Análisis serológicos del Zika en mujeres embarazadas y los efectos adversos en el neonato durante la epidemia en León, Nicaragua, febrerojulio del 2017





Lic. Omar Lenin Zepeda Alvarado Bioánalista Clínico UNAN - León

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua - León

Facultad de Ciencias Médicas

Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas



Tesis para optar al título de Master en Ciencias con mención en Microbiología Médica

Análisis serológicos del Zika en mujeres embarazadas y los efectos adversos en el neonato durante la epidemia en León, Nicaragua, febrero-julio del 2017.

Autor:

Lic. Omar Lenin Zepeda Alvarado

Estudiante de Maestría

UNAN - León

Tutor:

Filemón Bucardo Rivera, PhD

Profesor titular

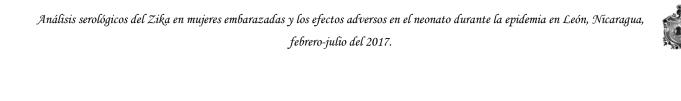
Dpto. de Microbiología y Parasitología

Facultad de Ciencias Médicas

UNAN- León

León, diciembre del 2019

"A la Libertad Por La Universidad



A mi papá y mamá (Julio Zepeda y Rosa Alvarado)

por su ejemplo de perseverancia, superación y darme ánimos de continuar.

A mis amigos y personas que creen en mí, son especiales en mi vida.



Agradecimientos

Agradezco a:

Dios Padre creador de todo lo visible e invisible ya que moldeo a esta persona extraña que soy ahora con virtudes y defectos.

Dr. Filemón Bucardo por su paciencia, empeño y asesoría, como dice el hay que ser perseverantes cuando se trata de investigación. Gracias por tratar de entender cuando hablo y a culminar la realización de esta tesis.

MSc. Fredman González y MSc. Yaoska Reyes por su orientación y tiempo en el trascurso de mi carrera.

A las mujeres embarazadas que fueron parte del estudio y al equipo del Centro de Salud Perla María Norori (Dr. Carla Vílchez, Dr. Cándida Chávez y Lic. Carlos Rayo) por permitirnos realizar la captación en ese lugar.

Dr. Rigoberto Pérez, Dr. Marcial Montes y al grupo que estuvo captando las muestras de cordón en el Hospital Ecuela Oscar Danilo Rosales: Lic. Hernán Vanegas, Lic, Yorling Picado, Lic. Nancy Corea y Lic. Celeste Flores ya que sin ellos nada de esto sería posible.

Al equipo de la Universidad de Carolina del Norte: Lic. Jessica Gronniger, Dr. Ramesh S. Jadi, Lic. Alice Liu. que apoyaron en la captación y análisis de las muestras.

Este estudio fue desarrollado con fondos de investigación recibidos por los Profesores de la UNAN-León: Filemón Bucardo (Fogarty Fellowship) y UNC-CH: Elizabeth Stringer (Grant: ECBR_003 6 / 2016-6 / 2017), Matthew Collins (NIH 1K22AI137306-01), Natalie Bowman, Sylvia Becker-Dreps (NIAID 5R21AI129532-02), Eva Harris (NIH P01 AI106695) y Aravinda de Silva (R21 AI134073).

El artículo científico de este estudio está actualmente en revisión en el Journal of Clinical Infectious Disease.

Mis más sinceros agradecimientos,

Omar Zeveda



Resumen

Introducción: La infección por el virus ZIKA generalmente pasa desapercibida y puede no presentar síntomas, pero desde su brote en las Américas y el aumento de casos de malformaciones congénitas y complicaciones neurológicas hizo de esta enfermedad un problema de salud pública. Desde entonces es de suma importancia el desarrollo de nuevas técnicas serológicas que contribuyan al diagnóstico temprano de la enfermedad debido a que los diagnósticos serológicos actuales poseen una capacidad limitada para distinguir entre DENV y ZIKV, en regiones donde estos dos virus son endémicos.

Objetivo: Determinar la seroprevalencia e incidencia de Zika en mujeres embarazadas durante la epidemia en León, Nicaragua en febrero-julio del 2017 y su correlación con efectos adversos en el neonato.

Diseño: Cohorte Prospectiva de 253 mujeres embarazadas que acudían a consultas prenatales en el centro de salud Perla María Norori en el periodo febrero a julio del 2017 y su posterior seguimiento hasta que dieran a luz en el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales Arguello (HEODRA-León). Se determinó de la seroprevalencia mediante ELISAS IgG e IgM, NS-1 BOB y confirmación con ensayos de neutralización (FRNT₅₀ y eFRNT). La determinación de los resultados fetales adversos se realizó mediante diagnóstico del resumen del parto en el HEODRA al momento de nacer.

Resultados: De las 253 mujeres embarazadas enroladas en esta nuestra cohorte, 194 mujeres cumplieron con el estudio hasta el momento del parto y los datos serológicos estaban disponibles para 187. La seroprevalencia de la infección por ZIKV en la cohorte se estimó del 59%, de las cuales 21% tuvieron una infección incidente durante el embarazo, 22% estaban inmunizadas contra ZIKV antes del embarazo, 41% no tenían evidencia de infección y 16% de las mujeres no se pudo determinar el tiempo de infección debido a la falta de una muestra prenatal que permitiera el análisis de la tendencia FRNT₅₀. El 40% de las mujeres que se embarazaron durante el periodo de mayor transmisión (julio – septiembre 2016) tenían una fuerte evidencia de infección por ZIKV en el embarazo. El 17% de los nacimientos tuvieron una complicación o resultado adverso y el 1.5% cumplió con la definición estricta de síndrome de Zika congénito.

Conclusiones: La seroprevalencia de ZIKV en mujeres embarazadas en el PNM durante la epidemia fue de 59%, determinada mediante ensayos de neutralización. En el estudio no se observó correlación entre infección incidente durante el embarazo y resultados fetales adversos.

Índice

Agradecimientos	III
Resumen	IV
Abreviaturas	VI
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	4
4. Planteamiento del Problema	5
5. Objetivos	6
5.1 Objetivo General	6
5.2 Objetivos Específicos	6
6. Marco Teórico	7
6.1 Historia y Epidemiología	7
6.2 Estructura y Clasificación	10
6.3 Análisis Filogenético	12
6.4 Replicación Viral	14
6.5 Transmisión	15
6.6 Características Clínicas	16
6.7 Manifestación neonatal	16
6.8 Patogénesis	19
6.9 Inmunidad	20
6.10 Diagnóstico	22
7. Material y Métodos	24
8. Resultados:	30
9. Discusión	36
10. Conclusiones	38
11. Recomendaciones	39
12. Referencias	40
13. Apéndices	48
Apéndice 1. Consentimiento	48
Apéndice 2. Cuestionario	52
Apéndice 3. Operacionalización de las Variables	67



Abreviaturas

IgG Inmunoglobulina G

IgM Inmunoglobulina M

ARN Ácido ribonucleico

ZIKV Virus del Zika

DENV Virus del Dengue

CSZ Síndrome congénito del Zika

BOB Block of binding

FRNT Ensayo de neutralización por reducción de placa

FFU Unidades de virus formadoras de foco

ELISA Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR PCR con transcriptasa reversa

NS-1 Proteína no estructural 1

UPM Último periodo menstrual

MINSA Ministerio de salud

OMS Organización Mundial de la Salud

OPS Organización panamericana de la salud

CDC Centros para el Control y la Prevención de

Enfermedades



1. Introducción

El virus Zika (ZIKV) es un flavivirus transmitido por mosquitos, fue identificado por primera vez en monos de Uganda en 1947⁽¹⁾ y se encontró evidencia serológica en humanos en 1952⁽²⁾. El primer gran brote se registró en la Isla de Ya en el 2007, seguido de las Polinesias Francesas, aunque no se registraron muertes atribuidas al virus si hubo asociación con complicaciones neurológicas⁽³⁻⁶⁾. A principios del 2015 Brasil reporta el primer brote de Zika en América⁽⁷⁾, desde entonces el virus se propagó en América Latina hasta el sur de EE. UU^(8, 9).

El ZIKV es un virus envuelto, icosaédrico, que tiene similitudes estructurales con otros flavivirus como el Dengue (DENV), el Nilo Occidental (WNV) y el virus de la encefalitis japonesa (JEV)⁽¹⁰⁾. Las manifestaciones clínicas son inespecíficas, generalmente autolimitadas y varían desde asintomáticas hasta una enfermedad aguda caracterizada por fiebre, erupción cutánea, dolor articular y conjuntivitis^(11, 12). La infección por ZIKV durante el embarazo puede causar defectos congénitos graves, incluida la microcefalia⁽¹³⁾, otros defectos cerebrales⁽¹⁴⁾ y el síndrome congénito del Zika (CZS por sus siglas en inglés), que se describe con contracturas de extremidades, tono muscular alto, anomalías oculares, microcefalia y pérdida de la audición⁽¹⁵⁾.

El diagnóstico de ZIKV es complejo, donde solo una pequeña proporción de casos (~ 5%) se logran confirmar mediante pruebas de laboratorio muchos meses después de la epidemia de ZIKV ⁽¹⁶⁾. Esto es debido a que Zika y Dengue son antigénicamente similares y el Dengue es endémico en la mayoría de las áreas de transmisión de ZIKV, por tanto, se espera la circulación de altos niveles de anticuerpos de reacción cruzada que reducen la especificidad de los ensayos serológicos tradicionales^(17, 18).

Al principio se estimaba que el 40 % de los niños de madres infectadas con ZIKV durante el embarazo tenían riesgo de desarrollar CSZ⁽¹⁴⁾, principalmente la infección en el primer trimestre⁽¹⁹⁾. Aunque actualmente el riesgo aún sigue siendo desconocido; se estima que entre el 5% y el 15% de los bebés nacidos de mujeres infectadas con ZIKV durante el embarazo tienen evidencia de complicaciones relacionadas con el virus⁽²⁰⁾.

Actualmente se proponen técnicas serológicas como ensayos de neutralización por reducción de placa (FRNT)^(21, 22), pruebas de inhibición como Block of Binding (BOB)⁽²³⁾ y técnicas de ELISA



(IgG anti-ZIKV-DENV) (MAC-ELISA)⁽²⁴⁾, para distinguir entre infecciones primarias, co-infecciones con Dengue e infección secundaria.

Estas técnicas podrían permitir la vigilancia serológica y el monitoreo de la infección por ZIKV durante el embarazo, que permitiría comprender la epidemiología, la patogenia y las complicaciones del ZIKV en regiones endémicas de Dengue⁽²⁵⁾. Por lo tanto, este estudio contribuye a la compresión del rol que juega el ZIKV en la aparición de anomalías congénitas, también describe la seroprevalencia de la enfermedad en mujeres embarazadas, así como el rol de nuevos métodos diagnóstico y de vigilancia para monitorear a las mujeres embarazadas expuestas al ZIKV.



2. Antecedentes

Después del brote de Zika en Brasil en 2015 y su propagación en América Latina⁽⁷⁾. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en febrero del 2016 declaro a Zika como una emergencia de salud pública de interés internacional, debido al aumento de casos malformaciones congénitas y complicaciones neurológicas. El director de la OMS declaró que se sospecha fuertemente una relación causal entre la infección por Zika durante el embarazo y la microcefalia, aunque todavía no se ha demostrado científicamente^(26, 27).

Pereira et al., en el 2016 reportaron en una cohorte de 345 mujeres embarazadas que la infección por ZIKV durante el embarazo es perjudicial para el feto y se asocia con muerte fetal, restricción del crecimiento fetal y un espectro de anomalías del sistema nervioso central y que además 55% de los embarazos tuvieron resultados adversos después de la infección materna en el primer trimestre, y que más del 40 % de los niños de madres infectadas con ZIKV durante el embarazo tenían riesgo de desarrollar CSZ ⁽¹⁴⁾.

Halai y colaboradores en el 2017 reportaron que el síndrome congénito de ZIKV no parece estar asociado con la gravedad de la enfermedad materna, tampoco con la carga de ARN de ZIKV en el momento de la infección y menos con la existencia de anticuerpos previos contra el dengue⁽²⁸⁾. No obstante, en el 2018 Rodríguez y colaboradores comunicaron que se observó microcefalia en 2.4% de los recién nacidos en una cohorte de 86 mujeres embarazadas positivas a ZIKV pero que no se detectaron calcificaciones u otras alteraciones del sistema nervioso central (SNC)⁽²⁹⁾.

Hoen Bruno y colaboradores en el 2018, encontraron en las mujeres que presentaban síntomas de infección por ZIKV y que cuyas pruebas de PCR fueron positivas que el 7% de los fetos y los lactantes mostraban defectos en el nacimiento posiblemente asociados a ZIKV, además que los defectos ocurrieron con más frecuencia en madres que se habían infectado al principio del embarazo⁽¹⁹⁾. Estos hallazgos se correlacionan con Pomar y colaboradores, quienes reportan que en los casos de una infección materna del virus del Zika conocida, aproximadamente una cuarta parte de los fetos se infectarán de forma congénita, de los cuales un tercio tendrá complicaciones graves al nacer o la pérdida fetal. La carga de la CZS puede ser menor que la descrita inicialmente en América del Sur y puede no diferir de otras infecciones congénitas⁽³⁰⁾.



3. Justificación

La infección por ZIKV se ha convertido rápidamente en una problemática de salud pública, desde el reporte de los primeros casos en Brasil, su propagación en América Latina entre 2015 al 2017 y su asociación con anomalías congénitas ha impactado directamente en las mujeres embarazadas y sus bebés.

En Nicaragua el Ministerio de Salud reportó el primer caso de anomalía congénita asociada a ZIKV en Julio del 2016. Este escenario nos obliga a evaluar la disponibilidad de recursos para diagnosticar los casos de Zika en mujeres embarazadas, así como el desarrollo de técnicas diagnósticas que den respuesta temprana a la detección de esta enfermedad emergente en nuestro país.

La mayoría de los estudios de cohorte de Zika en mujeres embarazadas publicados recientemente tienen como criterio de inclusión mujeres confirmadas con la infección por Zika mediante métodos moleculares, por tanto, estos estudios no reportan la importancia de la infección asintomática y el verdadero efecto del problema en la salud pública. Nuestro estudio tiene como criterio de inclusión solamente haberse embarazado durante la epidemia de ZIKV lo cual permitirá conocer el efecto de la infección asintomática y el rol de los nuevos ensayos serológicos.



4. Planteamiento del Problema

¿Cuál es la seroprevalencia e incidencia de Zika en mujeres embarazadas durante la epidemia en León, Nicaragua en febrero-julio del 2017 y los efectos adversos en él neonato?



5. Objetivos

5.1 Objetivo General

 Determinar la seroprevalencia e incidencia de Zika en mujeres embarazadas durante la epidemia en León, Nicaragua en febrero-julio del 2017 y su correlación con efectos adversos en el neonato.

5.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar los aspectos clínicos y epidemiológicos de las mujeres embarazadas expuestas al virus del Zika en el periodo de estudio.
- Determinar el estado serológico de Zika en las mujeres embarazadas.
- Asociar la infección por el virus del Zika en mujeres embarazadas y los resultados fetales adversos.



6. Marco Teórico

6.1 Historia y Epidemiología

El virus ZIKA fue descrito por primera vez en la sangre de un mono Rhesus (cepa 766) procedente de Uganda (África) en abril de 1947, ello ocurrió cuando se estaba investigando la transmisión de la fiebre amarilla en humanos por medio de mosquitos del género *Aedes*. La palabra Zika significa área cubierta de hierbas o de vegetación en la lengua Luganda (tribu de familia bantú) la que; en ese año no se tuvo ningún caso humano, el segundo aislamiento del virus fue el 12 Junio 1948, procedente de un mosquito (*Aedes africanus*) aproximadamente a 300 metros del primer aislamiento^(1, 31). En 1952 se encontró evidencia serológica de infección en seres humanos de Uganda y Republica Unida de Tanzania⁽²⁾. En 1954 se logró aislar el virus a partir de muestras humanas de una niña de 10 años en Nigeria⁽³²⁾, luego el virus estuvo confinado a África y el Sur este Asiático. Posteriormente en el 2007, se registra el primer gran brote en humanos en la Isla Yap de la Micronesia del Pacífico, donde aparecieron 189 pacientes afectados con fiebre, rash, artralgias y conjuntivitis, en los que se detectaron 49 casos positivos al virus Zika y 59 probables, no hubo muerte alguna, ni casos graves que requirieron hospitalización⁽⁵⁾.



Imagen 1. Origen y propagación del ZIKV

1947: Los científicos que realizan la vigilancia de rutina de la fiebre amarilla en el bosque Zika de Uganda aíslan el virus Zika en muestras tomadas de un mono cautivo, centinela rhesus.

1948: El virus se recupera del mosquito Aedes africanus, atrapado en la plataforma de un árbol en el bosque Zika.

1952: Los primeros casos humanos se detectan en Uganda y la República Unida de Tanzania en un estudio que demuestra la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus Zika en sueros [34].



Posteriormente ocurre un brote entre los años 2013-2014 se presentó en la Polinesia Francesa del Sur del Pacifico, la que posee 67 islas; se estimaron 29 000 casos con 29,34% de cuadro clínico asociado virus del Zika⁽³³⁾.



Imagen 2. Origen y propagación del ZIKV

1969–1983: La distribución geográfica conocida del Zika se expande a Asia ecuatorial, incluidas India, Indonesia, Malasia y Pakistán, donde se detecta el virus en los mosquitos. Al igual que en África, ocurren casos humanos esporádicos, pero no se detectan brotes y la enfermedad en los seres humanos continúa considerándose rara, con síntomas leves.

2007: el Zika se propaga desde África y Asia para causar el primer gran brote en humanos en la isla pacífica de Yap, en los Estados Federados de Micronesia. Antes de este evento, no se habían documentado brotes y solo 14 casos de la enfermedad del virus del Zika humano en todo el mundo.

2013-2014: el virus causa brotes en otros cuatro grupos de islas del Pacífico: la Polinesia francesa, la Isla de Pascua, las Islas Cook y Nueva Caledonia. El brote en la Polinesia Francesa, que genera miles de presuntas infecciones, se investiga de forma intensiva. Los resultados de las investigaciones retrospectivas se informan a la OMS el 24 de noviembre de 2015 y el 27 de enero de 2016⁽³⁴⁾.



El 2014 el Zika llega a América, a la Isla de Pascua⁽³⁵⁾ y posteriormente se reporta el primer caso en Brasil causando así un brote que se extiende por toda América Latina⁽⁷⁾.



Imagen 3. Origen y propagación del ZIKV

2 de marzo de 2015: Brasil notifica a la OMS sobre informes de una enfermedad caracterizada por erupciones en la piel en los estados del noreste. Desde febrero de 2015 hasta el 29 de abril de 2015, se reportan casi 7000 casos de enfermedades con erupciones en la piel en estos estados. Todos los casos son leves, sin muertes reportadas. Zika no era sospechoso en esta etapa, y no se realizaron pruebas para Zika.

1 de febrero de 2016: la OMS declara que la asociación reciente de infección por Zika con grupos de microcefalia y otros trastornos neurológicos constituye una emergencia de salud pública de preocupación internacional⁽³⁴⁾.



6.2 Estructura y Clasificación

El virus Zika (ZIKV), un miembro de la familia Flaviviridae, es un virus de ARN de cadena sencilla de sentido positivo a con un genoma de 10.7 Kb que codifica una poliproteína única que se divide en tres proteínas estructurales (de la cápside C, de membrana prM / M y de membrana envolvente E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) por las proteasas virales y del huésped^(36, 37).

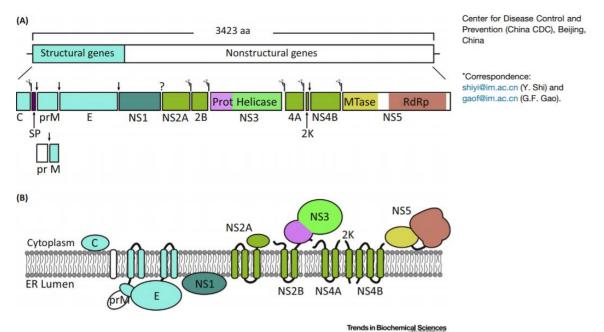
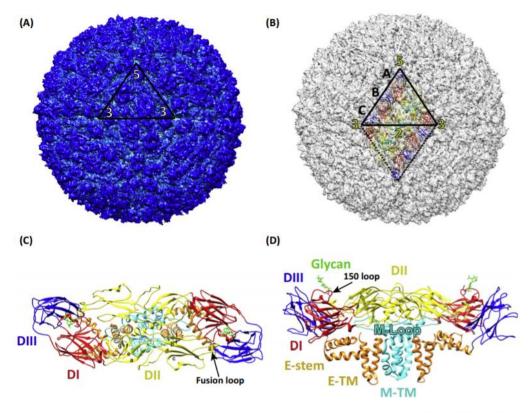


Imagen 4. Organización del genoma del virus Zika (ZIKV) y las proteínas procesadas. (A) Procesamiento de poliproteínas y productos de escisión. ZIKV tiene un genoma de sentido positivo de una sola hebra de aproximadamente 11 Kb. Las cajas debajo del genoma indica precursores y proteínas maduras generadas por la cascada de procesamiento proteolítico. (B) Poliproteína Topología en la membrana. Se muestra la orientación de la membrana propuesta de las proteínas ZIKV^(38, 39).

Dado que ZIKV exhibe una patogénesis clínica que difiere de la de otros flavivirus conocidos los científicos tenían curiosidad acerca de si la partícula ZIKV en sí misma tiene características únicas. Richard Kuhn, Michael Rossman y sus colegas informaron una estructura de resolución de 3.8 Å de la partícula ZIKV madura, determinada por microscopía crioelectrónica (crio-EM)⁽⁴⁰⁾.

Entre las características observadas en la estructura de la superficie de la partícula viral se cuentan 180 copias de la proteína E (proteína de envoltura), asociadas a la proteína M (proteína de membrana)^(40, 41). La proteína E es el componente principal involucrado en la unión del receptor, la fusión de la membrana y el reconocimiento inmunitario del huésped⁽³⁹⁾.





Trends in Biochemical Sciences

Imagenn 5. Microscopía crioelectrónica (EM) Estructuras del virus Zika (ZIKV) y sus proteínas de membrana (M) y envolvente (E). (A) El mapa crio-EM ZIKV (EMDataBank: EMD-8116). El mapa está coloreado radialmente: 0–219 Å (cian) y 220–250 Å (azul). Los números 30 y 50 se refieren al eje triple y al eje quíntuple, respectivamente. (B) La disposición de la proteína E en la superficie ZIKV. Las tres proteínas E individuales (A, B y C) en una unidad asimétrica (triángulo negro) se indican mediante representaciones de dibujos animados. (C) El dímero de proteína E se muestra en forma de cinta, visto en el eje doble. El código de color sigue la designación estándar de los dominios de proteína E: I (rojo), II (amarillo) y III (azul). El tallo subyacente y los residuos transmembrana (TM) se muestran (naranja). El glicano Asn154 (representación de palo) se muestra en verde. (D) Vista lateral del dímero E-M (PDB: 5IRE), que muestra los ectodominios E, así como los dominios E stem-TM (naranja) y los dominios M loop y stem-TM (cian). Los dominios E y M TM se encuentran dentro de la bicapa lipídica. El glicano Asn154 de un monómero está marcado y puede verse proyectándose desde la superficie (39, 40).

La proteína M es una proteína pequeña que se oculta bajo la capa de la proteína E. Las proteínas E y M se organizan en una simetría de icosaedro que consta de 60 unidades repetidas, cada una de las cuales contiene tres proteínas E individuales⁽⁴²⁾. Las proteínas E se disponen como dímeros, con tres dímeros paralelos entre sí, los cuales forman una especie de balsa. Hay 30 de tales balsas que cubren la superficie viral. Similar a los otros flavivirus, la proteína ZIKV E, comprende cuatro dominios: el dominio vástago-transmembrana, que es responsable del anclaje de membrana; y los



dominios I, II y III, que constituyen la porción de superficie predominantemente de la cadena B restante de la proteína⁽⁴²⁾.

La proteína M comprende un bucle en el extremo N (bucle M) y regiones troncales y transmembrana, que contienen una y dos hélices, respectivamente; estos anclan la proteína M a la membrana lipídica. Para la proteína E, el Dominio I (DI) actúa como un puente entre el Dominio II (DII) y el Dominio III (DIII). La punta de DII contiene el bucle de fusión (FL), que interactúa con la membrana huésped durante la fusión de la membrana. En la mayoría de los flavivirus, DIII contiene el sitio de unión del receptor putativo y tiene un papel importante en la fusión^(43, 44).

Curiosamente, ZIKV tiene un solo sitio de glicosilación (N154) en el DI de la proteína E (Figura 2D), que sobresale de la superficie, porque el ZIKV E-DI tiene un "bucle 150" más largo (residuos 145-160) en comparación con otros flavivirus, incluyendo DENV. Dado que la molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas no-integrina (DC-SIGN) y el receptor de manosa son supuestos receptores / co-receptores DENV que pueden unirse a los glicanos DENV, la glicosilación N154 puede funcionar como un sitio adjunto de ZIKV a las células huésped. Esta región de 150 bucles varía no solo entre las cepas del virus Zika, sino también con otros flavivirus, lo que sugiere que las diferencias en esta región influyen en la transmisión del virus y la enfermedad⁽³⁹⁾.

Las comparaciones estructurales de la proteína de la envoltura E-ZIKV revelan que algunas de sus regiones se asemejan mucho a las de los virus neurovirulentos como el WNV y el JEV, en tanto que otras son similares a las del virus del dengue (DENGV 1-4). De todas maneras, aunque se sabe que la proteína E contribuye al neurotropismo del ZIKV, los efectos en la fisiopatología aún no se han dilucidado^(40, 42).

La estructura crio-EM mostró que ZIKV tiene una Superficie más compacta en comparación con DENV-2 o DENV-4. Esta estabilidad estructural del virus. Puede ayudarlo a sobrevivir a las duras condiciones del semen, la saliva y la orina, aunque esta hipótesis requiere más evidencia experimental⁽³⁹⁾

6.3 Análisis Filogenético

El primer estudio filogenético de ZIKV fue realizado por Lanciotti et al. después del brote de Yap State. La secuenciación de la región codificadora completa del gen que codifica NS5 reveló tres



linajes o subclases ZIKV diferentes: África oriental (prototipo de la cepa de Uganda), África occidental (cepas de Senegal) y asiática (ZIKV 2007, cepa Yap)^(6, 45).

El linaje asiático se separó de un ancestro común que se movió en el sudeste asiático y el Pacífico. Los autores sugirieron que ZIKV surgió en Uganda (este de África) alrededor de 1920 y se trasladó a África occidental. Se produjeron dos introducciones independientes de África oriental a África occidental, la primera de Uganda a Costa de Marfil y Senegal alrededor de 1935 a 1940 relacionada con el grupo de cepas prototipo MR 766 y la segunda de Uganda a Nigeria y África central alrededor de 1935 con la subsiguiente dispersión a Senegal⁽⁴⁶⁾.

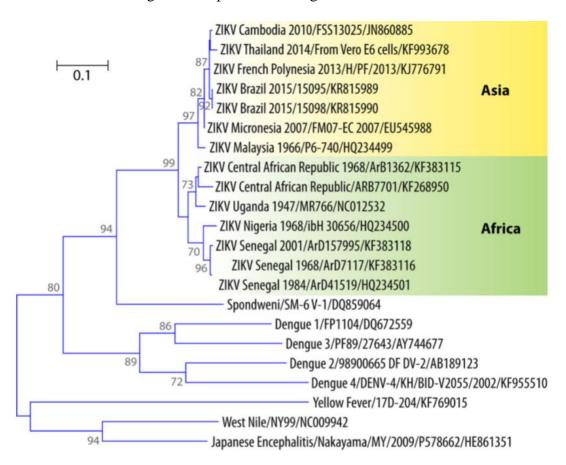


Imagen 6. Árbol filogenético de ZIKV que muestra los linajes africano y asiático, incluidas las cepas que surgieron recientemente en el Pacífico y Brasil⁽⁴⁶⁾.

ZIKV probablemente se mudó a Asia en la década de 1940 y se extendió a lo largo de la región, formando el linaje asiático. En las Américas, las secuencias de ZIKV estaban disponibles en Brasil, Colombia, Puerto Rico y Guatemala. Todos ellos mostraron más del 99% de la identidad de nucleótidos con las cepas polinesias francesas^(47, 48).



Estas cepas americanas pueden constituir un "grupo del hemisferio occidental" dentro del genotipo asiático⁽⁴⁸⁾. El gen que codifica el SN5 de la línea aislada en la isla de Pascua también mostró una identidad del 99.8% a nivel de nucleótidos con la cepa polinesia francesa⁽⁴⁹⁾. En conjunto, los datos epidemiológicos y posteriores apoyan la hipótesis de que las cepas epidémicas de ZIKV surgieron a través de un cambio genético en el virus del linaje asiático. Curiosamente, la secuencia parcial de la cepa aislada en SN5 de la cepa aislada de un viajero que regresó de Maldivas en junio de 2015 fue idéntica a la de las cepas de la Polinesia Francesa, Brasil y la Isla de Pascua⁽⁴⁶⁾.

6.4 Replicación Viral

El ciclo replicativo ha sido poco estudiado. ZIKV ingresa a la célula ya sea a través del endocitosis mediada por clatrina o mediada por receptores. El ambiente ácido en el endosoma induce la fusión viral liberando ARN genómico. El ssRNA genómico de sentido positivo se traduce posteriormente en una poliproteína que se procesa adicionalmente por el huésped y las proteínas codificadas por el virus, dividiéndose así todas las proteínas estructurales y no estructurales. El complejo de replicación de Flavivirus se ensambla muy cerca de la membrana del retículo endoplásmico (RE), el dsRNA se sintetiza a partir del ssRNA genómico (+). El genoma de dsRNA se transcribe y replica, proporcionando así ARNm virales y nuevos genomas de ssRNA (+). Después de la replicación viral, el empaquetamiento ocurre en la superficie del RE y los viriones inmaduros resultantes se trasladan al complejo de Golgi, donde la escisión mediada por furina de prM a M genera virus maduros que se liberan mediante exocitosis. ZIKV activa TLR3⁽⁵⁰⁾ y la vía de autofagia⁽⁵¹⁾, que puede potencialmente mediar la replicación viral y la supervivencia dentro de las células. Se ha informado que los exosomas liberados de células infectadas contienen proteínas ZIKV, incluyendo NS1⁽⁵²⁾. Los flavivirus manipulan las vías de respuesta de proteínas desplegadas (UPR) en el huésped mediante la activación de uno o más brazos de la UPR que pueden conducir a la reparación del ADN, la homeostasis celular o la apoptosis⁽⁵³⁾.

Investigadores de la Universidad de Heidelberg han mostrado cómo las cepas africanas y asiáticas del Zika reorganizan el retículo endoplásmico y la arquitectura citoesquelética de las células huésped para que pueda desarrollarse el virus. La infección causa una drástica perturbación de la red del citoesqueleto, reorganizando los filamentos intermedios y los microtúbulos en una estructura que rodea la maquinaria de replicación. Además, el Zika y el dengue, ambos flavivirus, usan estrategias similares para infectar células huésped. Así, una vez dentro de una célula, las



partículas virales se cierran sobre el retículo endoplásmico rugoso que participa en la síntesis y el transporte de proteínas. Después, los virus remodelan dicho orgánulo para formar una 'jaula' protectora con pequeños agujeros por los que el ARN y las partículas virales recién fabricadas pueden diseminarse. En el caso del Zika, el virus posee una manera única de reorganizar las estructuras dentro de la célula. Esto sugiere que aún existen factores desconocidos de tipo celular específicos que afectan a la forma en la que el virus se replica, por lo tanto, se especula que las alteraciones inducidas por el zika en el citoesqueleto del huésped estén conectadas a los mecanismos fisiopatológicos que vinculan las infecciones congénitas del virus con microcefalia y trastornos neurodegenerativos⁽⁵⁴⁾.

6.5 Transmisión

El virus del Zika puede Transmitirse por:

- **Picadura de un mosquito:** Los mosquitos se infectan cuando se alimentan de la sangre de una persona ya infectada con el virus. Los mosquitos infectados pueden propagar el virus mediante la picadura a otras personas⁽⁵⁵⁾.
- **De madre a hijo**: Una mujer embarazada que ya contrajo la infección por el virus del Zika puede contagiársela a su feto durante el embarazo o al momento de nacer. La transmisión puede ocurrir por vía transparentaría, filtración del virus a través del tapón trofoblástico, difusión del virus en el saco amniótico durante la formación o durante el parto por una madre infectada a su recién nacido^(55, 56).
- **Relaciones Sexuales:** El virus permanece de manera indefinida en el semen y los fluidos vaginales de una persona Zika positiva y esta puede transmitir la enfermedad antes de que se manifiesten sus síntomas, cuando ya tiene los síntomas y una vez que los síntomas desaparecen. Si bien no está bien documentado, es posible que una persona portadora del virus pueda transmitirlo, aunque nunca tenga síntomas^(55, 57).
- **Transfusiones sanguíneas:** Se han reportado múltiples casos de transmisión del virus por transfusión de sangre en Brasil. Actualmente, se están investigando estos casos⁽⁵⁵⁾.



6.6 Características Clínicas

La infección por el virus del Zika (ZIKV) en adultos se ha descrito como una enfermedad viral parecida al dengue, caracterizada por fiebre baja, erupción pruriginosa macular o maculo-papular, cefalea, hiperemia conjuntival, mialgia y artralgia, que generalmente dura entre 5 días y 10 años⁽²⁸⁾.

6.7 Manifestación neonatal

Las manifestaciones de ZIKV transmitidas verticalmente en los recién nacidos suelen ser microcefalia congénita, neuropatía óptica y glaucoma congénito, ventriculomegalia y lisencefalia⁽⁵⁸⁾.

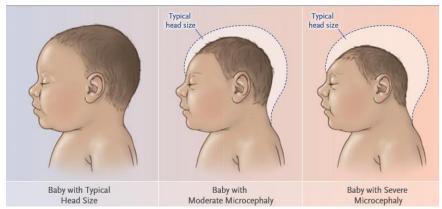


Imagen 7. Bebés con microcefalia moderada o grave asociada con infección materna por el virus del Zika, en comparación con un recién nacido típico⁽³⁷⁾.

Microcefalia congénita

El ZIKV congénito puede causar microcefalia y otras anomalías cerebrales. La microcefalia es una condición en la cual la circunferencia de la cabeza de un bebé al nacer está por debajo del tercer percentil en comparación con los bebés de la misma edad gestacional y sexo. Los bebés con microcefalia pueden tener un amplio espectro de características clínicas que van desde leves a graves; estas características clínicas a menudo duran toda la vida porque no existe una cura o una opción de tratamiento estándar para la microcefalia. Estas indicaciones incluyen discapacidad intelectual, convulsiones, trastornos del movimiento y del equilibrio, problemas de visión o audición, así como demoras generales en el desarrollo en áreas como sentarse, estar de pie o caminar⁽⁵⁹⁾.



Neuropatía óptica y glaucoma congénito

La neuropatía óptica se define como el daño al nervio óptico, que se manifiesta clínicamente por pérdida parcial o completa de la visión⁽⁶⁰⁾. Estudios recientes han demostrado que la infección con ZIKV puede causar anomalías oculares graves en bebés y adultos incluida la infiltración celular y el aumento de la citotoxicidad y la inflamación en pacientes. Más comúnmente, una infección con ZIKV se presenta como conjuntivitis no purulenta; sin embargo, las complicaciones graves, incluida la alteración del epitelio pigmentario de la retina macular externa, la uveítis posterior y la iridociclitis también pueden ser una presentación⁽⁶¹⁾.

El glaucoma es la segunda causa de ceguera irreversible en el mundo y afecta a más de 70 millones de personas en todo el mundo, con aproximadamente un 10% de ceguera bilateral⁽⁶²⁾. El glaucoma se caracteriza por una pérdida de células ganglionares de la retina y atrofia del disco óptico con ahuecamiento. Estudios recientes han demostrado que el ZIKV afecta la cámara anterior del ojo durante la gestación, lo que conduce a glaucoma y otros hallazgos oculares asociados⁽⁶³⁾.

Ventriculomegalia

La ventriculomegalia es la dilatación de los ventrículos cerebrales laterales, generalmente de más de 10 mm al nivel de las aurículas. El atrio del ventrículo lateral es la parte donde convergen el cuerpo, la asta posterior y el asta temporal. La ventriculomegalia puede ser un evento aislado, pero cuando excede de más de 15 mm, se clasifica como grave y generalmente se encuentra con otras anomalías asociadas, como las infecciones congénitas⁽⁶⁴⁾. Entre las infecciones congénitas, el ZIKV se ha relacionado con la ventriculomegalia. Se sabe que esto es un componente del Síndrome de Zika Congénito (CZS). La ventriculomegalia puede producir hidrocefalia, que es un aumento de la presión del LCR dentro de los ventrículos. El aumento de la flexibilidad del cráneo en los niños permite que sea susceptible al agrandamiento del cráneo secundario al aumento de la presión del LCR. Esto comprime y estira el tejido cerebral adyacente. Esto resulta en hallazgos asociados adicionales ya que el desarrollo normal del cerebro se ve obstaculizado⁽⁶⁵⁾.

Lisencefalia

La definición literal de lisencefalia es "cerebro liso". Es una malformación cerebral rara, vinculada al gen, que se caracteriza por la ausencia (agiria) o escasez (paquigiria) de estos pliegues y surcos y microcefalia⁽⁶⁶⁾. Los brotes recientes han confirmado que el ZIKV está vinculado a anomalías



congénitas del nacimiento. La neuroimagen revela malformaciones del desarrollo cortical que incluyen la lisencefalia entre otras. Como resultado, el feto / neonato se verá afectado según el grado de fracaso del desarrollo cortical⁽⁶⁷⁾.

Algunas de las manifestaciones clínicas más comunes incluyen retraso psicomotor severo, retraso en el desarrollo, convulsiones y retraso en el desarrollo. El pronóstico depende del grado de malformación cerebral y los casos graves pueden provocar la muerte en la infancia o la infancia temprana⁽⁶⁷⁾. No existe una cura para la lisencefalia que no sea la atención de apoyo para las necesidades básicas. Algunos niños pueden mostrar progreso en su desarrollo con el tiempo. Las convulsiones que se pueden presentar como resultado de la lisencefalia se pueden tratar con anticonvulsivos. Las otras manifestaciones de la lisencefalia son más difíciles de tratar con medicamentos solos⁽⁶⁶⁾.



6.8 Patogénesis

Los datos sobre la patogenia de ZIKV son escasos. Se encontró que los fibroblastos dérmicos humanos, los queratinocitos epidérmicos y las células dendríticas inmaduras son permisivos para la infección por ZIKV⁽⁶⁸⁾. Desde la piel, el virus se propaga al ganglio linfático donde sobreviene la viremia y el objetivo principal de ZIKV son los monocitos tanto para las cepas asiáticas como para las africanas.

Los factores de entrada / adhesión de DCSIGN, AXL, Tyro y TIM-1 permiten la entrada de ZIKV y la unión a los receptores celulares del huésped se ve facilitada por la glicoproteína E. A esto le sigue la captación endocítica, el recubrimiento de la nucleocápside y el ARN viral finalmente se liberan en el citoplasma^(68, 69). La replicación de ZIKV activa una respuesta inmune antiviral y la producción de interferón de tipo I en células infectadas. La formación de autofagosomas y la apoptosis se asocian con una mayor replicación viral y la expresión inducida de grupos de antígenos antivirales (RIG-1, MDA-5 y TLR3)⁽⁶⁹⁾ que producen las manifestaciones clínicas ya conocidas como la fiebre y la erupción pruriginosa macular⁽⁷⁰⁾. También se sabe que ZIKV puede viajar al ojo, aunque todavía no se sabe si el virus hace ese viaje al cruzar la barrera de la retina con la sangre que separa el ojo del torrente sanguíneo, viajando a lo largo del nervio óptico que conecta el cerebro y el ojo, o alguna otra vía⁽⁷¹⁾. Un estudio revelo que Zika infecta el nervio óptico, las células ganglionares de la retina y las células de la capa nuclear interna, mostrando así un adelgazamiento de la capa plexiforme externa. Durante la infección aguda, los ojos muestran desorganización de la capa retiniana, retinitis, vitritis y coroiditis focal, con leve infiltración celular y aumento de la expresión del factor de necrosis tumoral, interferón-γ, granzima B y perforina⁽⁶¹⁾. Se cree que el virus podría tener tropismo neuronal y de otros órganos, pues se ha encontrado RNA viral en el cerebro, así como en hígado, riñón, corazón y bazo⁽⁷⁰⁾.

ZIKV es un virus neurotrópico; por lo tanto, cruza la barrera hematoencefálica del feto y se adhiere a las células neuronales del cerebro. El ARN viral integra su genoma en las células neuronales, causando apoptosis y, en última instancia, conduce a la interferencia con el desarrollo neuronal, la proliferación neuronal y la migración. En segundo lugar, la infección placentaria por ZIKV causa insuficiencia placentaria y podría contribuir a la restricción del crecimiento y la microcefalia⁽³³⁾.



6.9 Inmunidad

La respuesta inmune innata

La respuesta del interferón (IFN) desempeña un papel fundamental en el control de los flavivirus, se han realizado varios estudios in vitro que utilizan tanto células humanas primarias como líneas celulares derivadas de humanos para evaluar la respuesta de IFN a la infección por ZIKV. Dependiendo del tipo de célula utilizado, la infección por ZIKV dio como resultado la producción de IFN de tipo I (α, β) , tipo II (γ) y tipo III (λ) , así como la activación de varios genes estimulados por IFN (ISG)⁽⁷²⁾.

También se han llevado a cabo investigaciones para determinar los mecanismos empleados por ZIKV para amortiguar la respuesta de IFN. Se ha demostrado que la proteína NS5 de ZIKV degrada la STAT2, una molécula de señalización involucrada en la vía de IFN tipo I. Esto limita la señalización de IFN de tipo I y permite una mayor replicación viral. Esto parece ser una interacción específica de la especie, ya que ZIKV NS5 no puede degradar STAT2 murino, lo que contribuye a la replicación ineficiente de ZIKV observada en ratones inmunocompetentes y la mayor susceptibilidad de los ratones que carecen de componentes de la vía de señalización IFN de tipo I a la infección por ZIKV⁽⁷²⁾.

Sin embargo, cabe señalar que este estudio se basa en la sobreexpresión de NS5. Además, otra investigación que utiliza células dendríticas humanas infectadas sugiere otro mecanismo de inhibición de IFN mediada por ZIKV. Ese estudio encontró que la infección por ZIKV da como resultado el antagonismo de la fosforilación de STAT1 y STAT2. Hasta el momento, no está claro qué mecanismo podría ocurrir primero o si ambos ocurren durante la infección natural⁽⁷²⁾.

La respuesta de anticuerpos

La respuesta inmune a la infección por ZIKV es similar a la de otros flavivirus; La IgM se desarrolla pocos días después del inicio de la infección y puede permanecer detectable durante aproximadamente 3 meses. La IgG se desarrolla después y permanece en la circulación durante años^(73, 74).

Las proteínas estructurales E y PrM junto con la proteína secretada NS1 representan los objetivos principales para los anticuerpos específicos para flavivirus. Los estudios han demostrado que los



anticuerpos específicos contra el ZIKV son cruciales para el control viral en modelos de infección en ratones⁽⁷²⁾.

Se han aislado varios anticuerpos monoclonales humanos capaces de neutralizar ZIKV tanto in vitro como in vivo. Estos incluyen anticuerpos contra el epítope del dímero E cuaternario, que reaccionan de forma cruzada entre ZIKV y DENV. También se identificaron anticuerpos que reconocen el dominio III de la proteína E ZIKV, que reduce los síntomas de la enfermedad y la mortalidad en ratones infectados con ZIKV. Además, se encontró que dos anticuerpos, que reconocen epítopes que abarcan múltiples dominios de la proteína ZIKV E, protegen a los ratones en un modo de post-exposición⁽⁷²⁾.

Respuesta Celular

Las células T CD8 + protegen y promueven la patogénesis de algunos flavivirus, pero se desconoce su papel en la infección por el ZIKV. En un estudio con ratones que carecían del receptor de interferón tipo I se evaluó las respuestas de las células T CD8 + al ZIKV y se encontró que las células T CD8+ de ratones infectados eran citotoxicidad polifuncional y mediada. La transferencia adoptiva de células T CD8 + inmunes a ZIKV redujo las cargas virales, mientras que su agotamiento llevó a una mayor carga tisular y los ratones CD8-/- mostraron una mayor mortalidad a la infección por ZIKV. En conjunto, estos resultados demuestran que las células T CD8+ protegen contra la infección por ZIKV⁽⁷⁵⁾.

Otro estudio en ratones deficientes de IFN de tipo 1 (IFNR) encontró que las CD8+ específicas de ZIKV se dirigen predominantemente a las proteínas PrM, E y NS5 ⁽⁷⁶⁾. También se evaluó la respuesta inmune adaptativa celular en ratones suprimidos de IFN tipo I y se encontró que las respuestas de células T CD8+ de ratones embarazadas a la infección por ZIKV se redujeron en comparación con ratones no embarazados. Por lo tanto es posible que la disminución de la inmunidad mediada por células durante el embarazo pueda aumentar la propagación del virus al feto⁽⁷⁷⁾.

Los estudios que investigan las respuestas de las células T durante la infección por ZIKV humano son escasos en la actualidad. y se han identificado células T CD4 + que proliferan en respuesta a la estimulación con E y NS1 en humanos que habían experimentado una infección reciente por



ZIKV. Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones adicionales sustanciales para confirmar un papel protector de las células T durante la infección por ZIKV en humanos⁽⁷⁸⁾

6.10 Diagnóstico

Debido a la poca frecuencia de infecciones por ZIKV antes de 2016, no hubo ensayos disponibles comercialmente para la detección del virus, por lo tanto desde el brote en el 2016 el centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) recomiendan actualmente probar a mujeres embarazadas en áreas de transmisión activa de ZIKV con anticuerpos de inmunoglobulina M (IgM) en el primer y segundo trimestre y, si es positivo en cualquier momento, confirmar mediante la selección de muestras de orina y suero mediante PCR⁽⁷⁹⁾.

Actualmente están disponibles el RT-PCR en tiempo real y el aislamiento viral, como estándares para el diagnóstico confirmatorio en los primeros días de la infección. Existen pruebas serológicas (ELISA, FRNT, BOB) para determinar anticuerpos IgM^(21, 23), pero hay el inconveniente de las reacciones cruzadas con otros flavivirus. Sin embargo, pueden utilizarse en ciertas circunstancias en la que no es posible contar con RT-PCR y hacer una interpretación adecuada⁽⁸⁰⁾.

Diagnóstico molecular: La detección directa de virus solo es posible durante los primeros 3 a 5 días después del inicio de los síntomas. Las muestras de saliva y orina para la detección del genoma viral mediante RT-PCR pueden ser las mejores muestras para diagnóstico. Es importante usar ensayos de PCR que se centren en los linajes ZIKV asiático y africano que se dirigen a las regiones conservadas del gen de la envoltura o la región NS5. Esto es para evitar resultados falsos negativos. También es importante tener en cuenta que los resultados negativos de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (rRT-PCR) en tiempo real no descartan la infección por Zika debido a la descomposición de la viremia a lo largo del tiempo y la inexactitud en el informe del inicio de los síntomas del Zika⁽⁶⁹⁾.

Diagnóstico serológico: La serología ZIKV se realiza generalmente mediante ELISA con pruebas de confirmación por FRNT de acuerdo con los protocolos estándar. Hasta la fecha, no hay un kit de serología comercial validado para el ZIKV, pero hay kits disponibles para el laboratorio. El ELISA no está disponible en muchos laboratorios. FRNT es el "estándar de oro" para la



diferenciación de anticuerpos anti-Flavivirus porque es relativamente específico en infecciones primarias por Flavivirus (sin infección previa con otro Flavivirus). FRNT, sin embargo, se realiza solo en laboratorios altamente especializados, es costoso y puede requerir laboratorios regulados debido a la manipulación de virus vivos. Se han desarrollado nuevos protocolos que utilizan virus recombinantes o partículas de virus informantes, pero aún no están disponibles para ZIKV⁽¹¹⁾.

Los ensayos de anticuerpos neutralizantes son capaces de discriminar las infecciones por DENV y ZIKV, particularmente después del período de convalecencia temprana^(21, 22). Más recientemente, algunos grupos han identificado antígenos o han desarrollado ensayos con especificidad serológica mejorada para discriminar la infección por ZIKV de la infección por flavivirus relacionados. Sin embargo, estos nuevos ensayos esperan una validación e implementación rigurosas^(81, 82).

7. Material y Métodos

Tipo de Estudio: Cohorte Prospectiva

Periodo del estudio: Febrero a Julio 2017

Población de Estudio: Estuvo conformada por mujeres Embarazadas que acudieron al Centro de salud Perla María Norori durante sus chequeos mensuales y que planificaron dar a luz en el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales (HEODRA) de la ciudad de León.

Muestras de estudio: Un total de 253 mujeres embarazadas.

Muestreo: Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, se tomó una muestra sanguínea de las madres gestantes en su primer, segundo y tercer trimestre de embarazo, así como muestras durante el parto que incluían muestras sanguíneas maternas y de cordón umbilical.

Criterios de inclusión:

Se incluyeron a todas aquellas mujeres embarazadas que asistan al centro de salud Perla María Norori y que dieron a Luz en el HEODRA.

Criterios de Exclusión:

Mujeres que dieron a luz en hospitales o clínicas privadas y cuyas fechas probables de parto fueron a partir del mes de octubre.

Muestreo y recolección de la información

Recolección de la información: Cada mujer embarazada fue captada durante su control prenatal en el laboratorio del centro de salud con el fin de solicitar su participación y firma de un consentimiento informado. Una vez captada un colaborador del estudio explico los objetivos de la investigación y le entrego el consentimiento para su lectura. Se realizó una entrevista para solicitar información clínica, epidemiológica y demográfica de interés. La información del resumen del parto que incluye el peso, el sexo, la circunferencia de la cabeza, las complicaciones y el estado vital del bebé fueron extraídos de los registros médicos después del alumbramiento.

Vigilancia de cordón umbilical: Las muestras de cordón umbilical fueron tomadas por un grupo de vigilancia activa en el Hospital Escuela Oscar Danilo Rosales de la ciudad de León. El equipo estuvo conformado por 4 bioánalistas clínicos, quienes realizaron turnos de 8 horas cada uno para



alcanzar una vigilancia de 24 horas los 7 días de la semana. La vigilancia se realizaba tanto en la sala de AROII y la sala de Labor y parto con el fin de controlar los ingresos del paciente y la recolección de la muestra de cordón de partos (naturales y cesáreas).

Obtención y conservación de la muestra: Luego de haber aceptado participar y llenar la ficha se procedió a la obtención de una muestra de sangre. Se tomó 4ml de muestra sanguínea del antebrazo en un tubo Vacutainer con EDTA y alrededor de 50 ml de sangre del cordón en tubos Vacutainer con EDTA, hubo casos en casos en que no se pudieron utilizar tubos para la toma de muestra de cordón y se utilizó bolsas hematológicas para extracción sanguínea con EDTA.

Las muestras fueron debidamente rotuladas y trasladadas al Laboratorio de Microbiología de la UNAN-León en termos con refrigerantes para mantener una temperatura entre 4-8 °C hasta el momento del análisis; una vez en el laboratorio, 1 ml de las muestras sanguíneas fueron guardadas a -20 °C hasta ser analizadas, los 3 ml restantes de la muestra sanguínea fueron centrifugadas a 3,000 rpm por 5 minuto para obtener el plasma y el paquete globular. Una vez separados, los plasmas se transfirieron a cryoviales para ser guardadas a -20 °C y los paquetes globulares guardados a 4 °C hasta ser analizados.

Análisis de Laboratorio

ELISAS

Determinación de anticuerpos IgG anti- ZikaV-DenV: Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por el CDC y adaptado a nuestro laboratorio. Se sensibilizaron las placas con 50 μl de anticuerpo Mab 4G2 diluido 1:1000 (100 ng/pozo) en buffer carbonato y se incubo a 4°C toda la noche en cámara húmeda. Al día siguiente se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween20 0.05%, se agregó 100 μl de solución de bloqueo (leche 3% en PBS-Tween 20 0.05%) y se incubo 1 h a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron las placas 5 veces y se agregaron 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 incubaron a 37°C por 1 hora en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se lavaron las placas 5 veces, se agregaron 50 μl de la muestra por pozo según dilución (1/100 y 1/1000) en solución de bloqueo y se incubaron a 37°C por 1 hora en cámara húmeda. Luego se lavaron las placas 5 veces, se agregaron 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 incubo



a 37°C por 1 hora en cámara húmeda. Posteriormente se agregaron 50 μ l de sustrato por pozo (El sustrato se prepara con 20ml de agua destilada + 1 tableta dorada + 1 tableta plateada) y se incubo en oscuridad aproximadamente 10 min a T° ambiente. Finalmente se leyó a una absorbancia a 405 nm. Se consideraron positivos todas aquellas absorbancias con un cut off = \bar{X} del control negativo + 3 SD.

Determinación de anticuerpos IgM anti- ZikaV-DenV: Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por el CDC y adaptado a nuestro laboratorio. Se sensibilizaron las placas con 75 µl por pozo de anti- Human IgM 1/50 diluido en buffer carbonato bicarbonato y se incubo toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se eliminaron los anticuerpos IgM de la placa y se secaron con papel toalla, posteriormente se agregaron 200 µl de solución de bloqueo (Leche 5% + PBS-Tween20 0.05%) y se incubo por 30 min a T° ambiente. Transcurrido el tiempo se procedio a lavar las placas 3 veces con PBS-Tween20 0.05%, luego se agregó 50 µl por pozo de las muestras y controles con dilución 1/40 diluido en solución de lavado y se incubo a 37°C por 1 hora en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron las placas 3 veces y se agregaron 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 incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se lavaron las placas 3 veces y se agregaron 50 µl del conjugado HRP-Conjugated 6B6C, 1/1000 diluido en solución de bloqueo, y se incubaron 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se lavarán las placas 3 veces, luego se agregaron 75 µl del sustrato (TMB) y se incubo aproximadamente 15 min a T° ambiente. Posteriormente se agregaron 50 µl de la solución Stop (1N H2SO4) dejando reposar hasta 5 minutos. Finalmente, se leyó a una absorbancia de 450 nm tomando tiempos de lectura con intervalos de 5 min entre cada lectura. Se utilizaron los controles positivos y negativos respectivos⁽²⁴⁾.

Las muestras se consideraron positivas de acuerdo:

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

PN= Media OD del control positivo con antigeno Zika o DenV (P)
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.

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



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

Interpretación:

- Valor de $P/N \ge 3.0$ se consideran presuntos positivos.
- Valor de $P/N \ge 2,0$ 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:

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

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

NS1 Block-of-Binding (NS-1 BOB)

Las placas de poliestireno (Nunc MaxiSorp) se recubrieron durante la noche con 1 μ g / ml de ZIKV NS1 (cepa MR766; Meridian o Native Antigen Company, Inc.) en un tampón de recubrimiento (PBS) a 4 ° C. Las placas se bloquearon durante 1 h con PBS que contenía 1 % BSA. Se añadió plasma o suero (dilución 1:10 en PBS / BSA al 1%) a las placas ELISA recubiertas con NS1. Después de 1 h, se añadió un volumen igual de anti-NS1 ZKA35 biotinilado a 20 ng / ml y la mezcla se incubo a temperatura ambiente durante 15 minutos (dilución final del plasma en la mezcla, 1:20). Las placas se lavaron con PBS-T (PBS más Tween 20 al 0,05%) y se añadió estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina durante 30 minutos. Las placas se lavaron de nuevo con PBS-T y se añadio el sustrato (p-NPP, Sigma) durante 30-60 min. Las placas se leyeron en un lector ELISA a 405 nm. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera: [1 - ([OD sample - OD neg ctr] / [OD pos ctr - OD neg ctr])] × $100^{(23)}$.

Ensavos de Neutralización

Se adaptó la prueba de neutralización de reducción de enfoque (FRNT₅₀) a un formato de 96 pocillos. Los títulos de neutralización se determinaron mediante FRNT₅₀ mediante una dilución en serie de suero humano de 3 veces y se mezclaron con \approx 50–100 unidades de virus formadoras de foco (FFU) en medio Eagle modificado con Dulbecco con FBS al 2%. Las mezclas de virus y anticuerpos se incubaron durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ C y luego se transfirieron a una monocapa de células Vero-81. Se generaron curvas de neutralización en Prism y debe tener un R2> 0.75, una pendiente



de Hill 0.5, y un FRNT₅₀ que caiga dentro del rango de la serie de dilución para que se considere válido⁽²¹⁾.

ZIKV Estimado FRNT (eFRNT): Este ensayo se realizó como el anteriormente descrito, pero las muestras se ejecutaron en software singleton en cuatro diluciones (en lugar de 8 diluciones). El valor eFRNT es un número discreto correspondiente al factor de dilución en el que se observa un 50% de FFU máximo o el promedio de los dos factores de dilución entre los cuales se cruza el 50% de FFU. Las muestras se consideraron probables para una infección previa por ZIKV con eFRNT> 200. Las muestras con un eFRNT <200 estimado se clasificarán como no infectadas con ZIKV.

Definición del estado ZIKA: Infección por ZIKV: 1) Las mujeres con títulos altos (FRNT> 3000) en el momento del nacimiento serán designadas como infectadas durante el embarazo. 2) Se asignará la misma designación si el valor de FRNT₅₀ aumentase 4 veces entre las muestras pre y perinatal. 3) Cualquier mujer con una IgM positiva (solo sangre materna) en el embarazo será diagnosticada con una infección incidente.

ZIKV Preinmune: las mujeres con niveles de FRNT₅₀ entre 40 y 3000 que se mantengan estables (diferencia de menos de 4 veces) durante el embarazo serán designadas como infecciones por ZIKV antes del embarazo.

ZIKV Naïve: 1) ZIKV IgG negativo o ZIKV FRNT o eFRNT₅₀ <200.

Momento desconocido de ZIKV: una parte de las mujeres inmunes a ZIKV que no se adaptarán fácilmente a ninguna de las dos categorías, principalmente debido a la disponibilidad inadecuada de la muestra desde los primeros momentos del embarazo.

Análisis Estadístico

Los datos del estudio se introdujeron y gestionaron con REDCap^{TM(83)}, y se analizaron con el software R (versión 3.4) y el paquete epitools R. SPSS, Inc. Chicago IL. (Statistical Package for the Social Sciences) versión 21.0.

Las características demográficas de las participantes que dieron a luz en el HEODRA se analizaron mediante pruebas t para las variables continuas, pruebas de ji cuadrado para las variables categóricas y pruebas exactas de Fisher para las variables categóricas con datos escasos. Los



resultados adversos del nacimiento se tabularon de forma cruzada con diversas exposiciones y características potenciales. Finalmente, los índices de riesgo y los intervalos de confianza de Wald del 95% que comparan el riesgo de resultados de nacimiento adversos y los resultados de nacimiento adversos específicos de CZS para diversas características se estimaron por probabilidad máxima incondicional con un pequeño ajuste de la muestra cuando las tablas de contingencia correspondientes contenían una celda con menos de cinco sujetos.

Consideraciones Éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León (UNAN) (Acta 93, 2016, aprobado el 21 de septiembre de 2016) y el Review Board Institucional de la Universidad de Carolina del Norte (UNC). Protocolo IRB 16-1402).

A todas las participantes se les explicaron los objetivos del estudio y se les solicito la firma del consentimiento informado. Todas las mujeres embarazadas que asistan a su control prenatal en el centro de salud Perla Maria Norori y planificaron dar a luz en el HEODRA, tuvieron igual oportunidad de participar en este estudio.



8. Resultados:

Perfil Epidemiológico de las mujeres embarazadas: Se estableció una cohorte prospectiva de 253 mujeres embarazadas que asistieron a control prenatal al centro de salud PMN, entre febrero y julio de 2017, en León Nicaragua. Al mismo tiempo se estableció un sistema de vigilancia del parto en el HEODRA para recolección de muestras de cordón umbilical de los neonatos de las mujeres que se captaron inicialmente en el PMN. De las 253 mujeres embarazadas inscritas, 194 (77%) mujeres dieron a luz en el HEODRA. La mayoría de las mujeres disponían, en sus hogares, de electricidad (95%), paredes con ladrillos y cemento (81%), agua potable (79%) e inodoro (66%). También se observó que el 23% de las mujeres estaban casadas, el 49% eran primerizas y la mediana de edad fue 22 años [Rango intercuartil (RIQ): 18-28 años]. La mediana de la edad gestacional al momento de la captación fue 26 semanas [RIQ: 13-34 semanas]. Entre las mujeres multíparas el 8% informaron haber tenido un parto prematuro previo y 18% tenían antecedentes de parto por cesárea. (Ver Tabla 1).

Características Clínicas: El 38.1% de las mujeres embarazadas informaron síntomas consistentes con la infección por ZIKV en algún momento durante el embarazo, tales como: fiebre (21.6%), erupción cutánea (6.7%) y conjuntivitis (9.8%). El 5% tenían un diagnóstico de ZIKV sintomático agudo documentado en su historia clínica; 3 de estos tenían infección confirmada por laboratorio mediante pruebas de RT-PCR. Además, se observó que el 39% de las mujeres informaron un diagnóstico previo de CHIK y 5% un diagnóstico previo por DENV. El 5% de las mujeres presento hipertensión y el 2% diabetes durante el embarazo. (Ver Tabla 1).

Seroprevalencia de infección por ZIKV: De 187 mujeres analizadas, el 94% tenían anticuerpos IgG anti-ZIKV según el análisis por ELISA. El re-análisis de las mismas muestras con la técnica de eFRNT que permite detectar selectivamente anticuerpos neutralizantes anti-ZIKV confirma que únicamente el 59% de las mujeres embarazadas tuvieron una infección previa con ZIKV, la cual pudo presentarse antes o durante el embarazo. Es decir, el 35% de las mujeres tenían anticuerpos de reacción cruzada, posiblemente anticuerpos anti-DENV. La misma técnica (eFRNT) se usó para investigar si los anticuerpos neutralizantes también estaban presentes en la sangre del neonato, encontrándose que 42% de los neonatos tenían anticuerpos neutralizantes contra ZIKV, posiblemente transferidos por la madre durante la gestación o por infección fetal. El análisis de



IgM anti-ZIKV en muestras maternas determinó que 8 participantes tenían infección aguda por ZIKV. (Ver Tabla 2).

Determinación de la infección incidente por ZIKV durante el embarazo: Los análisis de anticuerpos neutralizantes indican que 110 (59%) de las 187 mujeres analizados eran seropositivos al ZIKV, de las cuales 39 (21%) tuvieron una infección incidente durante el embarazo, 41 (22%) estaban inmunizadas contra ZIKV antes del embarazo, 77 (41%) no tenían evidencia de infección y en 30 (16%) mujeres no se pudo determinar el tiempo de infección debido a la falta de una muestra prenatal que permitiera el análisis de la tendencia FRNT₅₀. (Ver Figura 1a).

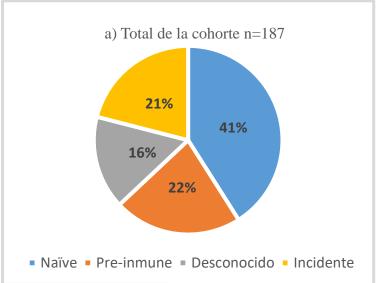
Después de estratificar según el último período menstrual (UPM) y el periodo de mayor transmisión de ZIKV en Nicaragua (mayo-diciembre de 2016), observamos que el 40% de las mujeres que se embarazaron durante el periodo de mayor transmisión tuvieron una infección incidente por ZIKV en el embarazo. Además, observamos una disminución marcada de infección incidente (10%) por ZIKV en las mujeres embarazadas después de la epidemia, es decir, durante el periodo de menor transmisión (Ver Figura 1b).

Resultados obstétricos y neonatales del parto: 194 mujeres dieron a luz 196 neonatos en el HEODRA, el 53% de los neonatos eran del sexo masculino. La edad gestacional media en el momento del parto fue de 39 semanas (IQR: 38-40) y el peso medio al nacer fue de 3050 gramos (IQR: 2750-3400). Del total, el 40% nacieron por cesárea, el 17% experimentó al menos un resultado adverso del parto y el 4% fue enviado a la UCIN. Además, se observa que el 1% presento microcefalia, 2% otras anomalías congénitas y el 0.5% murió al nacer. (Ver Tabla 3).

Resultados del embarazo y relación con el estado serológico: De los 33 neonatos que nacieron con alguna complicación, solamente 3 (1.5%) cumplieron con la definición estricta de síndrome congénito de Zika. No hubo correlación significativa entre ninguna categoría de resultados fetales adversos y el informe de síntomas, antecedentes obstétricos, tiempo de UPM y diagnóstico clínico previo de ZIKV. Del mismo modo, la comparación del riesgo de cualquier resultado adverso de nacimiento entre los grupos serológicos no arrojó diferencias significativas. (Ver Tabla 4).

Se utilizaron ensayos NS-1 BOB como comparador, se determinó la sensibilidad y especificidad para nuestro algoritmo de prueba de neutralización siendo 94%.





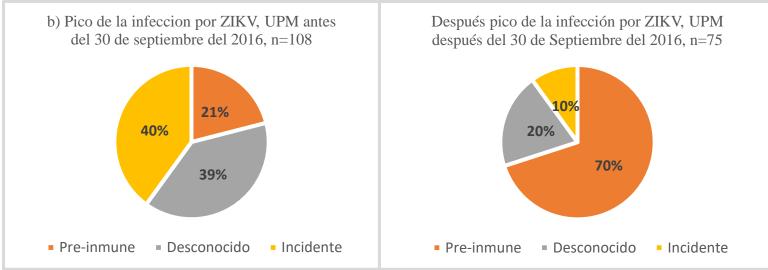


Figura 1: Proporción de mujeres en cada categoría serológica. a) El porcentaje de la cohorte total en cada grupo. b) Los sujetos se dividieron por el último periodo menstrual (UPM) durante el pico y después del pico de infección por ZIKV, y se muestra la proporción de cada categoría serológica entre las mujeres inmunes al ZIKV. Las muestras Naïve se excluyeron para este análisis; 183 de los 187 sujetos tenían datos para UPM, n = 108 antes del 30 de septiembre y n = 75 después del 30 de septiembre de 2016.



Tabla 1: Características maternas de las mujeres embarazadas.

Características	Mujeres con información del parto (n=194)
Edad materna al momento de la inscripción, mediana	22.5 (18.8, 28.2)
de años (IRQ)	
Casadas n (%)	45 (23.2)
Edad gestacional a la 1ª ANC ¹ , mediana de semanas	26 (13, 34)
(IRQ)	
Antescedentes de embarazo, n (%)	
Sin embarazos previos	95 (49.0)
1	53 (27.3)
2 ó más	46 (23.7)
Parto prematuro previo, n (%)	15 (7.7)
Parto por cesárea previa, n (%)	35 (18.0)
Hipertensión asociada al embarazo, n (%)	10 (5.2)
Diabetes en embarazo, n (%)	3 (1.5)
Diagnóstico médico del Zika en el embarazo, n (%)	9 (4.6)
Antecedentes de fiebre, erupción cutánea o	74 (38.1)
conjuntivitis en el embarazo, n (%)	

ANC¹ Captación en la atención prenatal

Tabla 2: Seroprevalencia de ZIKV en el momento del parto.

ELISA IgG (n=187)	eFRNT (n=176)*	Resultado Integrado^ (n=187)
n (%)	n (%)	n (%)
176 (94)	107 (61)	110 (59)
11 (6)	69 (39)	77 (41)
	(n=187) n (%) 176 (94)	(n=187) n (%) 176 (94) n (%) 107 (61)

^{*}eFRNT se determinó para muestras positivas para IgG ZIKV; positivo= eFRNT > 200

[^] El valor FRNT₅₀ se considera correcto si discrepa con eFRNT; 3 muestras negativas de eFRNT con puntaje positivo por FRNT₅₀



Tabla 3: Resultados obstétricos y neonatales.

Nacimiento	Mujeres con información de parto (N=194*)
Cualquier resultado adverso del nacimiento,	33 (16.8)
n (%)	
Nacimiento de un niño muerto, n (%)	1 (0.5)
Microcefalia, n (%)	2 (1.0)
Otra anormalidad, n (%)	4 (2.0)
Admisión en UCIN, n (%)	8 (4.1)
Edad gestacional al parto, mediana de	39 (38, 40)
semanas (IRQ)	
<37 semanas, n (%)	18 (9.3)
37 - 42 semanas, n (%)	176 (90.7)
Peso al nacer, g, mediana (IRQ)	3050 (2750, 3400)
<2500, n (%)	14 (7.1)
2500-3500, n (%)	152 (77.6)
>3500, n (%)	30 (15.3)
Parto por cesárea, n (%)	78 (40.2)

^{*}Datos recopilados sobre 194 mujeres que dieron a luz a 196 bebés.



Tabla 4: Asociación del ZIKV versus todos los resultados adversos del nacimiento.

Exposición / Característica	Resultados adversos de nacimiento específicos de CZS		Todos los resultados adversos de nacimiento	
Cuructor issued	n (%)	RR (IC 95%)	n (%)	RR (IC 95%)
Diagnóstico de	11 (70)	RR (10 /3/0)	11 (70)	KK (IC 7570)
laboratorio del Zika				
Naïve*	1 (1.3)		17 (22.1)	
Ambiguo	1 (3.4)	1.3 (0.1, 20.8)	4 (13.8)	0.6 (0.2, 1.6)
Intragravido	1 (2.5)	1.0 (0.1, 15.2)	6 (15.0)	0.7 (0.3, 1.6)
Pre-immune	0 (0.0)	$0 (0, \infty)$	5 (12.2)	0.5 (0.2, 1.3)
Diagnóstico clínico de	3 (313)	(*,)	- (==:=)	(0.2, 2.0)
Zika				
Si	1 (11.1)	4.3 (0.4, 43.0)	3 (33.3)	2.0 (0.7, 5.6)
No*	2 (1.8)		30 (15.3)	
Tiempo de UPM	2 (110)		00 (10.0)	
Antes 9/30/16	3 (2.7)	$2.2 (0, \infty)$	17 (15.2)	0.8 (0.4,
Después 9/30/16*	0 (0.0)	2.2 (0, 33)	16 (19.5)	1.4)
Antecedentes de	0 (0.0)		10 (17.5)	1.1)
fiebre, erupción				
cutánea o malestar				
general en el				
embarazo.	2 (2.7)	1.6 (0.2, 17.7)	16 (21.6)	1.5 (0.8, 2.8)
Si	1 (0.8)	(,,	17 (14.2)	
No*	- (0.0)		-, ()	
Embarazo previo				
Si	1 (1.0)	0.3 (0.0, 3.5)	19 (19.2)	1.3 (0.7, 2.4)
No*	2(2.1)		14 (14.7)	
Nacimiento previo	, ,		` ′	
prematuro				
Si	0 (0.0)	$0 (0, \infty)$	6 (40.0)	2.7 (1.3, 5.4)
No*	3 (1.7)		27 (15.1)	
Parto por cesárea				
previa				
Si	0 (0.0)	$0 (0, \infty)$	6 (17.1)	1.0 (0.5, 2.3)
No*	3 (1.9)		27 (17.0)	
Parto por cesárea de				
este embarazo				
Si	1 (15.4)	0.5 (0.0, 5.4)	12 (1.3)	0.8 (0.4, 1.6)
No*	2 (18.1)		21 (1.7)	

^{*} indica el grupo de referencia para las razones de riesgo.



9. Discusión

En este estudio reportamos que el 38.1% de las mujeres embarazadas durante la epidemia de ZIKV, en el territorio de salud PMN, reportaron sintomatología clínica compatible con dicha enfermedad, sin embargo, solamente el 5% tenían un diagnóstico clínico de ZIKV agudo documentado en su expediente clínico y apenas el 1.2% tenían infección confirmada por ensayos moleculares. Estos hallazgos sugieren que la enfermedad del ZIKV es tan leve que pocas mujeres embarazadas requirieron atención médica durante la epidemia y por tanto dicha enfermedad fue subdocumentada (84). Otro aspecto importante es que la sintomatología es similar a otras enfermedades endémicas como DENV y por ende difícil de diagnosticar clínicamente. Como se ha descrito en otros estudios las manifestaciones clínicas por ZIKV siguen siendo inespecíficas en áreas endémicas y que solo varían en intensidades subjetivas (84, 85). Otra limitante fundamental es la falta de métodos confirmatorios rápidos que permitan identificar la enfermedad en las unidades de salud, en particular por los efectos severos en el neonato.

El uso de métodos tradicionales de diagnóstico serológico, tampoco funcionaron durante la epidemia dado que aproximadamente el 35% de las mujeres embarazadas en el periodo de estudio presentaron anticuerpos de reacción cruzada con otros flavivirus, posiblemente DENV. Para establecer la seroprevalencia (59%) real de la infección por ZIKV fue necesario el uso de métodos muy laboriosos y de alto costo como los ensayos de neutralización, proponiendo así estos ensayos como el estándar de oro en la detección de ZIKV en las mujeres gestantes. Además, determinamos que la seroprevalencia (59%) reportada en mujeres embarazadas en este estudio es similar a la seroprevalencia (56%) reportada en adultos en Managua durante el mismo período ⁽⁸⁶⁾. Estudios similares en mujeres embarazadas de Colombia y Brasil (Rio de Janeiro) reportaron prevalencias de 56% de 54% respectivamente ^(14, 87).

En relación a las infecciones incidentes por ZIKV durante el embarazo reportamos que 21% de las mujeres se infectaron durante la etapa gestacional. Estos hallazgos son similares a los encontrados en mujeres embarazadas de la Guayana Francesa (29.5%), de Colombia (27%) y de Puerto Rico (25%). Todos estos estudios indican que durante la epidemia de ZIKV cerca de un cuarto de las mujeres se infectaron de forma sintomática o asintomática y proponen un escenario que podría propiciar un aumento sustancial de niños con problemas severos como la microcefalia o problemas de neuro-desarrollo en el infante (87-89).



En este estudio también demostramos que las infecciones incidentes se correlacionan con el periodo de mayor transmisión de ZIKV en León, es decir 40% de las mujeres con último periodo menstrual en el pico de la epidemia (Mayo a Septiembre 2016) mostraron una infección incidente en comparación con apenas el 10% de las mujeres con último periodo menstrual al final de la epidemia Estos datos sugieren que la técnica de neutralización utilizada en este estudio tiene buena correlación con los datos epidemiológicos reportados por el MINSA.

Un componente fundamental en este estudio fue la vigilancia 24/7 de las características del parto establecida en el hospital, lo cual permitía registrar información relacionado con los resultados adversos del recién nacido de las mujeres que se enrolaron en el PMN. El 17% de los neonatos presento al menos un resultado adverso y el 1% (2/196) nació con microcefalia, de ellos únicamente 1 niño fue confirmado con infección incidente por ZIKV y definición estricta por síndrome congénito de ZIKV. Este estudio no fue diseñado para establecer tazas de prevalencia de microcefalia dado su bajo poder. Sin embargo, una aproximación sugiere que aproximadamente 51 de 10,000 recién nacidos pudieron haber nacido con microcefalia asociada al ZIKV en el PMN. Es interesante mencionar que estudios epidemiológicos de Brasil y Las Polinesias Francesas reportaron tasas de 50 por 10,000 y 95 por 10,000 recién nacidos con microcefalia durante los brotes epidémicos de ZIKV, respectivamente (59, 90). Existen otros factores (TORCH) que puede causar malformaciones congénitas incluyendo las microcefalias (91), por tanto no todos los casos pueden atribuirse al ZIKV. Otro aspecto importante es que los médicos podrían estar más propensos a reportar malformaciones congénitas incluyendo microcefalia, dada la importancia mediática del fenómeno, como ocurrió en Brasil al inicio de la epidemia. El protocolo aplicado en este estudio junto a la confirmación mediante técnicas de neutralización puede ayudar a establecer las asociaciones correctas entre ZIKV y malformaciones congénitas.

El síndrome congénito por ZIKV que incluye contracturas de extremidades, tono muscular alto, anomalías oculares, pérdida de la audición y microcefalia no mostro una relación significativa con la infección incidente. Únicamente 3 niños (1.5%) presentaron el síndrome congénito por ZIKV, incluyendo 1 niño con microcefalia. Otros investigadores tampoco han demostrado asociaciones estadísticas entre las infecciones por ZIKV y defectos congénitos, de hecho, estos investigadores no encontraron relación con la gravedad de la enfermedad materna y la carga de ARN de ZIKV en el momento de la infección. (28,92).



Conclusiones

- En este estudio reportamos que el 38.1% de las mujeres embarazadas durante la epidemia de ZIKV, en el territorio de salud PMN, reportaron sintomatología clínica compatible con ZIKV, el 5% de ellas tenían un diagnóstico clínico de ZIKV agudo y apenas el 1.2% tenían infección confirmada por ensayos moleculares.
- La seroprevalencia de ZIKV en mujeres embarazadas en el PNM durante la epidemia fue de 59%, la cual fue determinada mediante ensayos de neutralización.
- En general la infección incidente por ZIKV, sintomática o asintomática fue del 21%, pero incrementa a 40% si las mujeres se embarazaron durante el pico epidémico.
- El 1.5% de los bebes nacidos presentan Síndrome Congénito de Zika, sin embargo, no hubo correlación entre infección incidente durante el embarazo y resultados fetales adversos.



10. Recomendaciones

- El protocolo y algoritmo utilizado en este estudio podría ser revisado por los tomadores de decisiones del ministerio de Salud, para utilizarse durante nuevos brotes epidémicos de dicha enfermedad.
- Realizar un seguimiento de los niños nacidos bajos esta cohorte para conocer el desarrollo de algún defecto congénito de largo plazo.
- Realizar un seguimiento activo de las mujeres embarazadas de los centros de salud para poder explicar en qué trimestre el virus infecta a la embarazada y conocer si una infección temprana por el virus se asocia al desarrollo de malformaciones congénitas.
- Realizar un estudio donde se involucren todos los factores que pueden estar asociados al desarrollo de anomalías congénitas, ya que en nuestro país se desconoce la incidencia de infección por otros agentes causantes de malformaciones y que pueden sesgar el estudio.
- Poner en práctica el algoritmo propuesto en este estudio para conocer mejor la prevalencia de infecciones ocasionadas por ZIKV.



11. Referencias

- 1. Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1952;46(5):509-20.
- 2. Smithburn KC. Neutralizing Antibodies Against Certain Recently Isolated Viruses in the Sera of Human Beings Residing in East Africa. The Journal of Immunology. 1952;69(2):223-34.
- 3. European Centre for Disease prevention and Control (ECDC). Zika virus infection outbreak, French Polynesia. Stockholm: ECDC14 February 2014. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-zika-virus-infection-outbreak-french-polynesia.
- 4. Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. Emerging infectious diseases. 2014;20(6):1085-6. PubMed PMID: 24856001.
- 5. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. New England Journal of Medicine. 2009 2009/06/11;360(24):2536-43.
- 6. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerging infectious diseases. 2008;14(8):1232-9. PubMed PMID: 18680646.
- 7. Zanluca C, Melo VCAd, Mosimann ALP, Santos GIVD, Santos CNDD, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2015;110(4):569-72. PubMed PMID: 26061233.
- 8. Salud OPdl. Zika Actualización Epidemiológica Regional de la OPS (Américas) 25 de agosto de 2017 2017. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599:regional-zika-epidemiological-update-americas&Itemid=41691&lang=es.
- 9. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. Antiviral research. 2016;130:69-80. PubMed PMID: 26996139. Epub 03/18.
- 10. Hasan SS, Sevvana M, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. Nature Structural & Molecular Biology. 2018 2018/01/01;25(1):13-20.
- 11. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. Clinical microbiology reviews. 2016;29(3):487-524. PubMed PMID: 27029595. Epub 03/30.
- 12. Sampathkumar P, Sanchez JL. Zika Virus in the Americas: A Review for Clinicians. Mayo Clinic Proceedings. 2016;91(4):514-21.
- 13. Oliveira Melo AS, Malinger 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. 2016 2016/01/01;47(1):6-7.
- 14. 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;375(24):2321-34. PubMed PMID: 26943629. Epub 03/04.
- 15. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura CV, Fonseca EBd, et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. JAMA pediatrics. 2017;171(3):288-95. PubMed PMID: 27812690.
- 16. Pacheco O, Beltrán M, Nelson CA, Valencia D, Tolosa N, Farr SL, et al. Zika Virus Disease in Colombia Preliminary Report. New England Journal of Medicine. 2016.



- 17. Granger D, Hilgart H, Misner L, Christensen J, Bistodeau S, Palm J, et al. Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences. Journal of clinical microbiology. 2017;55(7):2127-36. PubMed PMID: 28446573. Epub 06/23.
- 18. Speer SD, Pierson TC. Diagnostics for Zika virus on the horizon. Science. 2016;353(6301):750-1.
- 19. Hoen B, Schaub B, Funk AL, Ardillon V, Boullard M, Cabié A, et al. Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. New England Journal of Medicine. 2018 2018/03/15;378(11):985-94.
- 20. Organization WH. Zika virus 2018. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus.
- 21. Collins MH, McGowan E, Jadi R, Young E, Lopez CA, Baric RS, et al. Lack of Durable Cross-Neutralizing Antibodies Against Zika Virus from Dengue Virus Infection. Emerging infectious diseases. 2017;23(5):773-81. PubMed PMID: 28418292.
- 22. Montoya M, Collins M, Dejnirattisai W, Katzelnick LC, Puerta-Guardo H, Jadi R, et al. Longitudinal Analysis of Antibody Cross-neutralization Following Zika Virus and Dengue Virus Infection in Asia and the Americas. J Infect Dis. 2018 Jul 13;218(4):536-45. PubMed PMID: 29618091. Pubmed Central PMCID: PMC6047418. Epub 2018/04/05. eng.
- 23. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(31):8384-9. PubMed PMID: 28716913. Epub 07/17.
- 24. Centers for Disease Control and Prevention. Zika MAC-ELISA. Available from: https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/safety/emergencysituations/UCM488044.pdf.
- 25. Tsai W-Y, Youn HH, Brites C, Tsai J-J, Tyson J, Pedroso C, et al. Distinguishing Secondary Dengue Virus Infection From Zika Virus Infection With Previous Dengue by a Combination of 3 Simple Serological Tests. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2017;65(11):1829-36. PubMed PMID: 29020159. Epub 07/29.
- 26. Organization WH. WHO Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee on Zika. 1 February 2016. Available from: https://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-director-general-summarizes-the-outcome-of-the-emergency-committee-regarding-clusters-of-microcephaly-and-guillain-barr%C3%A9-syndrome.
- 27. Organization WH. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations 1 February 2016. Available from: https://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations.
- 28. Halai U-A, Nielsen-Saines K, Moreira ML, de Sequeira PC, Junior JPP, de Araujo Zin A, et al. Maternal Zika Virus Disease Severity, Virus Load, Prior Dengue Antibodies, and Their Relationship to Birth Outcomes. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2017;65(6):877-83. PubMed PMID: 28535184. Epub 05/23.
- 29. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Ramirez-Jaramillo V, Gaviria JA, González-Moreno GM, Castrillón-Spitia JD, et al. Diagnosis and outcomes of pregnant women with Zika virus infection in two municipalities of Risaralda, Colombia: Second report of the ZIKERNCOL study. Travel Medicine and Infectious Disease. 2018 2018/09/01/;25:20-5.



- 30. Pomar L, Vouga M, Lambert V, Pomar C, Hcini N, Jolivet A, et al. Maternal-fetal transmission and adverse perinatal outcomes in pregnant women infected with Zika virus: prospective cohort study in French Guiana. BMJ (Clinical research ed). 2018;363:k4431-k. PubMed PMID: 30381296.
- 31. Schwartz DA. The Origins and Emergence of Zika Virus, the Newest TORCH Infection: What's Old Is New Again. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2017;141(1):18-25. PubMed PMID: 27763793.
- 32. Macnamara FN. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria1954. 139-45 p.
- 33. Hayes EB. Zika virus outside Africa. Emerging infectious diseases. 2009;15(9):1347-50. PubMed PMID: 19788800.
- 34. Organization WH. The history of Zika virus. Available from: https://www.who.int/emergencies/zika-virus/timeline/en/.
- 35. Maguiña C, Galán-Rodas E. El virus Zika: una revisión de literatura. Acta Médica Peruana. 2016;33:35-41.
- 36. Kostyuchenko VA, Lim EXY, Zhang S, Fibriansah G, Ng T-S, Ooi JSG, et al. Structure of the thermally stable Zika virus. Nature. 2016 04/19/online;533:425.
- 37. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. New England Journal of Medicine. 2016;374(16):1552-63. PubMed PMID: 27028561.
- 38. Lindenbach BDea. Flaviviridae. In Fields Virology. 6 ed. David MKaP, M.H., eds, editor2013.
- 39. Shi Y, Gao GF. Structural Biology of the Zika Virus. Trends in Biochemical Sciences. 2017;42(6):443-56.
- 40. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. Science (New York, NY). 2016;352(6284):467-70. PubMed PMID: 27033547. Epub 03/31.
- 41. Kielian M. Mechanisms of Virus Membrane Fusion Proteins. Annual Review of Virology. 2014;1(1):171-89. PubMed PMID: 26958720.
- 42. Gómez LA, Montoya G, Rivera HM, Hernández JC. Características de la estructura molecular de las proteínas E del virus del Zika y E1 del virus de la rubéola y posibles implicaciones en el neurotropismo y en las alteraciones del sistema nervioso. Biomédica. 2017;37(1):121-32. Español.
- 43. Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Lescar J, et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. The EMBO journal. 2004;23(4):728-38. PubMed PMID: 14963486. Epub 02/12.
- 44. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. Nature. 2004 01/22/online;427:313.
- 45. 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 Negl Trop Dis. 2012;6(2):e1477-e. PubMed PMID: 22389730.
- 46. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. Clinical Microbiology and Infection. 2014;20(10):O595-O6.
- 47. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. Emerging infectious diseases. 2015;21(10):1885-6. PubMed PMID: 26401719.
- 48. Lanciotti RS, Lambert AJ, Holodniy M, Saavedra S, Signor LDCC. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. Emerging infectious diseases. 2016;22(5):933-5. PubMed PMID: 27088323.



- 49. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. Archives of Virology. 2016 2016/03/01;161(3):665-8.
- 50. Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, Qin Y, Patil VS, Eroshkin AM, et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. Cell stem cell. 2016;19(2):258-65. PubMed PMID: 27162029. Epub 05/06.
- 51. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo S-S, Lee S-A, et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. Cell stem cell. 2016;19(5):663-71. PubMed PMID: 27524440. Epub 08/11.
- 52. Zhang Z-W, Li Z-L, Yuan S. The Role of Secretory Autophagy in Zika Virus Transfer through the Placental Barrier. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2017;6:206-. PubMed PMID: 28119857.
- 53. Blázquez A-B, Escribano-Romero E, Merino-Ramos T, Saiz J-C, Martín-Acebes MA. Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded protein response and autophagy. Frontiers in microbiology. 2014;5:266-. PubMed PMID: 24917859.
- 54. Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. Cell reports. 2017;18(9):2113-23. PubMed PMID: 28249158.
- 55. CDC. Zika Virus. Available from: https://www.cdc.gov/zika/index.html.
- 56. Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. Eurosurveillance. 2014;19(13):20751.
- 57. Organization WH. ZIKA VIRUS MICROCEPHALY AND GUILLAIN-BARRÉ SYNDROME 2016. Available from: https://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report-26-02-2016.pdf.
- 58. Hussain A, Ali F, Latiwesh OB, Hussain S. A Comprehensive Review of the Manifestations and Pathogenesis of Zika Virus in Neonates and Adults. Cureus. 2018;10(9):e3290-e. PubMed PMID: 30443460.
- 59. Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-Artur P, Eyrolle-Guignot D, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. Lancet (London, England). 2016;387(10033):2125-32. PubMed PMID: 26993883. Epub 03/16.
- 60. De Moraes CG, Pettito M, Yepez JB, Sakuntabhai A, Simon-Loriere E, Zaidi MB, et al. Optic neuropathy and congenital glaucoma associated with probable Zika virus infection in Venezuelan patients. JMM case reports. 2018;5(5):e005145-e. PubMed PMID: 29896405.
- 61. Manangeeswaran M, Kielczewski JL, Sen HN, Xu BC, Ireland DDC, McWilliams IL, et al. ZIKA virus infection causes persistent chorioretinal lesions. Emerging microbes & infections. 2018;7(1):96-. PubMed PMID: 29802245.
- 62. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. JAMA. 2014;311(18):1901-11. PubMed PMID: 24825645.
- 63. Agarwal R, Gupta SK, Agarwal P, Saxena R, Agrawal SS. Current concepts in the pathophysiology of glaucoma. Indian journal of ophthalmology. 2009 Jul-Aug;57(4):257-66. PubMed PMID: 19574692.
- 64. Mary E Norton M. Fetal cerebral ventriculomegaly. Available from: https://www.uptodate.com/contents/fetal-cerebral-ventriculomegaly.



- 65. Chu V, Petersen LR, Moore CA, Meaney-Delman D, Nelson G, Christian Sonne D, et al. Possible Congenital Zika Syndrome in Older Children Due to Earlier Circulation of Zika Virus. American Journal of Medical Genetics Part A. 2018;176(9):1882-9.
- 66. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Lissencephaly Information Page 2018. Available from: https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Lissencephaly-Information-Page.
- 67. Ghai S, Fong KW, Toi A, Chitayat D, Pantazi S, Blaser S. Prenatal US and MR Imaging Findings of Lissencephaly: Review of Fetal Cerebral Sulcal Development. RadioGraphics. 2006;26(2):389-405. PubMed PMID: 16549605.
- 68. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. Journal of virology. 2015;89(17):8880-96. PubMed PMID: 26085147.
- 69. Shehu N, Shwe D, Onyedibe K, Pam V, Abok I, Isa S, et al. Pathogenesis, diagnostic challenges and treatment of zika virus disease in resource-limited settings. Nigerian Postgraduate Medical Journal. 2018 April 1, 2018;25(2):67-72.
- 70. Salinas S, Foulongne V, Loustalot F, Fournier-Wirth C, Molès J-P, Briant L, et al. Le virus Zika: L'émergence d'une menace. Med Sci (Paris). 2016:32: 378-86.
- 71. Miner JJ, Sene A, Richner JM, Smith AM, Santeford A, Ban N, et al. Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. Cell Reports. 2016;16(12):3208-18.
- 72. Culshaw A, Mongkolsapaya J, Screaton G. The immunology of Zika Virus. F1000Research. 2018;7:203-. PubMed PMID: 29527300.
- 73. CDC. Importance of Collecting Surveillance Data About Zika Virus and Its Effects. Available from: https://www.cdc.gov/zika/reporting/index.html.
- 74. Charrel RN, Leparc-Goffart I, Pas S, de Lamballerie X, Koopmans M, Reusken C. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. Bulletin of the World Health Organization. 2016;94(8):574-84D. PubMed PMID: 27516635. Epub 08/01.
- 75. Elong Ngono A, Vizcarra EA, Tang WW, Sheets N, Joo Y, Kim K, et al. Mapping and Role of the CD8(+) T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. Cell host & microbe. 2017;21(1):35-46. PubMed PMID: 28081442.
- 76. Robbiani DF, Bozzacco L, Keeffe JR, Khouri R, Olsen PC, Gazumyan A, et al. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. Cell. 2017;169(4):597-609.e11. PubMed PMID: 28475892.
- 77. Winkler CW, Myers LM, Woods TA, Messer RJ, Carmody AB, McNally KL, et al. Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950). 2017;198(9):3526-35. PubMed PMID: 28330900. Epub 03/22.
- 78. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. Science. 2016;353(6301):823-6.
- 79. Oduyebo T, Polen KD, Walke HT, Reagan-Steiner S, Lathrop E, Rabe IB, et al. Update: Interim Guidance for Health Care Providers Caring for Pregnant Women with Possible Zika Virus Exposure United States (Including U.S. Territories), July 2017. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2017;66(29):781-93. PubMed PMID: 28749921.
- 80. Cabezas C, García P. Diagnóstico de la infección por el virus Zika. Anales de la Facultad de Medicina. 2017;78:89-93.



- 81. Premkumar L, Collins M, Graham S, Liou G-JA, Lopez CA, Jadi R, et al. Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection. Journal of clinical microbiology. 2018;56(3):e01504-17. PubMed PMID: 29263206.
- 82. Wong SJ, Furuya A, Zou J, Xie X, Dupuis AP, 2nd, Kramer LD, et al. A Multiplex Microsphere Immunoassay for Zika Virus Diagnosis. EBioMedicine. 2017;16:136-40. PubMed PMID: 28094237.
- 83. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. J Biomed Inform. 2009;42(2):377-81. PubMed PMID: 18929686. Epub 09/30. eng.
- 84. Duarte G, Moron AF, Timerman A, Fernandes CE, Mariani Neto C, Almeida Filho GLd, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women and Microcephaly. Rev Bras Ginecol Obstet. 2017

02.06.2017;39(05):235-48. En.

- 85. Rao R, Gaw SL, Han CS, Platt LD, Silverman NS. Zika Risk and Pregnancy in Clinical Practice: Ongoing Experience as the Outbreak Evolves. Obstet Gynecol. 2017;129(6):1098-103. PubMed PMID: 28486369. eng.
- 86. Zambrana JV, Bustos Carrillo F, Burger-Calderon R, Collado D, Sanchez N, Ojeda S, et al. Seroprevalence, risk factor, and spatial analyses of Zika virus infection after the 2016 epidemic in Managua, Nicaragua. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(37):9294-9. PubMed PMID: 30150394. Epub 08/27. eng.
- 87. Adamski A, Bertolli J, Castañeda-Orjuela C, Devine OJ, Johansson MA, Duarte MAG, et al. Estimating the numbers of pregnant women infected with Zika virus and infants with congenital microcephaly in Colombia, 2015–2017. Journal of Infection. 2018;76(6):529-35.
- 88. Ellington SR, Devine O, Bertolli J, Martinez Quiñones A, Shapiro-Mendoza CK, Perez-Padilla J, et al. Estimating the Number of Pregnant Women Infected With Zika Virus and Expected Infants With Microcephaly Following the Zika Virus Outbreak in Puerto Rico, 2016. JAMA Pediatrics. 2016;170(10):940-5.
- 89. Pomar L, Malinger G, Benoist G, Carles G, Ville Y, Rousset D, et al. Association between Zika virus and fetopathy: a prospective cohort study in French Guiana. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. 2017;49(6):729-36.
- 90. de Oliveira WK, de França GVA, Carmo EH, Duncan BB, de Souza Kuchenbecker R, Schmidt MI. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. The Lancet. 2017;390(10097):861-70.
- 91. Kalter H, Warkany J. Congenital Malformations. New England Journal of Medicine. 1983;308(8):424-31. PubMed PMID: 6337330.
- 92. Romer Y, Valadez-Gonzalez N, Contreras-Capetillo S, Manrique-Saide P, Vazquez-Prokopec G, Pavia-Ruz N. Zika Virus Infection in Pregnant Women, Yucatan, Mexico. Emerging infectious diseases. 2019;25(8):1452-60. PubMed PMID: 31310215. eng.

1		PMN
1_	 	 T TATT 4

12. Apéndices

Apéndice 1. Consentimiento

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (UNAN) y University of North Carolina-Chapel Hill (UNC)

Consentimiento para participar en un estudio de investigación Sujetos adultos – Cohorte de Zika Vigilancia en Mujeres Embarazadas Fecha de la versión del formulario de consentimiento: 2 Septiembre 2016

Nº de estudio del IRB 16-1402 (IGHID 11609)

Título del estudio: Entender la infección maternofetal de Zika en Nicaragua

Investigador principal: Elizabeth Stringer, MD (UNC), Filemon Bucardo (Nicaragua)

Departamento de la UNC-Chapel Hill: Ob/Gvn

Dirección de correo electrónico: elizabeth_stringer@med.unc.edu; fili_bucardo@hotmail.com

Patrón del estudio: Universidad de Carolina del Norte-Chapel Hill Número telefónico del contacto del estudio: +505 904 0938

¿Cuáles son algunas de las cuestiones generales que usted debe saber sobre los estudios de investigación?

Se le pide que participe en un estudio de investigación. La participación en este estudio es voluntaria. Puede negarse a participar, o puede retirar su consentimiento para participar en el estudio, por cualquier motivo. Los estudios de investigación tienen como objetivo obtener nueva información que pueda ayudar a otras personas en el futuro. Es posible que no reciba ningún beneficio directo por participar en este estudio de investigación. 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, con el prestador de atención médica o con la University of North Carolina-Chapel Hill. Si es un paciente enfermo, no tiene que participar en el estudio de investigación con el fin de recibir atención médica.

Los detalles sobre este estudio se analizan a continuación. Es importante que entienda esta información de modo que pueda decidir en forma fundamentada acerca de la participación en este estudio de investigación. Se le entregará una copia de este formulario de consentimiento. Debe preguntar a los investigadores mencionados anteriormente, o a los miembros del personal que los asisten, cualquier consulta que tenga acerca de este estudio en cualquier momento.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

El propósito de esta investigación es estudiar cuántas mujeres embarazadas son infectadas por el virus de Zika durante el embarazo; con qué frecuencia el virus es transmitido a sus bebés durante el embarazo y cuáles son los factores de riesgo que aumentan la probabilidad de esta transmisión.

Le hemos pedido que participe en esta investigación porque Ud. es una mujer embarazada que vive en León en Nicaragua, se atiende en una de las tres clínicas centrales y planifica dar a luz en el hospital.

1		PMN
L		T TATTA

¿Existe algún motivo por el que usted no deba participar en este estudio?

Tenga en cuenta de que Ud. no debiera ser incluida en este estudio si no está embarazada ni se atiende en una de las tres clínicas centrales en León o si no planifica dar a luz en HEODRA.

¿Cuántas personas participarán en este estudio?

Si decide participar en este estudio, será una de entre aproximadamente 3100 de mujeres embarazadas en este estudio de investigación.

¿Cuánto tiempo participará en este estudio?

Su participación en esta investigación durará aproximadamente un año, desde su primera visita prenatal hasta el momento en que dé a luz. La visita de hoy durará unos 15 minutos durante los cuales le haremos algunas preguntas personales. Después de hoy, cada visita no tomará más tiempo que el acostumbrado durante sus visitas prenatales.

¿Qué ocurrirá si participa en este estudio?

Si decide participar en esta investigación, al firmar este consentimiento Ud. nos autoriza a obtener muestras de sangre de los sobrantes de la sangre extraída durante su control prenatal. También obtendremos sangre de los sobrantes de los controles realizados durante el primer, segundo y tercer trimestre de su embarazo. Estudiaremos esas muestras de sangre para determinar su exposición a virus propagados por mosquitos, tal como el virus de Zika, y los factores que puedan predisponerla, o hacerla más susceptible, a infecciones de este tipo. Las muestras serán destruidas después de 5 años si ya no se las necesite.

Cuando dé a luz en el hospital HEODRA, obtendremos una muestra de sangre suya untando un papel en la superficie de la placenta. También extraeremos una muestra de sangre de entre 10-100cc del cordón umbilical después del parto. Además, vamos a tomar una muestra de saliva de su boca con un hisopo. Si un miembro de nuestro equipo de investigación no estuviera presente durante el parto, obtendremos una pequeña muestra de sangre del talón de su bebé antes de que se vayan del hospital.

Nosotros estudiaremos sus antecedentes médicos para saber dónde ha recibido previamente atención médica, su edad, cuántos embarazos ha tenido, enfermedades durante sus embarazos y los resultados de laboratorio de exámenes prenatales. Además, obtendremos información sobre su bebé, tal como su estado vital, peso, sexo, largo y circunferencia de su cabeza, abdomen y pecho. Si Ud. no da a luz en el hospital, nos gustaría llamarla para determinar el resultado de su embarazo.

¿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 beneficiará personalmente por su participación en este estudio de investigación.

¿Cuáles son los posibles riesgos o molestias que implica la participación en este estudio?

Los riesgos para participar en este estudio son limitados porque usaremos porciones de muestras ya obtenidas por su control antenatal y otras muestras que son obtenidas fácilmente después de su parto. Si tuviéramos que obtener sangre del talón de su bebé, es posible que él/ella sienta dolor leve. Puede ser riesgos poco comunes o anteriormente desconocidos. Debe informar a los investigadores cualquier problema que tenga.

1		PMN
L		T TATT 4

Si opta por no participar en el estudio, ¿con qué otras opciones de tratamiento cuenta?

No es necesario que participe en este estudio de investigación para recibir tratamiento. Ud. Puede seguir con su control prenatal y dar a la luz en HEODRA aunque no participe en este estudio.

¿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. No va a recibir resultados de investigaciones que utilizan sus muestras.

¿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.

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 para controlar de calidad o la seguridad.

¿Qué ocurrirá si resulta lesionado por esta investigación?

A pesar de todas las medidas de seguridad, usted podría desarrollar una reacción o padecer una lesión personal durante su participación, aunque sea muy poco probable en este tipo de 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. Las universidades de UNC y UNAN no han 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. 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 no recibirá nada por participar en este estudio.

¿Le costará algo la participación en este estudio?

No le costará nada participar en este estudio.

¿Qué sucede si desea formular preguntas sobre este estudio?

	1 PMIN
Tiene el derecho de preguntar, y que le respondan, cualquier duda cinvestigación. Si tiene preguntas o si ocurre una lesión relacionada ponerse en contacto con los investigadores mencionados en la prima ¿Qué sucede si desea formular preguntas sobre sus derechos co	con la investigación, debe era página de este formulario.
investigación? Toda investigación realizada con voluntarios humanos es examinad para proteger sus derechos y su bienestar. Si tiene preguntas o inqui como sujeto de una investigación, puede ponerse en contacto, de modern el Institutional Review Board (Comité de revisión institucional al 919-966-3113 o por correo electrónico a IRB subjects@unc.edu ponerse en contacto el Comité Para la Éticas de Investigación Biomodemiteticaunanleon@gmail.com.	ietudes acerca de sus derechos anera anónima si lo desea, , IRB por sus siglas en inglés) . En Nicaragua, puede
Título del estudio: Entender la infección maternofetal de Zika e Investigador principal: Elizabeth Stringer, MD (UNC), Filemon E	G
Acuerdo del sujeto:	
He leído la información proporcionada más arriba. He realizado tod este momento. Acepto voluntariamente participar en este estudio de	
Firma del sujeto de investigación Fecha	
Nombre del sujeto de investigación en imprenta	

Fecha

Firma de la persona que obtiene el consentimiento

Nombre de la persona que obtiene el consentimiento en imprenta

Apéndice 2. Cuestionario

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA.

(UNAN-León)

Facultad de Ciencias Médicas.

Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas





Instrumento de Recolección de Información

Estudio

Infección Materno-Fetal por Zika en Nicaragua (Zika-PW).

Número de Identificación de la Participante:1_____-PMN

Investigadores Principales

Dra. Elizabeth Stringer.
Profesor Asociado.
Escuela de Medicina
Universidad de Carolina de Norte
Chapel Hill
USA

Dr. Filemón Bucardo Profesor Titular Facultad de Ciencias Medicas UNAN-León.

1		PMN

Recolección de Información durante la CAPTACION (en cualquier trimestre)

1.	Número d	e identificación	del paciente:			
2.	Fecha:			_ (Día/Mes/Año)		
3.	Fecha de r	nacimiento de la	a madre:		_ (Día/Mes/Aí	ĭo)
4.	Edad gesta	acional:	semanas			
5.	Fecha pro	bable del parto	(FPP):		(Día	/Mes/Año)
6.	¿Se ha rea	alizado ultrason	nido durante este em	ıbarazo? Si	No	
	En ca	aso afirmativo:				
ба.	¿Cuántos	ultrasonidos? _				
бb	¿Fecha d	el último ultras	onido?		(Día/Mes/A	.ño)
6с.	¿Edad ge	estacional en el	momento del ultraso	onido?seman	as	
7.	Fecha pro	bable del parto	determinado con:			
		Ultimo ci	iclo menstrual		_Ultrasonido	
3.	Número t	otal de embaraz	zos Em	nbarazo Múltiple: Si	No	_
		oroducto:		ro total de embarazos m		
	1					
	Año	Edad Gestacional (semanas)	Resultado del Parto (Vivo/Muerte Fetal)	Método de Parto (Vaginal/Cesárea)	¿El bebé sobrevivió? (Si/No)	Comentarios
ì						
)						
;						
l						
;						
f						

1		PMN
1	 	 T TATT 4

Condiciones de Vida:

10. Paredes de	la casa:
a.	Ladrillo / cemento
b.	Adobe
c.	Madera
d.	Palma
e.	Cartón / plástico / Zinc / Laton
f.	Otro:
11. Abastecim	iento de agua:
a.	Agua potable
b.	Pozo privado
c.	Pozo público
d.	Rio
e.	Compra embotellada
f.	Otro:
12. Disposicio	ón de excretas:
a.	Inodoro
b.	Letrina
c.	Fecalismo
d.	Otro:
13. Tipo de Pi	so:
a.	Cerámica
b.	Cemento
c.	Ladrillos
d.	Tierra
e.	Otro:
14. Electricida	
15. ¿Cuántas l	nabitaciones (utilizadas para dormir) hay en la casa?
=	le personas que viven en la casa:

		PMN

Información Médica e del Embarazo

17. Puesto de	salud donde se realiza el control prenatal:			
a.	Walter Ferreti	h.	Antenor	Sandino
b.	Santa Ana	i.	Miramar	•
c.	Fundeci	j.	Chacrase	eca
d.	Calvarito	k.	La Ceiba	a
e.	Villa 23 de Julio	1.	La Leon	a
f.	Arrocera	m.	Salinas (Grandes
g.	Rubén Darío	n.	Perla Ma	aría Norori
18. ¿Anteced	entes médicos significantes?			
a.	Hipertensión			
b.	Diabetes			
c.	Problemas en la coagulación			
d.	Otro:			
19. ¿Has teni	do un diagnostico previo de Chikungunya?	Si	No	No Sabe
20. ¿Has teni	do un diagnostico previo de Dengue? Si	No	No Sa	.be
21. ¿Te han d	liagnosticado con Zika durante este embarazo	o? Si_	No	No Sabe
22. En caso a	firmativo, ¿cómo hicieron el diagnostico? (E	nglobe	todos los q	que corresponden)
a.	PCR+			
b.	IgM +			
c.	Síntomas clínicos sin confirmación de labo	ratorio		
d.	Otros:			
23. ¿Cuándo	te diagnosticaron con Zika?			(Día/Mes/Año)

24. Durante este embarazo has tenido:	
a. Fiebre	f. Fatiga o malestar
b. Sarpullido / Rash	g. Dolor de cabeza
c. Conjuntivitis	h. Dolor de Garganta
d. Dolor retro-orbital	i. Artritis
e. Picazón/comezón	
25. Resultados de exámenes prenatales (del regi	stro prenatal)
a. Biometría Hemática Completa (BHC)	
Fecha: Día/Mes/Año	No Realizada:
Parámetro	
Hematocrito:%	C en bandas :%
Rec. Globulos Rojos:x10 ⁶	Segmentados:%
Rec. Leucocitario x10 ³	Linfocitos:%
Basófilos :%	Monocitos :%
Eosinofilos :%	Plaquetas : x10 ³
	Hemoglobina:gr/L

			1 PMN	1
b. Examen General de Orina	ı (EGO)			
Fecha:	(Día/Mes/Año)	No Realizad	la:	_
Parametros:				
Color :	pH :			
Aspecto:	Leucocito	os:	-	
Densidad :	Eritrocito	s :		
Glucosa:	Células E	piteliales :		
Proteínas :	Cilindros	:		
Sangre :	Filamento	os Mucosos:		
Urobilinógeno:	Bacterias	:		
Bilirrubina:	Cristales	<u>:</u>		
Nitritos:	Otros			
Albumina:				
Ácido Ascórbico :				
TORCH y otros exámenes				
Parámetros	Positivo	Negativo	No realizado	
Anticuerpos contra Toxoplasmos	is:			
Anticuerpos contra Rubéola:				
Anticuerpos contra Citomegalovi	rus :			
Sífilis:				
VIH:				

Parámetros

Tipo de Sangre: _____ Historia de incompatibilidad Sanguinea: Si____ No____

Rh:						
Otros:						
26. ¿Se recogió una muestra de sangre maternal? Si No						
a. Número de tubos						
Firma y Fecha de la persona que administro el cuestionario:						

1____ PMN

l		PMN

Recolección de datos en la SEGUNDA visita

1. Número de identificación del pac	ciente:			
2. Muestra recolectada: Si	No			
2a. Fecha:	Σ)ía/Mes/Año) Hoi	ra:
2b. Si la muestra no fue recolectada	a, cual fue la	razón:		
3. Edad gestacional:				
a. Semanas				
b. Días				
4. Desde la última extracción de sa	angre tuviste	alguna:		
	Si	No		Fecha (Día/Mes/Año)
a. Fiebre				
b. Erupción/sarpullido			_	
c. Conjuntivitisd. Dolor retro-orbital				
Has tenido otras Enfermedades:	Si	_ No	Fecha	
Cuales:				
7. ¿Diagnostico de Zika?	Si	No		
7a. Si respondiste sí: Fecha: _				(Día/Mes/Año)
En caso afirmativo, ¿cómo hicieror	ı el diagnosti	ico? (Englol	e todos	s los que corresponden)
a. PCR+				
h IoM +				

c. Síntomas c	línicos sin confi	rmación de laboratori	О		
d. Otros:					
8. ¿Ultrasonido? S	i	No			
8a. Si respondiste s	sí: Fecha:			(Día/Mes/Año)	
8b. ¿Algún hallazg	o anormal en el	ultrasonido? Si	No		
8c. Si la respuesta	es afirmativa, p	or favor describa:			
Firma y Fecha de l	a persona que a	dministro el cuestiona	rio:		
Análisis de Labora	torio:				
Tipo de Examen					
1. ZIKV IgG: Pos	itivo:	Negativo:	Fecha:		
2. ZIKV IgM:	Positivo:	Negativo:_	Fec.	ha:	
3. ZKV PCR:	Positivo:	Negativo:_	Fec.	ha:	
4 PRMC Colected	os: SI:	NO:			

1____ PMN

Firma y Fecha de la persona que realizo los análisis:______

l		PMN

Recolección de datos en la TERCERA visita

1. Número de identificación del pa	aciente:			
2. Muestra recolectada: Si	No_			
2a. Fecha:		Día/Mes/Año	Hot	ra:
2b. Si la muestra no fue recolectad	la, cual fue l	a razón:		
3. Edad gestacional:				
a. Semanas				
b. Días				
4. Desde la última extracción de s	sangre tuvist	e alguna:		
	Si	No		Fecha (Día/Mes/Año)
a. Fiebre				
b. Erupción/sarpullido				
c. Conjuntivitisd. Dolor retro-orbital			_	
Has tenido otras Enfermedades:	Si		– Fecha	
Cuales:				
7. ¿Diagnostico de Zika?	Si	No.		<u> </u>
7a. Si respondiste sí: Fecha:				(Día/Mes/Año)
En caso afirmativo, ¿cómo hiciero	n el diagnos	stico? (Englob	e todos	s los que corresponden)
a. PCR+				
b. IgM +				

c. Síntomas clír	nicos sin confi	rmación de labor	ratorio		
d. Otros:					
8. ¿Ultrasonido? Si_		No			
8a. Si respondiste sí:	Fecha:			(Día/M	es/Año)
8b. ¿Algún hallazgo	anormal en el	ultrasonido? Si_	No)	
8c. Si la respuesta es	afirmativa, p	or favor describa	a:		
Firma y Fecha de la	persona que a	dministro el cues	stionario:		
Análisis de Laborato	orio:				
Tipo de Examen					
1. ZIKV IgG: Positi	vo:	Negativo:	Fecha:		
2. ZIKV IgM:	Positivo:	Negat	ivo:	Fecha:	
3. ZKV PCR:	Positivo:	Negat	ivo:	Fecha:	
4 PRMC colected:	SI·	NO:			

1____ PMN

Firma y Fecha de la persona que realizo los análisis:______

		PMN

Toma de muestra de Sangre del Cordón Umbilical

Esta muestra es para análisis de IgM anti-zika en plasma de todos los niños de las madres participantes en el estudio y para preparación de UBMC (Umbilical Blood Mononuclear cells) a partir de sangre del cordón umbilical. Estas muestras se recolectaran en tubos vacutainer con EDTA de 10ml, de las Zika-positivo recolectaremos al menos 30 ml.

	I	ciente:		
2. Muestra recolecta	da: Si	No		
2a. Fecha:		Día/Mes/A	año Hora:	
2b. Si la muestra no	fue recolectada	a, cual fue la razón:		
En caso de que la m	ujer presente n	aás de un producto		
Placenta separada:	Si	No		
Número de producto):			
Firma y Fecha de la	persona que re	alizo la toma de muest	tra:	
Análisis de Laborato	orio:			
Tipo de Examen				
•	ivo:	Negativo:	Fecha:	
1. ZIKV IgG: Posit		Negativo: Negativo:		
1. ZIKV IgG: Posit 2. ZIKV IgM:	Positivo:		Fecha:	

1		PMN

Resumen del Parto

·	
3. Edad gestacional en el momento del parto:Semanas 4. Peso del bebe:gramos	Días
4. Peso del bebe:gramos	
5. Sexo:MasculinoFemenino	
6. Apgar 1 min: 5 min:	/10
7. Modo de parto:Parto normal vaginal	Cesárea
7a. Si fue cesárea:electiva programadaem	nergencia
7b. Si fue una cesárea inesperada:	
Dilatación cervical en el momento de cesárea:cr	n
8. Duración del parto:horascesáreo e	electivo
9. ¿La membranas se rompieron antes del parto? Si No	
9a: En caso afirmativo, ¿cuánto tiempo antes del parto se rompieron? _	horas
10. ¿Hubieron infecciones en el parto? Si No_	
11. ¿Se trataron con antibióticos? Si No	
a. ¿Qué tipo de infección fue y que antibióticos fueron suministrac	dos?

12. Dis	posición del bebé:				
	Con la madre	unidac	l de cuidados intensi	ivos	muerte fetal
a.	En caso de cuidados inter	nsivos o mu	erte fetal, cual fue la	a razón?	
b.	Edad del bebe al moment	to de muerte	e fetal:	Días	
13. Exa	amen físico infantil:				
	Circunferencia de la cabe Talla (cm):				
c.	Talla (cm): Esplenomegalia: SI Hepatomegalia: SI	NO _			
	Erupción Cutánea: SI				
	14a. Si la respuesta es afi	rmativa, po	r favor describa:		
15. Exa	amen neurológico del beb	é antes de a	lta hospitalaria:		
a.	Hipotonía : SI	NO			
b.	Hipertonía/Espasticidad:	SI	NO		
c.	Ojos capaces de rastrear:	SI	NO		
d.	Hiperreflexia: SI	_ NO			
e.	Irritabilidad: SI	NO			
f.	Convulsiones/Tremores:	SI	NO		
g.	Microcefalia: SI	_ NO			

1____ PMN

h. Alguna otra normalidad neurológica (Describa):

	1 PMN
	
16. ¿Algún hallazgo anormal en el ultrasonido durante el embarazo?	
Si No	
16a. Si la respuesta es afirmativa, por favor describa:	

Apéndice 3. Operacionalización de las Variables

Variable	Definición	Valores o Categorías
Edad Gestacional	Termino común usado durante el embarazo para	0-<13 semanas 1-14-27
	describir qué tan avanzado está éste. Se mide en semanas.	3->28 semanas
Edad	Lapso de tiempo que	1-15-25
	transcurre desde el nacimiento hasta el momento	2-26-35
	de referencia.	3-36-45
		4->46
Ultrasonido	Ondas sonoras para producir	0-Si
	fotografías de las estructuras	1-No
	internas del cuerpo que	
	ayuda a examinar al bebé en una mujer embarazada.	
Número de embarazos	El número de embarazos,	0-1-3
	completos o incompletos, experimentado por una	1-4-6
	hembra.	2-7-9
		3->10
Embarazo múltiple	Desarrollo de dos o más	0-Si
	bebes en el útero de manera simultánea.	1-No

Estado civil	Condición de una persona	0-Soltera
	según el registro civil en	1-Union de hecho estable
	función de si tiene o no	1-Onion de necho estable
	pareja y su situación legal	2-Casada
	respecto a esto.	3-Divorciada
		4-Viuda
Paredes de la casa	Construcción de superficie	0-Ladrillo-Cemento
	continua, levantada perpendicular al suelo, con	1-Adobe
	las dimensiones adecuadas	2-Madera
	para cerrar o dividir un	3-Palma
	espacio, sostener una techumbre o proteger una zona.	4-Carton/ Plastico/ Zinc/ Laton
		5-Otro
Abastecimiento de agua	Lugar de donde se toma agua	0-Agua potable
	para el consumo y las actividades humanas.	1-Pozo privado
	actividades numanas.	2-Pozo público
		3-Rio
		4-Compra embotellada
		5-Otro
Disposición de excretas	Es el lugar donde se guardan	0-Inodoro
	las deposiciones con las fines	1-Letrina
	de almacenar y aislar para así evitar enfermedades.	2-Fecalismo
Tipo de piso	Superficie sobre la que se	0-Cerámica
1 · · · · F	pisa recubierta de algún	

	material para hacerla lisa y	1-Cemento
	resistente.	2-Ladrillos
		3-Tierra
		4-Madera
Electricidad	Tensión eléctrica de corriente	0-Si
	alterna (CA) de propósito	1-No
	general para suministro de	1110
	energía eléctrica.	
Cantidad de habitaciones	Parte separada por paredes o	0-1-2
utilizadas para dormir	tabiques en que divide una casa, cuyo fin está destinada	1-3-4
	a dormir.	2-5-6
		3-> 6
N° de personas que viven en	Número de personas que	0-1-2
el hogar	habitan en un lugar determinado.	1-3-4
		2-5-6
		3-> 6
Puesto de salud donde se	Lugar destinado a la atención	0-Walter Ferreti
realizó el control prenatal	sanitaria de la población.	1-Santa Ana
		2-Fundeci
		3-Calvarito
		4-Villa 23 de Julio
		5-Arrocera
		6-Ruben Dario

		7-Antenor Sandino
		8-Miramar
		9-Chacraseca
		10-La Ceiba
		11-Salinas Grandes
		12-Perla María Norori
Antecedentes médicos	Registro con información	0-Hipertension
significantes	sobre la salud de una persona.	1-Diabetes
	F	2-Problemas de la
		coagulación
		3-Otro
Diagnóstico previo de	Identificación de la	0-Si
Chikungunya	enfermedad basándose en	1-No
	síntomas, la historia clínica y	
	exámenes complementarios	
Diagnóstico previo de	Identificación de la	0-Si
Dengue	enfermedad basándose en	1-No
	síntomas, la historia clínica y	
	exámenes complementarios	
Diagnóstico previo de Zika	Identificación de la	0-Si
	enfermedad basándose en	1-No
	síntomas , la historia clínica y	
	exámenes complementarios.	
Fiebre	Aumento temporal en la	0-Si
	temperatura del cuerpo en	1-No
L	70	

respuesta a alguna	
enfermedad o padecimiento.	
Erupción leve y pasajera de	0-Si
granos o manchitas en la piel.	1-No
Inflamación o irritación de la	0-Si
(túnica conjuntiva), la	1-No
_	
globo ocular.	
Dolor que es del tipo urente y	0-Si
se siente por detrás del globo ocular.	1-No
Sensación molesta que se	0-Si
siente en una parte del cuerpo	1-No
y que provoca la necesidad	1110
de rascarse.	
Agotamiento, extenuación o	0-Si
debilidad.	1-No
Cefalea intensa y persistente	0-Si
que va acompañado de	1-No
sensación de pesadez.	
sensación dolorosa en la	0-Si
garganta que suele	1-No
relacionarse con molestias al	
tragar.	
	enfermedad o padecimiento. Erupción leve y pasajera de granos o manchitas en la piel. Inflamación o irritación de la (túnica conjuntiva), la membrana mucosa que recubre la parte interna del párpado y la parte externa del globo ocular. Dolor que es del tipo urente y se siente por detrás del globo ocular. Sensación molesta que se siente en una parte del cuerpo y que provoca la necesidad de rascarse. Agotamiento, extenuación o debilidad. Cefalea intensa y persistente que va acompañado de sensación de pesadez. sensación dolorosa en la garganta que suele relacionarse con molestias al

Artritis	Inflamación de las	0-Si
	articulaciones de los huesos.	1-No
Edad gestacional al momento	Termino común usado	Se mide en semanas
del parto	durante el embarazo para	
	describir qué tan avanzado	
	está éste.	
Peso del Bebé	Indicador global de la masa	Peso en Kg
	corporal.	
Sexo	Característica biológica que	0-Masculino
	define a un ser humano como	1-Femenino
	hombre o mujer.	
Modo de parto	culminación del embarazo, el	0-Vaginal
	periodo de salida del bebé del	1-Cesárea
	útero materno ya sea vaginal	
	o cesárea.	
Ruptura de membrana antes	Ruptura del saco amniótico	0-Si
del parto	antes de que comience el	1-No
	trabajo de parto.	
Infecciones en el parto	Invasión y multiplicación de	0-Si
	agentes patógenos en los	1-No
	tejidos de un organismo.	
Tratamiento con antibióticos	Medicamentos potentes que	0-Si
	combaten las infecciones por	1-No
	bacterias.	
Disposición del bebé	Atención y soltura del bebe	0-Madre
	después de nacer	

		1-Unidad de Cuidados Intensivos (UCIN) 2-Cuidados mínimos del recién nacido (SCIN) 3-Muerte fetal
Circunferencia de la cabeza	Medición de la circunferencia de la cabeza de un niño en su área más grande.	Circunferencia de la cabeza en cm
Talla	Estatura que el bebé posee	Talla en cm
Esplenomegalia	Agrandamiento patológico del bazo o estructura esplénica más allá de sus dimensiones normales	0-Si 1-No
Hepatomegalia	Aumento patológico del tamaño del hígado.	0-Si 1-No
Erupción cutánea	Dermatitis o inflamación de la piel	0-Si 1-No
Anomalía del bebé	Cambio o desviación respecto de lo que es normal, regular, natural o previsible.	0-Si 1-No
Hipotonía	Disminución de la tensión o del tono muscular, o de la tonicidad de un órgano.	0-Si 1-No
Hipertonía/ Espasticidad	Músculos tensos y rígidos	0-Si

		1-No
Ojos capaces de rastrear	Capacidad para percibir y	0-Si
	reaccionar al entorno	1-No
Hiperreflexia	Exaltación o aumento de los	0-Si
	reflejos osteotendinosos.	1-No
Irritabilidad	Propiedad que posee una un	0-Si
	organismo de reaccionar ante	1-No
	los estímulos externos.	
Convulsiones/ Tremores	Movimientos involuntarios,	0-Si
	algo rítmico y contracciones	1-No
	que involucran oscilaciones o	
	espasmos de una o más partes	
	del cuerpo.	
Miocrocefalia	Medida de la circunferencia	0-Si
	de la cabeza que es más	1-No
	pequeña que cierto valor para	
	los bebés de la misma edad y	
	sexo. El valor de la medida	
	de la microcefalia es, por lo	
	general, menos de 2	
	desviaciones estándar (DE)	
	por debajo del promedio.	
Hallazgos anormales del	Examinación de hallazgos	0-Si
ultrasonido en el embarazo	anormales del bebe por ondas	1-No
	sonoras	
Tipo sanguíneo	Estructuras antigénicas	0-A
1	carbohidratadas presentes en	

Rh	la membrana de los eritrocitos. Proteína integral de la membrana de los glóbulos	1-B 2-AB 3-O 1-Rh –
IgG anti-Zika	rojos. Anticuerpos de fase convalesciente o crónica específicos contra Zika.	2-Rh + 0-Negativo 1-Positivo
IgM anti-Zika	Anticuerpos de fase agua específicos contra Zika.	0-Valor de P/N ≥3,0 se consideran presuntos positivos. 1-Valor de P/N ≥2,0 pero <3,0 se consideran equívocos. 2-Valor de P/N <2,0 se consideran negativos.
Block of binding (BOB)	Bloque de unión de los anticuerpos dirigidos a NS1	0-Negativo 1-Positivo
Serología Zika (Ensayos FRNT)	Determinación de anticuerpos dirigidos contra Zika	0-Negativo 1-Zika Pre- Pregnant (Infectada antes del embarazo) 2-Zika Pre-early Pregnant (posible infección antes o en

la etapa temprana del
embarazo)
3-Zika in Pregnancy
(Probable infección por Zika
durante el embarazo)