermatogonia se producen cuatro espermatoцитos haploides que permanecen unidos entre sí por puentes citoplasmáticos y a la vez están en comunicación con la célula de Sertoli. ⁽³⁵⁾

Estructura del espermatozoide

El espermatozoide maduro es una célula altamente diferenciada. Está formado por cabeza que contiene el núcleo y aporta la información genética, la pieza intermedia que contiene las mitocondrias y fuente de energía y por último consta de un flagelo que proporciona la movilidad necesaria para el traslado al lugar de fecundación y asegura la adecuada orientación de la cabeza para penetrar las cubiertas del ovocito. ⁽³⁶⁾

- ✓ Cabeza: Es de forma oval al observarla frontalmente, y piriforme cuando la observación es lateral, siendo más gruesa en la base y adelgazando hacia la punta. Su tamaño aproximado oscila entre 3,7 y 4,7 micras de longitud y 2,5 a 3,2 micras de anchura. En la cabeza del espermatozoide se sitúan el núcleo y el acrosoma, recubiertos ambos por la membrana plasmática. ⁽³⁶⁾
 - El núcleo ocupa la mayor parte de la cabeza está formado por una masa de ADN haploide que se fusionará con el núcleo del ovocito en el momento de la fecundación. Su cromatina se ha condensado intensamente a fin de

disminuir el volumen de la cabeza, lo que facilita la movilidad del espermatozoide a través de los diferentes fluidos y estructuras que debe atravesar. Además, protege al genoma de daños durante el trayecto. El núcleo está delimitado por una membrana doble, la membrana nuclear.

- El acrosoma es una estructura membranosa, situada entre el núcleo y la membrana plasmática, adopta la forma de capuchón. Está envuelto por la membrana acrosómica: El acrosoma se forma a partir del aparato de Golgi y contiene una gran concentración de hidratos de carbono y enzimas lisosómicas como la hialuronidasa. Hay también una enzima proteolítica llamada acrosina. El papel de estas enzimas en la fecundación es el facilitar el reconocimiento y penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito. ⁽³⁶⁾

- ✓ Cuello: es la unión entre la cabeza y el flagelo y es una zona compleja y de gran importancia, que soporta algunas estructuras esenciales: La pieza conectiva que tiene un denso capitel y la placa basal, adaptada en su forma a la fosa de implantación. A partir del capitel se extienden hacia atrás 9 densas columnas segmentadas que forman una especie de embudo, y se continúan en sus extremos con las nueve fibras externas densas del flagelo. ⁽³⁶⁾

- ✓ Flagelo: El flagelo es una larga estructura filiforme de aproximadamente 50 μm de longitud. Está recubierto por una vaina fibrosa en su primera fracción y luego solo por la membrana flagelar. Se considera que el axonema es el componente motor y que las fibras densas externas son estructuras que dan firmeza al flagelo. El flagelo se diferencia en tres regiones:
 - La pieza intermedia: mide de 5 a 7 μm . El axonema está en esta región rodeado por las fibras densas. Se caracteriza por una vaina de mitocondrias

orientadas circularmente y dispuestas extremo con extremo para formar una espiral cerrada. Las mitocondrias producen la energía necesaria para el movimiento en forma de ATP.

- La pieza principal: mide unas 45 μm de longitud. El axonema conserva el mismo aspecto en todo el trayecto, pero las fibras densas se modifican, disminuyendo progresivamente de diámetro y desapareciendo en un orden bien establecido. ⁽³⁶⁾

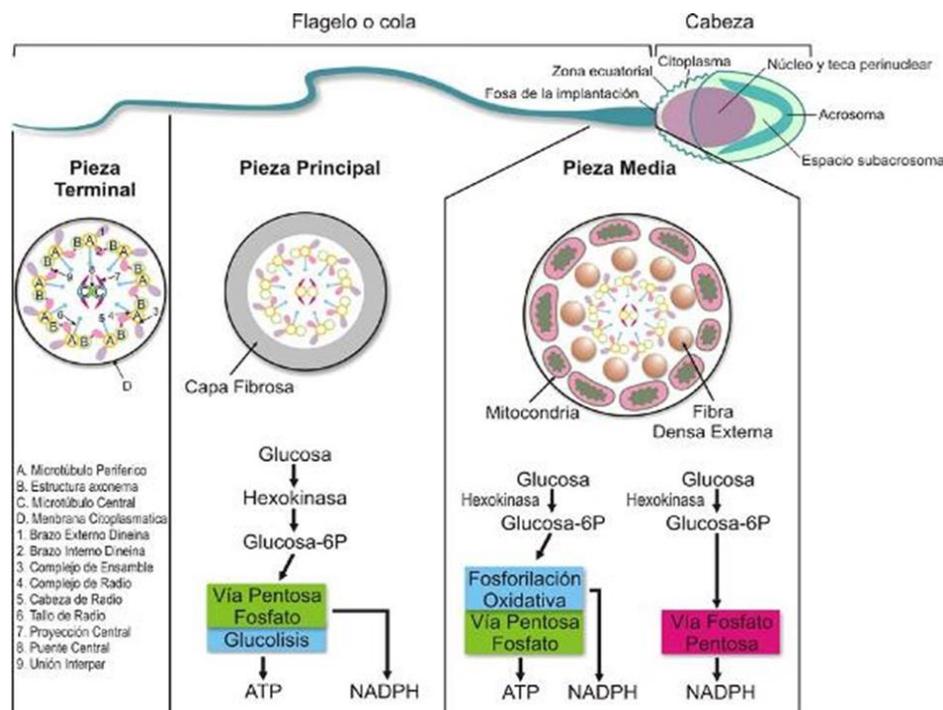


Fig. 2 Estructura del espermatozoide: la imagen muestra las diferentes partes en que se divide el espermatozoide y la actividad enzimática que permite la fuente de energía, estabilidad y movimiento del espermatozoide. ⁽³⁶⁾

El semen posee proteínas como la albúmina que proceden de la próstata y aminoácidos que descienden de las vesículas seminales. Un eyaculado 2 – 6 ml contiene aproximadamente 500 mg de proteínas en promedio. Las proteínas de la membrana de los espermatozoides como la fertilina α y β y las cirtestinas son importante para la hemostasia, inmuno-regulación y la interacción de los espermias con el ovocito. ⁽³⁵⁾

El espermatoograma

Es la herramienta estándar para valorar la infertilidad masculina a través de la calidad del líquido seminal, este examen estudia las características físicas y químicas del semen. Las muestras son catalogadas dentro de la normalidad o fuera de esta de acuerdo a los rangos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). ⁽³⁷⁾

Recolección de la muestra

La muestra debe ser recogida en una sala privada cerca del laboratorio, esta se debe de limitar a la exposición del semen a las fluctuaciones de la temperatura y se debe de controlar el tiempo transcurrido entre la recogida y el análisis.

- 1) La muestra debe de ser por masturbación y sin uso de preservativo.
- 2) El paciente debe de tener un mínimo de 2 días y un máximo de 7 días de abstinencia sexual.
- 3) La muestra debe de ser recogida en un frasco de boca ancha y estéril.
- 4) Abstinencia de bebidas alcohólicas en un período no menor de 10 días. ⁽³⁸⁾

Examen macroscópico inicial

El examen del semen debe comenzar con una simple inspección poco después de la licuefacción, preferiblemente a los 30 minutos, pero no más de 1 hora después de la eyaculación para prevenir deshidratación o cambios en la temperatura que afectan la calidad del semen. ⁽³⁹⁾

- **Licuefacción:**

Inmediatamente después de la eyaculación en el vaso colector, el semen suele ser semisólido. Dentro de unos minutos a temperatura ambiente, el semen generalmente comienza a licuarse (se vuelve más delgado), momento en el cual una mezcla heterogénea de grumos se verá en el líquido. A medida que la licuación continúa, el semen se convierte más homogéneo y bastante acuoso, y en las etapas finales sólo pequeñas áreas de la coagulación permanece.

- **Viscosidad:** Esta se puede estimar mediante una suave aspiración en una pipeta, permitiendo que el semen caiga por gravedad y observar la longitud de cualquier hilo. Una muestra normal deja la pipeta en pequeñas gotas, si la viscosidad está aumentada la gota formara un hilo de más de 2 cm de largo.

- **Aspecto del eyaculado:** Una muestra normal de semen licuado tiene un aspecto homogéneo, gris-opalescente. Puede parecer menos opaco si la concentración de esperma es muy baja; el color también puede ser diferente, es decir, marrón rojizo cuando están presentes glóbulos rojos (hemoespermia), o amarillo en un hombre con ictericia o tomar ciertas vitaminas o drogas.

- **Volumen de semen:** El volumen del eyaculado es aportado principalmente por las vesículas seminales y glándula prostática, con una pequeña cantidad de glándulas bulbo-uretrales y epidídimos.

- **pH del semen:** refleja el equilibrio entre los valores de pH de las diferentes secreciones accesorias de las glándulas, principalmente la secreción vesicular seminal alcalina y la secreción ácida de la próstata. El pH debe medirse después de la licuefacción a tiempo uniforme, preferiblemente después de 30 minutos, pero en cualquier caso dentro de 1 hora de eyaculación, ya que está influenciada por la pérdida de CO₂ que se produce después de la producción.⁽³⁹⁾

Examen microscópico inicial

- **Motilidad del esperma:** El grado de motilidad progresiva del esperma está relacionado con el embarazo. La motilidad espermática dentro del semen debe ser evaluada tan pronto como sea posible después de la licuefacción de la muestra, preferiblemente a los 30 minutos, pero en cualquier caso en 1 hora. Estas se clasifican en tres grupos: los progresivos, los no progresivos y los inmóviles.
- **Vitalidad espermática:** tal como se estima evaluando la integridad de la membrana de las células. El porcentaje de espermatozoides vivos se evalúa mediante la identificación de aquellos con una intacta membrana celular, de la exclusión del colorante. La exclusión del colorante método se basa en el principio de que las membranas plasmáticas dañadas, como las que se encuentran en las células no vitales (muertas), permiten la entrada de manchas impermeables a la membrana.
- **Concentración espermática:** El número de espermatozoides en el eyaculado se calcula a partir de la concentración de espermatozoides, que se mide durante la eyaculación del semen. Para los eyaculados normales, cuando el tracto masculino no está obstruido y el tiempo de abstinencia es corto, el número total de espermatozoides en el eyaculado se correlaciona con el volumen testicular y, por lo tanto, es una medida de la capacidad de los testículos para producir espermatozoides y la permeabilidad del tracto masculino.
- **Morfología del espermatozoide:** la muestra de semen contiene tanto espermatozoides con morfología normal, así como también con diferentes tipos de malformaciones como: defectos de cabeza, defectos de cuello y pieza intermedia, defecto de cola y defecto de citoplasma residual. ⁽³⁹⁾

Tabla N° 1: valores de referencia del espermograma según la OMS en el año 2010. ⁽³⁹⁾

VALORES DE REFERENCIA	
Volumen	$\geq 1,5$ ml
pH	≥ 7.2
Concentración espermática	≥ 15 M/ml
Número total espermatozoides	≥ 39 M/eyaculado
Motilidad	$\geq 32\%$ con progresión
Vitalidad	$\geq 58\%$
Leucocitos	< 1 M/ml
Morfología (espermatozoides normales)	$\geq 4 \%$ de espermatozoides

El inmunoensayo

Es una técnica que se basa en la reacción Antígeno (Ag) – Anticuerpo (Ac), esta permite determinar y cuantificar agentes patógenos. Estos pueden ser diferenciados claramente debido a que poseen Ag como proteínas y polisacáridos. ⁽⁴⁰⁾ Las técnicas inmunológicas deben ser sensibles, rápidas y además lo suficientemente específica. ⁽⁴¹⁾ Las más empleadas en la actualidad son: Inmunofluorescencia, la fijación del complemento, hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación, neutralización, aglutinación y ELISA. ⁽⁴²⁾

La técnica de Inmunofluorescencia

Se utiliza para la detección y diagnóstico de enfermedades causadas por bacteria, hongos, virus y parásitos. En este ensayo el Ac específico está unido a otro elemento capaz de foto – excitarse, las moléculas que no reaccionan serán eliminadas por el lavado, luego la muestra seca y es examinado con un microscopio de fluorescencia, los Ag que forman el complejo con los Ac fluorescentes serán observados como elementos verdosos contra un fondo oscuro.

⁽⁴³⁾



La Fluoresceína

Es la sustancia más utilizada debido a su alta capacidad de absorción y rendimiento cuántico, este es de 0,85 cuando la molécula es libre en una solución acuosa alcalina, pero disminuye a 0,3-0,5 cuando se conjuga con Ac. ⁽⁴⁴⁾

Historia de la Inmunofluorescencia

En 1930 existía mucho interés por el estudio de las proteínas, debido a esto se estaba trabajando en la posibilidad de combinar antisueros y colorante y que estos no perdiesen la propiedad específica del Ac. J. Marrack en el año de 1934 plantea por primera vez la técnica, resultando esta no tan sensible. ⁽⁴⁵⁾

En 1942 Coons, Creech, Jones y Berliner plantearon una solución para mejorar la sensibilidad óptica iluminando el espécimen con luz ultravioleta invisible (UVI) y marcando el Ac con un colorante fluorescente, este se podría detectar más fácil puesto que la luz fluorescente en el tejido no contrastaría con cualquier luz visible que se transmitiese. ⁽⁴⁶⁾

Coons y cols, demostraron que al conjugar el antisuero a la fluoresceína producía un color amarillo verdoso, que se podía distinguir del azul autofluorescente de los tejidos. Coons utilizo Ag de *Neumococo* marcado con fluoresceína dando lugar a la técnica de Inmunofluorescencia. ⁽⁴⁶⁾

Aplicación de la Inmunofluorescencia

Los métodos de Inmunofluorescencia son de gran utilidad para el diagnóstico y observación de microorganismos, detección de moléculas de complemento, cuantificación de inmunoglobulinas, y diagnóstico de neoplasias. ^(47, 48)

Tipos de Inmunofluorescencia

- 1. Inmunofluorescencia Directa (IFD):** Utiliza un único anticuerpo que se encuentra químicamente unido a un fluorocromo. El anticuerpo reconoce la molécula diana y se une a ella directamente. Este consiste en la aplicación de un conjugado previamente marcado sobre el tejido o muestra que se quiere examinar, se deja incubar por un periodo de tiempo en cámara húmeda a 37°C para que se realice la unión Ag-Ac. Pasado el tiempo de incubación se realizará el lavado para eliminar lo que no se unió y posteriormente se deja secar para el montaje en el microscopio de fluorescencia. ^(47, 48)
- 2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):** Utiliza dos anticuerpos; el anticuerpo primario es el que reconoce y se une a la molécula diana, mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo, reconoce al primario y se une a él. Aquí el antígeno es impregnado en una lámina, luego se le aplica el primer anticuerpo que es sin marcar, este se deja incubar por un período de tiempo en cámara húmeda, posteriormente se lava la muestra con una solución de fosfato de salina (buffer), se coloca un Ac marcado y posteriormente se elimina el material inespecífico con un nuevo lavado y se deja secar para el montaje en el microscopio de fluorescencia. ^(47, 48)

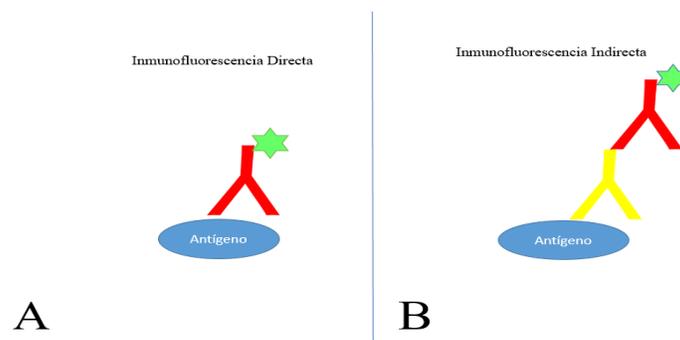


Fig. 3 Tipos de Inmunofluorescencia: A. Inmunofluorescencia Directa donde reacciona el Ag con el Ac marcado con fluoresceína. B. Inmunofluorescencia Indirecta donde primero se da una reacción Ag-Ac y después se le agregará el Ac marcado con fluoresceína que reconocerá al primer Ac unido al Ag.

Reacción en cadena de la polimerasa: es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. ⁽⁴⁹⁾

La tecnología del RT-PCR está basada en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del ADN blanco. Antes que revisar la cantidad de ADN blanco producido después de un número fijo de ciclos, las pruebas de RT-PCR determinan el punto en el tiempo durante el proceso de ciclado cuando se detecta por primera vez la amplificación de un producto de PCR. Este se determina identificando el número del ciclo en el cual la intensidad de la emisión del reportero marcado se levanta sobre el ruido de fondo. Este número del ciclo está referido como el ciclo umbral o “threshold cycle” (Ct). El Ct se determina en la fase exponencial de la reacción de PCR y es inversamente proporcional al número de copias del blanco. Por lo tanto cuanto más alto es el número de copias iniciales de los ácidos nucleicos a amplificar, más pronto se observa un aumento significativo en la fluorescencia, y son más bajos los valores de Ct. ⁽⁵⁰⁾

La principal meta del RT-PCR es distinguir y cuantificar de manera específica una secuencia de ácido nucleico en una muestra, incluso cuando ésta se presenta en pequeñas cantidades. Durante la amplificación, la velocidad en que se llega a un nivel determinado de fluorescencia (umbral) correlaciona con la cantidad de ADN que tenemos al inicio. Además, el producto final puede ser caracterizado si se somete a incrementos de temperatura para determinar en qué momento la doble cadena se separa. Este punto de fusión es una propiedad única que depende de la longitud y de la secuencia nucleotídica del producto. ⁽⁵¹⁾

Otra de las ventajas de la técnica de PCR en tiempo real es la cuantificación de ARN. Esto es posible gracias al uso de las reverso transcriptasas, enzimas que generan ADN complementario (ADNc) a partir de un templado de ARN. Bajo condiciones apropiadas, la cantidad de ADNc generado por reverso transcripción es proporcional al número de moléculas de ARN presente en una muestra dada. Entonces este ADNc puede ser el templado para una reacción de PCR en tiempo real, utilizando su sensibilidad y precisión para determinar cambios en la expresión de genes. ⁽⁵¹⁾



MATERIAL Y MÉTODO

Tipo de estudio: Experimental que consistió en la optimización y estandarización interna de una prueba de Inmunofluorescencia.

Etapas del estudio:

- I. Parámetros técnicos que fueron optimizados en la Inmunofluorescencia.
- II. Parámetros de calidad de la técnica de Inmunofluorescencia.

I. Parámetros técnicos que fueron optimizados en la Inmunofluorescencia: 1) Conservación de la muestra (tiempo, temperatura y soluciones). 2) Celularidad (recuento de células por campo). 3) Fijación de las muestras (acetona, metanol y paraformaldehído al 4%). 4) Titulación de los anticuerpos anti-Flavivirus (mouse 4G2) y el anticuerpo conjugado Alexa (mouse 488). 5) Titulación de la solución de contraste (azul de Evans). 6) Tiempos de lavado (PBS 1X).

1. Conservación de las muestras de semen: Se recolectó una muestra de semen mediante masturbación. Siguiendo las buenas prácticas clínicas para la toma de muestra, este proceso fue realizado en el ambiente del Laboratorio de Microbiología y durante la primera hora del día. La manera en que probamos la conservación ideal de los espermatozoides, fue por medio de la utilización del colorante eosina-nigrosina que es utilizado para observar la permeabilidad de la membrana de los espermatozoides en relación al tiempo de guardado, los diferentes solventes y a diferentes temperaturas. De esta muestra se fueron creadas alícuotas en un total de 75 viales. (Ver tabla N°6, Pág. 36)

A. Procedimiento para el guardado de las muestras en los diferentes viales:

- Muestra de semen sin tratamiento: se guardó en cada vial 300 μ l de semen.
- Muestra de semen lavada y resuspendida en PBS 1X: en cada vial se le agregó 100 μ l de semen en 900 μ l de PBS 1X, luego se centrifugó por 10 minutos a 1500 rpm, luego se decantó el sobrenadante, se le agregó de nuevo 900 μ l de PBS 1X y se centrifugó para descartar el sobrenadante y resuspendió en 900 μ l de PBS 1X, esto se realizó para eliminar el líquido seminal y solo dejar las células.
- Muestra semen con PBS 1X: se realizó una dilución 1/20 (se colocó 950 μ l de PBS 1X + 50 μ l de semen)
- Muestra con formaldehído al 37%: se realizó una dilución 1/20 (se colocó 950 μ l de formaldehído al 37% + 50 μ l de semen).
- Muestra con paraformaldehído al 4%: se realizó una dilución 1/20 (se colocó 950 μ l de paraformaldehído al 4% + 50 μ l de semen).

B. Lectura de la permeabilidad de la membrana: Las muestras guardadas a -20°C y -80°C fueron descongeladas mediante choque térmico (baño María por 2 minutos). En la visualización de la permeabilidad de la membrana utilizamos eosina, en donde en una lámina portaobjeto se colocó 25 μ l de eosina y 25 μ l de muestra, luego se coloca un cubreobjeto y se dejó reposar por un minuto para su posterior visualización en el microscopio óptico utilizando el objetivo de 40X. Conteo de los espermatozoides: Se contaron 100 espermatozoides clasificándolos en permeables: (espermatozoides con color rosado por eosina); y no permeables: (espermatozoides sin color).

2. Celularidad: Inicialmente se realizó el conteo de las células en la cámara de Neubauer para conocer la concentración espermática de la muestra de semen. Se utilizó una lámina de IF de 10 pocillos, en el primer y segundo pocillo se colocó la muestra pura, a partir del tercer pocillo hasta el último se fueron realizando diluciones de 1:2 hasta 1:16. Luego que las muestras fueron colocadas, estas se dejaron secar a temperatura ambiente y se tiñeron con Wright por 3 minutos, se lavaron y se observaron al microscopio con el objetivo de 100x y



se realizó un promedio de cuantas células se pueden observar por campo, también se realizó el conteo de células con Dappi un anticuerpo que tiñe el núcleo de los espermatozoides en color azul confirmando el conteo con Wright. (Ver tabla N°7, Pág. 37)

3. Fijación de las muestras: La fijación de las células a las láminas fue un paso muy importante para poder realizar la inmunofluorescencia, por lo que permitió conservar bien las estructuras celulares y observarlas con mejor claridad en el microscopio de Inmunofluorescencia.

Este proceso se llevó a cabo al probar diferentes fijadores como; acetona, metanol y paraformaldehído al 4% y luego se tiñeron con eosina para observar sus estructuras y la intensidad del color. Una vez descongelada la muestra pura se prepararon 3 láminas para inmunofluorescencia (una lámina para cada fijador) y se le colocaron 15µl de muestra en cada pocillo, se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secadas las muestras en las láminas, se colocaron en diferentes fijadores tales como: metanol y acetona que se dejó incubar -20°C por 5 minutos y paraformaldehído al 4% a una temperatura de 4°C por 5 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS 1X para hidratar la célula. Luego se tiñeron con eosina durante 5 minutos y se volvieron a lavar con PBS 1X. Se dejaron secar para posteriormente observar las láminas en el microscopio óptico con el objetivo de 100X.

Lectura de las muestras: Se valoraron 100 espermatozoides con respecto a dos características importantes: Intensidad de color (+ No teñidas, ++ Pocos teñidas, +++ Medio teñidas y ++++ Teñidas completas) y Estructura (+ Deformación de la estructura celular, ++ Se diferencia la cabeza o cola, +++ Se diferencia cabeza y cola y ++++ se observa núcleo, vacuola y acrosoma en el espermatozoide). (Ver tabla N°8, Pág. 38)

4. Titulación de los Anticuerpos: Se utilizaron 2 anticuerpos: El primero es el Anti-Flavivirus 4G2: es un anticuerpo monoclonal recombinante al antígeno del grupo Flavivirus con regiones variables del hibridoma D1-4G2-4-15 (4G2) que reconoce los antígenos específicos del grupo Flavivirus (virus del Dengue, virus del Nilo occidental, encefalitis

japonesa, virus de la fiebre amarilla, virus del Zika, etc.). Se une al bucle de fusión en la extremidad del dominio II de la proteína E. Este anticuerpo es producido en ratón y está a una concentración de 1.79 mg/ml y el segundo es el Anticuerpo Alexa Fluor 488 mouse: es un anticuerpo secundario conjugado que se unirá al complejo Ag-Ac, este dará la positividad en color verde manzana.

Para esta evaluación se realizó en una lámina de inmunofluorescencia de 10 pocillos:

- Se le agregó 15 μ l de semen (de una muestra Zika positiva en PCR) en cada uno de los pocillos, se dejó secar y luego se fijó con paraformaldehído al 4% por 5 minutos a una temperatura de 4°C.
- Se diluyeron los anticuerpos anti-Flavivirus 4G2 y Alexa Fluor 488 en las siguientes diluciones: 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, y 1/600, (Empezamos en el primer pocillo con la dilución 1/100 y en el último pocillo la dilución 1/600).
- Se le agregó 50 μ l del primer Ac (anti-Flavivirus 4G2) y se incubó en cámara húmeda por 30 minutos a 37°C.
- Se lavó la lámina con PBS 1X para eliminar lo que no se unió.
- Se incubó el segundo Ac (Alexa Fluor 488 mouse) en cámara húmeda por 30 minutos a 37°C en oscuridad.
- Se realizó el segundo lavado.
- Se le colocó glicerol en la lámina y se colocó el cubre para la observación en el microscopio de fluorescencia.

5. Titulación de la tinción de contraste: se utilizó Azul de Evans 10g de la marca SIGMA lote E2129-50G.

- Se realizaron diluciones para disminuir la concentración de 10g hasta 0.156g.
- En una lámina para inmunofluorescencia se colocó la muestra y luego se fijó con paraformaldehído al 4% por 5 minutos a 4°C.



- Cada concentración del azul de Evans se pusieron por duplicado a partir de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y 0.156 gramos.
- Se colocó 50 µl de la dilución a cada pocillo y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 minutos.
- Se dejaron secar y posteriormente se realizó el montaje de la lámina con glicerol y luego se observó la lámina en el microscopio de inmunofluorescencia.

6. Tiempos de lavados: para los lavados se utilizó PBS 1X, en este se determinó la cantidad de veces de lavado y los minutos de duración. Fue decidido de acuerdo a la observación de las láminas que tengan menos fondos de tinciones inespecíficas.

II. Parámetros de calidad de la técnica de inmunofluorescencia: Esta etapa se realizó con la ayuda de un panel a ciego que contenía 32 muestras de semen que corresponden a 23 pacientes, las muestras estaban guardadas a una temperatura de -80°C todas ellas con resultados de RT-PCR como prueba de referencia. Dichas muestras se obtuvieron del proyecto Zika-TS durante el periodo Noviembre 2016 – Octubre 2017.

Obtención y conservación de la muestra:

Muestras de semen: Se obtuvieron las muestras por masturbación del propio paciente en un vaso recolector estéril, estas fueron debidamente rotuladas con el código del paciente y luego se le realizó un espermograma para conocer concentración, vitalidad y movilidad de los espermatozoides (ver anexo N° 1) y posteriormente el sobrante se guardó a una temperatura de -80°C para su posterior análisis de RT-PCR e IF.

Realización del panel a ciegas: cuando fueron optimizados los parámetros técnicos de la inmunofluorescencia, se procedió a montar las muestras del panel, además se colocó un control positivo que fue una muestra de semen positiva para ZIKV por RT-PCR que se obtuvo durante la fase convalescente de un paciente y un control negativo que fue una muestra de semen de un paciente con resultado negativo por el RT-PCR en todos los fluidos.

La lectura se realizó de la siguiente manera: Positivo: cuando se encontraron al menos 1 espermatozoide con fluorescencia verde manzana por 10 campos y se calculó el número de células infectadas, Negativo: no se observó fluorescencia.

Tabla N° 2: Hoja de lectura de la IF para la estimación del porcentaje de células infectadas.

Numero de campo	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		Porcentaje de células	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Resultado por campos																						
Semen																						

Realización de RT-PCR para la detección del ZIKV en muestras de semen: se realizó utilizando la muestra de semen por elementos separados como son: solo células espermáticas lavadas y líquido seminal.

- 1. Extracción de ácidos nucleicos (QIAamp viral ARN mini kit 250):** se descongelaron las muestras a 4°C, luego en un vial estéril de 1.5 ml se mezcló 140 µl de la muestra con 560 µl de buffer AVL (Previamente mezclado con ARN carrier). Se dio vórtex por 15 segundos y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, se le agregó 560 µl de etanol al 97% a la mezcla anterior y se dio vórtex por 15 segundos. En una columna contenida en un tubo colector se depositó 630 µl de la mezcla anterior y se centrifugó a 8,000 rpm por un minuto, luego se descartó el tubo colector que contenía el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo colector, luego se le agregó el restante de la mezcla y se centrifugó a 8,000 rpm por un minuto,

nuevamente se descartó el tubo colector y se agregó la columna en un nuevo tubo colector, luego se depositó 500 µl de solución de lavado AW1 y se centrifugó a 8,000 rpm, después se descartó el tubo colector y se colocó la columna en un nuevo tubo colector donde se le agregó 500 µl de solución de lavado AW2 y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos, luego se colocó la columna en un eppendorf estéril de 1.5 ml y se le agregó 60 µl de buffer de elución AVE y se centrifugó a 8,000 rpm por minuto, al final se descartó la columna y se rotuló el vial que contiene el ARN y se guardó a -20°C hasta su uso.

- Iniciadores y Mezcla (P/N: 4387391 AgPath-ID™ One-step RT-PCR Reagents Kit)** : las amplificaciones se realizaron por la técnica de PCR en tiempo real, se utilizaron dos sets para la detección del ARN viral, el set 1 para el reconocimiento de todas las cepas del virus del Zika, el cual se preparó con una mezcla de 12.5 µl de Buffer 2x RT-PCR 10x, 1 µl de primer que reconoce a la proteína de Envoltura (Zika 1087 5'-CCGCTGCCCAACAACAAG-3' + Zika 1163c 5'-CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3'), 1 µl de sonda (Zika 1108FAM 5'-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-3'), 1 µl de enzima (transcriptasa inversa), 1 µl de Detección Enhancer y 8 µl de ARN extraído tanto de las células espermáticas y líquido seminal.

El set 2 para el reconocimiento de la cepa asiática del virus del Zika, el cual se preparó con una mezcla de 12.5 µl de Buffer 2x RT-PCR 10x, 1 µl de primer (Zika 4481 5'-CTGTGGCATGAACCCAATAG-3' + Zika 4552c 5'-ATCCCATAGAGCACCCTCC-3'), 1 µl de sonda (Zika 4507FAM 5'-CCACGCTCCAGCTGCAAAGG-3'), 1 µl de enzima (transcriptasa inversa), 1 µl de Detección Enhancer y 8 µl de ARN extraído tanto de las células espermáticas y líquido seminal.

3. **Programa para amplificación del ARN:** para la amplificación del ARN del virus del Zika se utilizó el termociclador Applied Biosystems 7500 Real Time System, con el método de Lanciotti que consiste en un ciclo de retro transcripción a partir del ARN para la síntesis de ADNc a 45°C por 10 minutos, seguido de una desnaturalización del ADNc a 95°C por 10 minutos, después se realizaron 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, extensión a 60°C por 45 segundos y por último la extensión

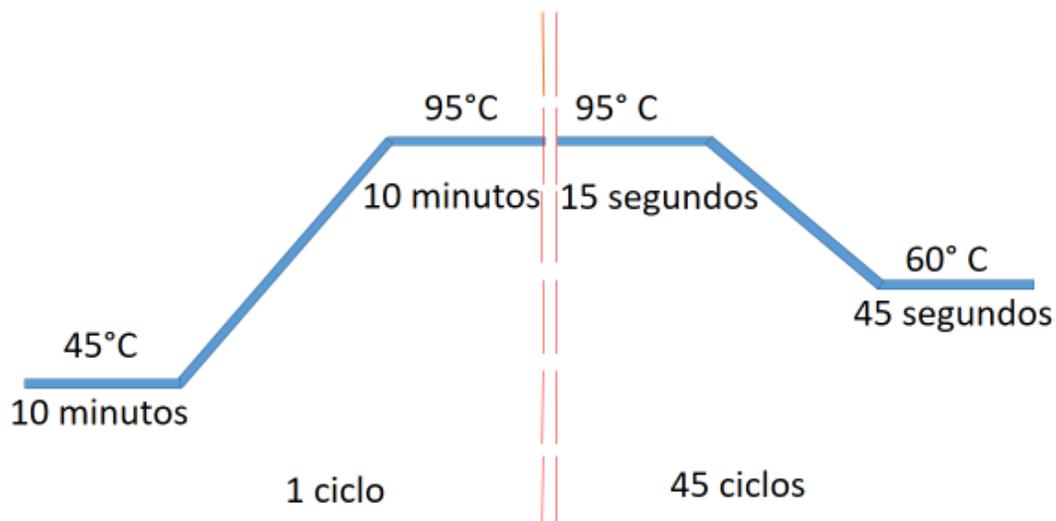


Fig. 4: Esquema de ciclos de amplificación del ARN del Virus del Zika.

Comparación de los resultados de la IF con los resultados obtenidos del RT-PCR de las muestras: Los resultados que obtuvimos de los dos métodos fueron escritos en una hoja de resultados (Ver anexo N° 2), estos se analizaron mediante una prueba estadística que indique número y porcentajes de las muestras positivas y negativa para cada uno de los métodos.

Cálculo de la sensibilidad y especificidad: Con el propósito de saber la sensibilidad y especificidad de la IF con respecto al RT-PCR (Dicha prueba no es el Gold Estándar, pero se realizó con esta porque ensayos de neutralización no se realizan en nuestro país), se realizó una tabla de 2 x 2 de acuerdo al siguiente modelo:

Tabla N° 3: Tabla de 2x2 para el cálculo de la sensibilidad y especificidad

		RT-PCR		
		+	-	TOTAL
IFI	+	A	B	A+B
	-	C	D	C+D
TOTAL		A+C	B+D	N

Dónde: A: verdaderos positivos, B: falsos positivos, C: falsos negativos, D: verdaderos negativos.

Cálculo de la sensibilidad: $A/A+C \times 100$

Cálculo de la especificidad: $D/B+D \times 100$

Cálculos de Razón de Verosimilitud: La razón de verosimilitud positiva se relaciona a la medida que se alejen los resultados del 1 hacia el ∞ mejor será el cociente y la información. La razón de verosimilitud negativa se relaciona a la medida que se acercan los resultados al cero mejor será el cociente y la información que aporte a la prueba. Para obtener estos valores se utilizó la sensibilidad y especificidad aplicando las siguientes formulas:

Razón de Verosimilitud Positiva (RVP): $\frac{\text{sensibilidad}}{100\% - \text{especificidad}}$



Razón de Verosimilitud Negativa (RVN): 100% - sensibilidad

Especificidad

Tabla N° 4: Tabla para la interpretación de la razón de verosimilitud y su impacto en la utilidad clínica. ⁽⁵²⁾

Razón de Verosimilitud Positiva	Razón de Verosimilitud Negativa	Utilidad
10	< 0,1	Altamente relevante
5 - 10	0,1 – 0,2	Buena
2 - 5	0,5 – 0,2	Regular
< 2	>0,5	Mala

Cálculos de los valores predictivos: Para obtener los valores predictivos se realizó una tabla de 2x2 de la siguiente manera:

Tabla N° 5: Tabla de 2x2 para el cálculo de los valores predictivos.

IF	PCR	
	Enfermos	Sanos
Positivos	A	B
Negativos	C	D

Dónde: A: enfermos positivos, B: sanos positivo, C: enfermos negativo y D: sanos negativos.



Valor predictivo positivo (VPP): $A/A+B$

Valor predictivo negativo (VPN): $D/C+D$

Valor predictivo global (VPG): $(A+D)/(A+B+C+D)$

Plan de análisis: Los datos obtenidos a partir de la optimización y resultados de las pruebas de laboratorio fueron ingresados en una hoja de Excel 2010 y SPSS versión 20 para la realización de estadísticas, cruce de variable y gráficas de los resultados obtenidos para determinar el índice de relación de nuestra prueba con respecto al RT-PCR.

Consideraciones éticas: Esta investigación es parte del estudio titulado “**Epidemiología y manifestaciones clínicas de la infección por Zika en niños y adultos en Nicaragua**”, aprobado por el Comité de Ética para investigaciones Biomédicas (CEIB), inscripto en el Acta No 85 en Julio del año 2016, en el cual los pacientes donaron una muestra de semen que se le realizó un espermatoograma y se les entregó resultados. (Ver anexo N° 3).

RESULTADOS

I. Parámetros técnicos que fueron optimizados en la inmunofluorescencia para la detección del antígeno Zika en semen.

1). Conservación de las muestras de semen: los resultados se evaluaron usando temperaturas (4°C, -20°C y -80°C), soluciones (semen sin tratamiento, semen diluido 1:20 en PBS 1X, semen lavado y resuspendido en PBS 1X, semen diluido 1:20 en paraformaldehído al 4% y semen diluido 1:20 en formaldehído al 37%) y aún tiempo de conservación (1 hora, 24 hora, 48 hora, 72 hora, 1 mes y 3 meses). Las muestras se analizaron utilizando el test de eosina-nigrosina que evaluó la permeabilidad de la membrana de los espermatozoides, en el cual se obtuvo los siguientes datos:

Al pasar 1 hora se obtuvo que el 7% de los espermatozoides eran permeables. A las 24 horas la muestra de semen diluida 1:20 en PBS y guardada a -80°C presentó un 98% de espermatozoides permeables. En 48 horas el porcentaje más bajo de permeabilidad fue del 92 % que se observó en la muestra de semen diluida en formaldehído al 37% guardada a -20°C, el resto de las muestras obtuvieron del 93 al 100% de permeabilidad. En un lapso de 72 horas se observó un 100% de permeabilidad en las tres temperaturas y en las diferentes soluciones.

En un mes de conservadas las muestras se observó un porcentaje de 100% de permeabilidad en los espermatozoides en las tres temperaturas y en las diferentes soluciones. A los tres meses de conservación, la muestra de semen sin tratamiento a una temperatura de 4°C se secó, por el cual no se pudo realizar el análisis, el semen diluido 1:20 en PBS 1X y el semen lavado y suspendido en PBS 1X guardados a una temperatura de 4°C no se observaron estructuras compatibles a espermatozoides, solo se logró la observación de estructuras compatibles a levaduras, el resto de las muestras guardadas a -20 y -80°C en las diferentes

soluciones, obtuvieron un porcentaje del 100% de permeabilidad en los espermatozoides. Por lo tanto la conservación óptima para el guardado de las muestras de semen es usando cualquiera de las soluciones mencionadas anteriormente a una temperatura de -80°C . (Ver tabla N° 6)

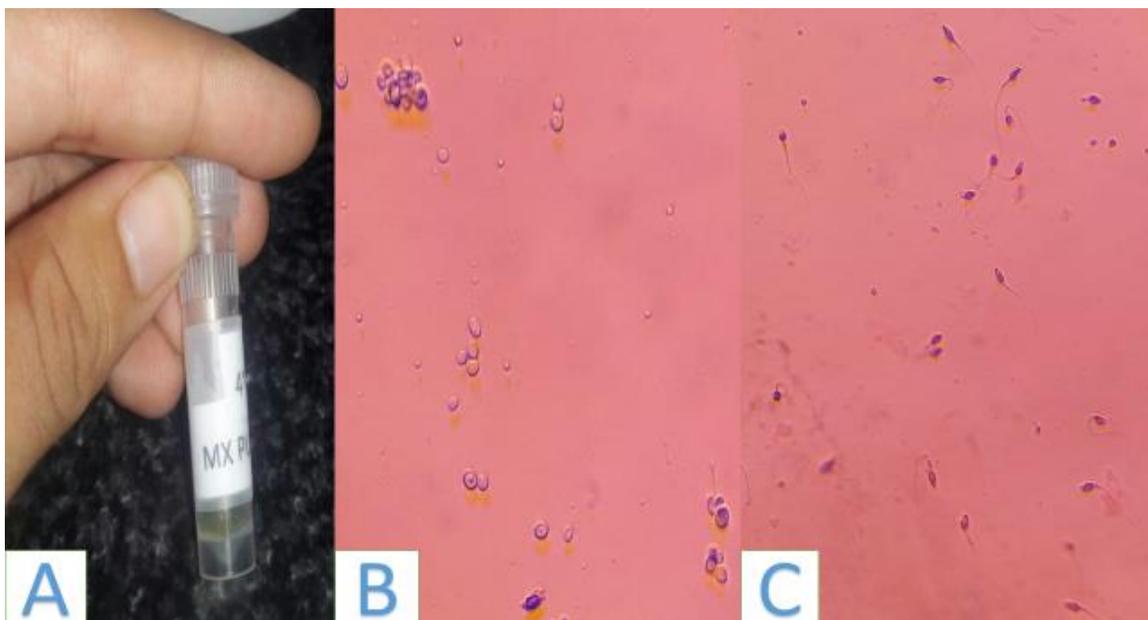


Fig. 5 Observación de las muestras guardadas: A) muestra sin tratamiento a 4°C que se secó. B) muestra de semen 1:20 en PBS a 4°C con estructuras compatibles a levaduras. C) Espermatozoides con la membrana permeable utilizando test de eosina.

Tabla N° 6: Resultados en porcentajes de los parámetros que se midieron para la conservación de las muestras.

Tiempo de conservación	Temperatura	Semen sin tratamiento	Semen diluido 1:20 en PBS	Semen lavado y suspendido en PBS	Semen diluido 1:20 en solución de paraformaldehído al 4%	Semen diluido 1:20 en formaldehído al 37%
1 hora	4°C	7	7	7	7	7
	-20°C	7	7	7	7	7
	-80°C	7	7	7	7	7
24 horas	4°C	48	95	89	89	90
	-20°C	93	97	96	92	91
	-80°C	95	98	97	94	97
48 horas	4°C	98	99	94	100	100
	-20°C	100	100	100	93	92
	-80°C	95	100	100	96	100
72 horas	4°C	100	100	100	100	100
	-20°C	100	100	100	100	100
	-80°C	100	100	100	100	100
1 mes	4°C	100	100	100	100	100
	-20°C	100	100	100	100	100
	-80°C	100	100	100	100	100
3 meses	4°C	0 *	0 **	0 **	100	100
	-20°C	100	100	100	100	100
	-80°C	100	100	100	100	100

Leyenda: * muestra de semen se secó, ** la muestra se observó con levadura.

2). Celularidad: La celularidad óptima por campo con objetivo de 100X, se obtuvo diluyendo la muestra 1:2 con PBS 1X; el cual se observaron 94 ± 10 espermatozoides por campos en muestras de semen con concentraciones normales, en donde estos estaban uniformemente distribuidos y sin agrupaciones logrando así una visualización de sus estructuras con claridad en todo el campo. (Ver tabla N° 7)

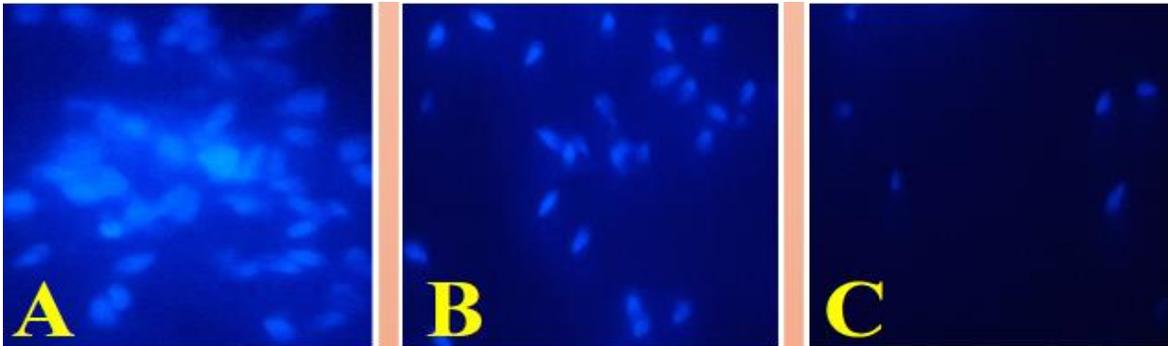


Fig. N° 6: Observación de los espermatozoides con Dappi que tiñe los núcleos de los espermatozoides en azul: A) Muestra sin diluir con una hiper celularidad. B) Muestra con una dilución 1:2, C) Muestra con una dilución 1:16 con una hipocelularidad.

Tabla N° 7: Media de la cantidad de células vista por campo según dilución.

Tipo de muestra	Muestra sin diluir	Dilución 1:2	Dilución 1:4	Dilución 1:8	Dilución 1:16
Semen	210 ± 10	94 ± 10	51 ± 10	22 ± 10	10 ± 10

3). Fijación de las muestras: Las muestras fijadas con acetona y metanol obtuvieron un 65% y 66% respectivamente (+++) con coloración media en los espermatozoides, mientras que las muestras con paraformaldehído al 4 % obtuvo un 95% de coloración por lo que se observaron los espermatozoides teñidos completamente (+++), también se evaluaron la estructura de los espermatozoides con los fijadores, en donde la acetona obtuvo un 41% y el metanol un 66% diferenciándose la cabeza y cola del espermatozoide equivalente a (+++), mientras que la fijación con paraformaldehído al 4% obtuvo un 93% en el cual se lograban visualizar estructuras internas como: núcleo, vacuolas y acrosoma de las células espermáticas

equivalentes a (++++), por lo tanto se decide que la fijación ideal es paraformaldehído al 4% por 5 minutos a una temperatura de 4°C. (Ver tabla N°8)



Fig. N° 7: Lámina fijada con paraformaldehído al 4% y teñida con eosina: en el cual se observa un espermatozoide teñido completamente y se logran visualizar sus estructuras internas.

Tabla N° 8: Porcentaje obtenido en la coloración y estructura de los espermatozoides en la evaluación de los fijadores.

Fijadores	Intensidad de color	Resultados en porcentajes	Estructura	Resultados en porcentajes
Acetona	+	0	+	0
	++	11	++	3
	+++	65	+++	41
	++++	24	++++	56
Metanol	+	0	+	1
	++	5	++	12
	+++	66	+++	66
	+++	29	++++	21
Paraformaldehído al 4%	+	0	+	1
	++	1	++	0
	+++	4	+++	6
	++++	95	++++	93

4). Titulación de los anticuerpos: La titulación para el anticuerpo Anti-Flavivirus 4G2 y el Anticuerpo Alexa Fluor 488 mouse fue una dilución 1/200 en 30 minutos de incubación en cámara humedad a una temperatura de 37°C para ambos, el cual proporcionó una mejor señal (color verde manzana) en los espermatozoides infectados, a medida que se aumentaba la dilución (1/300, 1/400, 1/500 y 1/600) de los anticuerpos se reducía la intensidad de la señal.

5). Titulación de la tinción de contraste: Se utilizó azul de Evans en su concentración inicial de 10 gr/ml, sin poder lograr una visualización de las células infectadas debido a que el fondo era demasiado rojo, en cambio cuando se iba disminuyendo la concentración en: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y 0.156 gr/ml era más fácil la observación de las células hasta llegar a visualizarse con mayor diferenciación y claridad, por lo que se indicó que la concentración ideal es de 0.312 gr/ml con una incubación de 3 minutos a temperatura ambiente.

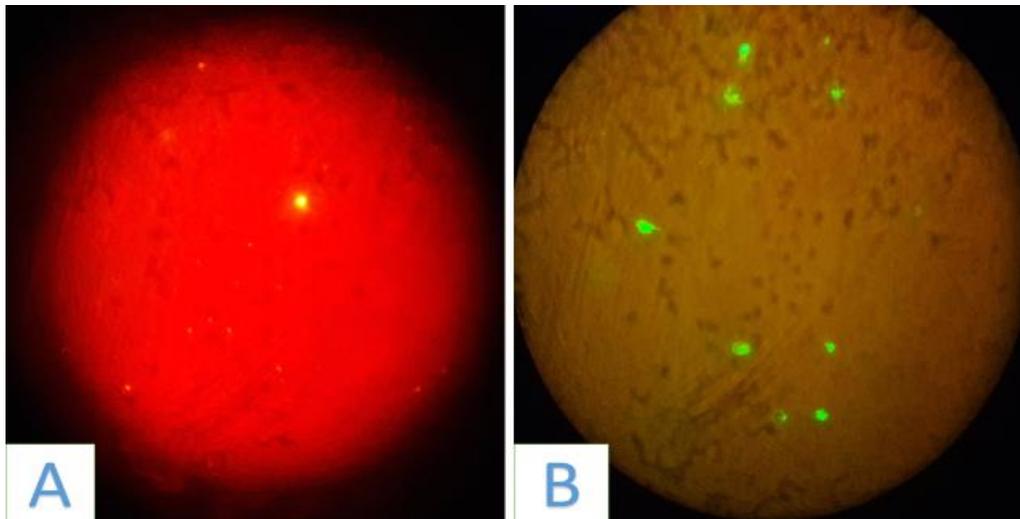


Fig. N° 8: Diferencia en la intensidad del Azul de Evans A) Azul de Evans a una concentración de 10 gr/ml, en el cual se observa un fondo muy rojizo. B) Azul de Evans a una concentración de 0.312 gr/ml, en el que observamos un fondo más claro.

6). Tiempos de lavado: El mejor resultado se obtuvo lavando 3 veces las láminas por 5 minutos cada lavada utilizando PBS 1X en una cubeta coplin, tiempos menores a este se observaron más artefactos que pueden interferir a resultados falsos positivos.

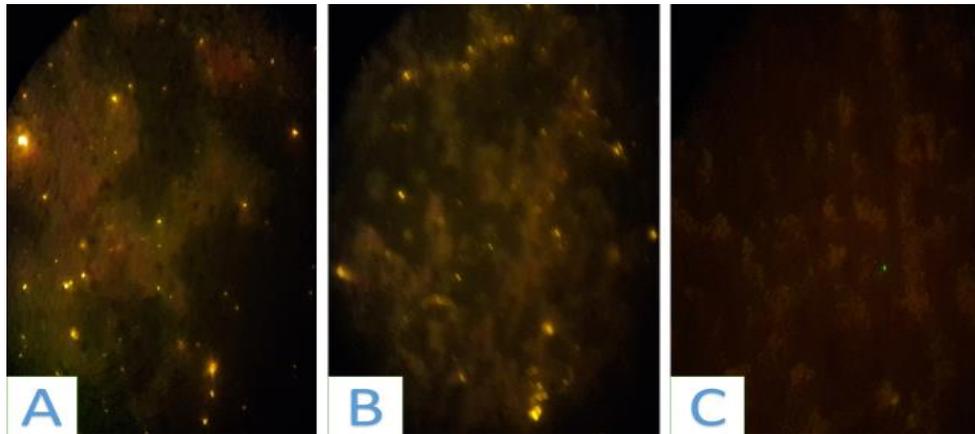


Fig. N° 9: Evaluación de los tiempos y número de lavados. A) Lavado 1 vez por 5 minutos se observa mayor número de residuos. B) Lavado 2 veces en un intervalo de 5 minutos se observa disminución de residuos. C) Lavado 3 veces por 5 minutos cada uno casi no existen residuos.

II. Parámetros de calidad de la técnica de inmunofluorescencia para la detección de antígeno del virus Zika.

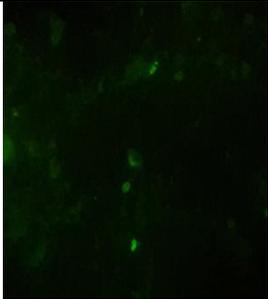
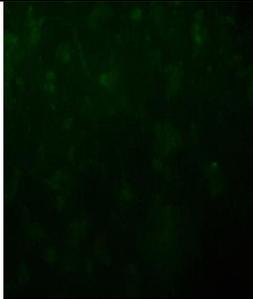
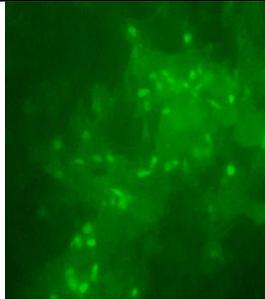
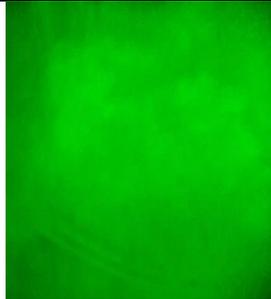
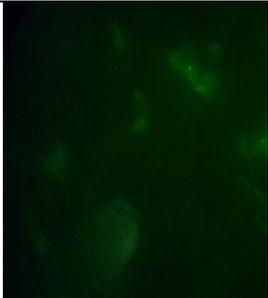
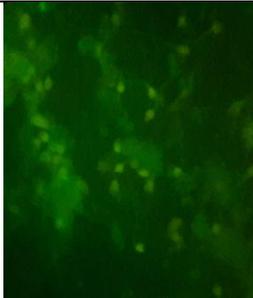
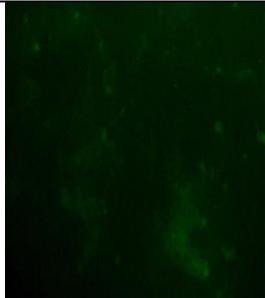
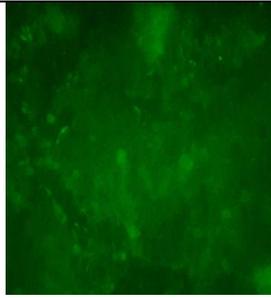
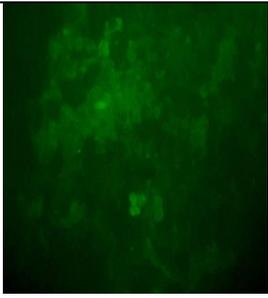
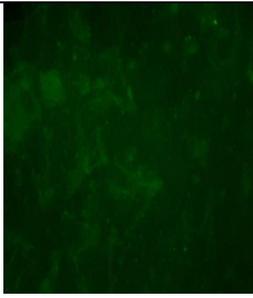
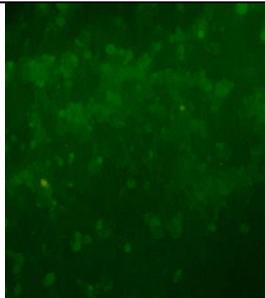
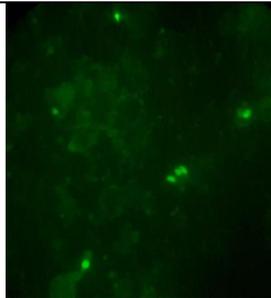
1). Evaluación del panel a ciegas: Primero se descodificaron las muestras de semen y se le colocó un nuevo código del 01 al 32, después se realizaron las inmunofluorescencia y hasta que se leyeron todas las muestras se procedió a la realización del RT-PCR. En la inmunofluorescencia se obtuvieron 23 muestras negativas (71.9%) y 9 muestras positivas (28.1%) en estas se estimó el porcentaje de espermatozoides infectados, el cual el mayor fue de 25.4% que equivale a 6.8×10^6 de espermatozoides infectados y el menor fue 0.44%

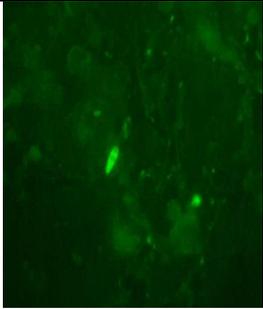
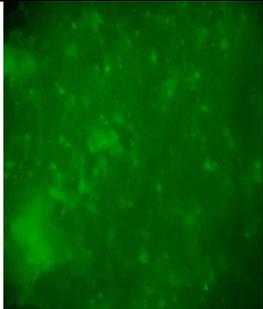
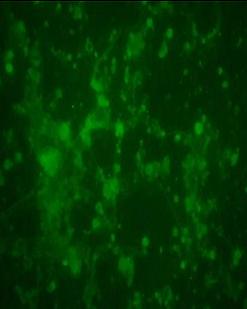
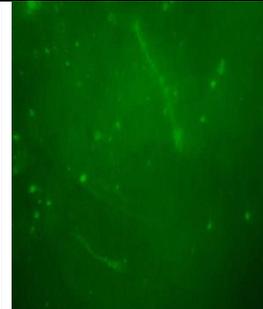
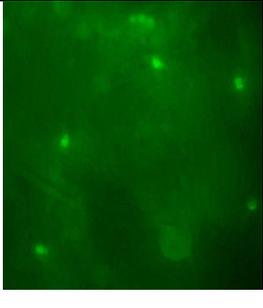
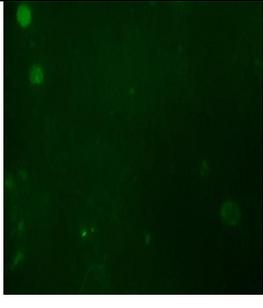
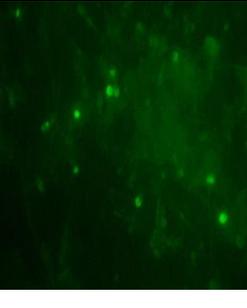
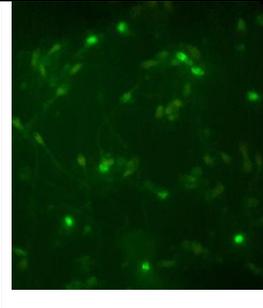
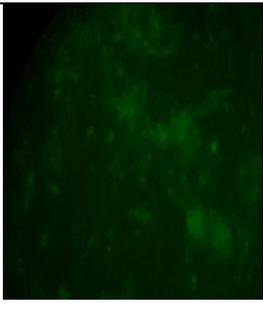
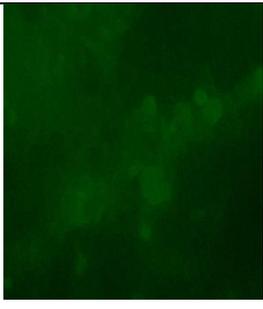
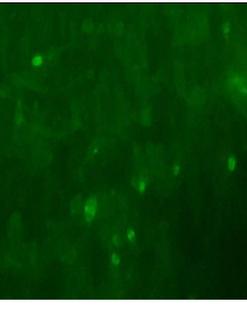
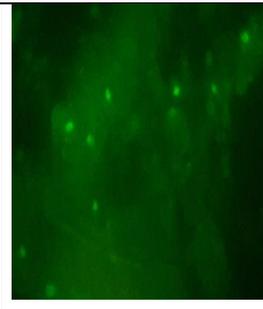
equivalente a 1.8×10^5 de células espermáticas infectadas con una media de 1.26% y una desviación estándar de 4.51, en el RT-PCR obtuvimos un total de 21 muestras negativas (65.6%) y 11 muestras positivas (34.4%) de estas 10 dieron positivas en células espermáticas y solamente una dio positiva en líquido seminal. (Ver tabla N°9)

Tabla N° 9: Resultados obtenidos por Inmunofluorescencia y RT-PCR para la detección de Zika en semen.

Método	Inmunofluorescencia		RT-PCR	
	N°	%	N°	%
Positivos	9	28.1	11	34.4
Negativos	23	71.9	21	65.6
Total	32	100	32	100

Se recolectó un total de 32 muestras de semen de 23 pacientes, en donde 13 muestras eran de 4 pacientes que fueron diagnosticados con Zika por sintomatología y RT-PCR, a los cuales se les dio un seguimiento prospectivo hasta 180 días después del inicio de los síntomas. Se recolectaron 5 muestras del primer paciente, de las cuales la del día 7 salió positivas en inmunofluorescencia y RT-PCR, la muestra del día 14 dieron negativas para ambos métodos, la del día 21 dio positivas para RT-PCR y negativas para inmunofluorescencia, las muestras del día 28 y 60 dieron negativas para ambos métodos. Del segundo paciente se recolectaron 5 muestras, de las cuales las del día: 7, 14 y 21 dieron resultados positivos para la inmunofluorescencia y negativas los días 28 y 180, en el RT-PCR dieron positivos los días: 7 y 28 y negativos los días: 14, 21 y 60. Del tercer paciente se recolectaron dos muestras las del día 21 dieron negativas para ambos métodos y la del día 28 dieron positivas para ambos métodos y del cuatro paciente solo se analizó una muestra la del día 14, la cual resulto negativas para ambos métodos.

			
<p>Código: 01 IF: Positivo %CI: 1 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 02 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 03 IF: Positivo %CI: 25.1 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 04 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>
			
<p>Código: 05 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 06 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 07 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 08 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Positivo</p>
			
<p>Código: 09 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 10 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Positivo</p>	<p>Código: 11 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 12 IF: Positivo %CI: 3.27 RT-PCR: Positivo</p>

 <p>Código: 13 IF: Positivo %CI: 0.44 RT-PCR: Positivo</p>	 <p>Código: 14 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	 <p>Código: 15 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Positivo</p>	 <p>Código: 16 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>
 <p>Código: 17 IF: Positivo %CI: 2.45 RT-PCR: Negativo</p>	 <p>Código: 18 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	 <p>Código: 19 IF: Positivo %CI: 0.82 RT-PCR: Positivo</p>	 <p>Código: 20 IF: Positivo %CI: 1.38 RT-PCR: Positivo</p>
 <p>Código: 21 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Positivo</p>	 <p>Código: 22 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Positivo</p>	 <p>Código: 23 IF: Positivo %CI: 1.92 RT-PCR: Positivo</p>	 <p>Código: 24 IF: Positiva %CI: 3.81 RT-PCR: Negativo</p>

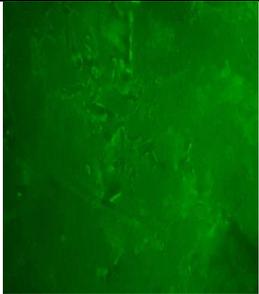
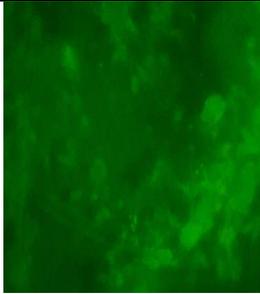
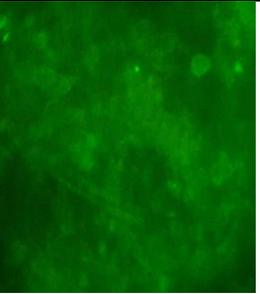
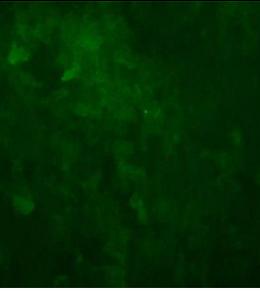
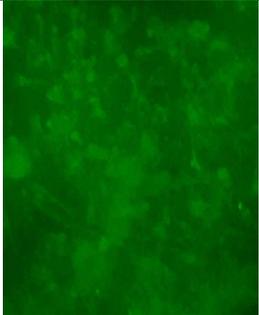
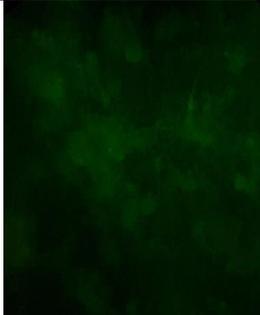
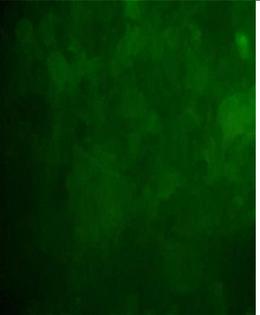
			
<p>Código: 25 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 26 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 27 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 28 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Positivo</p>
			
<p>Código: 29 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 30 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 31 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>	<p>Código: 32 IF: Negativo %CI: 0 RT-PCR: Negativo</p>

Tabla N° 10: Resultados de las 32 muestras de semen por Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcriptasa Inversa (RT-PCR) e Inmunofluorescencia (IF), en donde las células verde manzana indican el Porcentaje de Células Infectadas (%CI).

Otros hallazgos relevantes: durante la lectura de las láminas se observaron dos patrones de fluorescencia de las células infectadas, el primero marcaba una fluorescencia en todo el espermatozoide, mientras que el segundo solo a nivel de la cabeza.

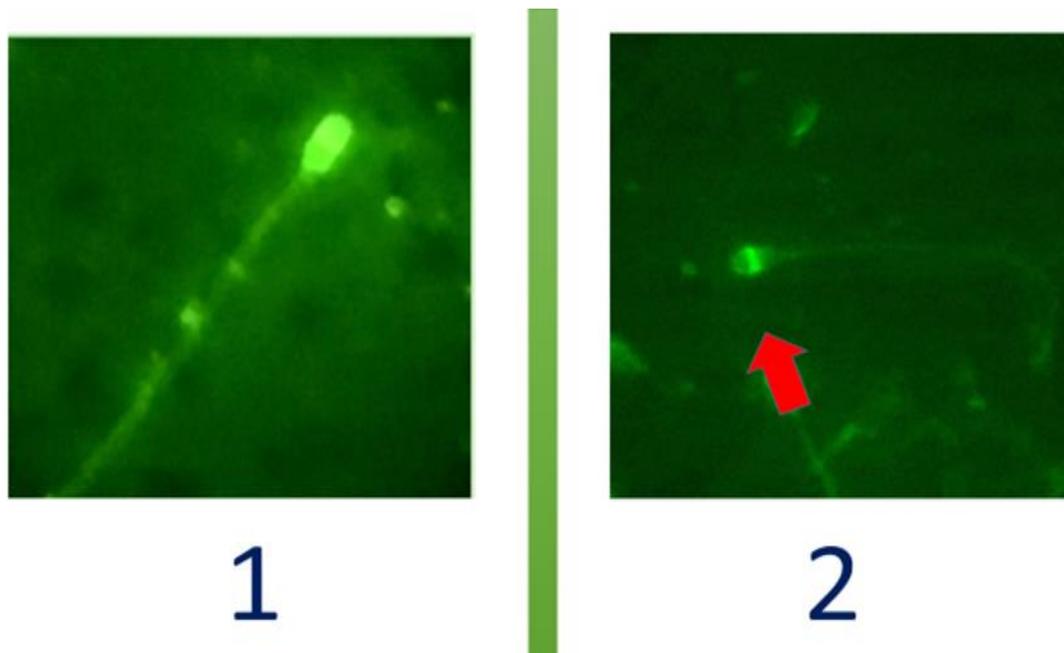


Fig. N° 10: Tipos de positividad de los espermatozoides. 1) Coloración verde manzana en todo el espermatozoide (cabeza, cuello y cola). 2) Coloración verde manzana en la cabeza del espermatozoide, lugar donde correspondería el citoplasma entre el acrosoma y el núcleo.

2). **Cálculo de la sensibilidad y especificidad:** comparando los resultados de la inmunofluorescencia con respecto a los del RT-PCR obtuvimos; verdaderos positivos: 5, falsos positivos: 4, falsos negativos: 3 y verdaderos negativos: 20 (Ver tabla N° 11). La sensibilidad es del 62.5% y la especificidad es de 83.3%. (Ver tabla N° 12)

Tabla N° 11: Tabla de 2x2 para el cálculo de la sensibilidad y especificidad.

		RT-PCR		Total
		Positivos	Negativos	
IF	Positivos	5	4	9
	Negativos	3	20	23
	Total	8	24	32

3). Cálculo de la Razón de Verosimilitud: la razón de verosimilitud positiva: 3.74 y la razón de verosimilitud negativa: 0.45, según interpretación de estos cálculos la prueba de Inmunofluorescencia es considerada regular. (Ver tabla N° 12)

4). Cálculo de los valores predictivos: El valor predictivo positivo: es de 55.5%, El valor predictivo negativo: es de 86.95% y El valor predictivo global es de 78.12%. (Ver tabla N° 12)

Tabla N° 12: Parámetros de calidad para la técnica de inmunofluorescencia para la detección de antígeno del Zika en semen.

Parámetros de calidad	Resultados
Sensibilidad	62.5%
Especificidad	83.3%
Razón de Verosimilitud Positiva	3.74
Razón de Verosimilitud Negativa	0.45
Valor Predictivo Positivo	55.5%
Valor Predictivo Negativo	86.95%
Valor Predictivo Global	78.12%

DISCUSIÓN

En el año 2016 se introdujo el virus del *Zika* en Nicaragua, esto implicó un problema de salud debido a que su sintomatología se parece a otros virus que circulan en el país y la respuesta inmune de tipo humoral produce reacciones cruzadas con otros *Flavivirus*, por esta razón el diagnóstico serológico del dengue colapsó y además, las pruebas de laboratorio para pacientes con sospecha de Zika no existían en el país. La única alternativa disponible a nivel central y en laboratorios especializados fue el RT-PCR, este permite la detección del ARN viral, pero esta prueba tiene muchas desventajas como un alto costo. La contribución de este estudio es el desarrollo de una técnica de inmunofluorescencia que permite observar el antígeno en los espermatozoides.

Para la realización de una técnica es necesario optimizar todos los parámetros, por tal razón la conservación de las muestras de semen es un paso muy importante para que los espermatozoides no sufran cambios bioquímicos que alteren sus estructuras. En el estudio de Garde y cols evaluaron la criopreservación del espermatozoide utilizando el nitrógeno líquido que tiene una temperatura de -196°C para el almacenamiento del semen, dichas condiciones son un desafío en nuestro país, ⁽⁵³⁾ por tanto, tuvimos que experimentar un método que involucrara soluciones de guardado, temperatura y el tiempo en que estarían guardadas. En los tiempos de: 1 hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 1 mes se mantenían los espermatozoides en condiciones estables, es decir, conservaban su estructura morfológica completa, en cambio cuando se realizó la lectura de los 3 meses, la muestra de semen sin tratar y guardada a 4°C se secó debido a los cambios osmóticos y deshidratación, dos de las muestras guardadas a 4°C (semen diluido en PBS 1X y semen lavado y suspendido en PBS 1X) se observaron con levaduras, posiblemente por contaminación del ambiente o por contaminación del paciente durante el muestreo. Esto demuestra que temperaturas superiores al grado de congelación las células sufren una alteración debido a un desequilibrio osmótico entre el espacio intra y extracelular donde el espermatozoide pierde agua con el objetivo de equilibrarse osmóticamente con el medio externo, mientras que temperaturas inferiores como a -80°C mantiene la integración celular de los espermatozoides, ya que disminuye la

actividad metabólica celular prolongando de la vida media de los espermatozoides. ⁽⁵⁴⁾ En este demuestra que las muestras de semen permanecen viables hasta 3 meses a -80°C , otros estudios pueden verificar almacenamientos más prolongados.

La celularidad fue evaluada en pacientes que presentaban una concentración espermática normal ($\geq 15,000,000$ espermatozoides/ml según la OMS)⁽³⁹⁾, por campo en un objetivo de 100X, en la muestra sin diluir se observaba hiper celularidad (agrupación y falta de resolución de estructuras espermáticas), en cambio a una dilución 1:2 (volumen/volumen) se observó buena resolución, es decir, espermatozoides dispersos, estos es importante porque para esta técnica se necesita que las células estén dispuestas, para que los anticuerpos reconozcan al antígeno. No obstante a mayor dilución (1:4, 1:8 y 1:16), se observó hipocelularidad, menor número de espermatozoides que dificultaba la visualización de inmunofluorescencia (Ver Fig. N° 6, pág. 37)

La fijación de las células es un paso muy importante; debido que la célula debe de mantener su estructura y además, adherirse en el portaobjeto al momento de realizar las tinciones y los lavados. La elección del mejor fijador se basó en la observación de la estructura y coloración de los espermatozoides para cada fijador. Cuando utilizamos metanol y acetona los espermatozoides se observaban cristalizados y con una coloración de baja intensidad, teniendo en cuenta que estos 2 fijadores provocan deshidratación y retracción de las células. En cambio, el paraformaldehído al 4% preservaba la estructura celular y les daba una buena intensidad de color, además que este facilita la entrada de los anticuerpos a las células, por tal razón decidimos que el paraformaldehído es el fijador ideal.

La concentración de los anticuerpos es un factor importante; por lo que fue necesario titularlos mediante una serie de diluciones que determinó la concentración óptima que permitió una buena intensidad de fluorescencia, en las diluciones 1/100 y 1/200 tenían una buena intensidad de color, pero se eligió la dilución 1/200 para reducir el consumo de estos



reactivos, en las otras diluciones a medida que se aumentaba de 1/300 hasta 1/600 la intensidad de la fluorescencia era menor y difícil de observar. La probabilidad de una reacción cruzada en nuestro ensayo es nula, debido a que en nuestro país no se ha reportado la circulación de los virus (Nilo occidental, encefalitis japonesa y virus de la fiebre amarilla), que pueden ser reconocidos por el anticuerpo primario, a excepción del virus del Dengue, pero no existe evidencia científica que dicho virus pueda replicarse en células espermáticas.

La tinción de contraste que se utilizó en este ensayo fue el Azul de Evans, considerando que es una solución de contraste universal, además es un colorante muy soluble que se une fácilmente a la albúmina y restos de los componentes celulares, pero tiene como desventaja que tiñe todo y no se pueden diferenciar sus estructuras, cuando se inició con la concentración inicial de 10 gr/ml fue difícil observar los espermatozoide infectados con el color verde manzana, debido a la gran cantidad de contraste que se disipaba en un fondo rojo muy intenso, lo cual esto podía aumentar la cantidad de falsos negativos, mientras que al disminuir la concentración a 0.312 gr/ml se debilitó el fondo pudiéndose observar con mayor intensidad la coloración verde manzana de los espermatozoides infectados.

La presencia de tinciones inespecífica se controla con el proceso de lavado, por tal razón se optimizó los tiempos de lavados con PBS 1X, siendo este uno de los buffers más utilizados por tener propiedades isotónicas y no tóxicas para las células, este paso se determinó con la observación de las láminas que mostraran menos fondos de tinciones inespecíficas, cuando se realiza uno y dos lavados no son tan eficientes debido a la presencia aún de residuos y artefactos que pueden interferir a resultados falsos positivos, en cambio al realizar tres lavados durante cinco minutos la observación era más clara que las anteriores.

En este estudio se evaluó un panel a ciegas que contaba de 32 muestras de semen, al analizar las muestras por RT-PCR, obtuvimos que 11 muestras (34.4%) estaban positivas y 21 muestras (65.6%) estaban negativas, en contraste con el estudio realizado por Atkinson y

cols, en el año 2016 en Reino Unido, quienes evaluaron 23 muestras de semen utilizando RT-PCR, logrando detectar altos niveles de ARN del ZIKV en 13 muestra (56.5%), no fue detectado en 9 muestras (39.1%) y fue indeterminado en 1 muestra (4.4%).⁽⁷⁾

De las 11 muestras positivas por RT-PCR ensayadas en nuestro estudio, 10 resultaron positivas en células espermáticas y solamente una dio positiva en líquido seminal. Esto nos lleva a la deducción de que estas partículas virales se excretan mayormente en los espermatozoides, posiblemente podrían ser infectados antes de convertirse en gametos maduros, quizás el virus infecta a sus células germinativas o espermatogonias en el proceso de la espermatogénesis, situada en los túbulos seminíferos, y por esta razón da una inflamación testicular y en el epidídimo. Esta hipótesis no puede ser confirmada in-vivo, por lo que se necesitan estudios en modelos animales como lo hizo el estudio de Wengiang y cols en el año 2016.⁽⁸⁾

También se estimó el porcentaje de células espermáticas infectadas, en el cual la media es de 1.26% con una desviación estándar de 4.51, este resultado fue comparado con el estudio de Mansuy y cols., el cual obtuvieron una proporción de células espermáticas infectadas de 3.52% con una Desviación Estándar de 0.71 siendo mayor que la nuestra,⁽¹⁴⁾ sin embargo en nuestro estudio se encontró un porcentaje alto en una muestra con el 25.4% células infectadas.

Al momento de observar los espermatozoides positivos, se podían distinguir dos patrones de fluorescencia: 1) Espermatozoides que se observaban color verde manzana en toda su estructura, esto nos hace sospechar que las partículas virales pueden estar adheridas a la membrana plasmática en el exterior y estas no son replicativas. 2) Espermatozoides que solo se observa el color verde manzana en la cabeza, en el cual podríamos deducir que las partículas virales se encuentran en el interior del espermatozoide y al parecer estas pudieran ser replicativas, ya que el virus del Zika es de ARN monocatenario de cadena positiva este

se replica en el citoplasma; si bien los espermatozoides no poseen una gran cantidad de este, pero en la espermiogénesis les queda una pequeña cantidad para envolver al acrosoma (que a la vez este se deriva del aparato de Golgi) y al pronúcleo, pero lo que podría descartar esta posibilidad es que para la replicación viral este necesita retículo endoplásmico, el cual los espermatozoides maduros no poseen. ⁽⁵³⁾ (Ver Fig. N° 10, pág. 45)

Para este estudio se incluyó la persistencia de la excreción viral de 4 pacientes Zika positivos por inmunofluorescencia, en el primer paciente se le detectó el virus el día 7, el segundo hasta el 21 días y el tercer paciente se le detectó hasta el día 28 después de iniciados los síntomas y en el cuarto paciente no fue detectado. Nuestra investigación tiene una similitud con el estudio realizado por Joguet y cols, quienes encontraron ARN del virus en 3 pacientes al día 7, cuatro al día 11 y 20. ⁽¹⁵⁾ Aunque otros autores como Nicastrí y cols, estudiaron infección de Zika en semen encontrando ARN 188 días que equivalen a 6 meses después de la aparición de los síntomas, ⁽¹³⁾ estudios como Mansuy y cols sugieren que la duración de la excreción del virus varía dependiendo de las características del virus y del huésped, ya que ellos investigaron cinco hombres que presentaron la enfermedad de Zika, se evaluaron sus muestras de semen; en dos pacientes el ARN se detectó 69 días y 115 días después del inicio de los síntomas, pero en los otros tres se le detectó hasta el día 20. ⁽¹⁴⁾

La inmunofluorescencia para la detección del antígeno del Zika en semen puede identificar correctamente al 62.5% de los enfermos (Verdaderos Positivos) y el 37.5% de los enfermos (Falsos Negativos) no serán identificados por la prueba, al igual que puede identificar adecuadamente al 83.3% de sanos (Verdaderos Negativos), mientras que el 16.7% de sanos serán (Falsos Positivos). La probabilidad de que si un individuo tiene un resultado positivo, este significa que tiene el 55.5% de probabilidad de que tenga la enfermedad y si obtiene un resultado negativo tiene el 86.95% de probabilidad de no tener la enfermedad y la probabilidad de que sea clasificado correctamente por la prueba es de 78.12%, según la razón de verosimilitud nuestra prueba es considerada como regular; pero esta técnica funciona



porque detecta tanto sanos como enfermos y también puede utilizarse para estudios de investigación.

Este estudio logró poner en perspectiva la utilidad de la inmunofluorescencia como método diagnóstico y de investigación, así como una alternativa en el estudio de otros fluidos corporales como el semen para la detección del virus del *Zika*, por estos motivos esta investigación debe ser considerada como un estudio preliminar, que pueda motivar la realización de estudios futuros.

CONCLUSIONES

1. Los parámetros óptimos para la realización de la inmunofluorescencia para la detección de antígeno de Zika en semen son:
 - a) Temperatura de conservación ideal son de -20°C y -80°C en todas las soluciones ya que en ellas los espermatozoides conservan sus estructuras evaluadas hasta 3 meses.
 - b) La dilución 1:2 con PBS 1X permite una celularidad de 94 ± 10 espermatozoides por campo evaluado con el objetivo de 100X.
 - c) El paraformaldehído al 4% demostró ser la mejor solución de fijación por 5 minutos a 4°C .
 - d) La dilución óptima de los anticuerpos Anti-Flavivirus 4G2 y Alexa Fluor 488 mouse es de 1/200 por 30 minutos de incubación en cámara humedad.
 - e) La mejor concentración del Azul de Evans como tinción de contraste fue de 0.312 gr/ml por 3 minutos a temperatura ambiente.
 - f) El tiempo de lavado fue de 3 lavados por 5 minutos cada uno con PBS 1X.

2. Se obtuvieron 9 (28.1%) muestras positivas por inmunofluorescencia y 11 (34.4%) muestra positivas por RT-PCR. La media de espermatozoides infectados por el virus del Zika es del 1.26% con una Desviación Estándar de 4.51. La excreción de partículas virales en dos pacientes fue detectado hasta el día 28 después de iniciados los síntomas. La Sensibilidad de la prueba es de 62.5% y la Especificidad 83.3%. La Razón de Verosimilitud Positiva es de 3.74 y La Razón de Verosimilitud Negativa es de 0.45. El Valor Predictivo Positivo es de 55.5%, El Valor Predictivo Negativo es de 86.95% y el Valor Predictivo Global es de 78.12%.



RECOMENDACIONES

1. Optimizar la técnica de Inmunofluorescencia para la detección de antígeno del virus del Zika en otros fluidos corporales como: sangre, saliva, orina y secreciones vaginales.
2. Realizar estudios que permitan saber si las partículas virales dentro de los espermatozoides pueden ser infecciosas y replicativas en dicha célula.



BIBLIOGRAFÍA

1. Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G, Purcell RH, Rice CM. 2005. Family Flaviviridae, p 981–998. In *Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic, San Diego, CA
2. Daep CA, Muñoz-Jordán JL, Eugenin EA. Flaviviruses, an expanding threat in public health: focus on dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. *J Neurovirol*. 2014 Dec;20(6):539–60. PMID: 25287260
3. Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ*. E-pub: 9 Feb 2016. doi:BLT.16.171082
4. Musso D, Stramer SL, Busch MP. Zika virus: a new challenge for blood transfusion. 2016. *Lancet* 387:1993–1994.
5. Gornet ME, Bracero NJ, Segurs JH. Zika Virus in Semen: What We Know and What We Need to Know. *Semin Reprod Med*. 2016 Sep; 34(5):285-292. Epub 2016 Sep 14.
6. Adams W, Nelson BR, Stencel-Baerenwald JE, Studhome C, Kapur RP, Armistead B, Walker CL, Merillat S, Vornhagen J. Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain. *Nat Med*. 2018 Mar; 24(3):368-374. doi: 10.1038/nm.4485. Epub 2018 Feb 5.
7. Barry Atkinson, Fiona Thorburn, Christina Petridou, Daniel Bailey, Roger Hewson, Andrew J.H. Simpson, Timothy J.G. Brooks, Emma J. Aarons. Presence and Persistence of Zika Virus RNA in Semen, United Kingdom, 2016
8. Wenqiang Ma, Shihua Li, Shuoqian Ma, Lina Jia, y cols. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. 1 December 2016



9. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastere S, Valour F y cols. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 2014;19:pii: 20720.
10. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS y cols. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360:2536–43.
11. Percivalle E, Zavattoni M, Baldanti F, Rovida F. Zika virus isolation from semen,
12. Musso D, Roche C, Nhan T, Robin E, Teissier A. Detection of Zika virus in Saliva. *Journal of clinical virology* 68, 2015 (53-55).
13. Nicastrì E, Castilletti C, Liuzzi G, Iannetta M, Capobianchi MR, Ippolito G. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Euro Surveill.* 2016;21(32):pii=30314.
14. Mansuy, J. M. y cols. Zika virus in semen and spermatozoa. *Lancet Infect. Dis.* 16, 1106–1107 (2016).
15. Joguet G, Mansuy J, Matusali G, Hamdi S, Walschaerts M, Pavil L. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases.* August 2017.
16. Henry R. Zika virus. *Emerg Infect Dis* 2014; 20:1090.
17. Cao-Lormeau VM. RE: Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20:1085-1086
18. Musso D, Nhan T-X. Emergence of Zika Virus. Vol. 04, *Clinical Microbiology: Open Access.* 2015. p. doi:10.4172/2327– 5073.1000222.
19. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *ClinMicrobiol Infect* 2014; 20:O595-596.
20. Zanoluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *MemInst Oswaldo Cruz* 2015; 110:569-572



21. Fonseca K, Meatherall B, Zarra D, Drebot M, MacDonald J, Pabbaraju K y cols. Case report: First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91:1035-1038.
22. World Health Organization (WHO). Zika virus microcephaly and Guillain-Barrésyndrome-Situation report 31 March 2016. p. 1-13.
23. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ y cols. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1232-1239.
24. Blázquez AB, Escribano-Romero E, Merino-Ramos T, Saiz JC, Martín-Acebes MA. Stress responses in flavivirus-infected cells: Activation of unfolded protein response and autophagy. *Front Microbiol* 2014; 5:1-7
25. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flavivirus entry receptors: An update. *Viruses* 2013; 6:69-88.
26. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy Rm y cols. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1477.
27. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG y cols. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* 2016; 5316:1-7.
28. Ertel KJ, Benefield D, Castaño-Diez D, Pennington JG, Horswill M, den Boon JA, Otegui MS, Ahlquist P. Cryo-electron tomography reveals novel features of a viral RNA replication compartment. 2017 Jun 27;6.
29. Geo F, Karen C, Janet S, Stephan A. Jawetz, Melnick y Adelberg *Microbiología médica*. Editorial: Graw Hill. 25ta edición. 2010 pag 583.
30. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, Santos AAC, Menezes LSR, Cruz SOD y cols. Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. *bioRxiv* 2016; p. 045443.
31. Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, da Rosa AT, Haddow AD y cols. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:880-882.



32. Colt S, Garcia-Casal MN, Peña-Rosas JP y cols. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily fluids: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11:e0005528.
33. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition. 2010.
34. Jedrzejczak K, Silicka M. History of Cell Culture. In *Tech* 2017.
35. Olivera M, Ruíz T, Tarazona A, Giraldo y cols. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista colombiana de ciencias pecuarias. Rev Col CiencPec* Vol. 19:4, 2006.
36. López M, Urbano A, Cárdenas M. Manual de laboratorio para el análisis de semen. Onmia Publisher SL. 2012.
37. Munuce M. El laboratorio andrológico en la evaluación del factor masculino. *Reproducción*. 2008; 23:120- 128.
38. Sarabia L, Munuce M y cols. Nuevos valores para el espermiograma OMS 2010. *Rev. méd. Chile* vol.139 no.4 Santiago abr. 2011
39. World Health Organization. "WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen" Cambridge: Cambridge University. fifth Edition (2010).
40. Arce V., Catalina P., Mall o F Endocrinología. Capítulo: metodología en el laboratorio clínico: el inmunoensayo. Santiago– Chile. Universidad de Santiago de Compostela. 2006:384 – 394.
41. Alegret S, Del Valle M., Merkoçi A y cols. Sensores electroquímicos: introducción a los quimio sensores y bio sensores: curso teórico-práctico. Capítulo sensores electroquímicos. Cataluña-España. Universidad autónoma de Barcelona. 2004: 67 – 80.
42. Koneman E.W., Allen S. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color. Capítulo: Diagnóstico de enfermedades causadas por virus, chlamydia, Rickettsia y microorganismos relacionados. Buenos Aires –Argentina. Editorial Médica Panamericana .2008:1271 – 1291.



43. Siachoque. H.O. Inmunología Diagnóstico e interpretación de pruebas de laboratorio. Capitulo: laboratorio en clínica. Colombia. Editorial. Centro Editorial Universidad de Rosario. 2006:17 –24.
44. Nargessi RD, Landon J. Indirect quenching fluoroimmunoassay. *Methods Enzymol* 1981; 74:60-79.
45. Marrack J. Nature of antibodies. *Nature* 1934; 133: 292-293.
46. Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E. The desmostration of Pneumococcal antigenintissus by use of fluorescense antibody. *J Immunol.* 1942; 45: 159-170.
47. Gómez S, Rueda ArdilaN.S., Gutiérrez M. F. La inmunología en el diagnóstico clínico. Capitulo: relación antígeno-anticuerpo interacción primaria. Bogotá - Colombia. Editorial: CEJA.1994: 73 –120.
48. Montero C. Manual teórico práctico de técnicas inmunohistoquímicas. Capitulo: inicio de los métodos inmunoenzimáticos. México.Editorial Universitaria Potosina.1997: 17 – 20.
49. Tamay D. Ibarra C. Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud.* Vol. 2, Núm. 2 Mayo-Agosto 2013 pp 70-78.
50. Hazbon, M.H.; Alland, D. (2004). Hairpin primers for simplified single-nucleotide polymorphism analysis of Mycobacterium tuberculosis and other organisms. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1236–1242.
51. Bustin, SA. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol*, 25: 169-93.
52. Florkowski, C.M. Sensitivity, specificity, receiver-operating characteristic (ROC) curves and likelihood ratios: Communicating the performance of diagnostic tests. *Clin Biochem Rev.* Volume 29, Issue SUPPL. 1, Pages S83-S87
53. Foster JA, Gerton GL. The acrosomal matrix. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2016; 220; 15-33.
54. Garde J. Congelación de semen en la especie ovina, características biológicas de las dosis congeladas, Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1993, P,P 137.



ANEXOS



Anexo N° 1: Hoja de resultado del espermatograma, cuestionario para el análisis del semen y procedimiento del espermatograma.

Hoja de resultado para análisis de semen.			
			Código: _____
Datos personales:			
Primer y segundo nombre: _____		Ocupación: _____	
Apellidos: _____		Edad: _____	
Estado civil: _____			
Fecha de espécimen: _____ Días desde la última eyaculación: _____ Tiempo de colección: _____			
Tiempo de recepción: _____ Contenedor Std. : SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			
Colección: Masturbación: _____ Otros: _____ Porción perdida: SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>			
pH del espécimen: _____ (7.2-8.0) Color del espécimen: _____			
Viscosidad: _____ Licuefacción: _____			
Datos del semen	Móvil	No- móvil	Rangos de referencia por la OMS 2010
Volumen del semen			> 1.5 mL
Concentración espermática			≥15x10 ⁶ /mL
Total de espermatozoides			≥39x10 ⁶
Progresión	A:	B:	
A: Progresivo rápido B: progresivo			
C: movilidad no progresiva D: inmóviles	C:	D:	
Motilidad porcentual (A+B+C)			≥40%
Motilidad progresiva porcentual (A+B)			≥32%
Porcentaje de No-progresivos e inmóviles(C+D)			
Concentración espermática móvil			
Total de espermatozoides móviles			
Viabilidad			≥58%
Células redondas			≤4.0x10 ⁶ /mL
Leucocitos			negativo
Morfología	Defectos predominantes de cabeza	Defectos predominantes de cola	≥4%
% Normal			
Evaluación: Normal _____ Subnormal _____ Anormal _____			
Comentarios:			
Fecha: _____			



Laboratorio de Microbiología y parasitología UNAN-León.

Cuestionario para el análisis del semen (Espermatograma)

Por favor responder las siguientes preguntas de la mejor manera posible. Recuerde escribir su nombre en la etiqueta del recipiente para la muestra. Código: _____

Fecha: _____
Nombre completo: _____
Pareja: SI ___ NO ___
Celular: _____
Días desde la última eyaculación: _____
Medicamentos: _____
¿Has viajado al Caribe, América Central, Sur América en los últimos 6 meses? SI ___ NO ___

Método de colección.

Tiempo de colección: _____
Lugar de colección: _____
Método de colección: Masturbación: _____ otros: _____
Mientras se tomó la muestra ¿perdió una porción en el contenedor? SI ___ NO ___
Si es si, ¿Qué parte se perdió? Si es si, ¿Cuanto se perdió?
Comenzando Pequeña cantidad
Medio Media cantidad
Fin Gran cantidad

Yo verifico que todos mis datos sean los correctos para la muestra biológica a estudiar.
Firma: _____ Fecha: _____
Especimen recibido por: _____
Tiempo de recepción: _____



Pasos del Espermatograma:

Una vez que el paciente haya obtenido la muestra esta se dejara en incubación a 37°C hasta completar la hora después de la eyaculación. Posteriormente se realizará el examen macroscópico de la siguiente manera:

Licuefacción: se hará por la observación del eyaculado a la hora, esta se reportará como:

1. Muestra normal o licuefacción completa se observará homogénea, aunque pueda que tenga algunos gránulos gelatinosos que no se licuen.
2. Licuefacción incompleta se observará con la presencia de hilos de moco en la muestra.

Aspecto: esta se realizará por una simple inspección del eyaculado a la hora, se reportará de la siguiente manera:

1. Normal: las muestras que tengan una apariencia homogénea gris-opalescente.
2. Marrón: cuando la muestra contenga glóbulos rojos.
3. Amarillenta: este puede ser si el paciente presente ictericia o que consuma algunas vitaminas.

Volumen: este será medido utilizando un cilindro graduado de base cónica

Viscosidad: esta será estimada espirando la muestra con una pipeta Pasteur de 1.5 ml y permitiendo la libre caída de las gotas de semen, se reportará de la siguiente manera:

1. Normal: se observarán gotas pequeñas cayendo y bien definidas.
2. Aumentada: se formará un filamento de más o menos 2 cm de longitud.

Medición del pH: se utilizará cinta HYDRION Test Paperscat #6080, agregándole una gota sobre el papel y se dará lectura a los 30 segundos.

Después se realizará el examen microscópico del semen a la hora, para este se utilizará un microscopio óptico y se evaluará los siguientes parámetros:



Concentración espermática: se utilizará una cámara Makler al que se le agregará una gota de semen, se observará con el objetivo de 20x y se contarán los 100 cuadros y el total de espermatozoides se multiplicará por 10,000.

Motilidad: se leerá en un espacio de la cámara Makler se contarán 200 espermatozoides que se van a dividir en tres grupos dependiendo de las siguientes características y se reportan en porcentajes:

1. Motilidad progresiva rápida (PR): espermatozoides moviéndose activamente, ya sea de forma lineal o círculo grande.
2. Motilidad progresiva (P): movimientos lentos lineales y circulares.
3. Motilidad no progresiva (NP): todos los otros patrones de motilidad con ausencia de progresión. Nadando en pequeños círculos, la fuerza flagelar apenas desplazando la cabeza, o cuando sólo se puede observar un latido flagelar.
4. Inmovilidad: sin movimiento.

Vitalidad: se utilizará la tinción de eosina/nigrosina, se colocará en un portaobjeto 50ul de semen y 50 ul de la solución de tinción y posteriormente se colocará el cubreobjeto, se dará lectura con el objetivo de 40x contando 200 espermatozoides y el resultado será en porcentajes, los espermatozoides se dividirán en dos grupos:

1. Vivos: espermatozoides no teñidos, ya que sus membranas no permiten la entrada del colorante de eosina/nigrosina.
2. Muertos: espermatozoides teñidos de rojo, ya que sus membranas están permeables y están permitiendo la entrada del colorante de eosina/nigrosina.

Concentración leucocitaria: se utilizará para la evaluación de este parámetro el reactivo LeucoScreen LOT: FP16L14. Se preparará la solución de trabajo agregando 30 ul del reactivo 2 a 1 ml del reactivo 1, una vez preparada la solución de trabajo en un portaobjeto se agregará una gota de semen y una gota de solución de trabajo, se cuenta el total de leucocitos y se multiplica por 0.98.

Morfología de los espermatozoides: para esta evaluación se necesitará hacer un frotis, en un portaobjeto se colocará 10 ul de semen y con una lámina extensora en un ángulo de 70° se



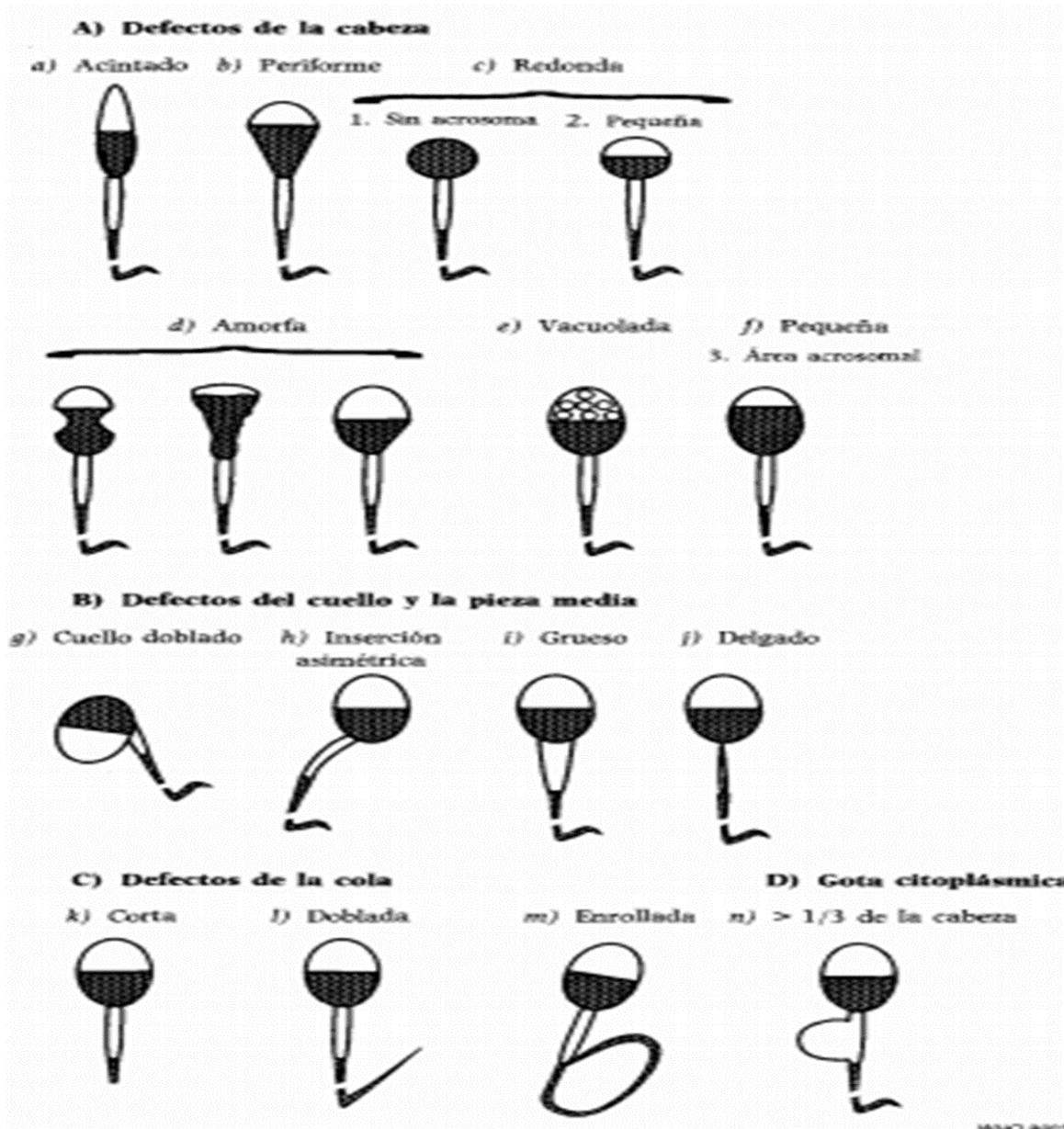
realizará un frotis, luego se dejará secar por 10 minutos aproximadamente y después se procederá a la tinción de la siguiente manera:

- Se fijará la lámina en metanol sumergiéndola 10 veces
- Se sumergirá en azul de metileno 10 veces
- Se sumergirá en eosina 10 veces
- Se sumergirá en agua destilada 10 veces para eliminar el exceso de colorantes.

Luego se dejará secar, se contarán 200 espermatozoides con el objetivo de 100x y se reportarán en porcentajes. Las características de los espermatozoides serán las siguientes:

1. Normales: Para que un espermatozoide sea considerado normal, la cabeza, el cuello, la pieza intermedia y la cola deben ser normales. La cabeza debe ser ovalada. Debe tener una longitud entre 4,0-5,0 μm , tomando en cuenta el cambio de tamaño que induce la fijación y el tejido, y un ancho de 2,5-3,5 μm . El cociente largo/ancho debe ser 1,5 a 1,75.
2. Espermatozoides defectuosos: son 4 categorías, sin embargo, en el reporte se deberá de agregar un comentario de indicando los defectos más frecuentes.
 - Defectos de la cabeza: puede ser grande, pequeña, acintada, piriformes, amorfa y vacuolada, cabezas con área acrosomal pequeña, cabezas dobles y toda combinación entre estos.
 - Defectos del cuello y pieza intermedia: incluyen el cuello "doblado", inserción asimétrica de la pieza intermedia en la cabeza, pieza media gruesa o irregular, pieza media anormalmente fina, por ejemplo, ausencia de la batería de mitocondrias, y toda combinación entre estos.
 - Defectos de la cola: puede ser corta, múltiple, en horquilla, rota, doblada, de espesor irregular, arrollado y toda combinación entre estos.
 - Las gotas citoplasmáticas mayores que un medio de la superficie de la cabeza normal. Las gotas citoplasmáticas se encuentran generalmente en la pieza media.

Nota: Solo se considerarán espermatozoides en el diferencial, las células espermáticas completas, espermatozoides con solo cola o cabeza y células redondas no se deben incluir en el conteo morfológico.





Anexo N° 2: hoja de resultados de PCR e IF.

Estudio: Inmunofluorescencia para la detección del antígeno del Virus del Zika en semen.

Código del panel: _____

Fecha: ___/___/___

Concentración espermática: _____

Resultado del RT-PCR:

Tipo de muestra: Positivo Negativo

Semen: _____ _____

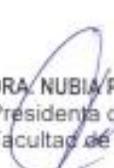
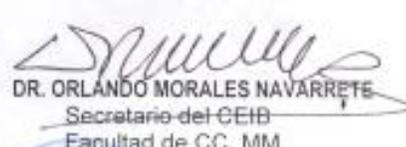
Resultado de la IF:

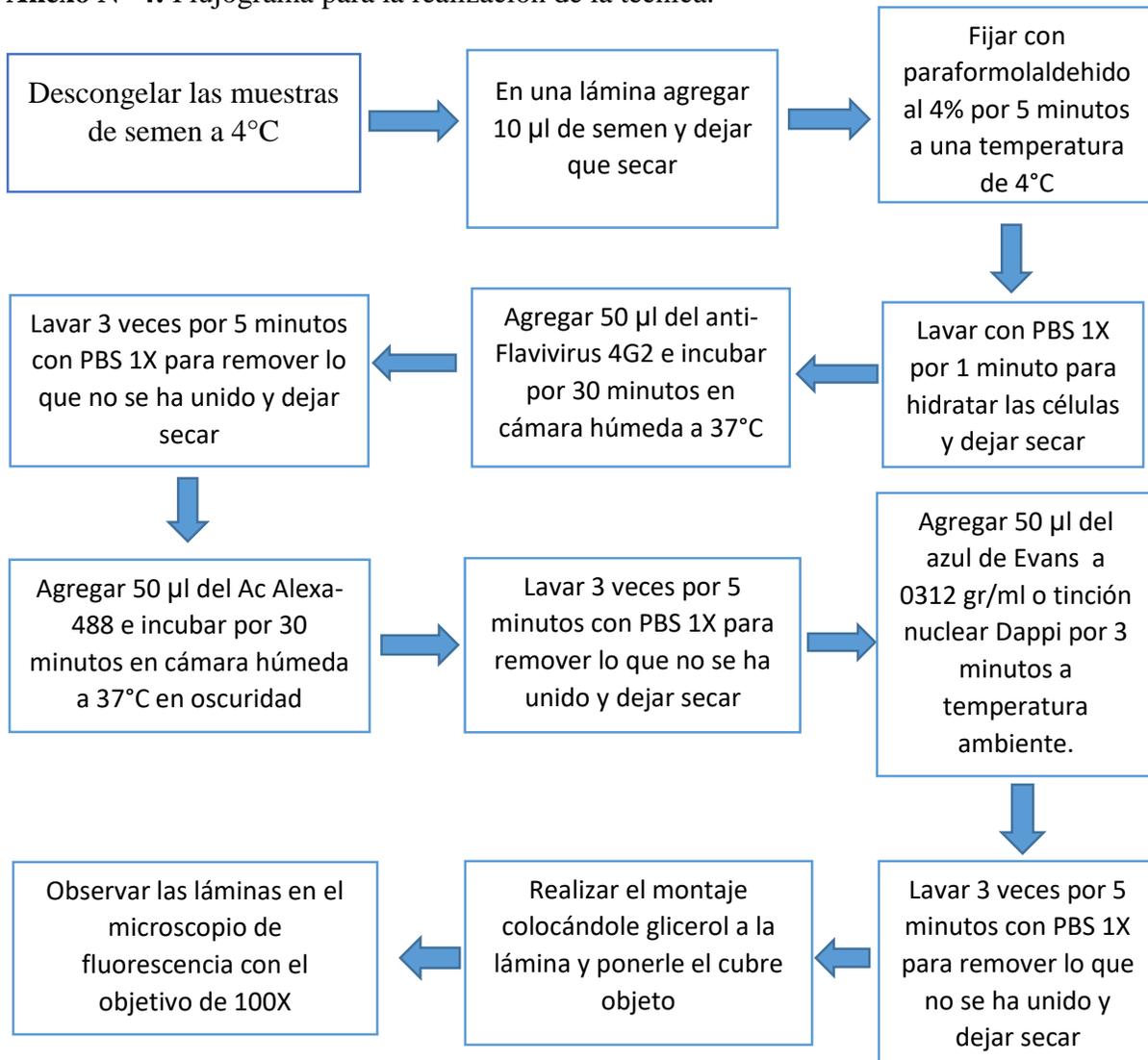
Numero de campo	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		Porcentaje de células	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Tipo de muestra																						
Semen																						

Tipos de muestra: Positivo Negativo

Semen: _____ _____

Anexo N° 3: Acta de aprobación del comité de Ética.

 <p style="text-align: center;">Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua Facultad de Ciencias Médicas UNAN - León</p> <p style="text-align: center;">Comité de Ética para Investigaciones Biomédicas (CEIB) "Dr. Uriel Guevara Guerrero" FWA00004523 / IRB00003342</p>	
<p>Miembros Fundadores</p> <p>Dr. Uriel Guevara Guerrero Médico Patólogo</p> <p>Dr. Jaime Granera Soto Médico y Sacerdote</p> <p>Dra. Nubia Pacheco Solís Médico y Dermatóloga</p> <p>Comité Ejecutivo</p> <p>Dra. Nubia Pacheco Solís Presidenta</p> <p>Dr. Efrén Castellón C. Vice - Presidente</p> <p>Dr. Orlando Morales N. Secretario</p> <p>Miembros alternos</p> <p>Dr. Jorge Alemán Pineda MSc. Ivilla Romero S. Dr. William Ugarte</p>	<p style="text-align: right;">León, 18 de julio del 2017</p> <p style="text-align: center;">ACTA No. 37</p> <p>Dr. Filemón Bucardo Investigador Su Despacho</p> <p>Estimado Doctor:</p> <p>El CEIB le informa que ha recibido misiva de parte suya donde solicita autorización para extender la fecha, por un año más, del trabajo de investigación titulado, "Epidemiología y manifestaciones clínicas de la Infección por Zika en niños y adultos de Nicaragua", el cual fue aprobado en Acta No. 85 en julio del año 2016</p> <p>Este Comité aprueba la extensión de este trabajo de investigación, para cumplir con los requerimientos de las Buenas Prácticas Clínicas, así mismo esperamos que éste no altere en nada al Protocolo original</p> <p>Como Comité de Ética, valoramos muy positivamente la importancia de este trabajo sobre este tema. Copia de esta carta debe estar presente en el Protocolo e informe final. :</p> <p style="text-align: center;">Sin otro particular, nos es grato suscribirnos.</p> <p style="text-align: center;">Atentamente,</p> <p> DRA. NUBIA PACHECO SOLÍS Presidenta del CEIB Facultad de CC. MM.</p> <p> DR. ORLANDO MORALES NAVARRETE Secretario del CEIB Facultad de CC. MM.</p> <p> Dra. Mercedes Cáceres, PhD. Vice Decana Facultad de Ciencias Médicas</p> <p>Cc: Archivo NAPS/rhl</p> <p style="text-align: center;">A la libertad por la Universidad</p>

Anexo N° 4: Flujograma para la realización de la técnica.**Resultados:**

Positivo: cuando se encuentre al menos 1 espermatozoide con fluorescencia verde manzana por 10 campos.

Negativo: no se observa fluorescencia en los espermatozoides.

Anexo N° 5: Cronograma de trabajo.

Actividades	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero
Conservación de la muestra	■	■	■								
Celularidad y fijación			■	■							
Titulación de los anticuerpos				■	■						
Titulación de la tinción de contraste					■						
Tiempo y cantidad de lavado					■	■					
Redacción del protocolo					■	■	■				
Análisis del panel								■	■		
Resultados										■	
Discusión de los resultados										■	■
Informe final											■