

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León

UNAN-León

Facultad de Ciencias Médicas

Departamento de Microbiología y Parasitología

Centro de Enfermedades Infecciosas (CEI)



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MASTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

Tema: Excreción prolongada de virus Zika en diferentes fluidos biológicos de pacientes sintomáticos durante la epidemia de 2016-2018 en León, Nicaragua.

Autor:

Lic. Edwing Daniel Centeno Cuadra

Asistente de Investigación, CEI

Estudiante de Maestría UNAN-León

Tutor:

Filemón Bucardo Rivera PhD.

Profesor Titular UNAN-León

Co-Tutor:

Yaoska Reyes Berrios MSc.

Profesor Asistente UNAN-León

León, Diciembre de 2019

“A la Libertad por la Universidad”



Dedicatoria

A ti **Amalia Cuadra**, madre querida, tú fuiste, eres y siempre serás un ejemplo de vida para mí, eres prueba irrefutable de la superación personal independiente de los demás, pilar de fortaleza inquebrantable ante la adversidad, mar de amor incondicional hacia la familia pero por sobre todo, eres mi más grande evidencia del actuar bien para los demás de manera desinteresada y por el simple hecho de ser lo correcto y para mejorar el mundo en el que todos vivimos, todo lo que he logrado y lo que soy te lo debo enteramente a ti y a quien te inculcó todas estas enseñanzas que me has transmitido a mi ahora, mi hermosa y amada abuelita **Isabel Rocha de Cuadra**.



Agradecimientos

1. A ti, madre querida, gracias por toda la guía que me has dado, por estar siempre ahí para mí aunque no lo pareciera, gracias por ayudarme siempre en todos mis problemas, pero por sobre todo gracias por siempre escucharme y aconsejarme siempre que lo necesité.
2. A mis tutores, Filemón Bucardo y Yaoska Reyes, por llevarme en el camino correcto de la investigación y por ser un ejemplo a seguir de un investigador profesional y unos excelentes mentores durante toda mi preparación académica y profesional.
3. A mi hermano, Louis Cuadra, por ser siempre un pilar de apoyo y de hermandad verdadera ante cualquier situación.
4. A mis amigos, Helder Arriola, Omar Zepeda, Fernando Acosta, Carlos Espinoza e Isaac Guido por mantener mi cordura y mi felicidad cuando estaba decaído.
5. A ti, Katherine Ortega, te agradezco infinitamente por tu amor incondicional, tu apoyo certero, tus consejos acertados y por estar a mi lado durante todo este camino.
6. A mis colegas, por hacer de mí día a día algo placentero y de ambiente agradable en nuestro querido Laboratorio.
7. A los participantes del estudio que permitieron gracias a su participación poder comprender más acerca de esta enfermedad y su comportamiento en la población.
8. A la Universidad de Carolina del Norte (UNC), en particular a los Profesores Sylvia Becker-Dreps, Natalie Bowman, Aravinda de Silva y Matthew Collins. Este estudio se realizó con fondos de NIAID (Grant No. R21 AI129532) and Emerging Challenges in Biomedical Research Awards from UNC-CH.



Resumen

El virus de Zika (ZIKV) es un flavivirus principalmente transmitido de forma vectorial y que pasó desapercibido por mucho tiempo hasta su reaparición en el año 2013 ganando relevancia en el mundo de la salud debido a su rápido esparcimiento y al descubrimiento de su capacidad de infección por contacto sexual; también fue capaz de ser detectado en distintos fluidos biológicos de personas sintomáticas como suero, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, mucosa endocervical, entre otros, demostrando su alto tropismo celular. Se realizó un estudio en la ciudad de León-Nicaragua en el periodo de Enero de 2016 a Febrero 2018 donde se enroló un total de 294 pacientes con síntomas característicos de la enfermedad de Zika para la detección de ARN viral de ZIKV encontrando una positividad en 155 pacientes (52.7%), la edad media de los Zika-Positivos fue de 25.6 años. Las manifestaciones clínicas más comunes fueron fiebre (82.6%), rash (72.3%) y dolor de cabeza (70.3%). Se encontró una disminución estadísticamente significativa en los leucocitos de pacientes Zika-Positivos (6,676/mm³) en comparación con los Zika-Negativos (8,374/mm³) U de Mann-Whitney (p=0.045). Para observar por cuánto tiempo puede ser detectado ZIKV en distintos fluidos biológicos se mantuvo en vigilancia a 39 pacientes Zika-Positivos durante 180 días post infección (DPI) recolectando muestras de sangre, saliva, orina y/o fluido vaginal. ARN viral fue detectado hasta 180 DPI en los distintos fluidos biológicos, siendo la saliva el de mayor positividad durante todo el seguimiento. Anticuerpos preexistentes de tipo IgG anti-ZIKV son mayores en pacientes Zika-Negativos en comparación con los Zika-Positivos (U de Mann-Whitney p=0.037). Se observa tendencia en que títulos bajos de anticuerpos IgG anti-ZIKV aumenta la cantidad de días que el virus es excretado en distintos fluidos biológicos.

Palabras clave: Zika, clínica, hematología, excreción prolongada, anticuerpos.



“Cada uno de nosotros tenemos cosas, pensamientos y descripciones de un increíble universo por el cual los reyes del siglo XVII hubiesen ido a la guerra con tal de poseerlos”

Kary Banks Mullis



Índice

1. Introducción.....	7
2. Antecedentes.....	8
3. Justificación.....	9
4. Pregunta de Investigación.....	10
5. Objetivos.....	11
6. Marco Teórico.....	12
6.1 Epidemiología.....	12
6.2 Transmisión.....	13
6.3 Virus.....	14
6.4 Inmunología.....	17
6.5 Métodos de detección.....	18
6.5.1 Neuroimagenología.....	19
6.5.2 Aislamiento viral.....	19
6.5.3 Pruebas serológicas.....	19
6.5.4 Técnicas Moleculares.....	21
7. Diseño Metodológico.....	22
8. Resultados.....	27
9. Discusión.....	36
10. Conclusión.....	40
11. Recomendaciones.....	41
12. Referencias.....	42
13. Apéndice.....	51



1. Introducción

El virus de Zika (ZIKV) se transmite a los humanos principalmente por medio de la picadura de mosquitos infectados, este se ha aislado de múltiples especies de *Aedes*, sin embargo, solo se ha demostrado que tiene potencial infectivo a los humanos los siguientes: *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus* y *Aedes aegypti* (1). La transmisión directa de ZIKV de persona-a-persona ha sido documentada de casos perinatales, sexuales y a través de lactancia materna o por transfusión sanguínea. ZIKV puede ser contagiado de una madre infectada al feto durante el embarazo, como evidencia no solo se cuenta con la detección del ARN viral en fluido amniótico, orina o suero de las madres cuyos fetos presentaran anomalías cerebrales, sino también al probar la presencia de partículas/proteínas/ARN viral en el cerebro, placenta o suero de los recién nacidos con microcefalia o que hubiesen sido abortados(2-9)

ZIKV es un *Flavivirus* (*Familia Flaviviridae*) al igual que los virus West Nile, Dengue y de la Fiebre Amarilla(10). ZIKV fue aislado por primera vez del plasma de un mono *Rhesus* proveniente del bosque de Zika, en Uganda, en 1947 y su genoma fue completamente secuenciado hasta el año 2006(11, 12). Es un virus envuelto de 50 nm que posee nucleocápside y una bicapa lipídica externa. La nucleocápside interna está compuesta por un ARN viral lineal de sentido positivo de 10,794 nucleótidos y múltiples copias de la proteína de la cápside (C). La bicapa lipídica externa está cubierta de 180 copias de dos compuestos: la proteína de membrana (prM) y la de envoltura (E). El ARN genómico comprende un marco de lectura que codifica para una larga poli-proteína dividida a su vez en 10 proteínas: 3 proteínas estructurales (C, prM, E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). La replicación viral ocurre el citoplasma de la célula infectada(13-15).

Aunque la transmisión vectorial es la predominante, reportes de transmisión de ZIKV a humanos por contacto sexual aparecieron rápidamente y se observó que la excreción del virus en semen podía durar por semanas(16, 17). Modelos animales demostraron que ZIKV puede ser detectado en suero hasta 188 días después de la infección (18). En humanos, ZIKV ARN ha sido detectado en orina hasta 40 días después de presentada la enfermedad, 216 días en suero y hasta 281 días en semen (19, 20).



2. Antecedentes

ZIKV fue aislado por primera vez en 1947 del suero de un mono Rhesus autóctono en el bosque de Zika en la península Entebbe, Uganda durante una vigilancia de Fiebre Amarilla(11). El aislado, MR-766, es la cepa prototipo de ZIKV. La primera enfermedad registrada por infección de ZIKV fue en 1954 durante un brote de ictericia en Nigeria(21). En 2007 ZIKV causa el primer brote de magnitud en la Isla Yap, una parte de los Estados Federales de Micronesia, con un cuadro clínico caracterizado por fiebre, erupción cutánea, conjuntivitis y artralgia(22). Entre 2013 y 2014 ocurre una epidemia de ZIKV en la Polinesia Francesa, donde se estima que aproximadamente el 11% del total de la población necesitaron de asistencia médica debido a sospechas de enfermedad causada por ZIKV(23). A inicios de 2015, la primera transmisión autóctona de ZIKV fue detectada en el Noreste de Brasil(24). En el transcurso del año, la actividad de ZIKV se expandió al menos en 14 estados diferentes del país con un estimado de entre 440,00-1,300,000 casos sospechosos de la enfermedad(25).

En 2013 se reporta un caso de enfermedad de Zika de una turista canadiense que viajó a Tailandia. Se logra aislar ZIKV de sangre, saliva, orina y exudado nasofaríngeo hasta 9 días después de la aparición del primer síntoma(26). En el mismo año se reporta aislamiento viral en suero y leche materna en madres expuestas a la epidemia de la Polinesia francesa hasta 8 días después del parto, y en los recién nacidos se aisló ZIKV en suero y orina en el mismo periodo de observación(27). En 2016 un estudio de cohorte de 184 hombres en edad reproductiva dio como resultado el aislamiento de ZIKV en muestras de orina hasta 60 días después del primer día de síntomas y en semen hasta 281 días después(19). En 2018 se reporta el aislamiento de ZIKV de secreciones vaginales y mucosa endocervical de una mujer en Brasil hasta 31 días después de la presentación del primer síntoma(28). En 2018 en Puerto Rico se reporta excreción prolongada de ZIKV en diferentes fluidos biológicos, resultando en el aislamiento del virus o la detección de ARN viral por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en suero, saliva, orina y fluido vaginal hasta 60 días y en semen hasta 191 días después de la fase aguda de la enfermedad, así mismo, se observó que ZIKV se encuentra de manera más habitual en suero y semen durante un periodo de observación de 180 días ya que se logró detectar en al menos una muestra en un 86% y 80% del total de muestras proporcionadas respectivamente(29).



3. Justificación

La primera descripción de enfermedad causada por ZIKV fue reportada en 1954 por Duffy y colaboradores, desde entonces se mantuvo como una enfermedad esporádica y limitada a la región africana. Fue hasta 2007 que reaparece y se reporta como el primer brote epidémico causado por ZIKV según Lanciotti y colaboradores en las islas Yap. Desde su introducción a América del Sur (Brasil), a inicios de Octubre de 2015, se observa un comportamiento de distribución rápida en el continente, llegando hasta Centroamérica en Diciembre del mismo año. Esto motivó a la comunidad científica a investigar diversos métodos de transmisión ajenos a la vectorial, llegando a determinar que existían distintas vías de transmisión (sexual, materno-fetal y por transfusión sanguínea).

Diversos reportes de aislamiento viral en distintos fluidos biológicos han sido publicados, la mayoría de los modelos investigativos publicados están enfocados en la vía de transmisión sexual y el estudio de semen en hombres en edad reproductiva.

Este estudio tiene como finalidad contribuir a ampliar el conocimiento sobre el comportamiento de ZIKV en pacientes sintomáticos y la excreción viral en diferentes fluidos durante la etapa sintomática de la enfermedad y de manera asintomática de manera prolongada.



4. Pregunta de Investigación

¿Cuál es el tiempo de excreción y la presencia ZIKV en diferentes fluidos biológicos de pacientes que desarrollaron la enfermedad del Zika durante el brote epidémico de 2016-2018 en León, Nicaragua?



5. Objetivos

5.1 General:

- Determinar el tiempo de excreción y la carga viral en diferentes fluidos biológicos de pacientes que desarrollaron la enfermedad del Zika durante el brote epidémico ocurrido en León, Nicaragua, 2016 - 2018.

5.2 Específicos

- Describir las características clínicas, epidemiológicas y hematológicas de los pacientes con diagnóstico molecular de Zika Virus.
- Determinar la presencia del ARN del virus Zika en diferentes fluidos biológicos y el tiempo de excreción en una cohorte de pacientes con diagnóstico molecular de Zika observados durante 6 meses.
- Correlacionar la magnitud de la excreción (días post-infección) del ARN del Zika en los diferentes fluidos con la respuesta serológica (IgG) a Zika.



6. Marco Teórico

6.1 Epidemiología

El primer aislado de ZIKV proveniente de humanos fue detectado en 1954(22). En 1960 más cepas de ZIKV fueron aisladas de Uganda y Nigeria y se logró determinar que ZIKV estaba presente tanto en humanos como en diversas especies de *Aedes* en el Este de África(30, 31). Actualmente se conoce que ZIKV diverge en dos líneas genéticas: Africana y Asiática(32). Todas las cepas epidémicas identificadas en la zona del pacífico y la región de las Américas pertenecen al linaje asiático. En 1977 ocurre un pequeño brote epidémico de 7 casos en Java, Indonesia, posteriormente se realiza un estudio de detección de anticuerpos anti-ZIKV que revelaron altos índices de seroprevalencia (66%), lo que indicaba que las infecciones por el virus pueden estar esparcidas por toda la región sur y sureste de Asia, esto sugería que ZIKV podía haber circulado en estas zonas sin ser detectado (33, 34).

Casi seis décadas después de que se presumía que ZIKV circulaba de manera asintomática, el primer brote aparece en las islas Yap, Micronesia en 2007(22). Al menos 49 casos fueron confirmados, y análisis serológicos sugirieron que aproximadamente el 83% de la población total de Yap estuvo infectada con ZIKV, que es indicativo de la rápida diseminación de este nuevo agente infeccioso en una población inmunológicamente virgen. En 2013, ZIKV asiático causa un brote aun mayor que en la Polinesia francesa(35). Al menos 396 casos confirmados de ZIKV fueron reportados y en general se estima que 29,000 personas fueron infectadas(36). Posteriormente, ZIKV continuó su propagación en el Pacífico causando múltiples brotes en distintas islas aledañas, incluidas las islas Cook, Nueva Caledonia y de Pascuas(37).

Los primeros casos autóctonos confirmados de ZIKV en las Américas fueron identificados en mayo de 2015(38), sin embargo, análisis filogenéticos y moleculares sugieren que ZIKV fue introducido a Brasil entre Mayo y Diciembre de 2013, al menos un año antes de que el primer caso en humanos fuese descrito(39). Para finales de 2016, al menos 48 países y territorios en las Américas fueron afectados, con más de 175,000 casos confirmados por laboratorio de infecciones causadas por ZIKV y un número aún mayor de casos sospechosos(40).



6.2 Transmisión

ZIKV es un arbovirus (arthropode-borne) transmitido por mosquitos, con dos ciclos de transmisión distintos: el ciclo selvático, que se refiere a preservar el virus entre primates no-humanos y los mosquitos arbóreos en la selva; y el ciclo urbano, en el que la transmisión está limitada entre humanos y mosquitos en ciudades urbanas(41). En el ciclo urbano, la transmisión de ZIKV esta mediada predominantemente por dos especies de *Aedes*: *A. aegypti*, diferenciado por su patrón de bandas blancas en sus patas, y *A. albopictus*, caracterizada por una única línea longitudinal blanca en sus patas; de estas dos especies, *A. aegypti* es considerado el vector principal asociado a la transmisión de ZIKV, sin embargo, *A. albopictus* tiene una amplia distribución geográfica en regiones tropicales y templadas, por lo tanto tiene un alto potencial de convertirse en un vector de importancia en las zonas urbanas(42). Tanto *A. aegypti* como *A. albopictus* tienen su pico máximo de actividad durante el día y su tasa de reproducción más alta se registra entre Junio-Octubre de cada año(43).

Existen reportes de contagio de ZIKV durante su manipulación en laboratorios, sin embargo, son esporádicos y están relacionados con la ruptura de protocolos establecidos de protección durante la manipulación de inóculos o fómites(44).

Los primeros registros de la transmisión perinatal datan del primer brote acontecido en la Polinesia Francesa durante diciembre de 2013 y febrero de 2014, con 28 000 casos de personas infectadas, donde se reportaron dos casos documentados de infección por ZIKV en los recién nacidos, asimismo se detectaron cargas de ARN ZIKV por reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa (PCR-RT) en la leche materna, sin embargo, los cultivos específicos fueron negativos(27). Respecto del periodo de lactancia, se menciona que pudiera existir transmisión a través de la leche materna, ya que se ha identificado material viral por PCR-RT, no obstante, al cultivar la leche no se ha reportado positividad. Pese a ello, se recomienda tomar en cuenta la posible transmisión por vía de la lactancia materna(45, 46).

La transmisión por transfusión de hemoderivados fue descrita durante el brote epidémico de la Polinesia francesa, donde se analizaron las unidades de sangre de donación y se detectó ZIKV en



el 2.8% del total de analizados (n=1,505). Actualmente se considera un agente de alto riesgo por su potencial de ser transmitido por trasfusión de hemoderivados, por lo que se recomienda el tamizaje de ZIKV de donadores que vivan en áreas endémicas por técnicas de PCR(47).

La transmisión por contacto sexual ha sido descrita en diversos escenarios. El primer caso de una transmisión no vectorial de ZIKV por contacto sexual se describe en 2013, donde una persona que no había viajado a ninguna zona epidémica presenta un cuadro clínico similar al causado por ZIKV luego de mantener relaciones sexuales con su pareja que había presentado la patología 9 días antes al retornar de Senegal(48). A partir de este punto, diversos estudios empiezan a reportar aislamiento de ZIKV a partir de fluidos seminales. La mayoría de autores reportan transmisión sexual de hombres sintomáticos a mujeres asintomáticas al mantener contacto sexual vaginal sin preservativos (condón) donde se describe un tiempo de ventana de 44 días después de la presentación del cuadro clínico en el hombre (49). Se estima que la transmisión en esta linealidad ocurre entre el día 34 y 41 después del caso índice, asumiendo un tiempo de incubación de 3-12 días (50). Existe un reporte de transmisión sexual de una mujer a un hombre que retornaba de un área epidémica de Zika y mantiene contacto sexual sin protección con su pareja, quien no había viajado a esta zona, siete días después ambos presentan un cuadro clínico de Zika y son diagnosticados por PCR-RT (51). Infección de un hombre a otro también ha sido reportado; en este caso, un hombre retornando de Venezuela que desarrolla un cuadro clínico de Zika, sostiene relaciones sexuales (anal) sin protección con su pareja al retornar a Estados Unidos, una semana después presenta sintomatología de Zika, este caso fue confirmado vía serología ya que los análisis moleculares arrojaban resultados negativos (52).

6.3 Virus

La partícula viral de ZIKV mantiene la estructura general de otras especies de *Flavivirus*. Es esférico con un diámetro entre 42-52 nm. Posee un genoma de ARN de 10.8 kb de longitud lineal de sentido positivo. Su envoltura está formada por una bicapa lipídica que consiste en 180 unidades de glicoproteínas E y M dispuestas de manera icosaédrica; la nucleocápside está conformada por la proteína C (53, 54) (ver Figura 1).

ZIKV es capaz de infectar casi todos los tipos de células cerebrales incluyendo astrocitos, microglías, células endoteliales microvasculares, pericitos, oligodendrocitos y neuronas (55-57). ZIKV también puede infectar el ojo incluyendo la córnea y los nervios ópticos causando uveítis e incluso ceguera (58).

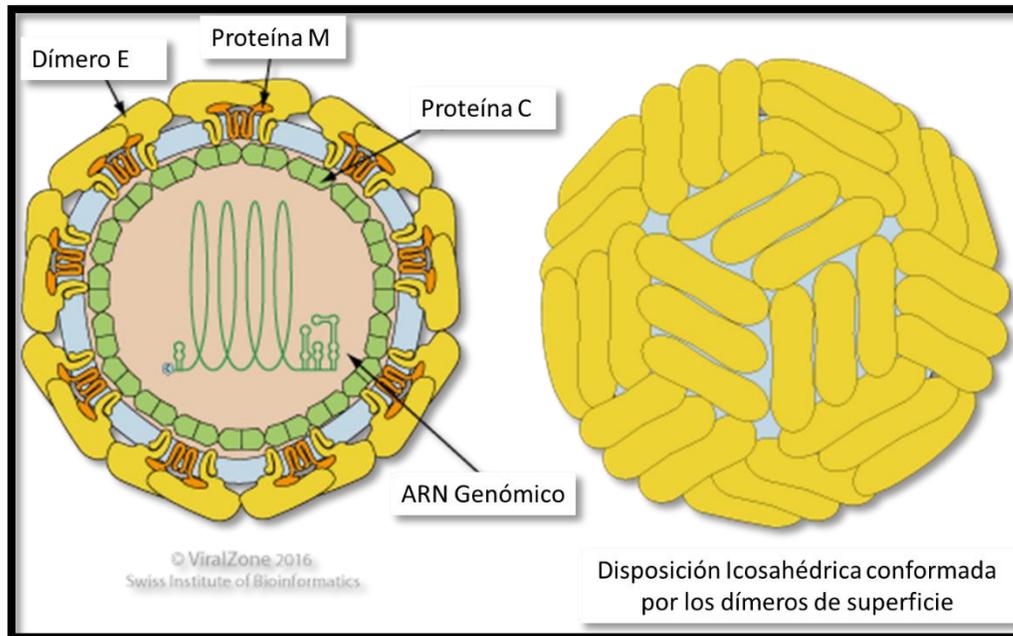


Figura 1. Partícula viral de ZIKV donde se observan las distintas proteínas estructurales y la disposición de la proteína E (Envoltura) para formar la estructura icosaédrica.

Durante la replicación viral, la nucleocápside brota dentro del retículo endoplasmático (ER) para adquirir la capa externa de la membrana recubierta de las glicoproteínas de pre membrana viral (prM) y de envoltura (E). El virión inmaduro es transportado al aparato de Golgi, donde los péptidos pr son anclados a la proteína prM mediante la furin-proteasa de la célula hospedera, es hasta su salida por exocitosis que los pr son liberados y de esta manera se libera el virión maduro (53) (Ver Figura 3).

Las proteínas no estructurales son esenciales para la replicación viral, el ensamblaje del virión y el antagonismo hacia el sistema inmune del hospedero (59). La proteína NS3 tiene múltiples actividades enzimáticas esenciales para la síntesis del ARN viral, es una helicasa-NTP'asa y RTP'asa (60), y la proteína NS5 es esencial para la replicación y funciona como metil-transferasa, guanilil-transferasa y como ARN polimerasa ARN-dependiente (61). El resto de proteínas no

estructurales cooperan en el re-ajustamiento de la membrana del retículo endoplasmático de la célula hospedera para generar paquetes vesiculares virales y así facilitar el proceso de replicación viral regulados por las proteínas NS3 y NS5 (62).

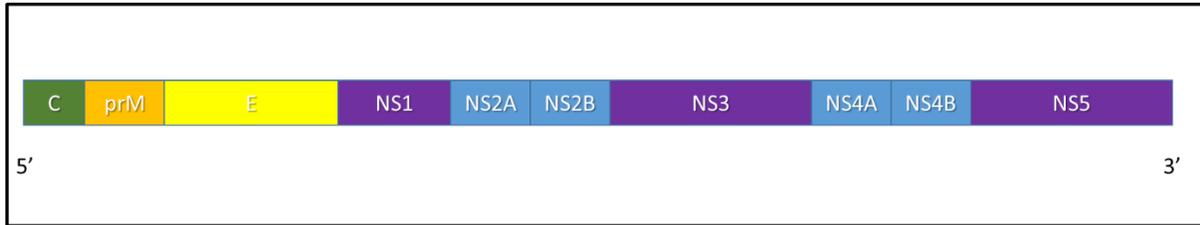


Figura 2. Proteínas codificadas en el genoma de ZIKV, que consta de un total de 10 genes que generan 3 proteínas estructurales: de la cápside (C), de membrana (prM) y de envoltura (E); y 7 proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5.

Múltiples receptores en las superficies de células como DC-SIGN (Dendritic Cell Specific ICAM Grabbing Non-integrin), GRP78/BiP y CD-14 se han propuesto como principales receptores de entrada de *Flavivirus* (63). Actualmente, DC-SIGN, AXL y Tyro3 han sido correlacionados con infección por ZIKV a células renales humanas (HEK)-293 (64).

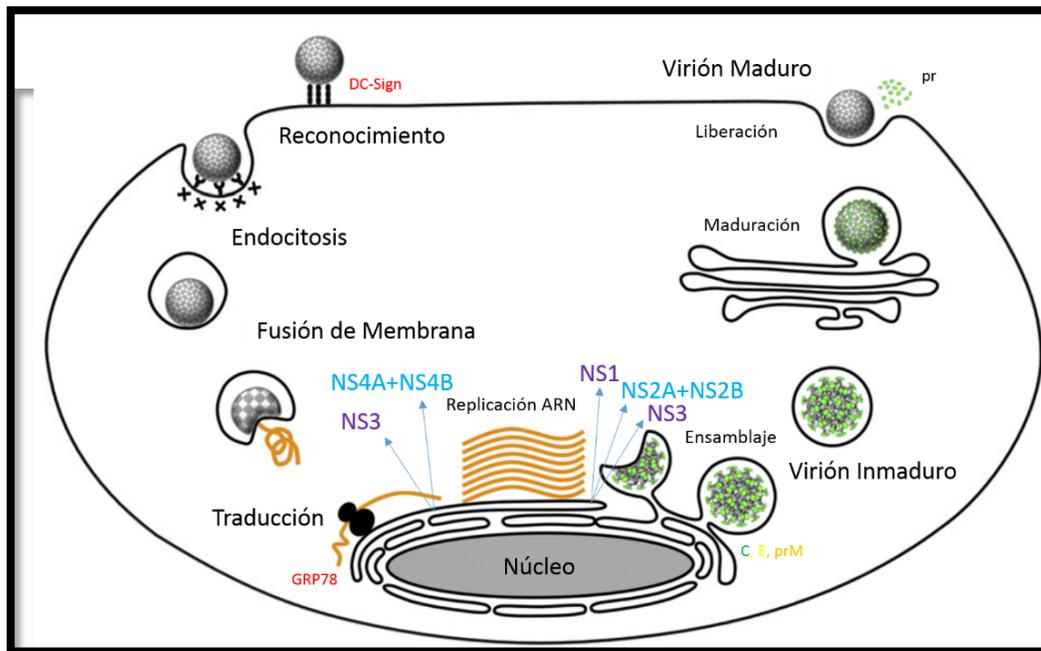


Figura 3. Propuesta de replicación viral de ZIKV. El virus entra a la célula a través de reconocimiento de receptores DC-Sign, posterior a eso llega a retículo endoplasmático reconocimiento el regulador GRP78 y comienza el proceso de traducción, se producen las proteínas estructurales C, E y prM, así como proteínas no estructurales reguladoras de la respuesta inmune de la célula hospedera. El virión inmaduro pasa al proceso de maduración en el aparato de Golgi hasta su liberación por gemación que es completado al liberarse las proteínas pr ancladas a la membrana celular del virión inmaduro. En este momento la partícula viral es completamente infectiva y es capaz de completar el ciclo de transmisión. Actualizado de la fuente: Yun and Lee, 2014



6.4 Inmunología

Antes de los recientes brotes epidémicos, infección por ZIKV era considerada asintomática o como cuadro de fiebre auto limitada y de rápida resolución. El alto rango de tropismo celular, múltiples vías de transmisión y su asociación con diversas patologías a largo plazo han sido reportados a partir de los brotes actuales (65). ZIKV posee tropismo por células cerebrales, particularmente las células progenitoras, lo que conlleva a un deterioro del crecimiento cerebral que puede finalizar en microcefalia y desordenes neuronales (65).

La vía de entrada clásica de ZIKV sucede cuando un mosquito *Aedes* infectado con el virus se alimenta e infecta las células de Langerhans a través de la picadura del vector. Esta célula presentadora de antígeno local migra hacia los nódulos linfáticos locales (LN) e interactúa con células T de respuesta viral específica. Posterior a esto, las células T activadas expresan el receptor de antígenos cutáneos asociados a linfocitos (CLA) y son liberados al torrente sanguíneo (66).

Se ha reportado que ZIKV puede modular tanto la línea de respuesta innata como la adaptativa, sin embargo, ambas no son necesarias para prevenir la enfermedad (67). ZIKV induce la expresión de receptores tipo Toll (principalmente TLR3), RIG-1, MDA5, ISGs y MX1 junto con IFN- β en distintas células(64). Así mismo es capaz de inducir respuesta de células T en modelos de animales, ZIKV fue capaz de sensibilizar células T CD4+ e inducir el fenotipo Th1 mientras que las células T CD8+ se diferenciaron en el fenotipo efector que conllevó a la producción de citoquinas y moléculas citolíticas (68).

Existen distintos mecanismos de evasión de la respuesta inmune por ZIKV descritos. La proteína NS5 actúa sobre la degradación proteosomal de STAT2 y así bloquea la señalización de IFN tipo 1 (59). Las proteínas virales NS1 y NS4B inhiben la activación de IFN- β a nivel de la Tank-binding quinasa (TBK1), una multi-proteína funcional implicada en la respuesta inmune innata y en la apoptosis y la proliferación celular (67). La proteína NS2B en conjunto con NS3 promueve la degradación de la Janus quinasa (JAK1) y la inhibición de la señalización de la misma, esto tiene como consecuencia la inhibición de apoptosis inducida por virus y aumenta la replicación viral de ZIKV. Finalmente, las proteínas NS1 y NS4B inhiben la expresión de INF tipo 1 y la degradación

de NS2B y NS3 suprimen la vía de la autofagia evitando la respuesta a la replicación viral por este mecanismo (69).

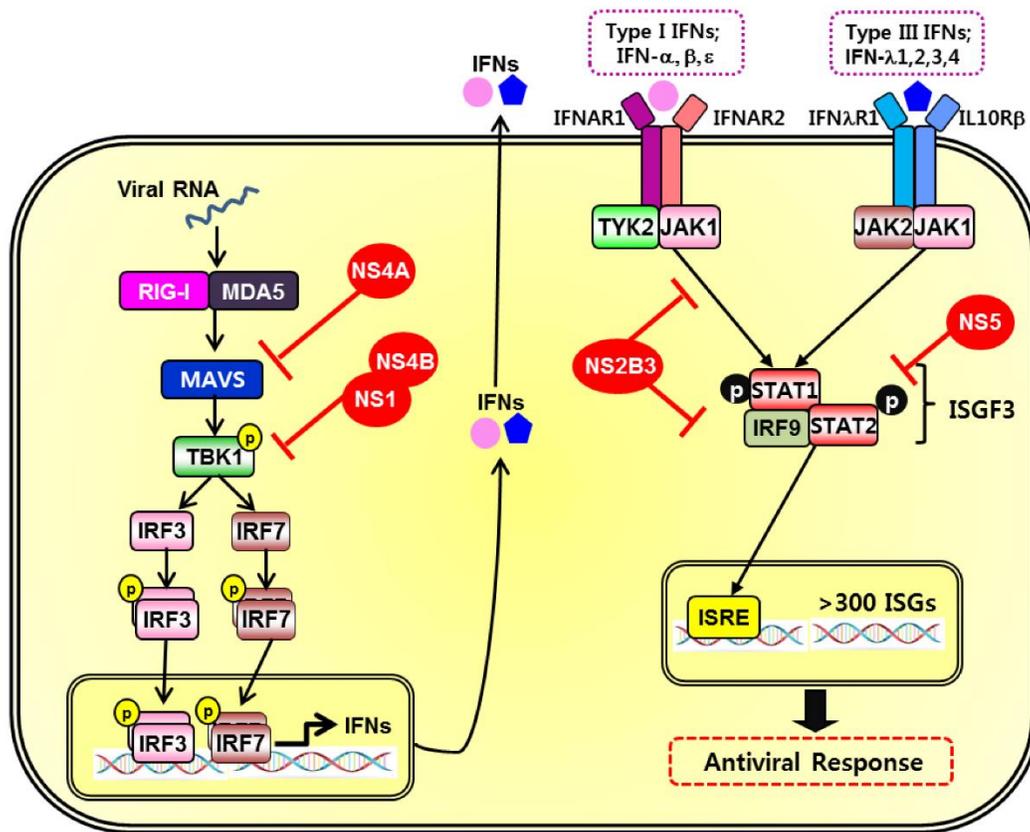


Figura 4. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata por ZIKV. Durante la infección por ZIKV, los sensores de ARN viral y las vías de señalización en cascada mediadas por interferón pueden ser bloqueados como estrategias de evasión de la respuesta inmune. Las proteínas virales, indicadas en color rojo, pueden interferir con la respuesta por Interferón (IFN) al suprimir la inducción a la señalización en distintos puntos de la vía de activación. Fuente: Lee and Shin 2019.(70)

6.5 Métodos de detección

Los signos clínicos de la enfermedad de Zika no son patognomónicos, por tanto, la infección por ZIKV requiere del aislamiento e identificación del virus. El diagnóstico de ZIKV puede estar basada en clínica del paciente, presencia del vector en el área, síndromes neurológicos asociados a ZIKV, evidencia epidemiológica y resultados de pruebas serológicas y moleculares (71). Las muestras clínicas que pueden ser utilizadas para propósitos diagnósticos son suero, cordón umbilical del recién nacido, hisopados nasofaríngeos, saliva, tejido cerebral, fluido amniótico, fluido cerebroespinal y placenta (72).



6.5.1 Neuroimagenología

La tomografía computarizada (TC) e imágenes de resonancia magnética (IMR) son capaces de detectar microcefalia congénita (73). Las anomalías que se pueden detectar durante el periodo de gestación incluyen: atrofia en el parénquima del cerebro con una ventriculomegalia secundaria; calcificación intracraneal; malformaciones durante el desarrollo cortical; hipoglasia de los cuerpos callosos, cerebelo y tallo cerebral.

Otras anomalías descritas asociadas a infección por ZIKV son anomalías oculares y artrogriposis en el feto infectado. Infección post-natal por ZIKV puede evolucionar en un cuadro sintomático o asintomático en el recién nacido y puede llegar a ocasionar anomalías cerebrales conocidas como síndrome congénito de Zika (74). Una característica marcada asociada a infección intra-uterina por ZIKV es la deformación de la cabeza, el cráneo adopta una forma colapsada con suturas revertidas y/o ahuecadas con huesos que sobresalen en la región occipital, lo que lleva a la formación de piel redundante y doblada; la calcificación craneal también debe ser tomada en cuenta durante la evaluación post-natal (75).

6.5.2 Aislamiento viral

Para cultivos *in vitro* de ZIKV las líneas celulares utilizadas son células renales provenientes de monos Rhesus (LLC-192 MK2), y células provenientes de mosquitos (*Aedes albopictus* C6/36, *A. pseudoscutellaris* AP-61) (76). Bajas cargas virales de ZIKV pueden limitar el aislamiento del virus. Un estudio realizado en 2016 utilizó 18 líneas celulares humanas para determinar el potencial de replicación del virus. Los resultados reflejaron que ZIKV puede replicarse en líneas celulares neuronales (SF268), de retina (ARPE19), pulmonares (Hep-2 y HFL), hepáticas (Huh-7), placentarias (JEG-3), musculares (RD) y del colon (Caco-2) (77).

6.5.3 Pruebas serológicas

El monitoreo de anticuerpos IgG e IgM en suero por ELISA es de extrema utilidad para el diagnóstico serológico de ZIKV. La seroconversión (aumento exponencial de cuatro veces el título



de anticuerpos) es confirmada al analizar títulos de anticuerpos en sueros pareados (durante la fase aguda y convaleciente) durante el curso de la infección (72).

La prueba de reducción de neutralización en placa (PRNT) es utilizada para detectar anticuerpos neutralizantes en contra de ZIKV y muestra una baja reactividad cruzada con anticuerpos en contra de otros miembros de *Flavivirus*. PRNT es el “Gold Standard” para la diferenciación de anticuerpos anti-*Flavivirus* debido a que es relativamente específico contra las infecciones primarias por *Flavivirus* (78). El criterio para determinar positividad para infección por ZIKV es que el título de PRNT-ZIKV sean 4 veces mayor que el título PRNT-DENV (22).

Anticuerpos IgM anti-ZIKV son detectables 5 días después del inicio de síntomas y pueden mantenerse en el cuerpo humano por 3 meses (79). ELISA basados en la proteína NS1 de ZIKV fue desarrollado como un diagnóstico adicional que muestra poca reacción cruzada con anticuerpos anti-DENV, estos son capaces de detectar anticuerpos IgM e IgG específicos contra ZIKV, mostrando una sensibilidad de 58.8% y 88.2% respectivamente y combinada de 100%, así mismo muestra una especificidad de 99.8% (80). Un ELISA competitivo desarrollado y testeado en una población sintomática de Zika y confirmado por diagnóstico por PCR-RT dio como resultado que casi el 92% de los sueros analizados marcaban una inhibición igual mayor al 50% (81).

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) de captura de anticuerpos IgM (Zika MAC-ELISA) es un método de análisis usado para casos de emergencia como brotes epidémicos. Esta técnica permite la cuantificación de anticuerpos anti-Zika IgM en muestras de suero y fluido cerebroespinal de pacientes con sospecha clínica de Zika. La interpretación de los resultados está basado en la relación positividad/negatividad (P/N), muestras con valores P/N iguales o mayores de 3 son consideradas como “muestras presuntamente positivas de IgM anti-Zika” (82), por tanto es necesario enviar las muestras a laboratorios certificados capaces de realizar una confirmación del caso sospechoso mediante análisis PRNT, de esta manera se pueden descartar posibles casos de falsos positivos al descartar infecciones de otros *Flavivirus* como Dengue, principalmente en zonas endémicas (83).

Anticuerpos específicos de tipo IgA anti-ZIKV-NS1 también han sido descritos en respuesta contra la infección natural por ZIKV, donde se sabe que son la principal línea de defensa a nivel



de mucosas y para el control de replicación, y por subsiguiente, excreción en fluidos biológicos como lo son saliva y orina. Así mismo, estos tipos de análisis de anticuerpos puede dar un nuevo tipo de diagnóstico de laboratorio con muestras de recolección no invasivas en pacientes sospechosos de padecer la enfermedad de Zika (16).

6.5.4 Técnicas Moleculares

La detección del genoma viral basada en RT-PCR es una prueba sensible y rápida que de preferencia debe ser usada durante la fase aguda de la infección en muestras de suero, saliva, orina, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo (LCR) y muestras de semen (26, 84). RT-PCR ofrece grandes ventajas diagnósticas: rapidez, bajo índice de falsos negativos, alta sensibilidad y especificidad con análisis cuantitativos; este método puede detectar ARN ZIKV en la fase temprana de la enfermedad (85). Varios reportes indican que el fluido preferido para diagnóstico de Zika por RT-PCR debe ser en suero y orina (86), sin embargo, estudios más recientes demuestran que es posible recuperar mayor copias de ZIKV en saliva en comparación de orina y suero, así mismo, demostró que puede utilizarse la sangre completa como muestra base para diagnóstico molecular de ZIKV (87). A pesar de sus altas ventajas en este método, un estudio comparativo de 7 ensayos moleculares reveló 10 potenciales puntos de falla en emparejamientos de primers con el genoma de ZIKV, esto debido a la continua evolución viral que posee este agente lo que conlleva a una reducción de la sensibilidad del método, este estudio reveló que 174 genomas de ZIKV mostraban mutaciones en las regiones diagnósticas utilizadas en la técnica de RT-PCR (88).

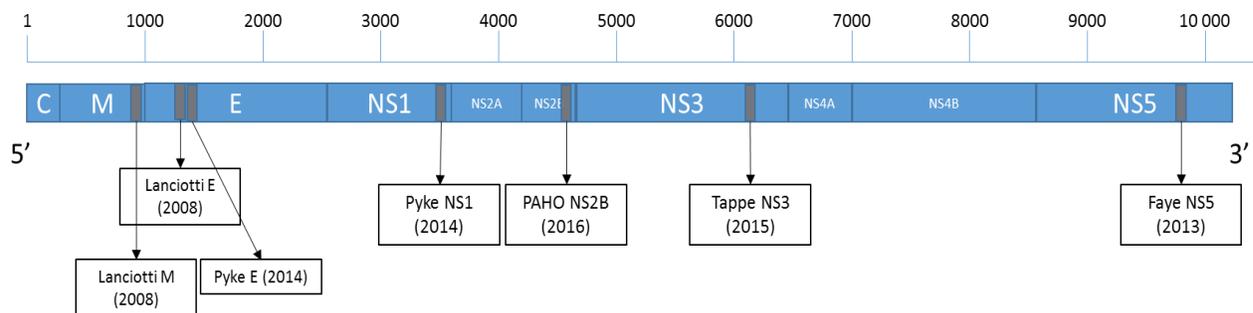


Figura 5. Distintos objetivos en las diferentes técnicas de PCR en tiempo real para la detección de ARN viral de ZIKV.



7. Diseño Metodológico

- **Tipo de Estudio:** Descriptivo de corte transversal
- **Área de Estudio:** Territorios atendidos por los centros de Salud Perla María Norori, Sutiaba, Mántica Berrios, HEODRA y Campus Médico
- **Población de Estudio:** Pacientes febriles con sospecha clínica de Zika (Fiebre, Conjuntivitis no purulenta y/o erupción cutánea).
- **Muestra:** Serán seleccionados todos aquellos pacientes con diagnóstico molecular positivo de ZIKV por RT-PCR (Lanciotti 2008) en cualquiera de los fluidos testeados (sangre, saliva y orina) en los primeros 5 días de presentar el primer síntoma.
- **Criterios de Inclusión:**
 - Pacientes que deseen participar voluntariamente del estudio
 - Pacientes con confirmación diagnóstica de Zika en base a pruebas moleculares
 - Pacientes con residencia permanente, o que permanecerán por lo menos un año, en el área geográfica donde se realiza el estudio
- **Fuente de Información:** Primaria
- **Recolección de Datos:** Los datos serán obtenidos mediante entrevista directa con los pacientes y evaluación en la fase aguda de la enfermedad y por medio de análisis de las muestras biológicas proporcionadas por los mismos.
- **Recolección de muestras:** Se recolectarán muestras de sangre, saliva en la etapa aguda de la enfermedad. Posterior a esto, se realizará un seguimiento de 7, 14, 21, 28, 60, 90 y 180 días después del primer día de sintomatología clínica. Si el paciente acepta donar otros fluidos como esperma, fluido vaginal y/o leche materna también se recolectarán, se separarán las muestras de sangre y orina y se guardarán el plasma y el pellet de las mismas respectivamente y todas las muestras biológicas se guardarán a -20°C hasta su análisis.
- **Análisis de Laboratorio:**
 - ARN viral será extraído de las muestras usando Kit de Extracción de ARN (Qiagen) utilizando el siguiente protocolo:
 - I. Mezclar 560 μL de Buffer AVL + ARN Carrier en 140 μL de Muestra en un Crio vial (Debidamente codificado). Dar Vórtex e incubar a temperatura ambiente por 10 min.
 - II. Agregar 560 μL de Etanol (98%) y dar Vórtex



- III. Agregar 630 μL de la mezcla a una columna de silica y centrifugar a 8000 RPM durante 1 min.
- IV. Pasar la columna a un nuevo tubo recolector. Agregar lo restante de la mezcla a la misma columna y centrifugar a 8000 RPM por 1 min.
- V. Pasar la columna a un nuevo tubo recolector. Agregar 500 μL de Solución de lavado AW1 y centrifugar a 8000 RPM por 1 min.
- VI. Se transfiere la columna a un nuevo tubo y agregar 500 μL de solución de lavado AW2 y centrifugar a 14000 RPM por 3 min para asegurar una eliminación completa de los restos de la solución de lavado de la columna previamente a la elución del ARN viral.
- VII. Transferir la Columna a un tubo Eppendorf de 2 mL y agregar 60 μL de buffer de elución e incubar a temperatura ambiente por un minuto, posterior a esto, centrifugar a 8000 RPM por 1 min.
- VIII. Descartar la Columna y guardar el Tubo Eppendorf con su etiqueta de codificación oficial (que contiene el material genómico purificado) a -20°C hasta su análisis molecular.

Análisis por RT-PCR

La detección de ZIKV mediante RT-PCR será usando el kit AgPath-ID™ One-step RT-PCR Kit (Applied Biosystems P/N AM1005, 4387424, 4387391; esta mezcla contendrá 12.5 μL de Buffer 2x RT-PCR (Ambion® 4388511), 1.0 μL de 25X RT-PCR Enzyme (Ambion® 4388512), 1.67 μL Detection Enhancer (Ambion® 4388513), 0.5 μL Primer Forward (ZikaV 1087), 0.5 μL Primer Reverse (ZikaV1163c), 1 μL de sonda (ZikaV 1108FAM) y 8 μL de ARN viral proveniente del método de extracción previamente descrito, para obtener un volumen final de 25 μL para la detección de los dos genotipos conocidos de ZIKV. Para la detección del genotipo asiático, que fue la cepa circulante en el hemisferio oeste, se utilizarán el primer forward (ZikaV 4481), el primer reverso (ZikaV 4552c) y la sonda (ZikaV 4507cFAM), usando la misma mezcla descrita anteriormente. Todos los primers serán utilizados a una concentración de 10 pmol/ μL .



Tabla 1. Secuencias de Primers para la detección de ARN viral de ZIKV según el protocolo de Lanciotti 2008. ZikaV1087, ZikaV1108FAM y ZikaV1163 son el set de primers más sonda para detectar todos los genotipos de ZIKV; y ZikaV4481, ZikaV4507cFAM y ZikaV4552c son el set de primers más sonda para la detección específica de ZIKV para la cepa Asiática

Primer/Sonda	Secuencia
ZikaV1087	CCGCTGCCCAACACAAG
ZikaV1108FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA
ZikaV1163c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
ZikaV4481	CTGTGGCATGAACCCAATAG
ZikaV4507cFAM	CCACGCTCCAGCTGCAAAGG
ZikaV4552c	ATCCCATAGAGCACCCTCC

El PCR tiempo real se realizará usando un termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems® 275005923). El protocolo de termociclado consiste en dos etapas, la primera en un paso de 30 minutos a 50° C y un paso de 15 segundos a 95° C, posteriormente seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95° C y un paso final de 1 minuto a 60° C.

Las muestras se considerarán positivas si el umbral (ct) es sobrepasado en el ciclo 38 o antes.

Serología.

Las muestras de plasma fueron analizadas para detección de anticuerpos IgG e IgM MAC (CDC) anti-Dengue y anti-Zika usando Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) en las muestras agudas y convaleciente (día 28) para evaluación de la respuesta inmune de los pacientes siguiendo el siguiente protocolo:

Determinación de anticuerpos IgG anti- ZIKV-DENV: Se sensibilizarán las placas con 50 µl de anticuerpo Mab 4G2 diluido 1:1000 (100 ng/pozo) en buffer carbonato y se incubarán a 4°C toda la noche en cámara húmeda. Al día siguiente se lavarán las placas 5 veces con PBS-Tween20 0.05%, se agregarán 100 µl de solución de bloqueo (leche 3% en PBS-Tween 20 0.05%) y se incubarán 1 h a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente se lavarán las placas 5 veces y se agregarán 50 µl por pozo de antígenos Zika 1/2 y 50 µl de antígenos Dengue 1/3 diluido en solución de bloqueo respectivamente y se incubarán a 37°C por 1 hora en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se lavarán las placas 5 veces, se agregarán 50 µl de la muestra por pozo según dilución (1/100 y 1/1000) en solución de bloqueo y se incubarán a 37°C por 1 hora en cámara húmeda. Luego se lavarán las placas 5 veces, se agregarán 50 µl del anticuerpo secundario anti-



IgG humano de cabra conjugado con fosfatasa (Ab) por pozo dilución 1/1000 diluido en solución de bloqueo y se incubarán a 37°C por 1 hora en cámara húmeda. Posteriormente se agregarán 50 µl de sustrato por pozo (El sustrato se prepara con 20ml de agua destilada + 1 tableta dorada + 1 tableta plateada) y se incubarán en oscuridad aproximadamente 10 min a T° ambiente. Finalmente se leerá a una absorbancia a 405 nm. Se consideraran positivos todas aquellas absorbancias con un cut off = \bar{X} del control negativo + 3 SD.

Determinación de anticuerpos IgM anti- ZIKV-DENV: Se realizará de acuerdo al protocolo descrito por el CDC. Se sensibilizarán las placas con 75 µl por pozo de anti- Human IgM 1/50 diluido en buffer carbonato bicarbonato y se incubarán toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se eliminarán los anticuerpos IgM de la placa y se secarán con papel toalla, posteriormente se agregarán 200 µl de solución de bloqueo (Leche 5% + PBS-Tween20 0.05%) y se incubarán por 30 min a T° ambiente. Transcurrido el tiempo se procederán a lavar las placas 3 veces con PBS-Tween20 0.05%, luego se agregarán 50 µl por pozo de las muestras y controles con dilución 1/40 diluido en solución de lavado y se incubarán a 37°C por 1 hora en cámara húmeda. Posteriormente se lavarán las placas 3 veces y se agregarán 50 µl por pozo de antígenos Zika y Normal Vero 81 dilución 1/2 y 50 µl de antígenos Dengue y Normal Vero 81 dilución 1/3 diluido en solución de lavado respectivamente y se incubarán toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se lavarán las placas 3 veces y se agregaran 50 µl del conjugado HRP-Conjugated 6B6C, 1/1000 diluido en solución de bloqueo, y se incubaran 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se lavarán las placas 3 veces, luego se agregarán 75 µl del sustrato (TMB) y se incubarán aproximadamente 15 min a T° ambiente. Posteriormente se agregarán 50 µl de la solución Stop (1N H2SO4) dejando reposar hasta 5 minutos. Finalmente se leerán a una absorbancia de 450 nm tomando tiempos de lectura con intervalos de 5 min entre cada lectura. Se utilizarán los controles positivos y negativos respectivos.

Las muestras se consideran positivas de acuerdo:

Validación del ensayo: cálculo del valor P/N de los controles

$$PN = \frac{\text{Media OD del control positivo con antígeno Zika o DenV (P)}}{\text{Media OD del control negativo con el antígeno del zika (N)}}$$

Si el P/N del control positivo del suero es ≥ 2 , entonces la prueba es válida. Si es < 2 , se debe repetir la prueba.



Cálculo del valor P/N de los sueros del paciente:

$$PN = \frac{\text{Media OD del suero del paciente con antígeno Zika o DenV (P)}}{\text{Media OD del control negativo con el antígeno del zika (N)}}$$

Interpretación:

- Valor de P/N $\geq 3,0$ se consideran presuntos positivos.
- Valor de P/N $\geq 2,0$ pero $< 3,0$ se consideran equívocos.
- Valor de P/N $< 2,0$ se consideran negativos.

Todos los resultados equívocos deben verificarse contra el antígeno normal de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$PN = \frac{\text{Media OD de la muestra con antígeno Zika o DenV (P)}}{\text{Media OD de la muestra con antígeno Vero 81 (N)}}$$

Si el resultado es < 2 , esto indica que el resultado de ese paciente no puede interpretarse.

- **Análisis estadísticos:** Información clínica, epidemiológica y de laboratorio será analizada usando IBM® SPSS® Statistics Version 21 donde se presentaran los resultados en porcentaje, la correlación entre las variables se realizaran usando el modelo paramétrico de regresión logística.
- **Consideraciones éticas:** Este estudio fue revisado y aprobado por comité de ética para investigaciones biomédicas (CEIB) de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua en Acta No. 85, así mismo, fue revisado por la Oficina de Ética de Investigaciones Humanas de la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill bajo Acta No. 16-0541 y aprobado conforme a los estatutos que confiere la ley estatal.



8. Resultados

8.1 Perfil clínico y epidemiológico de la población en estudio

Un total de 294 pacientes con sospecha clínica de infección por ZIKV en base a la triada de síntomas (fiebre, rash y/o conjuntivitis no supurativa) fueron enrolados en el periodo de Enero 2016 a Febrero 2018 en la ciudad de León, Nicaragua; de los cuales 155 (52.7%) fueron confirmados de infección por ZIKV (Zika-Positivos) mediante análisis de RT-PCR en al menos uno de los siguientes fluidos analizados: sangre (30%), saliva (33%), orina (36%)

La mayoría de los participantes, 202 (68.7%) fueron adultos, 190 (64.6%) pertenecían al sexo femenino y 104 (35.4%) eran del sexo masculino; del total de mujeres enroladas, 11 (7.8%) fueron captadas en etapa de gestación. La edad promedio de los participantes fue de 27 años de edad (DS= 17.2, Rango= 1-81). Después de estratificar según el diagnóstico molecular no se observaron diferencias en relación a la edad, sexo y embarazo (ver Tabla. 2).

Tabla 2. Descripción de las características generales de los sujetos enrolados en el estudio.

Característica	Participantes (n= 294)	Zika-Positivos (n=155)
Media de edad †	27.5 (1-81)	25.68 (1-67)
Grupo de Edad	n (%)	n (%)
< 7	29 (9.9)	20 (13)
8 – 15	50 (17.1)	26 (16.9)
16 – 30	106 (36.3)	59 (38.3)
> 30	107 (36.6)	49 (31.8)
Sexo masculino	104 (35.4)	54 (34.8)
Sexo femenino	190 (64.6)	101 (65.2)
Embarazadas §	11 (7.8)	9 (9.6)

† No se fue capaz de conocer la edad de 2 participantes. Análisis realizado con un n=292

§ En el porcentaje mostrado se toma en cuenta solo a mujeres que se encontraban en la mayoría de edad legal (>18 años) n=140.

Según el historial clínico, 51 (19.6%) de los participantes reportaban haber sido diagnosticados clínicamente con una infección previa con el virus del Dengue (DENV), siendo el de tipo febril el más común en 32 (62.7%) de los casos; y 44 (15.2%) con el virus de Chikungunya antes de ser enrolados en el estudio. Un total de 84 (28.5%) participantes presentaban una enfermedad crónica



al momento del ingreso en el estudio, siendo el padecimiento de asma la más predominante (n=15), seguido de diabetes (n=9).

Tabla 3. Historial clínico de los participantes. Información recolectada a partir de entrevista realizada a los participantes al momento de su enrolamiento en el estudio

	Zika-Positivo n=155	Zika-Negativo n=139	OR (IC 95%)	Total
Historial de infección con Dengue	34	17	2.3 (1.2-4.3) p=0.007	51
Historial de infección con Chikungunya	21	23	0.8 (0.4-1.5) p=0.33	44
Cualquier enfermedad crónica	53	31	1.5 (0.8-2.6) p=0.089	84

8.1.1 Manifestaciones clínicas en general.

De los 294 pacientes en estudio, 174 (60.4%) se captaron entre el 3er y 5to día de inicio de los síntomas. No fue posible recolectar la información clínica de 8 pacientes. La presencia de fiebre fue el síntoma más común, presentado en 260 sujetos (88.4%), seguido de dolor de cabeza en 210 (71.4%), artralgia en 179 (60.9%) y rash en 166 (56.5%). Solo 151 (51.4%) pacientes presentaron conjuntivitis no supurativa.

Manifestaciones clínicas de los pacientes con ZIKV. De los 155 pacientes Zika-Positivos, 128 (82.6%) presentaron uno de los síntomas de la triada característica de Zika, siendo más común la fiebre presentada en 128 (82.6%) de los pacientes, seguido de rash en 112 (72.3%) y conjuntivitis no supurativa en 95 (61.3%). Dentro de los otros síntomas presentados, 109 (70.3%) presentaron dolor de cabeza, 92 (59.4%) letargo, 90 (58.1%) artralgia, 79 (51.0%) mialgia, 71 (45.8%) dolor ocular, 63 (40.6%) dolor en la garganta, 56 (36.1%) náuseas y 42 (27.1%) dolor abdominal. (Ver tabla 4). Después de estratificar según el diagnóstico molecular observamos asociación estadística entre la presencia de Zika con los síntomas de Rash, Conjuntivitis y Letargo.



Tabla 4. Descripción clínica de los participantes en el estudio.

Presencia de signos característicos de infección por ZIKV durante la fase aguda - n (%)							
	Total	Zika Positivos	Zika Negativos	Sig. (Unilateral)	OR	Lím. Inferior-Lím. Superior	
Si	209 (73.1)	128	81	<0.0001	3.71	2.116-6.507	
No	77 (26.9)	23	54				
Signos y síntomas al momento de inicio del estudio n/ total n (%)		Zika Positivos	Zika Negativos	Sig. (Unilateral)	OR	Lím Inferior-Lím Superior	
Rash	166/294 (56.5)	112	54	<0.0001	4.308	2.609-7.112	
Conjuntivitis	151/294 (51.4)	95	56	<0.0001	2.419	1.497-3.908	
Letargo	148/294 (50.3)	92	56	0.001	2.200	1.370-3.532	
Dolor de garganta	111/294 (37.8)	63	48	0.161	1.313	0.813-2.119	
Dolor de cabeza	210/294 (71.4)	109	101	0.318	0.848	0.499-1.441	
Artralgia	179/294 (60.9)	90	89	0.185	0.779	0.482-1.259	
Nauseas	116/294 (39.5)	56	60	0.146	0.753	0.468-1.210	
Dolor abdominal	88/294 (29.9)	42	46	0.165	0.754	0.456-1.247	
Mialgia	162/294 (55.1)	79	83	0.096	0.711	0.444-1.138	
Fiebre	260/294 (88.4)	128	132	<0.0001	0.176	0.059-0.526	

‡ No se fue capaz de recolectar esta información de 8 pacientes del estudio

8.1.2 Valoración Hematológica

Se contaba con 260 muestras de sangre venosa de fase aguda del total de 294 participantes, a las cuales se les realizó una Biometría Hemática Completa (BHC). El promedio del conteo de leucocitos en la fase aguda fue de 7,479 (IC 95% 7,039 a 7,919), de eritrocitos fue de 4, 440,723 (IC 95% 4, 357,364 a 4, 524,081) y plaquetas 275,069 (IC 95% 265,757 a 284,380).

Después de estratificar según el diagnóstico molecular se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los conteos de leucocitos totales, porcentaje de hematocrito, porcentaje de linfocitos en el diferencial y el porcentaje de segmentados en el diferencial (Ver Tabla 5).



Tabla 5. Perfil hematológico de los participantes en el momento de captación.

Parámetro de Laboratorio				
Conteo Celular	Total (n=260) Media (Rango)	Zika-Positivo (n=137) Media (Rango)	Zika-Negativo (n=123) Media (Rango)	Sig. (bilateral)*
Leucocitos /mm³	7,479 (2700 - 26,150)	6,676 (2,700 - 23,700)	8,374 (3,300 - 26,150)	<0.0001
Eritrocitos /mm³	4,440,723 (1,820,000 - 9,752,000)	4,404,846 (1,820,000 - 8,570,000)	4,480,682 (2,900,000 - 9,752,000)	0.295
Hematocrito %	38 (13 - 56)	37.63 (13 - 56)	38.42 (25 - 49)	0.045
Hemoglobina/mm³	13.4 (4.0 - 18.5)	13.35 (4.0 - 18.5)	13.45 (9.4 - 17.8)	0.492
Plaquetas/mm³	275,069 (107,000 - 565,000)	266,357 (132,000 - 525,000)	284,772 (107,000 - 565,000)	0.100
Diferencial de Leucocitos %				
Linfocitos	34.7 (4 - 86)	37.9 (4 - 86)	31.1 (4 - 75)	0.001
Segmentados	60 (8 - 93)	56.6 (8 - 93)	63.7 (24 - 92)	0.001
Monocitos	3.32 (0 - 16)	3.2 (0 - 11)	3.3 (0 - 16)	0.815
Eosinófilos	1.38 (0 - 25)	1.3 (0 - 13)	1.3 (0 - 25)	0.125
Basófilos	0.27 (0 - 3)	0.2 (0 - 3)	0.2 (0 - 3)	0.977

* U de Mann-Whitney

Análisis de excreción viral en una cohorte de seguimiento. Del total de los 155 pacientes Zika-Positivos para infección por ZIKV, 39 cumplieron los criterios de inclusión y aceptaron participar en el estudio de seguimiento. La vigilancia se realizó por 180 días después de iniciado los síntomas y se recolectados un total de 750 muestras, incluyendo sangre, saliva, orina, fluido vaginal y semen (ver Figura 6)

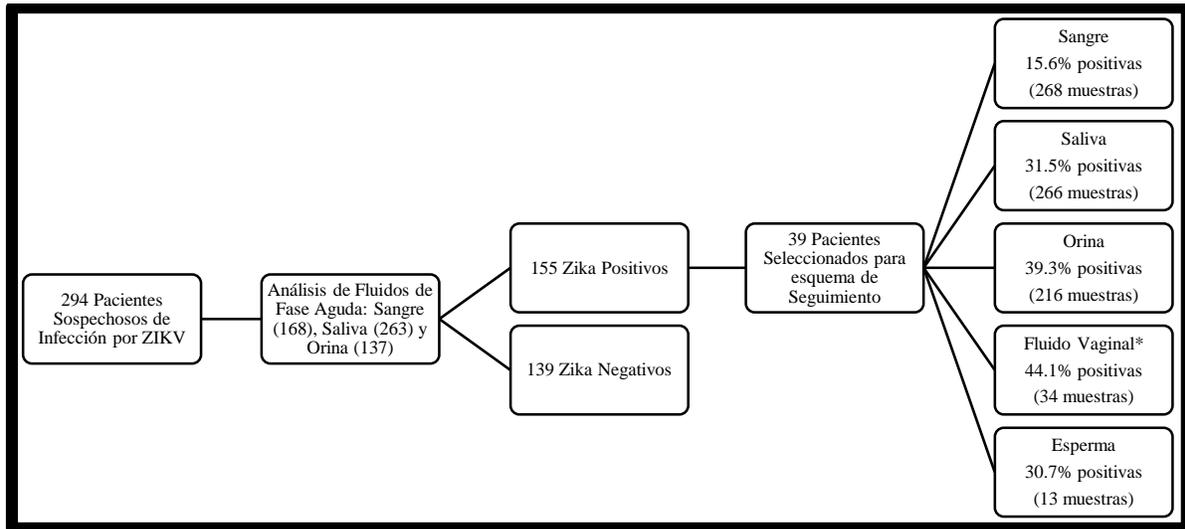


Figura 6. Esquema de seguimiento de los 39 pacientes. *Muestras proporcionadas solo por 12 mujeres.

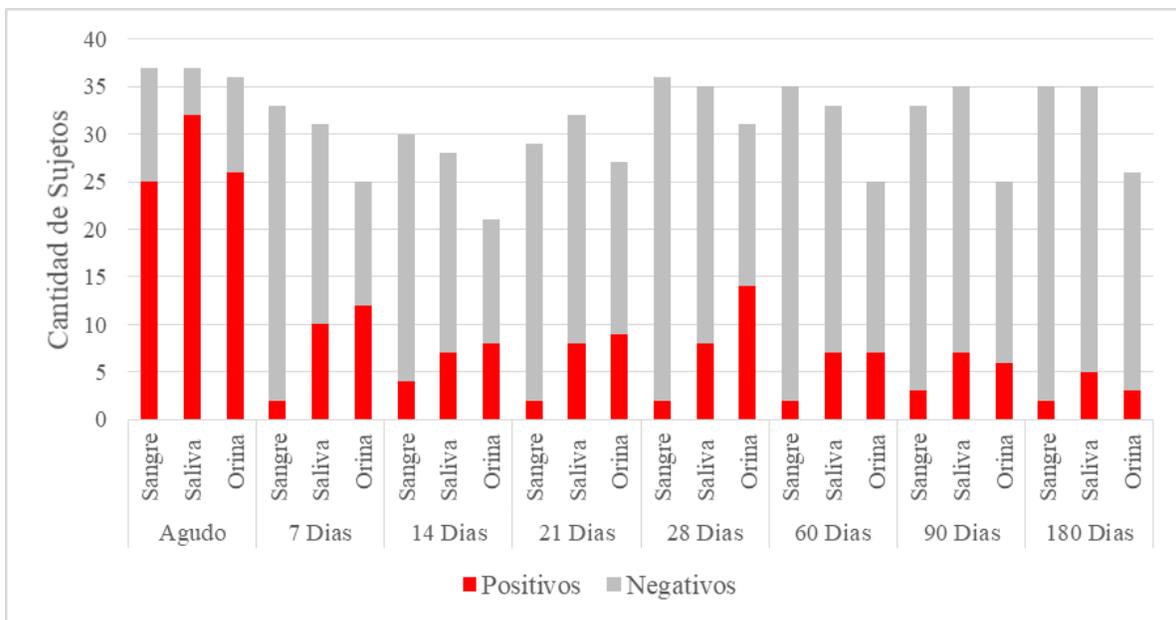


Figura 7. Positividad en los distintos fluidos biológicos recolectados en el esquema de seguimiento de los 39 participantes.

Detección de ZIKV ARN en Sangre. De las 268 muestras de sangre total recolectadas en los pacientes de la cohorte, 42 (15.6%) fueron Zika-Positivas. De los 39 pacientes ZIKV-positivos, 29 (79%) tenían ARN detectable en al menos 1 muestra de sangre y 8 participantes (20.5%) tenían ARN detectable más de una vez. ZIKV fue detectado en todos los días de seguimiento siendo la



fase aguda la de mayor positividad (25/39) seguido de 14 DPI (4/39). En 2 pacientes se observó la presencia de ARN de ZIKV durante 182 días después de iniciados los síntomas (Ver Figura 7).

Detección de ZIKV ARN en Saliva. De las 266 muestras de saliva recolectadas en los pacientes de la cohorte, 84 (31.5%) resultaron positivas. De los 39 pacientes Zika-Positivos, 36 (92.3%) poseían al menos una muestra de saliva positiva para ARN viral y 21 (53.8%) tenían más de una muestra de saliva positiva durante el tiempo de seguimiento. ARN viral fue detectable en todos los días de seguimiento, siendo la fase aguda la de mayor positividad (32/39) seguido de 7 días (10/39); 21 y 28 DPI (8/39); 14, 60 y 90 DPI (7/39) cada uno y 180 DPI (5/39). (Ver Figura 7)

Detección de ZIKV ARN en Orina. Del total de 216 muestras de orina, proporcionadas por los participantes Zika-Positivos de la cohorte 85 (39.3%) resultaron positivas para ZIKV de participantes. De los 39 pacientes Zika-Positivos, 35 (89.7%) poseían al menos una muestra de orina positiva para ARN viral y 24 (61.5%) tenían ARN viral en más de una de las muestras proporcionadas. ARN viral fue detectable en todos los días correspondientes al esquema de seguimiento, siendo mayormente detectado durante la fase aguda de la infección (26/39) seguido de 28 días (14/39), 7 días (12/39), 21 días (9/39), 14 días (8/39), 60 días (7/39) y 90 DPI (6/39). ZIKV fue detectado en 3 pacientes a los 180 DPI. (Ver Figura 7).

Detección de ZIKV ARN en Fluido Vaginal. Un total de 34 muestras fueron proporcionadas por 12 mujeres en edad adulta (5 de ellas estaban gestando) diagnosticadas como Zika-Positivas, resultando en 15 (44.1%) especímenes positivos para la detección de ZIKV. Un total de 9 (75%) de las participantes tenían al menos un muestra de fluido vaginal positiva para ZIKV. Se detectó ARN viral en tres pacientes a los 14 días, en 4 a los 21 días, en 2 a los 28 días, en 2 a los 60 días, en 3 a los 90 días y en 2 pacientes hasta 180 DPI. Solo 2 participantes tuvieron al menos 2 muestras positivas durante el seguimiento y de ellas 1 tuvo positividad en todas las muestras analizadas (n=6) que correspondían desde el día 14 hasta el día 180. Del total de 34 muestras analizadas, 15 (44.1%) resultaron positivas para la detección de ZIKV. De las cinco mujeres embarazadas, 4 tenían al menos una muestra positiva para la detección de ZIKV. No se fue capaz de recolectar muestras biológicas de fluido vaginal durante la fase aguda de la enfermedad.

Detección de ZIKV ARN en Semen. Se les solicitó a los hombres en edad adulta muestras de semen para la detección de ARN viral, solo 4 hombres sintomáticos proporcionaron este fluido para un total de 13 muestras recolectadas y analizadas, de las cuales, 4 (30.7%) fueron positivas



para detección de ZIKV provenientes de 2 pacientes. Las muestras fueron positivas en los días 7, 14, 21 y 28 DPI.

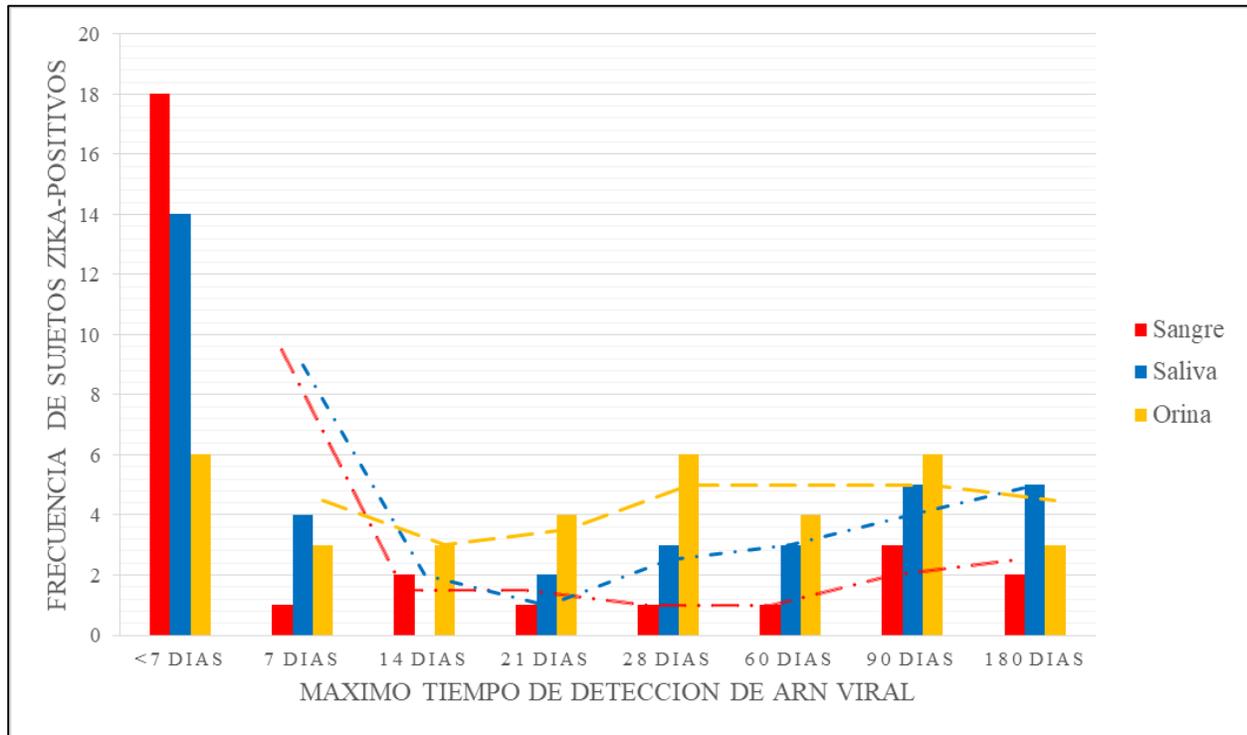


Figura 8. Mayor tiempo de Excreción viral según análisis moleculares (RT-PCR) n=39. Se observa un decaimiento dramático de la positividad con referente a los primeros 7 días de infección (Fase Aguda). Según las líneas de tendencia, el fluido más estable es Orina. ZIKV no fue detectable en Sangre en 10 pacientes, en Orina en 4 pacientes y en Saliva en 3 pacientes durante todo el esquema de seguimiento.

8.2 Respuesta de Anticuerpos IgM

Un total de 113 participantes proporcionaron muestras de sangre pareadas (aguda y convaleciente) para el análisis de seroconversión de IgM específicos contra ZIKV y DENV. Un total de 14 (12.4%) de estos sujetos presentaron infección aguda por ZIKV y otros 8 (7.1%) por DENV, mientras que 16 (14.2%) sujetos presentaron infección simultánea con ambos virus, el resto de los sujetos estudiados (75, 66.4%) fueron IgM-negativo para ambos virus (Ver Tabla 6).

Tabla 6. Respuesta de anticuerpos IgM en base a la fase aguda y convaleciente.

	Frecuencia n=113	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Incremento IgM anti ZIKV	1	0.9	12.4
ZIKV Seroconversión	12	10.6	
ZIKV Positivo	1	0.9	7.1
DENV Positivo	6	5.3	
DENV Seroconversión	2	1.8	



Flavivirus Positivo	6	5.3	14.2
Incremento IgM anti-Flavivirus	2	1.8	
Seroconversión IgM anti-Flavivirus	8	7.1	
DENV y ZIKV Negativo	75	66.4	66.4

Según los análisis realizados y usando un modelo de conclusión basado en la respuesta conjunta de anticuerpos IgG e IgM contra ZIKV y DENV (ver tabla 8), 66 (45.2%) de los participantes no corrían con una infección reciente por flavivirus, 32 (21.9%) presentaban una infección por ZIKV, 8 (5.4%) una infección por DENV y 40 (27.3%) tenían un resultado inconcluso y fueron categorizados como una infección reciente por flavivirus (ver Tabla S1).

8.3 Correlación entre las lecturas de absorbancias de IgG anti-ZIKV y la detección del ARN viral en distintos fluidos biológicos.

Se realizó un análisis usando gráficos de dispersión para relacionar los valores de absorbancia de anticuerpos IgG anti-ZIKV con el mayor tiempo de detección de ARN viral de ZIKV en los distintos fluidos analizados (sangre total, saliva, orina y fluido vaginal). La media de absorbancia de anticuerpos anti-ZIKV en participantes PCR-negativos (n=50) fue de 1.20 (IC 95% 1.00 a 1.41), mientras que en los pacientes PCR-positivos (n=63) fue de 0.92 (IC 95% 0.74 a 1.11); se encontró diferencia significativa de medias entre las poblaciones de ZIKV positivos y Negativos, (U de Mann-Whitney, $p = 0.037$).

Se observó que tanto los pacientes PCR-negativos como los PCR-positivos con excreción viral menor a 20 días post-infección tenían lecturas de absorbancia de IgG ≥ 1.00 , a una dilución de 1:100. En contraste, los pacientes PCR-positivos con excreción de ARN viral de ZIKV por un periodo mayor a 60 días, e incluso por más de 180 días tenían valores de absorbancia IgG < 0.200 . Dichas tendencias fueron muy marcadas para la excreción viral en sangre y orina (Ver Figura 9).

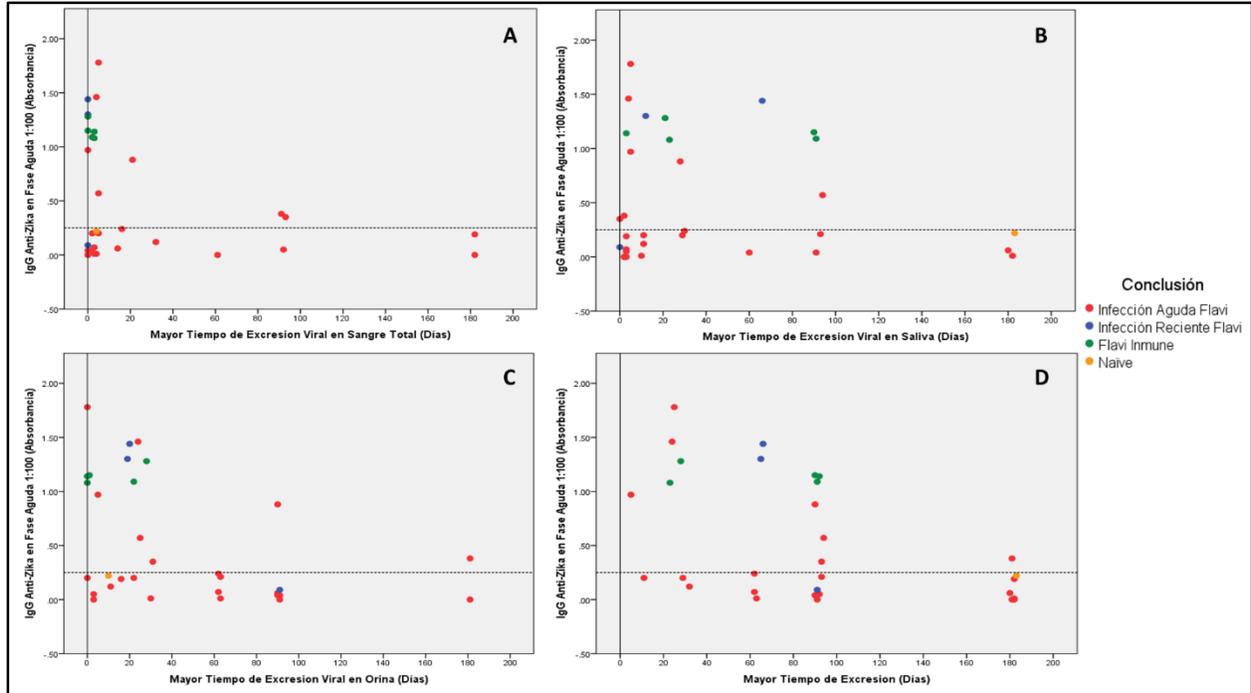


Figura 9. Excreción de ARN viral de ZIKV en base a los títulos de absorbancia de anticuerpos de los pacientes enrolados en el estudio con vigilancia de 180 días $n=39$. Se muestra el tiempo mayor en días en que fue detectado material genómico de ZIKV en Sangre Total (Panel A), Saliva (Panel B), Orina (Panel C) e independientemente del fluido (Panel D). Cada punto representa un paciente en el estudio a quien se le fue clasificado según la conclusión expuesta en Apéndice en la Tabla S2 en base al análisis serológico durante la fase aguda y convaleciente. Los puntos fuera de la línea de origen (eje Y), representan a los pacientes a quienes se les realizó el esquema de seguimiento de 180 días ($n=39$). El valor de corte (eje X), se estableció usando la media de los controles negativos más 3 DS, todos los valores por debajo de este valor son considerados como bajos.



9. Discusión

Durante la etapa aguda de la enfermedad se contabilizaron 294 casos sospechosos de Zika, de los cuales, al menos la mitad (53%) resultaron positivos para la detección de ARN viral, resultados similares fueron observados en la Polinesia Francesa durante el brote de 2014 donde el 53% de los casos fueron confirmados por RT-PCR (89). Así mismo en Brasil (Campo Grande), durante la epidemia del 2016 la frecuencia de detección mediante RT-PCR alcanzó el 27% (69). Los resultados de Puerto Rico indicaron que al inicio de la epidemia se confirmaron el 14% de los casos sospechosos de ZIKV y alcanzaron un pico máximo de 64% de detección a mediados de la epidemia (66). Estos resultados sugieren que el ZIKV puede alcanzar tasas elevadas de transmisión en poblaciones completamente Naïve.

En este estudio se observó que los pacientes Zika-positivos reportaron con mayor frecuencia (OR = 2.3) infecciones clínica previas con DENV en comparación los Zika-negativos, aunque los datos son estadísticamente significativos, deben interpretarse con precaución, estudios en áreas endémicas del DENV sugieren que una infección previa facilita las formas graves de la enfermedad, así que la introducción de un virus antigénicamente similar incita a pensar que dicho fenómeno podría ocurrir después de la introducción de ZIKV (17). También podría pensarse que los anticuerpos de reacción cruzada previenen la infección o la transmisión del ZIKV; resulta interesante que hacia el final de este estudio (diciembre 2017) la frecuencia de detección disminuyó de forma consistente con la adquisición de inmunidad de rebaño (Ver Figura S1).

Una de las observaciones principales de este estudio en términos clínicos es el riesgo asociado con la presentación de los síntomas: rash (OR = 4.3), conjuntivitis no supurativa (OR = 2.4) y letargo (OR = 2.2), lo cual no se relaciona completamente con la triada de síntomas descritos en estudios previos (fiebre, rash y/o conjuntivitis no supurativa). De hecho, el letargo no es tomado en cuenta en las características clínicas de esta enfermedad según previas descripciones de la misma (90). Es importante mencionar que la fiebre no fue una característica clínica asociada al ZIKV en este estudio, mientras que otros síntomas como letargo parecen tener mayor importancia ya que el riesgo se aumenta hasta 2 veces de ser padecido durante la fase aguda de la enfermedad, muy cercano al riesgo de presencia del síntoma más característico de infección por ZIKV en la fase aguda, que es la conjuntivitis no supurativa, así mismo, el porcentaje de padecimiento del letargo fue presentado casi en igual medida por los pacientes Zika-Positivos (61.2%) (2, 22, 27).



Con respecto a la valoración hematológica, cabe destacar la diferencia que existe en el conteo total de leucocitos, que era menor en los pacientes Zika-Positivos (6,676/mm³) con respecto a los Zika-Negativos (8,374/mm³), no podemos asegurar que hay una disminución patológica, pero existe un decrecimiento con respecto a los Zika-Negativos. También observamos que de los 50 (17.2%) pacientes leucopénicos (<4500 leucocitos/mm³), 39 (78%) eran Zika-Positivos, por tanto, es correcto decir que la infección por ZIKV provoca una deducción en el conteo de glóbulos blancos totales. Estudios previos revelaron que existe una reducción en monocitos CD14+ durante la infección aguda por ZIKV (84) lo que sugiere a estas como un tipo de célula blanco para este virus, esto podría explicar porque las poblaciones de leucocitos disminuyen pero no a un nivel patológico que pueda ser considerado como leucopenia ya que los monocitos solo representan de un 2 al 8% de la población total de células blancas.

Los análisis de la cohorte sobre excreción de ZIKV revelaron que, el ARN viral puede detectarse en sangre, saliva, orina y fluido vaginal hasta 6 meses después de iniciado los síntomas, mientras que en semen solo se detectó hasta los 28 días. Nuestros resultados difieren de estudios realizados previamente en cohortes de seguimiento similares a la nuestra realizadas en Puerto Rico y en Florida, donde se analizaron estos mismos especímenes y solo se logró detectar ZIKV no por más de 20 días y 60 días respectivamente ya fuese en saliva, orina y/o fluido vaginal (88, 91). Esto implica que la dinámica de excreción viral varía con respecto al tiempo y cada tipo de paciente, por tanto los tiempos de excreción máxima de ZIKV aún no pueden ser determinados.

Durante la fase aguda la mayoría de los participantes (56.8%) que resultaron positivos fue por la detección de ARN viral en muestras de saliva, seguido de la detección en sangre (32.3%) y orina (31.6%). Según las recomendaciones del CDC, el tipo de muestra biológica de preferencia a usar para el diagnóstico de ZIKV mediante ensayos moleculares son orina y plasma (92), nuestros resultados no concuerdan con esas recomendaciones ya que el fluido con menos positividad para diagnóstico por infección aguda fue el de orina. De hecho, en esta cohorte el espécimen de mayor positividad fue saliva tanto en la fase aguda como al final de la vigilancia, por tanto es importante que se tome en cuenta este fluido biológico como potencial muestra de análisis para el diagnóstico de infección por ZIKV. (Ver figura 7).

El porcentaje mayor de los participantes tuvo un aclaramiento viral en sangre en menos de siete días (46.1%), en saliva durante más de 28 días (41.0%) y en orina por más de 28 días (48.7%)



después de presentado el primer síntoma. Esto indica que el fluido biológico en el que más se mantiene ZIKV de manera detectable es en Saliva, de hecho al hacer un análisis más profundo, la mayoría de participantes que mantuvieron ARN viral detectable por más tiempo (>180 días post-infección) fue en Saliva (5/39), a diferencia de reportes previos en Puerto Rico donde solo a un 5% de los participantes se les detectó la presencia de ARN viral en este espécimen no por más de 60 días después de presentado el primer síntoma (91).

Cabe destacar que nuestro estudio reflejó un alto porcentaje de positividad de ZIKV en orina (39.3%) y no es comparable con la cohorte de Puerto Rico (93) donde se encontró solamente el 1% de positividad en muestras recolectadas después de 60 días de iniciados los síntomas, ya que este estudio realizado en Nicaragua reporta 20% de positividad en el mismo periodo. Dichas diferencias pueden estar asociadas con aspectos étnicos, forma de recolección y análisis de la muestra, por ejemplo, durante la optimización de nuestro protocolo de laboratorio encontramos que la detección de ZIKV en pellet de orina fue más frecuente que en el sobrenadante de la misma y usando el espécimen completo (datos no mostrados).

Al realizar la búsqueda de ARN ZIKV en fluido vaginal pudimos ser capaces de detectar el virus en mujeres adultas hasta 180 días post-infección (DPI), este estudio revela un tiempo mayor de excreción viral en este espécimen ya que otros autores solo han sido capaces de detectarlo no por más de 60 DPI y en una sola persona (91, 94), así mismo, la dinámica de excreción viral es única en cada paciente, ya que algunas mujeres solo presentaban presencia de ARN ZIKV en 1 o 2 muestras durante todo el seguimiento, es pertinente señalar que 4/5 mujeres embarazadas presentaron presencia de ARN viral en los distintos días de vigilancia y que una de ellas mantuvo persistencia viral desde el día 14 hasta el 180 post-infección. Estudios previos han evidenciado la transmisión vertical al feto de ZIKV (73), por tanto el tiempo de riesgo de infección congénita se aumenta durante un embarazo planificado o no.

Al realizar el esquema de dispersión es curioso observar que aquellos pacientes que mantuvieron una excreción prolongada de ZIKV en diferentes fluidos también tenían bajas lecturas de absorbancia de anticuerpos IgG anti-ZIKV en plasma. Esto sugiere que la respuesta inmune de tipo humoral y los anticuerpos preexistentes contra ZIKV juegan un rol importante en el proceso de aclaramiento viral tanto en sangre como en orina, pero no en saliva. Quizás se debe a que la respuesta inmunológica en este sitio anatómico es principalmente por IgA, pero esta solo mantiene



una respuesta contra el patógeno durante corto tiempo después de la infección. En concordancia con esta sugerencia aparece la evidencia encontrada en dos pacientes que cursaban con una infección por este virus, los cuales presentaban un pico máximo de expresión anticuerpos IgA anti-NS1 de ZIKV a los 11 DPI para luego decaer al día 14 (16). El decaimiento de la respuesta de IgA en el día 14 DPI es consecuente con el incremento de ARN viral en los días subsecuentes (Ver Figura 8).

Tomando lo anterior en cuenta, se puede pensar que el tipo de respuesta inmunológica más eficaz contra ZIKV es la de tipo humoral. De hecho, al observar la Figura 9, es evidente que la cantidad de anticuerpos durante la fase aguda juegan un rol importante en la excreción viral, es decir, altas cantidades de anticuerpos IgG específicos contra ZIKV parecen contener la excreción viral prolongada.

La principal implicación de este estudio en términos de salud pública es que demostramos la posibilidad de excreción viral por aproximadamente 6 meses en diferentes fluidos, lo que podría facilitar la transmisión, no solamente de forma vectorial, pero también de forma sexual o transfusional. Otro dato relevante en relación a la excreción prolongada en términos de diagnóstico molecular es que afecta su capacidad de identificación de la fase aguda de la enfermedad.



10. Conclusión

- Se encontró una prevalencia de 52.7% de positividad para ZIKV en pacientes que presentaban un cuadro febril con sospecha clínica de enfermedad de Zika. El riesgo de presentar los siguientes síntomas en pacientes Zika-Positivos fueron: Rash (OR=4.3), Conjuntivitis no Supurativa (OR=2.4) y Letargo (OR=2.2). Existe una disminución estadísticamente significativa en los conteos totales de leucocitos en los pacientes Zika-Positivos en relación con los Zika-Negativos (U de Mann-Whitney $p < 0.001$)

- ARN viral de ZIKV fue detectado hasta 180 días en los distintos fluidos biológicos (Sangre, Saliva, Orina y Fluido Vaginal), siendo la saliva el de mayor positividad durante todo el seguimiento.

- Altos niveles de anticuerpos IgG anti-ZIKV pre-existentes, medidos mediante ELISA, tienen correlación con el aclaramiento viral en los distintos fluidos biológicos.



11. Recomendaciones

- Debido a los hallazgos, creemos que es necesario mejorar el diagnóstico de la enfermedad de Zika usando un análisis conjunto de pruebas serológicas junto a análisis moleculares para develar cuales son las infecciones primarias agudas reales por ZIKV.
- Ya que logramos observar la presencia del virus hasta 180 días post-infección en los distintos fluidos biológicos testeados, es recomendable aumentar el tiempo de vigilancia de excreción prolongada para reconocer cual es el tiempo máximo de presencia viral en el cuerpo humano debido a una infección aguda por ZIKV.
- Es necesario realizar estudios de cultivo celular para dilucidar si las partículas virales detectables en los distintos fluidos tienen capacidad infectiva para otras personas, ya sea por contacto directo o por ingesta de los mismos.
- Creemos que es pertinente realizar análisis de anticuerpos específicos anti-ZIKV de tipo IgA en saliva y orina para comprender más sobre la respuesta inmunológica que se da en estos sitios anatómicos donde el virus es más persistente y sostiene una dinámica diferente a la observada en sangre.
- En términos de salud pública este estudio sugiere incluir el tamizaje de ZIKV en la donación de sangre, evitar la planificación de un embarazo y la utilización de preservativos para evitar el contagio sexual al menos durante los próximos 6 meses después de la infección.



12. Referencias

1. Boyer S, Calvez E, Chouin-Carneiro T, Diallo D, Failloux A-B. An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes and Infection*. 2018 2018/12/01/;20(11):646-60.
2. Brasil P, Pereira JP, Jr., Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *The New England journal of medicine*. 2016 Dec 15;375(24):2321-34. PubMed PMID: 26943629. Pubmed Central PMCID: PMC5323261. Epub 2016/03/05. eng.
3. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016 Jun;16(6):653-60. PubMed PMID: 26897108. Epub 2016/02/22. eng.
4. Driggers RW, Ho CY, Korhonen EM, Kuivanen S, Jaaskelainen AJ, Smura T, et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *The New England journal of medicine*. 2016 Jun 2;374(22):2142-51. PubMed PMID: 27028667. Epub 2016/03/31. eng.
5. Jouannic JM, Friszer S, Leparc-Goffart I, Garel C, Eyrolle-Guignot D. Zika virus infection in French Polynesia. *Lancet (London, England)*. 2016 Mar 12;387(10023):1051-2. PubMed PMID: 26944027. Epub 2016/03/06. eng.
6. Meaney-Delman D, Hills SL, Williams C, Galang RR, Iyengar P, Hennenfent AK, et al. Zika Virus Infection Among U.S. Pregnant Travelers - August 2015-February 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016 Mar 4;65(8):211-4. PubMed PMID: 26938703. Epub 2016/03/05. eng.
7. Oliveira Melo AS, Malinge G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2016 Jan;47(1):6-7. PubMed PMID: 26731034. Epub 2016/01/06. eng.
8. Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, do Rosario MS, Costa F, Archanjo G, et al. Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Feb;10(2):e0004517. PubMed PMID: 26914330. Pubmed Central PMCID: PMC4767410. Epub 2016/02/26. eng.
9. Villamil-Gomez WE, Mendoza-Guete A, Villalobos E, Gonzalez-Arismendy E, Uribe-Garcia AM, Castellanos JE, et al. Diagnosis, management and follow-up of pregnant women with Zika virus infection: A preliminary report of the ZIKERNCOL cohort study on Sincelejo, Colombia. *Travel medicine and infectious disease*. 2016 Mar-Apr;14(2):155-8. PubMed PMID: 26960750. Epub 2016/03/11. eng.



10. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of virology*. 1998 Jan;72(1):73-83. PubMed PMID: 9420202. Pubmed Central PMCID: PMC109351. Epub 1998/01/07. eng.
11. Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1952 1952/09/01;46(5):509-20.
12. Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of virology*. 2007;152(4):687-96. PubMed PMID: 17195954. Epub 2007/01/02. eng.
13. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases*. 2008 Aug;14(8):1232-9. PubMed PMID: 18680646. Pubmed Central PMCID: PMC2600394. Epub 2008/08/06. eng.
14. Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JVC, Diallo M, et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(1):e2636.
15. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(2):e1477.
16. Zhao LZ, Hong WX, Wang J, Yu L, Hu FY, Qiu S, et al. Kinetics of antigen-specific IgM/IgG/IgA antibody responses during Zika virus natural infection in two patients. *Journal of medical virology*. 2019 May;91(5):872-6. PubMed PMID: 30485459. Epub 2018/11/30. eng.
17. Oliveira RA, de Oliveira-Filho EF, Fernandes AI, Brito CA, Marques ET, Tenorio MC, et al. Previous dengue or Zika virus exposure can drive to infection enhancement or neutralisation of other flaviviruses. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2019;114:e190098. PubMed PMID: 31411310. Pubmed Central PMCID: 6690646.
18. Aubry M, Kama M, Henderson AD, Teissier A, Vanhomwegen J, Mariteragi-Helle T, et al. Low chikungunya virus seroprevalence two years after emergence in Fiji. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2019 Nov 2;90:223-5. PubMed PMID: 31689529.
19. Aubry M, Mapotoeke M, Teissier A, Paoaafaite T, Dumas-Chastang E, Giard M, et al. Dengue virus serotype 2 (DENV-2) outbreak, French Polynesia, 2019. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2019 Jul;24(29). PubMed PMID: 31339095. Pubmed Central PMCID: 6652116.
20. Richard V, Cao-Lormeau VM. Mosquito vectors of arboviruses in French Polynesia. *New microbes and new infections*. 2019 Sep;31:100569. PubMed PMID: 31316821. Pubmed Central PMCID: 6611972.



21. Kama M, Aubry M, Naivalu T, Vanhomwegen J, Mariteragi-Helle T, Teissier A, et al. Sustained Low-Level Transmission of Zika and Chikungunya Viruses after Emergence in the Fiji Islands. *Emerging infectious diseases*. 2019 Aug;25(8):1535-8. PubMed PMID: 31310218. Pubmed Central PMCID: 6649350.
22. Baidaliuk A, Miot EF, Lequime S, Moltini-Conclois I, Delaigue F, Dabo S, et al. Cell-Fusing Agent Virus Reduces Arbovirus Dissemination in *Aedes aegypti* Mosquitoes In Vivo. *Journal of virology*. 2019 Sep 15;93(18). PubMed PMID: 31243123. Pubmed Central PMCID: 6714787.
23. Aubry M, Cao-Lormeau VM. History of arthropod-borne virus infections in French Polynesia. *New microbes and new infections*. 2019 May;29:100513. PubMed PMID: 30899520. Pubmed Central PMCID: 6407142.
24. Aubry M, Kama M, Vanhomwegen J, Teissier A, Mariteragi-Helle T, Hue S, et al. Ross River Virus Antibody Prevalence, Fiji Islands, 2013-2015. *Emerging infectious diseases*. 2019 Apr;25(4):827-30. PubMed PMID: 30882332. Pubmed Central PMCID: 6433005.
25. Subissi L, Dub T, Besnard M, Mariteragi-Helle T, Nhan T, Lutringer-Magnin D, et al. Zika Virus Infection during Pregnancy and Effects on Early Childhood Development, French Polynesia, 2013-2016. *Emerging infectious diseases*. 2018 Oct;24(10):1850-8. PubMed PMID: 30226164. Pubmed Central PMCID: 6154169.
26. Mitchell PK, Mier YT-RL, Biggerstaff BJ, Delorey MJ, Aubry M, Cao-Lormeau VM, et al. Reassessing Serosurvey-Based Estimates of the Symptomatic Proportion of Zika Virus Infections. *American journal of epidemiology*. 2019 Jan 1;188(1):206-13. PubMed PMID: 30165474. Pubmed Central PMCID: 6321808.
27. Kucharski AJ, Kama M, Watson CH, Aubry M, Funk S, Henderson AD, et al. Using paired serology and surveillance data to quantify dengue transmission and control during a large outbreak in Fiji. *eLife*. 2018 Aug 14;7. PubMed PMID: 30103854. Pubmed Central PMCID: 6092126.
28. Calvez E, Mousson L, Vazeille M, O'Connor O, Cao-Lormeau VM, Mathieu-Daude F, et al. Zika virus outbreak in the Pacific: Vector competence of regional vectors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Jul;12(7):e0006637. PubMed PMID: 30016372. Pubmed Central PMCID: 6063428.
29. Musso D, Rodriguez-Morales AJ, Levi JE, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ. Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America. *The Lancet Infectious diseases*. 2018 Nov;18(11):e355-e61. PubMed PMID: 29934112.
30. Pettersson JH, Bohlin J, Dupont-Rouzeyrol M, Brynildsrud OB, Alfsnes K, Cao-Lormeau VM, et al. Re-visiting the evolution, dispersal and epidemiology of Zika virus in Asia. *Emerging microbes & infections*. 2018 May 9;7(1):79. PubMed PMID: 29739925. Pubmed Central PMCID: 5940881.
31. Musso D, Cao-Lormeau VM. Is the Zika threat over? *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2018 Jun;24(6):566-7. PubMed PMID: 29549059.



32. Lequime S, Richard V, Cao-Lormeau VM, Lambrechts L. Full-genome dengue virus sequencing in mosquito saliva shows lack of convergent positive selection during transmission by *Aedes aegypti*. *Virus evolution*. 2017 Jul;3(2):vex031. PubMed PMID: 29497564. Pubmed Central PMCID: 5782851.
33. Aubry M, Teissier A, Huart M, Merceron S, Vanhomwegen J, Mapotoeke M, et al. Seroprevalence of Dengue and Chikungunya Virus Antibodies, French Polynesia, 2014-2015. *Emerging infectious diseases*. 2018 Mar;24(3):558-61. PubMed PMID: 29460745. Pubmed Central PMCID: 5823337.
34. Dupont-Rouzeyrol M, Diancourt L, Calvez E, Vandenbergert M, O'Connor O, Teissier A, et al. Zika virus evolution on the edges of the Pacific ocean. *Emerging microbes & infections*. 2017 Dec 13;6(12):e111. PubMed PMID: 29235552. Pubmed Central PMCID: 5750458.
35. Subissi L, Daudens-Vaysse E, Cassadou S, Ledrans M, Bompard P, Gustave J, et al. Revising rates of asymptomatic Zika virus infection based on sentinel surveillance data from French Overseas Territories. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2017 Dec;65:116-8. PubMed PMID: 29081369.
36. Aubry M, Teissier A, Huart M, Merceron S, Vanhomwegen J, Roche C, et al. Ross River Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014-2015. *Emerging infectious diseases*. 2017 Oct;23(10):1751-3. PubMed PMID: 28930020. Pubmed Central PMCID: 5621548.
37. Calvez E, Guillaumot L, Girault D, Richard V, O'Connor O, Paoaafaite T, et al. Dengue-1 virus and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from New Caledonia. *Parasites & vectors*. 2017 Aug 9;10(1):381. PubMed PMID: 28793920. Pubmed Central PMCID: 5551013.
38. Gerardin P, Cao-Lormeau VM, Tournebize P, Cerny T. Letter re: Acute Zika infection with concurrent onset of Guillain-Barré syndrome. *Neurology*. 2017 May 9;88(19):1874. PubMed PMID: 28483991.
39. Richard V, Paoaafaite T, Cao-Lormeau VM. Acquittal of *Culex quinquefasciatus* in transmitting Zika virus during the French Polynesian outbreak. *Acta tropica*. 2017 Sep;173:200-1. PubMed PMID: 28476603.
40. Aubry M, Teissier Y, Mapotoeke M, Teissier A, Giard M, Musso D, et al. High risk of dengue type 2 outbreak in French Polynesia, 2017. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2017 Apr 6;22(14). PubMed PMID: 28422007. Pubmed Central PMCID: 5388125.
41. Andronico A, Dorleans F, Ferge JL, Salje H, Ghawche F, Signate A, et al. Real-Time Assessment of Health-Care Requirements During the Zika Virus Epidemic in Martinique. *American journal of epidemiology*. 2017 Nov 15;186(10):1194-203. PubMed PMID: 28200111. Pubmed Central PMCID: 5860153.



42. Lau C, Aubry M, Musso D, Teissier A, Paulous S, Despres P, et al. New evidence for endemic circulation of Ross River virus in the Pacific Islands and the potential for emergence. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2017 Apr;57:73-6. PubMed PMID: 28188934.
43. Gerardin P, Cao-Lormeau VM, Musso D, Despres P, Besnard M. Zika rash and increased risk of congenital brain abnormalities. *Lancet (London, England)*. 2017 Jan 14;389(10065):151-2. PubMed PMID: 28102133.
44. Aubry M, Teissier A, Huart M, Merceron S, Vanhomwegen J, Roche C, et al. Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014-2015. *Emerging infectious diseases*. 2017 Apr;23(4):669-72. PubMed PMID: 28084987. Pubmed Central PMCID: 5367400.
45. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell reports*. 2017 Jan 10;18(2):324-33. PubMed PMID: 28076778.
46. Champagne C, Salthouse DG, Paul R, Cao-Lormeau VM, Roche B, Cazelles B. Structure in the variability of the basic reproductive number (R0) for Zika epidemics in the Pacific islands. *eLife*. 2016 Nov 29;5. PubMed PMID: 27897973. Pubmed Central PMCID: 5262383.
47. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, et al. Erratum: Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. 2016 Nov 10;539(7628):314. PubMed PMID: 27626374.
48. Richard V, Paoaafaite T, Cao-Lormeau VM. Vector Competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Sep;10(9):e0005024. PubMed PMID: 27654962. Pubmed Central PMCID: 5031459.
49. Fontanet A, Cao-Lormeau VM, Dub T, Mallet HP, Ghawche F. Association between Guillain-Barre syndrome and Zika virus infection - Authors' reply. *Lancet (London, England)*. 2016 Jun 25;387(10038):2600. PubMed PMID: 27353817.
50. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nature immunology*. 2016 Sep;17(9):1102-8. PubMed PMID: 27339099. Pubmed Central PMCID: 4994874.
51. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, et al. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. 2016 Aug 4;536(7614):48-53. PubMed PMID: 27338953.
52. Richard V, Paoaafaite T, Cao-Lormeau VM. Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* Populations from French Polynesia for Chikungunya Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 May;10(5):e0004694. PubMed PMID: 27144888. Pubmed Central PMCID: 4856362.



53. Cao-Lormeau VM. Tropical Islands as New Hubs for Emerging Arboviruses. *Emerging infectious diseases*. 2016 May;22(5):913-5. PubMed PMID: 27088243. Pubmed Central PMCID: 4861506.
54. Aubry M, Finke J, Teissier A, Roche C, Broult J, Paulous S, et al. Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011-2013. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2015 Dec;41:11-2. PubMed PMID: 26482390.
55. Cao-Lormeau VM. In response. *Emerging infectious diseases*. 2014 Nov;20(11):1960. PubMed PMID: 25513658. Pubmed Central PMCID: 4214324.
56. Cao-Lormeau VM, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet (London, England)*. 2014 Nov 1;384(9954):1571-2. PubMed PMID: 25443481.
57. Nhan TX, Claverie A, Roche C, Teissier A, Colleuil M, Baudet JM, et al. Chikungunya virus imported into French Polynesia, 2014. *Emerging infectious diseases*. 2014 Oct;20(10):1773-4. PubMed PMID: 25271852. Pubmed Central PMCID: 4193187.
58. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014 Oct;20(10):O595-6. PubMed PMID: 24909208.
59. Richard V, Viallon J, Cao-Lormeau VM. Use of Centrifugal Filter Devices to Concentrate Dengue Virus in Mosquito per os Infection Experiments. *PloS one*. 2015;10(9):e0138161. PubMed PMID: 26372347. Pubmed Central PMCID: 4570664.
60. Musso D, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *Lancet (London, England)*. 2015 Jul 18;386(9990):243-4. PubMed PMID: 26194519.
61. Aubry M, Finke J, Teissier A, Roche C, Broult J, Paulous S, et al. Silent Circulation of Ross River Virus in French Polynesia. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2015 Aug;37:19-24. PubMed PMID: 26086687.
62. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of virology*. 2015 Sep;89(17):8880-96. PubMed PMID: 26085147. Pubmed Central PMCID: 4524089.
63. Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Detection of Zika virus in saliva. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2015 Jul;68:53-5. PubMed PMID: 26071336.
64. Aubry M, Teissier A, Roche C, Richard V, Yan AS, Zisou K, et al. Chikungunya outbreak, French Polynesia, 2014. *Emerging infectious diseases*. 2015 Apr;21(4):724-6. PubMed PMID: 25811534. Pubmed Central PMCID: 4378499.



65. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging infectious diseases*. 2015 Feb;21(2):359-61. PubMed PMID: 25625872. Pubmed Central PMCID: 4313657.
66. Adams L, Bello-Pagan M, Lozier M, Ryff KR, Espinet C, Torres J, et al. Update: Ongoing Zika Virus Transmission - Puerto Rico, November 1, 2015-July 7, 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016 Aug 5;65(30):774-9. PubMed PMID: 27490087.
67. Cao-Lormeau VM, Roche C, Musso D, Mallet HP, Dalipanda T, Dofai A, et al. Dengue virus type 3, South Pacific Islands, 2013. *Emerging infectious diseases*. 2014 Jun;20(6):1034-6. PubMed PMID: 24856252. Pubmed Central PMCID: 4036764.
68. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*. 2014 Jun;20(6):1085-6. PubMed PMID: 24856001. Pubmed Central PMCID: 4036769.
69. Azeredo EL, Dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Correa J, Sanchez-Arcila JC, et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. *PLoS currents*. 2018 Feb 15;10. PubMed PMID: 29588874. Pubmed Central PMCID: 5843488.
70. Lee JK, Shin OS. Advances in Zika Virus⁻ Host Cell Interaction: Current Knowledge and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1101. PubMed PMID: 30836648. eng.
71. Musso D, Richard V, Broult J, Cao-Lormeau VM. Inactivation of dengue virus in plasma with amotosalen and ultraviolet A illumination. *Transfusion*. 2014 Nov;54(11):2924-30. PubMed PMID: 24845685.
72. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014 Apr 10;19(14). PubMed PMID: 24739982.
73. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014 Apr 3;19(13). PubMed PMID: 24721538.
74. Dupont-Rouzeyrol M, Aubry M, O'Connor O, Roche C, Gourinat AC, Guigon A, et al. Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001-2013. *Virology journal*. 2014 Mar 31;11:61. PubMed PMID: 24684835. Pubmed Central PMCID: 3997821.
75. Musso D, Roche C, Marfel M, Bel M, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Improvement of leptospirosis surveillance in remote Pacific islands using serum spotted on filter paper. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2014 Mar;20:74-6. PubMed PMID: 24384412.



76. Nogareda F, Joshua C, Sio A, Shortus M, Dalipanda T, Durski K, et al. Ongoing outbreak of dengue serotype-3 in Solomon Islands, January to May 2013. *Western Pacific surveillance and response journal : WPSAR*. 2013 Jul-Sep;4(3):28-33. PubMed PMID: 24319611. Pubmed Central PMCID: 3853998.
77. Aubry M, Roche C, Dupont-Rouzeyrol M, Aaskov J, Viallon J, Marfel M, et al. Use of serum and blood samples on filter paper to improve the surveillance of Dengue in Pacific Island Countries. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012 Sep;55(1):23-9. PubMed PMID: 22695001.
78. Cao-Lormeau VM, Roche C, Aubry M, Teissier A, Lastere S, Daudens E, et al. Recent emergence of dengue virus serotype 4 in French Polynesia results from multiple introductions from other South Pacific Islands. *PloS one*. 2011;6(12):e29555. PubMed PMID: 22216313. Pubmed Central PMCID: 3247278.
79. Imrie A, Roche C, Zhao Z, Bennett S, Laille M, Effler P, et al. Homology of complete genome sequences for dengue virus type-1, from dengue-fever- and dengue-haemorrhagic-fever-associated epidemics in Hawaii and French Polynesia. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 2010 Apr;104(3):225-35. PubMed PMID: 20507696. Pubmed Central PMCID: 3084289.
80. Descloux E, Cao-Lormeau VM, Roche C, De Lamballerie X. Dengue 1 diversity and microevolution, French Polynesia 2001-2006: connection with epidemiology and clinics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Aug 4;3(8):e493. PubMed PMID: 19652703. Pubmed Central PMCID: 2714178.
81. Cao-Lormeau VM. Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Virology journal*. 2009 Mar 25;6:35. PubMed PMID: 19320997. Pubmed Central PMCID: 2670272.
82. Tabata T, Pettitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Harris E, Pereira L. Zika Virus Replicates in Proliferating Cells in Explants From First-Trimester Human Placentas, Potential Sites for Dissemination of Infection. *The Journal of infectious diseases*. 2018 Mar 28;217(8):1202-13. PubMed PMID: 29106643. Pubmed Central PMCID: 6075529.
83. Andrade P, Gimblet-Ochieng C, Modirian F, Collins M, Cardenas M, Katzelnick LC, et al. Impact of pre-existing dengue immunity on human antibody and memory B cell responses to Zika. *Nature communications*. 2019 Feb 26;10(1):938. PubMed PMID: 30808875. Pubmed Central PMCID: 6391383.
84. Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E. CD14(+)CD16(+) monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nature microbiology*. 2017 Nov;2(11):1462-70. PubMed PMID: 28970482. Pubmed Central PMCID: 5997390.



85. Tabata T, Pettitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover J, et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell host & microbe*. 2016 Aug 10;20(2):155-66. PubMed PMID: 27443522. Pubmed Central PMCID: 5257282.
86. Likos A, Griffin I, Bingham AM, Stanek D, Fischer M, White S, et al. Local Mosquito-Borne Transmission of Zika Virus - Miami-Dade and Broward Counties, Florida, June-August 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016 Sep 30;65(38):1032-8. PubMed PMID: 27684886.
87. Meaney-Delman D, Oduyebo T, Polen KN, White JL, Bingham AM, Slavinski SA, et al. Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Pregnant Women. *Obstetrics and gynecology*. 2016 Oct;128(4):724-30. PubMed PMID: 27479770.
88. Bingham AM, Cone M, Mock V, Heberlein-Larson L, Stanek D, Blackmore C, et al. Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine, Serum, and Saliva Specimens from Persons with Travel-Associated Zika Virus Disease - Florida, 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016 May 13;65(18):475-8. PubMed PMID: 27171533.
89. Ios S, Mallet HP, Leparc Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect*. 2014 Jul;44(7):302-7. PubMed PMID: 25001879. Epub 2014/07/09. eng.
90. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet (London, England)*. 2016 Apr 9;387(10027):1531-9. PubMed PMID: 26948433. Pubmed Central PMCID: 5444521.
91. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. *New England Journal of Medicine*. 2017 2018/09/27;379(13):1234-43.
92. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for US laboratories testing for Zika virus infection. CDC [Internet]. 2017.
93. Mead PS, Duggal NK, Hook SA, Delorey M, Fischer M, Olzenak McGuire D, et al. Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *N Engl J Med*. 2018 Apr 12;378(15):1377-85. PubMed PMID: 29641964. Epub 2018/04/12. eng.
94. da Cruz TE, Souza RP, Pelloso SM, Morelli F, Suehiro TT, Damke E, et al. Case Reports: Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Vaginal and Endocervical Samples from a Brazilian Woman, 2018. *Am J Trop Med Hyg*. 2019 Jan;100(1):183-6. PubMed PMID: 30398145. Epub 2018/11/07. eng.



13. Apéndice

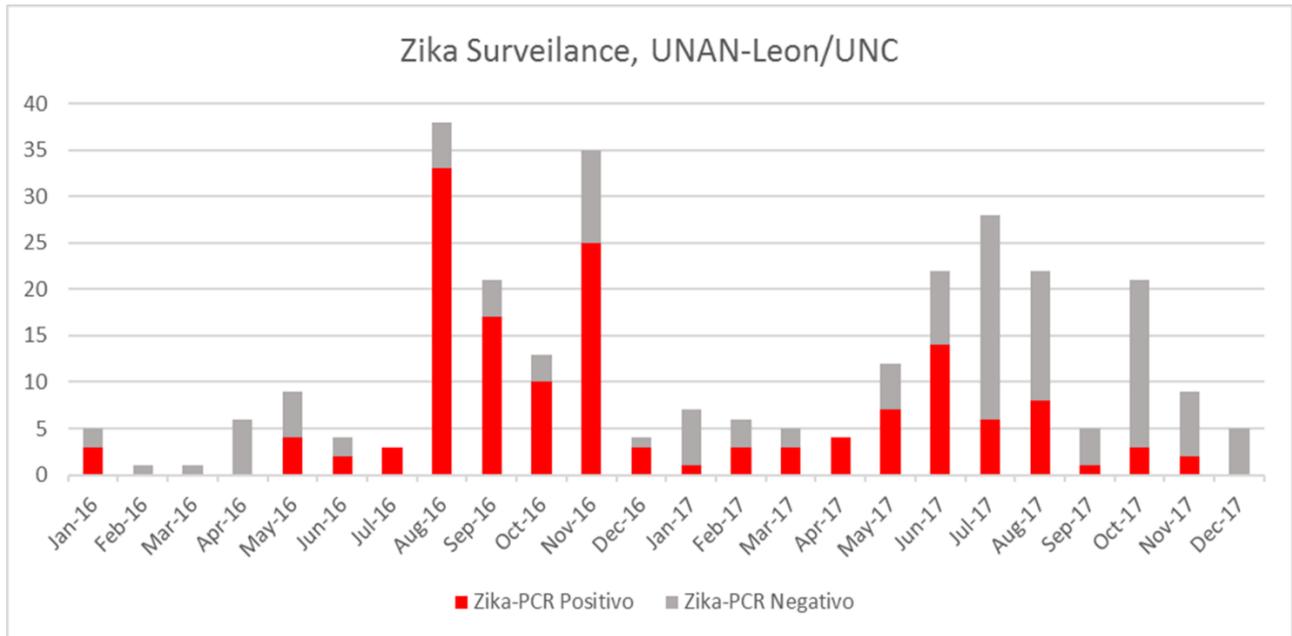


Figura S1. Captación de pacientes sospechosos de infección por Zika, de Enero de 2016 a Diciembre de 2017.

IgG (Anti-Zika & Anti Dengue)	IgM (Anti-Zika & Anti-Dengue)	Conclusión §
Naïve *	Flavivirus Seroconversión	Infección Primaria Aguda por Flavivirus
Zika Seroconversión]	Zika Seroconversión	Infección Aguda Primaria por ZIKV
Naïve	Aumento IgM-Zika	Infección Aguda Primaria por ZIKV
Zika Seroconversión	Flavivirus Seroconversión	Infección Aguda Primaria por ZIKV
Naïve	Zika Seroconversión	Infección Aguda Primaria por ZIKV
Flavivirus Seroconversión	Zika Seroconversión	Infección Aguda Primaria por ZIKV
Flavivirus Seroconversión	Aumento IgM-Zika	Infección Aguda Primaria por ZIKV
Aumento IgG-Dengue	Negativo	Infección Secundaria por DENV
Aumento IgG anti-Flavivirus	Dengue Seroconversión	Infección Aguda Secundaria por DENV
Aumento IgG anti-Flavivirus	Flavivirus Seroconversión	Infección Secundaria Aguda por Flavivirus
Aumento IgG anti-Flavivirus	Negativo	Infección Secundaria Aguda por Flavivirus
Aumento IgG anti-Flavivirus	Dengue Seroconversión	Infección Secundaria Aguda por Flavivirus
Flavivirus Seroconversión	Flavivirus Positivo	Infección Secundaria Aguda por Flavivirus
Flavivirus Inmune ∞	Flavivirus Seroconversión	Infección Secundaria Aguda por Flavivirus
Aumento IgG-Zika	Flavivirus Seroconversión	Infección Secundaria Aguda por ZIKV



Aumento IgG-Zika	Aumento IgM anti-Flavivirus	Infección Secundaria Aguda por ZIKV
Flavivirus Inmune	Negativo	Flavivirus Inmune, no cursa infección
Naïve	Negativo	Naïve
Flavivirus Inmune	Dengue Positivo	Infección Reciente por DENV
Flavivirus Inmune	Flavivirus Positivo	Infección Reciente por Flavivirus
Flavivirus Inmune	Zika Positivo	Infección Reciente por ZIKV
Naïve	Flavivirus Positivo	Infección Reciente por ZIKV β

Tabla S1. Conclusión en base a análisis conjunto de respuesta de anticuerpos Anti-ZIKV & Anti-DENV durante fase aguda y fase convaleciente usando un método de ELISA (CDC). n=113.

§ Conclusión realizada por Laboratorio a cargo de Aravinda de Silva en University of North Carolina, Departamento de Microbiología e Inmunología.

* Naïve se refiere a personas sin anticuerpos preexistentes, inmunológicamente vírgenes ante estos Virus.

∫ Seroconversión se refiere al aumento de 4 veces de anticuerpos en la fase convaleciente en base al resultado en la fase aguda.

∞ Presencia conjunta de anticuerpos contra virus de Dengue y Zika

β Se da en un caso donde el paciente presentaba títulos de anticuerpos altos, sin embargo, los títulos IGM anti-Zika eran mayores pero se encontraban en decrecimiento durante la fase convaleciente.

Tabla S2. Categorización para pacientes sospechosos de infección aguda por ZIKV según análisis de anticuerpos IgG e IgM anti-ZIKV. *Se reconoce como seroconversión al aumento exponencial de cuatro veces el título encontrado 28 días antes.

IgG anti ZIKV		
Fase Aguda	Fase Convaleciente	Conclusión
Positivo	Positivo (Mismo título)	ZIKV Inmune
Positivo	Positivo (seroconversión)	Infección Aguda por ZIKV
Positivo	Negativo (disminuye)	Infección Reciente por ZIKV
Negativo	Positivo	Infección Aguda por ZIKV
Negativo	Negativo	Negativo/Naïve
IgM anti ZIKV		
Fase Aguda	Fase Convaleciente	Conclusión
Positivo	Positivo (Mismo título)	Infección Reciente por ZIKV
Positivo	Positivo (seroconversión*)	Infección Aguda por ZIKV
Positivo	Negativo (disminuye)	Infección Reciente por ZIKV
Negativo	Positivo	Infección Aguda por ZIKV
Negativo	Negativo	Negativo/Naïve



University of North Carolina-Chapel Hill
Consentimiento para participar en un estudio de investigación
Sujetos adultos

Fecha de la versión del formulario de consentimiento: 11/11/2016
Nº de estudio del IRB: 16-0541

Título del estudio: Epidemiología y manifestaciones clínicas de Zika en Nicaragua

Investigador principal: Natalie Bowman

Departamento de la UNC-Chapel Hill: Medicina – Enfermedades Infecciosas

Número telefónico de la UNC-Chapel Hill: +1 917-657-6154

Dirección de correo electrónico: nbowman@med.unc.edu

Co-Investigadores: Filemon Bucardo, Sylvia Becker-Dreps, Aravinda Desilva, Matthew Collins,

Origen del financiamiento: Universidad de Carolina del Norte (EE.UU)

Número telefónico del contacto del estudio: 2311-0022, ext 2155

Correo electrónico del contacto del estudio: fili_bucardo@hotmail.com

¿En general, que debería saber usted sobre los estudios de investigación?

Con este documento se le está pidiendo su participación en un estudio de investigación. La participación en este estudio es voluntaria y puede negarse a participar, o retirar su consentimiento por cualquier motivo sin penalidad.

Los estudios de investigación tienen como objetivo obtener información relevante sobre nuevas enfermedades que pueda ayudar a otras personas en el futuro. Es posible que usted no reciba ningún beneficio directo por participar en este estudio, así como, también pueden existir riesgos asociados con la participación en estudios de investigación. La decisión de no participar en el estudio o de abandonar el estudio antes de su finalización no afectará su relación con el investigador, tampoco con los doctores encargados de la atención médica, ni con la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León ni la University of North Carolina-Chapel Hill. Si está enfermo, usted no está obligado a participar en el estudio de investigación para recibir atención médica.

A continuación, se describen los detalles de este estudio. Es importante que comprenda ampliamente la información que le presentamos para que pueda decidir conscientemente su participación en este estudio de investigación.

Se le entregará una copia de este consentimiento. Debe preguntar a los investigadores mencionados anteriormente, o a los miembros del equipo que los asisten, cualquier duda que tenga acerca de este estudio en cualquier momento.



¿Cuál es el objetivo de este estudio?

El propósito de este estudio es descubrir cuántas personas desarrollan síntomas cuando han sido infectados con el virus del Zika, cuáles son esos síntomas y los riesgos médicos más graves relacionados con la infección de este virus. Además, queremos saber si el virus del Zika puede ser detectado en distintos fluidos corporales (sangre, saliva, orina, semen, leche materna) y durante cuánto tiempo, y si esto puede conducir a la transmisión del virus por vía oral o genital. En hombres adultos, también nos gustaría estudiar si el virus puede afectar las espermias y niveles de hormonas.

Le pedimos que participe en este estudio porque usted tiene síntomas que podrían ser causados por la infección del virus del Zika o una persona que vive con Ud. ha recibido un diagnóstico de infección del Zika.

¿Quién puede participar en este estudio?

Ud. es elegible a participar si:

- Tiene 2 años o más
- Está atendido en una institución de salud por fiebre, erupción o sarpullido, conjuntivitis por 7 días o menos O vive con una persona diagnosticada con Zika
- Vive en León, Nicaragua
- Está de acuerdo de dar una muestra de sangre ahora y en 2-4 semanas
- Está de acuerdo de participar en este estudio

¿Quién no puede participar en este estudio?

Ud. no es elegible a participar por lo siguiente:

- Edad menos de 2 años
- Síntomas de fiebre, erupción o sarpullido, conjuntivitis por más de 7 días
- Tiene diagnóstico que no es Zika que explica sus síntomas
- Infección anterior con Zika
- Su médico dice que Ud. es demasiado enfermo para participar

¿Cuántas personas participarán en este estudio?

En total, aproximadamente 1200 personas de Nicaragua participarán en este estudio.

¿Cuánto tiempo participará en este estudio?

Si usted está positivo al Zika participará en este estudio durante 6 meses. Cada visita durará aproximadamente 1 hora. Si no detectamos el virus del Zika en su primera visita, le pediremos que regrese al hospital o centro de salud una vez más entre 2 a 4 semanas después para obtener otra muestra de sangre y darle los resultados de la primera visita. Si en su primera visita muestra tener la infección del virus del Zika, obtendremos las muestras en su casa (o en el hospital, si lo prefiere) 8 veces más en un período de 6 meses. Nosotros conservaremos las muestras hasta por 5 años.

¿Qué ocurrirá si participa en este estudio?



Al participar en este estudio, tendrá que responder preguntas de un cuestionario sobre los síntomas de la enfermedad y factores de riesgo del Zika; una enfermera de este estudio le solicitará una muestra de sangre de su brazo (10 mL). Pocas semanas después, le tomaremos sangre por segunda vez. Le pediremos una última muestra a los 6 meses. Durante su primera visita, también obtendremos muestras de orina y saliva.

Si es mujer de edad 18-50 años, le haremos un a prueba de embarazo en la primera visita. Si tiene infección con Zika, le haremos un a prueba de embarazo de nuevo en la visita de 3 meses. Si está embarazada, le haremos un referido a una clínica antenatal.

Si encontramos el VZIK en uno de tus primeros exámenes, te pediremos muestras de sangre, saliva, orina y semen (hombres), flujo vaginal (mujeres) y leche materna (mujeres dando de mamar) varias veces más (8 veces en 6 meses) para determinar cuándo desaparece el virus de estos flujos corporales.

Si no tienes una infección del virus de Zika en tu primera visita, obtendremos muestras de sangre 2 veces más:

- 2 a 4 semanas después del inicio del estudio de investigación
- 6 meses después del inicio del estudio de investigación

Si tienes una infección del virus de Zika, iremos varias veces más a tu casa (o al hospital, si lo prefieres) para obtener muestras de sangre, orina y saliva.

- 2 días después del inicio del estudio de investigación
- 1 semana después del inicio del estudio de investigación
- 2 semanas después del inicio del estudio de investigación
- 3 semanas después del inicio del estudio de investigación
- 4 semanas después del inicio del estudio de investigación
- 2 meses después del inicio del estudio de investigación
- 3 meses después del inicio del estudio de investigación
- 6 meses después del inicio del estudio de investigación

Si usted tiene una infección por Virus de Zika y tiene más de 18 años de edad se le solicitará una muestra adicional de sangre venosa a los 12 meses luego del día de su captación, aproximadamente 100 mL.

La muestra de sangre la obtendremos insertando una aguja en tu vena. Esto lo hará una persona con experiencia que usará una aguja nueva y esterilizada con cada persona. También te entregaremos un envase para que nos proporciones muestras de orina y saliva.

¿Cuáles son los posibles beneficios por participar en este estudio?

La investigación está diseñada para beneficiar a la sociedad mediante la obtención de nuevos conocimientos. Es poco probable que usted se beneficie personalmente por su participación en este estudio de investigación.



Le daremos los resultados de pruebas de Zika en la segunda visita. Los métodos para diagnosticar Zika no son perfectos, y el resultado puede ser equivocado. Si sale negativa la primera prueba significa que quizás el virus no es en su cuerpo actualmente. No significa que Ud. no tuvo la infección en el pasado y que no va a contraer la Zika en el futuro. **¿Cuáles son los posibles riesgos o molestias que implica la participación en este estudio**

La muestra de sangre se obtendrá por una punción venosa y será extraída por una persona con experiencia. En el sitio de punción se puede generar molestia, sangrado o un moretón. En raros casos, puede causar desmayo. Existe un riesgo mínimo de infección. Todo el material utilizado será nuevo y estéril.

Hay un pequeño riesgo de violación de la confidencialidad, es decir, otras personas podrían enterarse de su historial médico o características personales. Haremos todo lo posible por prevenir que personas que no estén involucradas en el estudio o en su atención médica obtengan información de usted. Los exámenes y las entrevistas se llevarán a cabo con la mayor privacidad posible. Solo sus médicos y el personal necesario para conducir este estudio tendrán acceso a los resultados de sus exámenes. No compartiremos información alguna sobre usted sin su consentimiento. Sus datos serán archivados bajo un código, no bajo su nombre. Para mayor información sobre cómo protegeremos la confidencialidad de esta información, lea la sección “¿De qué manera se protegerá su privacidad?”

Podrían existir riesgos poco comunes o previamente desconocidos. Usted deberá informar al investigador sobre cualquier problema que se presente.

¿Cómo se procederá si durante el estudio obtenemos nuevos hallazgos o información?

Se le proporcionará cualquier información nueva obtenida durante el transcurso del estudio que pueda afectar su deseo de seguir participando.

¿De qué manera se protegerá su privacidad?

Los registros impresos de este estudio serán conservados en un lugar seguro y cerrado con llave, accesible solo para el personal del estudio. Los registros digitales serán guardados bajo el código asignado para usted, no bajo su nombre. Además, serán guardados en una computadora encriptada protegida por una contraseña. La clave que une su nombre con el código del estudio será guardada en forma separada.

El equipo de investigación que trabaja en el estudio recolectará información sobre usted. Esta incluye lo aprendido a través de los procedimientos descritos en este formulario de consentimiento. También recogerán otra información tal como su nombre, dirección, fecha de nacimiento, historial médico e información de sus registros médicos. El equipo de investigación conocerá su identidad y sabrá que usted es uno de los participantes en el estudio. Para su seguridad, pondremos esta información a disposición de sus propios doctores. Si usted piensa que este estudio puede afectar su atención médica, infórmesele a su doctor.

No se identificará a ninguna persona en ningún informe o publicación relacionada con este estudio. Aunque se realizarán todos los esfuerzos por conservar los registros de investigación en forma



privada, podrá ocurrir que la ley federal o estatal exija que tales registros, incluida la información personal, sean revelados. Esto es muy poco probable, pero si alguna vez se pide que sean revelados, UNC-Chapel Hill tomará las medidas permitidas por ley para proteger la privacidad de la información personal. En algunos casos, su información reunida en este estudio de investigación podría ser examinada por representantes de la Universidad, patrocinadores de la investigación u organismos gubernamentales con fines tales como el control de calidad o la seguridad.

¿Qué ocurrirá si resulta lesionado por esta investigación?

En todas las investigaciones existe la posibilidad de que pueda ocurrirle algo malo. Esto puede incluir el riesgo de que se produzca una lesión personal. A pesar de todas las medidas de seguridad, usted podría desarrollar una reacción o padecer una lesión durante su participación en este estudio. Si tales problemas se presentan, los investigadores lo ayudarán a obtener atención médica, pero los costos por la atención médica serán facturados a usted y/o a su compañía de seguros. La Universidad de Carolina del Norte de Chapel Hill no ha reservado fondos para pagarle por ninguna de tales reacciones o lesiones, o para la atención médica relacionada. Sin embargo, al firmar este formulario, no renuncia a ninguno de sus derechos legales.

¿Qué sucede si usted desea finalizar su participación antes de que la misma se haya completado?

Puede retirarse de este estudio en cualquier momento, sin que ello le ocasione ninguna sanción. Ud. puede decidir dar algunas muestras, pero otras no. Los investigadores también tienen el derecho de finalizar su participación en cualquier momento. Eso podría suceder si usted ha tenido una reacción inesperada, si no ha cumplido con las instrucciones o porque el estudio se ha detenido por completo.

¿Recibirá algo por participar en este estudio?

Usted recibirá aproximadamente \$5 de reembolso para pagar el transporte para su visita. En el caso de visitas en la casa, también recibirá aproximadamente \$5 cada visita por su tiempo y colaboración. También le entregamos resultados de pruebas básicas del laboratorio de su primer visita.

¿Le costará algo la participación en este estudio?

No le costará nada participar en este estudio. El estudio paga por pruebas de Zika, pero usted o su seguro médico será responsable por las otras cuentas de su atención médica.

¿Quién patrocina este estudio?

Esta investigación está financiada por la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill y el Instituto Nacional de la Salud EE.UU. Esto significa que el patrocinador le paga al equipo de investigación por la realización del estudio. Los investigadores no tienen, sin embargo, un interés financiero directo con el patrocinador ni con los resultados del estudio.

¿Qué sucede si desea formular preguntas sobre este estudio?

Tiene el derecho de preguntar, y que le respondan, cualquier duda que tenga acerca de esta investigación. Si tiene preguntas o si ocurre una lesión relacionada con la investigación, debe ponerse en contacto con los investigadores mencionados en la primera página de este formulario.



¿Qué sucede si desea formular preguntas sobre sus derechos como sujeto de una investigación?

Toda investigación realizada con voluntarios humanos es examinada por un comité que trabaja para proteger sus derechos y su bienestar. Si tiene preguntas o inquietudes acerca de sus derechos como sujeto de una investigación, puede ponerse en contacto, de manera anónima si lo desea, con la Oficina del Comité de Ética para las Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNAN-León (Tel. 2311 4675) o con el Institutional Review Board (Comité de revisión institucional, IRB por sus siglas en inglés) al +1 919-966-3113 o por correo electrónico a IRB_subjects@unc.edu.

Acuerdo del sujeto:

He leído la información proporcionada más arriba. He realizado todas las preguntas que tengo en este momento. Acepto voluntariamente participar en este estudio de investigación.

Firma del sujeto de investigación

Fecha

Nombre del sujeto de investigación en imprenta

Firma de la persona que obtiene el consentimiento

Fecha

Nombre de la persona que obtiene el consentimiento en imprenta



Si nos da su permiso firmando abajo, podemos compartir sus respuestas de cuestionario, sus resultados de pruebas e información de contacto con otros investigadores que trabajan con nosotros para estudiar el virus de Zika. Estos investigadores se pueden poner en contacto con usted para ver si le gustaría participar en otros estudios sobre zika. Si no quiere que nosotros compartamos esta información, no lo haremos, y usted todavía puede participar en este estudio.

Firma del sujeto de investigación

Fecha

Nombre del sujeto de investigación en imprenta

Firma de la persona que obtiene el consentimiento

Fecha

Nombre de la persona que obtiene el consentimiento en imprenta



Código del Participante: ID: ZikaV-□□□-□□□□



Instrumento de Recolección de Información

Estudio: Epidemiología y manifestaciones clínicas de la infección por Zika en niños y adultos de Nicaragua.

Periodo: Mayo 2016 - Octubre 2017
Área: León, Chinandega, Nicaragua
Investigador Principal: Dr. Filemón Bucardo
Departamento de Microbiología, UNAN-León

60

Acta No. _____ CEIB, UNAN-León
Mayo de 2016



INFORMACIÓN DEL PARTICIPANTE & HISTORIA

INFORMACIÓN DEMOGRÁFICA	
Fecha de nacimiento (DD/MMM/YYYY): _____	Edad: _____ años
Género: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Femenino Si es femenino, ¿Está Embarazada? <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Cuantos meses: _____	
<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido <p>¿Alguna vez el participante ha visitado países fuera de su lugar de residencia? En caso de si, especifique los países y años en los que viajó:</p>	

HISTORIAL DE SALUD				
Ha / Esta el participante (verifique la respuesta correcta):	Si	No	Desconocido	En caso de si, especifique:
¿Sido Hospitalizado en el último año?				
¿Recibido transfusión(es) sanguínea en el último año?				
¿Tomando algún medicamento recetado en este momento?				
¿Tomado algún medicamento recetado en los últimos 6 meses que no este listado arriba?				
Historial médico pasado:	Si	No	Desconocido	En caso de si, especifique fecha del diagnóstico, detalles, y cualquier tratamiento actual:
Asma				
Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOD)				
Cáncer				
Enfermedad vascular cerebral				
Enfermedad cardiaca				
Diabetes				
Enfermedades infecciosas				
Enfermedad del hígado				
Enfermedad del pulmón				
Enfermedad neurológica				
Enfermedad renal				
Un trasplante				

EPISODIO(S) PREVIOS DE DENGUE



HISTORIA PREVIA DE DENGUE	
<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido	¿Alguna vez ha sido diagnosticado con dengue por algún profesional de la salud? En caso de si, especifique la fecha (DD/MMM/YYYY): _____
<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido	¿Fue alguna vez hospitalizado por dengue? En caso de si, especifique la fecha: _____
<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido	¿Alguna vez al participante se le ha diagnosticado de DF/DHF/DSS? En caso de si, especifique la fecha: _____
En caso de si, especifique el tipo: <input type="checkbox"/> DF <input type="checkbox"/> DHF <input type="checkbox"/> DSS <input type="checkbox"/> Desconocido	

Cuadro Clínico del Episodio Febril

REVISIÓN GENERAL DE LOS SÍNTOMAS DEL CUADRO FEBRIL			
Fecha de aparición del primer síntoma (DD/MMM/YYYY): _____			<input type="checkbox"/> Desconocido
Fiebre	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Letargo	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Dolor de cabeza	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Mialgia	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Dolor retro-orbital	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Artralgia	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Nausea/Vomito	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Ojos enrojecidos	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Sarpullido	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Equimosis/moretones	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Dolor abdominal	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Historia de sangrado de cualquier sitio	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Dolor de garganta	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	En caso de si, especifique el sitio: _____	

EXAMEN FISICO	
CABEZA Y CUELLO	
Ictericia escleral	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido Fecha DD/MMM/YYYY): _____ Especifique: _____
Cianosis circumoral	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido Fecha DD/MMM/YYYY): _____ Especifique: _____
PIEL	
Petequias	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido Fecha DD/MMM/YYYY): _____ Especifique: _____
Equimosis	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido Fecha DD/MMM/YYYY): _____ Especifique: _____
Extremidades frías	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido Fecha DD/MMM/YYYY): _____ Especifique: _____



EXAMEN DE TÓRAX	
Sibilancias	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido Fecha DD/MMM/YYYY): _____ Especifique: _____
Estertores	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido Fecha DD/MMM/YYYY): _____ Especifique: _____
EXAMEN ABDOMINAL	
Suave/Blando	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido Fecha DD/MMM/YYYY): _____ Especifique: _____
Esplenomegalia	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconocido Fecha DD/MMM/YYYY): _____ Especifique: _____

EVALUACIÓN LONGITUDINAL					
Por favor complete esta tabla si paciente es Zika-Positivo.					
Fecha en que la fiebre inicio (DD/MMM/YYYY): _____					
Fecha de admisión al hospital (DD/MMM/YYYY): _____ Fecha de salida del hospital (DD/MMM/YYYY): _____					
Fecha Observacional (DD/MMM/YYYY)	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha
Observaciones					
Test de Torniquete (Si/No)					
Especifique positivo o negativo					
La más alta Temperatura (°C)					
Ritmo de pulso más alto (pulsos/min)					
Presión arterial sistólica (mmHg)					
• La más baja					
• La más alta					
Presión arterial diastólica (mmHg)					
• La más baja					
• La más alta					
La más baja presión de pulso (sistólica – diastólica)					
La más alta frecuencia respiratoria (respiraciones/min)					
Agrandamiento del hígado (Si/No)					
Especifique cm debajo del margen costal					
El más bajo conteo de plaquetas (x 10 ³ /mm ³)					
El más alto de hematocrito (%)					
El más bajo conteo de leucocito (x 1,000)					
ALT (U/L)					
AST (U/L)					
ALP (U/L)					
Bilirrubina directa (mg/dL)					
Bilirrubina total (mg/dL)					
Creatinina (mg/dL)					
Electrolitos					
Ct Zika en Sangre					
Ct Zika en Orina					



Ct Zika en Saliva					
-------------------	--	--	--	--	--

TEST DE LABORATORIO	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha
BHC						
Blancos						
Neutrófilos (%)						
Linfocitos (%)						
Monocitos (%)						
Eosinófilos (%)						
Basófilos (%)						
Linfocitos atípicos (%)						
Hemoglobina (g/dL) (línea base)						
Plaquetas						
Hematocrito						

TEST DE LABORATORIO	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha	Fecha
EGO						
Color						
Aspecto						
Densidad						
pH						
Células Epiteliales						
Glóbulos Blancos						
Glóbulos Rojos						
Bacterias						
Cristales						
Cilindros						
Células Renales						
Otros						

PCR y Serología del Zika, Dengue y Chikungunya				
	Especificar Resultado			En los casos PCR positivos especificar Tm
	POS	NEG	Equívoco	
PCR Zika				
PCR Dengue				
PCR Chikungunya				
IgM Dengue				



Comentarios Adicionales:



■ Operacionalización de variables

Variable de caracterización	Indicadores	Valores Finales	Tipo de Variable
Lugar de Captación	Centro de Salud donde fue captado el paciente	Perla María Norori, Mantica Berrios, Sutiaba, Campus Medico, Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Arguello	Nominal
Edad	Años cumplidos		Escala
Género	Distinción biológica	Masculino, Femenino	Nominal
Mes de Captación	Mes en el que el paciente fue reclutado en el estudio	Enero, Febrero, Marzo, Abril, Mayo Junio, Julio, Agosto, Septiembre, Octubre, Noviembre, Diciembre	Escala
Año de Captación	Año en el que el paciente fue reclutado en el estudio	2017, 2018	Escala
Fecha de Toma de Muestra	Momento en el tiempo en que se tomó una muestra biológica del paciente		Escala
Diagnóstico CDC Trioplex	Resultado de análisis usando RT-PCR según protocolo CDC para Trioplex con un ct menor o igual a 38	Positivo, Negativo para Dengue, Zika y/o Chikungunya	Nominal
Diagnóstico Zika Lanciotti	Resultado de análisis usando RT-PCR según protocolo Lanciotti 2008 con un ct menor o igual a 38	Positivo, Negativo para Zika	Nominal



Título de IgG anti-DENV dilución 1:100 en fase aguda	Título de anticuerpos IgG anti-DENV detectados por MAC-ELISA en plasma de fase aguda de la enfermedad a una dilución 1:100		Numeral
Título de IgG anti-DENV dilución 1:1000 en fase aguda	Título de anticuerpos IgG anti-DENV detectados por MAC-ELISA en plasma de fase aguda de la enfermedad a una dilución 1:1000		Numeral
Título de IgG anti-DENV dilución 1:100 en fase convaleciente	Título de anticuerpos IgM anti-DENV detectados por MAC-ELISA en plasma de fase convaleciente de la enfermedad a una dilución 1:100		Numeral
Título de IgG anti-DENV dilución 1:1000 en fase convaleciente	Título de anticuerpos IgM anti-DENV detectados por MAC-ELISA en plasma de fase convaleciente de la enfermedad a una dilución 1:1000		Numeral
Título de IgG anti-ZIKV dilución 1:100 en fase aguda	Título de anticuerpos IgG anti- ZIKV detectados por MAC-ELISA en plasma de fase aguda de la enfermedad a una dilución 1:100		Numeral



Título de IgG anti-ZIKV dilución 1:1000 en fase aguda	Título de anticuerpos IgG anti- ZIKV detectados por MAC-ELISA en plasma de fase aguda de la enfermedad a una dilución 1:1000		Numeral
Título de IgG anti-ZIKV dilución 1:100 en fase convaleciente	Título de anticuerpos IgM anti- ZIKV detectados por MAC-ELISA en plasma de fase convaleciente de la enfermedad a una dilución 1:100		Numeral
Título de IgG anti-ZIKV dilución 1:1000 en fase convaleciente	Título de anticuerpos IgM anti- ZIKV detectados por MAC-ELISA en plasma de fase convaleciente de la enfermedad a una dilución 1:1000		Numeral
Interpretación IgM	Interpretación de títulos de IgM totales	Dengue positivo, seroconversión para Dengue, Flavi positivo, Aumento de IgM anti-Flavi, seroconversión para Flavi, Negativo, Aumento de IgM anti-ZIKV, seroconversión para Zika, ZIKV positivo.	Nominal



Interpretación IgG	Interpretación de títulos de IgG totales	Aumento de IgG anti-DENV, Inmune a Flavivirus, Aumento de IgG anti-Flavi, Seroconversión para Flavivirus, naïve, Aumento de IgG anti-ZIKV, Seroconversión para Zika.	Nominal
Conclusión Serología	Interpretación de los resultados combinados de títulos de anticuerpos anti-DENV y anti-ZIKV (IgG e IgM)	Infección aguda primaria por Flavivirus, Infección primaria aguda por ZIKV, Infección secundaria por DENV, Infección aguda secundaria por Flavivirus, Infección aguda secundaria por ZIKV, Inmune a Flavivirus, naïve, Infección reciente por DENV, Infección reciente por Flavivirus, Infección reciente por ZIKV	Nominal
Leucocitos	Conteo de leucocitos en la fase aguda de la enfermedad		Numeral
Eritrocitos	Conteo de eritrocitos en la fase aguda de la enfermedad		Numeral
Plaquetas	Conteo de plaquetas en la fase aguda de la enfermedad		Numeral
Linfocitos	Porcentaje de Linfocitos en la fase aguda de la enfermedad		Escala



Neutrófilos	Porcentaje de Neutrófilos en la fase aguda de la enfermedad		Escala
Monocitos	Porcentaje de Monocitos en la fase aguda de la enfermedad		Escala
Eosinófilos	Porcentaje de Eosinófilos en la fase aguda de la enfermedad		Escala
Basófilos	Porcentaje de Basófilos en la fase aguda de la enfermedad		Escala
Tipo Sanguíneo	Clasificación de la sangre según los anticuerpos presentes en la membrana de las células sanguíneas según la clasificación de Landsteiner	A, B, AB, O	Nominal
Factor Rh	Presencia del antígeno D en la superficie de los glóbulos rojos	Positivo (+), Negativo (-)	Nominal
Fiebre	Aumento de la temperatura corporal por encima de 37 grados centígrados	Si, No	Nominal
Rash	Erupción cutánea bien caracterizada	Si, No	Nominal
Conjuntivitis	Inflamación en la capa conjuntiva con un enrojecimiento de la misma	Si, No	Nominal
Cefalea	Dolor de cabeza intenso y persistente	Si, No	Nominal



Dolor Retro-Orbital	Dolor en el globo ocular intenso y persistente	Si, No	Nominal
Nauseas	Sensación de enfermedad o malestar en el estómago que puede aparecer con una necesidad imperiosa de vomitar	Si, No	Nominal
Dolor Abdominal	Sensación de dolor en la zona anatómica del cuerpo donde está alojado el estómago e intestinos.	Si, No	Nominal
Odinofagia	Dolor en la garganta que se produce principalmente al tragar fluidos como consecuencia de un cuadro inflamatorio en la mucosa esofágica.	Si, No	Nominal
Letargo	Estado de cansancio y de somnolencia profunda y prolongada	Si, No	Nominal
Mialgia	Sensación de dolor aguda, convulsiva y tirante en un musculo	Si, No	Nominal
Artralgia	Afección que se caracteriza fundamentalmente por un dolor agudo en las articulaciones.	Si, No	Nominal



Debilidad en extremidades	Debilidad muscular en las extremidades superiores y/o inferiores del cuerpo.	Si, No	Nominal
Hipostesia	Distorsión sensorial a causa de una disminución de la intensidad de las sensaciones	Si, No	Nominal
Parálisis	Perdida de las funciones de un musculo en una parte del cuerpo	Si, No	Nominal
Parestesia	Sensación anormal de los sentidos que se traduce en una sensación de hormigueo en una parte del cuerpo	Si, No	Nominal
Fotofobia	Intolerancia anormal a la luz natural o artificial	Si, No	Nominal
Misofonía	Sensibilidad selectiva al sonido	Si, No	Nominal
Antecedente de Dengue	Diagnóstico previo a Dengue en cualquier periodo de tiempo anterior a la captación del paciente	Si, No	Nominal
Antecedentes de Chikungunya	Diagnóstico previo a Chikungunya en cualquier periodo de tiempo anterior a la captación del paciente	Si, No	Nominal

Tabla S3. Descripción de Variables a utilizar en el estudio.