



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**DIRECCIÓN DE POSGRADO**  
**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN  
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**“APLICACIÓN DE UNA TÉCNICA MULTIPLEX PARA DETECCIÓN  
SIMULTÁNEA DE ARBOVIRUS”**

**AUTOR: MÁXIMO ISRAEL ARMIJOS CARRIÓN**

**DIRECTOR: HÉCTOR XAVIER ZAMBRANO MANRIQUE, MSC M.D. (c)**

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**MAYO 2017**



<b>REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA</b>		
<b>FICHA DE REGISTRO DE TESIS</b>		
<b>TÍTULO Y SUBTÍTULO:</b> “APLICACIÓN DE UNA TÉCNICA MULTIPLEX PARA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE ARBOVIRUS”		
<b>AUTOR:</b> MVZ Máximo Israel Armijos Carrión	<b>TUTOR:</b> Héctor Xavier Zambrano Manrique, MSC M.D. (c)	
	<b>REVISORES:</b> Dra. Iliana Rosado Ruiz Apodaca, MSc.	
<b>INSTITUCIÓN:</b> UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL	<b>FACULTAD:</b> DIRECCIÓN DE POSGRADO	
<b>CARRERA:</b> MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR		
<b>FECHA DE PUBLICACIÓN:</b> mayo 2017	<b>No. DE PÁGS:</b> 82	
<b>ÁREAS TEMÁTICAS:</b> Ciencias de la Vida		
<b>RESUMEN:</b>		
<p>Los arbovirus son virus emergentes importantes en todo el mundo. Los signos y síntomas de la infección por el virus Zika (ZIKV) son similares a los presentados por las infecciones por el virus del Dengue (DENV) y el virus Chikungunya (CHIKV), son virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) que comparten un vector común, el mosquito Aedes aegypti. En las etapas iniciales, los pacientes infectados con estos virus tienen manifestaciones clínicas similares, sin embargo, el manejo clínico de estas enfermedades deben de ser diferentes, por lo que es necesaria una identificación temprana y precisa del virus causante. Este ensayo podría ser una herramienta útil y de alto costo-beneficio para la detección de estas infecciones en regiones donde estos arbovirus co-circulan, el diagnóstico diferencial es crucial. Se utilizó técnicas de biología molecular en este caso la QPCR Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real para determinar la presencia de ZIKV, CHIKV Y DENV en muestras clínicas de pacientes que acuden al hospital Luis Vernaza, la viremia se cuantificó para cada virus detectado. Después de haber realizado los diferentes análisis de laboratorio se concluyó que existe una alta prevalencia de arbovirus en los pacientes que ingresaron a la casa de salud, se tomó una población de 108 personas, de las cuales 26 (24.07%) personas presentaron arbovirus, se evidencio la prevalencia de Chikungunya en 16 (14.81%) personas, mientras el Dengue y Zika fue detectado en 5 (4.63%) de personas respectivamente, se observó que 21 (19.44%) personas presentaron co-infecciones, así mismo pudimos establecer que 12 (11.11%) personas presentaron CHIK/ZIKA, 9 (8.33%) personas DCZ, pero no se encontró resultados positivos en las co-infecciones de DENV/CHIKV y DENV/ZIKV, la mayor prevalencia de contraer arbovirus, es la población de mujeres, está comprendida entre los 50 a 60 años de edad.</p>		
<b>No. DE REGISTRO</b> (en base de datos):	<b>No. DE CLASIFICACIÓN:</b>	
<b>DIRECCIÓN URL (tesis en la web):</b>		
<b>ADJUNTO PDF:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
<b>CONTACTO DE AUTOR</b>	<b>Telef:</b> 0980366375	<b>Email:</b> israel.armijos@yahoo.es
<b>CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:</b>	<b>Nombre:</b> Dirección de Posgrado	
<b>Teléfono:</b> 2325530-38 Ext. 114	<b>E-mail:</b> upid@ug.edu.ec	

## CERTIFICADO DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del Programa de Maestría en Biotecnología Molecular yo Héctor Xavier Zambrano Manrique, nombrado por el Director General de la Dirección de Posgrado, **CERTIFICO:** que he analizado la Tesis presentada, como requisito para optar el grado académico de Magíster en Biotecnología Molecular titulada: “APLICACIÓN DE UNA TÉCNICA MULTIPLEX PARA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE ARBOVIRUS”, la cual cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que demanda el reglamento de posgrado.

Atentamente,

Héctor Xavier Zambrano Manrique, MSC M.D. (c)  
N° 0915827562

Guayaquil, 31 de mayo de 2017

## CERTIFICACIÓN DE REDACCIÓN Y ESTILO

Efraín Eduardo Ordóñez González, Magister en Gerencia y Liderazgo Educativo, con registro del SENESCYT 1031-08-671680, por medio del presente tengo a bien **CERTIFICAR**: Que he revisado la redacción, estilo y ortografía de la tesis de grado, elaborado por el Señor Máximo Israel Armijos Carrión, con C.I. 0704719384, previo a la obtención del título de MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR.

Tema de tesis:

“APLICACIÓN DE UNA TÉCNICA MULTIPLEX PARA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE ARBOVIRUS”

Trabajo de investigación que ha sido escrito de acuerdo a las normas ortográficas y de sintaxis vigentes.

Atentamente,



-----  
Efraín Eduardo Ordóñez González. Mgs. Sc.  
N° Cédula: 0703786921  
Registro SENESCYT: 1031-08-671680  
Número de teléfono: 0985823363 072972018  
Correo: efrainordonezgonzalez@hotmail.com

## **DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR**

Yo, MÁXIMO ISRAEL ARMIJOS CARRIÓN, declaro bajo juramento ante la Dirección de Posgrado de la Universidad de Guayaquil, que el trabajo aquí descrito, así como sus resultados, conclusiones y recomendaciones presentados, son de mi autoría y exclusiva responsabilidad, que es inédito y no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional.

La reproducción total o parcial de esta tesis en forma idéntica o modificada, no autorizada por los editores transgrede los derechos de autoría. Cualquier utilización debe ser previamente solicitada a la Universidad de Guayaquil, a través de la Dirección de Posgrado o al autor.

Máximo Israel Armijos Carrión

N° Cédula 0704719384

Copyright © 2017 por Máximo Israel Armijos Carrión.

Todos los derechos reservados.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad de Guayaquil y a la Unidad de Postgrado Investigación y Desarrollo, por haberme acogido en sus aulas y darme la oportunidad de seguirme preparando profesionalmente.

A nuestros distinguidos profesores y profesoras, por la paciencia y dedicación que tuvieron al impartirnos sus conocimientos y mi especial gratitud a Héctor Xavier Zambrano Manrique, MSC M.D. (c), en su calidad Director de tesis, por compartir conmigo su conocimiento y sus sabias enseñanzas.

Mi gratitud infinita al personal del Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Luis Vernaza de la ciudad de Guayaquil, por las facilidades que me brindaron durante la elaboración de mi tesis.

Agradezco a mi familia por la comprensión, confianza y por el tiempo suficiente que me brindaron para culminar este trabajo; así como a todos quien de una u otra manera permitieron que este propósito se culmine con satisfacción.

**El Autor.**

## **DEDICATORIA**

Con amor, gratitud, respeto dedico esta tesis a mi esposa Vanessa Mora, por su amor, paciencia y apoyo incondicional en todo momento.

A mi hijo Romeito por ser mi orgullo y gran motivación.

A mi familia por su apoyo incondicional, cariño y consejos; y para todas las personas que creyeron en mí.

**Máximo Israel**

## ÍNDICE GENERAL

### CONTENIDOS

PORTADA .....	I
REPOSITORIO DE LA SENESCYT.....	II
CERTIFICADO DEL TUTOR.....	III
CERTIFICADO DE REDACCIÓN Y ESTILO.....	IV
DECLARACIÓN JURADA DEL AUTOR.....	V
AGRADECIMIENTO.....	VI
DEDICATORIA.....	VII
ÍNDICE GENERAL.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XIV
SUMMARY.....	XV
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
1. El Problema.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Formulación Del Problema.....	3
1.3. Justificación.....	4
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. Objetivo General.....	5
1.4.2. Objetivos Específicos.....	5



CAPÍTULO II.....	6
2. Marco Teórico.....	6
2.1. Infecciones por Arbovirus.....	6
2.1.1. Virus del Zika.....	11
2.1.2. Fiebre Chikungunya.....	17
2.1.3. Dengue con signos de alarma y Dengue grave.....	18
2.1.4. Co-infecciones.....	20
2.1.5. Introducción de los métodos de detección del Arbovirus.....	20
2.1.5.1. Diagnóstico inmunológico.....	21
2.1.5.2. Cultivo Viral.....	22
2.1.5.3. Métodos de biología molecular.....	23
2.1.5.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	23
2.1.6. Prueba ZCD para diagnóstico de arbovirus.....	30
Capítulo III.....	31
3. Metodología o Diseño de la Investigación .....	31
3.1. Materiales y Métodos.....	31
3.1.1. Manejo y ejecución de la investigación.....	31
3.1.2. Localización socio-geográfica.....	31
3.1.3. Recursos empleados.....	32
3.1.3.1. Recursos humanos.....	32
3.1.3.2. Recursos de laboratorio y oficina.....	32
3.1.4. Materiales.....	33
3.1.5. Diseño de la investigación.....	33
3.1.5.1. Tipo de investigación.....	33
3.1.5.2. Enfoque clínico de la presente investigación.....	34
3.1.5.3. Universo de recolección de datos.....	34
3.1.5.4. Muestreo.....	35

3.1.5.5. Criterios de inclusión.....	35
3.1.5.6. Criterios de exclusión.....	35
3.1.5.7. Aspectos éticos y legales.....	35
3.1.5.8. Métodos y técnicas de laboratorio.....	36
3.1.5.9. Toma de muestra de sangre periférica.....	36
3.1.5.10. Procedimiento para la toma de muestra.....	36
3.1.5.11. Extracción de ADN viral.....	37
3.1.5.12. Reactivos utilizados para extracción de ADN.....	38
3.1.5.13. PCR en tiempo real.....	38
3.1.5.14. Detección de arbovirus.....	39
CAPÍTULO IV.....	41
4. Análisis e interpretación de datos.....	41
4.1. Resultados.....	41
4.2. Discusión.....	45
CAPÍTULO V.....	49
5. Conclusiones y Recomendaciones.....	49
5.1. Conclusiones.....	49
5.2. Recomendaciones.....	51
6. Bibliografía.....	52
7. Anexos.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización de las proteínas estructurales y no estructurales en el genoma del virus del dengue y su función.....	9
Figura 2. Regiones del planeta donde la presencia del vector del dengue es constante durante todo el año.....	18
Figura 3. Estructura del virus del dengue.....	19
Figura 4. Mecanismo de las sondas de hidrólisis.....	27
Figura 5. Molecular <i>beacons</i> .....	28
Figura 6. Sondas FRET.....	29
Figura 7. Localización socio-geográfica.....	32

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales moléculas fluorescentes.....	26
---	----

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Resultados de prevalencia de los arbovirus.....	42
Gráfico 2. Resultados de frecuencia de co-infecciones.....	43
Gráfico 3. Resultados de arbovirosis en función del sexo y grupos Etarios.....	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Datos binarios.....	57
Anexo 2. Análisis de muestras en el equipo Cobas Z 480.....	65
Anexo 3. Preparación de muestras.....	65
Anexo 4. Reactivos empleados para la utilización de extracción y amplificación de muestras.....	66
Anexo 5. Procesamiento de muestras y lectura de resultados.....	66
Anexo 6. Cebadores y sondas incluidos en el ensayo ZCD.....	67

## ABREVIATURAS

**ARN** = Ácido ribonucleico

**ADN**=Ácido desoxirribonucleico

**QRT-PCR**=Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real

**ZIKV**= ZIKA

**CHIKV**= Chikungunya

**DENV**=Dengue

**GBS**=síndrome de Guillain- Barré OMS=Organización Mundial de la Salud

**ICTV**= Comité Internacional de Taxonomía de Virus

**UTR**=Regiones no Codificantes

**E o Env**=Envoltura

**C**=cápside

**PRM**= premembrana

## RESUMEN

Los arbovirus son virus emergentes importantes en todo el mundo. Los signos y síntomas de la infección por el virus Zika (ZIKV) son similares a los presentados por las infecciones por el virus del Dengue (DENV) y el virus Chikungunya (CHIKV), son virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) que comparten un vector común, el mosquito *Aedes aegypti*. En las etapas iniciales, los pacientes infectados con estos virus tienen manifestaciones clínicas similares, sin embargo, el manejo clínico de estas enfermedades deben de ser diferentes, por lo que es necesaria una identificación temprana y precisa del virus causante. Este ensayo podría ser una herramienta útil y de alto costo-beneficio para la detección de estas infecciones en regiones donde estos arbovirus co-circulan, el diagnóstico diferencial es crucial. Se utilizó técnicas de biología molecular en este caso la QPCR Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real para determinar la presencia de ZIKV, CHIKV Y DENV en muestras clínicas de pacientes que acuden al hospital Luis Vernaza, la viremia se cuantificó para cada virus detectado. Después de haber realizado los diferentes análisis de laboratorio se concluyó que existe una alta prevalencia de arbovirus en los pacientes que ingresaron a la casa de salud, se tomó una población de 108 personas, de las cuales 26 (24.07%) personas presentaron arbovirus, se evidencio la prevalencia de Chikungunya en 16 (14.81%) personas, mientras el Dengue y Zika fue detectado en 5 (4.63%) de personas respectivamente, se observó que 21 (19.44%) personas presentaron co-infecciones, así mismo pudimos establecer que 12 (11.11%) personas presentaron CHIK/ZIKA, 9 (8.33%) personas DCZ, pero no se encontró resultados positivos en las co-infecciones de DENV/CHIKV y DENV/ZIKV, la mayor prevalencia de contraer arbovirus, es la población de mujeres, está comprendida entre los 50 a 60 años de edad.

**Palabras clave:** Arbovirus, Zika, Chikungunya, Dengue, PCR, Multiplex.

## SUMMARY

Arboviruses are important emerging viruses throughout the world. The signs and symptoms of Zika virus infection (ZIKV) are similar to those presented by Dengue virus infections (DENV) and Chikungunya virus (CHIKV), are arthropod-transmitted viruses (arboviruses) that share a vector common, the *Aedes aegypti* mosquito. In the initial stages, patients infected with these viruses have similar clinical manifestations, however, the clinical management of these diseases must be different, so an early and accurate identification of the causative virus is necessary. This assay could be a useful and high cost-benefit tool for the detection of these infections in regions where these arboviruses co-circulate, the differential diagnosis is crucial. Molecular biology techniques were used in this case the QPCR chain reaction of quantitative polymerase in real time to determine the presence of ZIKV, CHIKV and DENV in clinical samples of patients attending the Luis Vernaza hospital, viremia was quantified for each virus detected. After having carried out the different laboratory tests, it was concluded that there is a high prevalence of arboviruses in the patients who entered the health center, a population of 108 people was taken, of which 26 (24.07%) had arboviruses, evidenced the prevalence of Chikungunya in 16 (14.81%) people, while Dengue and Zika was detected in 5 (4.63%) of people respectively, it was observed that 21 (19.44%) people presented co-infections, so we could establish that 12 (11.11%) people presented CHIK / ZIKA, 9 (8.33%) DCZ people, but no positive results were found in co-infections of DENV / CHIKV and DENV / ZIKV, the highest prevalence of contracting arboviruses, is the population of women, is between 50 to 60 years of age.

**Key words:** Arbovirus, Zika, Chikungunya, Dengue, PCR, Multiplex

## INTRODUCCIÓN

El virus Zika (ZIKV) es un virus transmitido por artrópodos (arbovirus) del género *Flavivirus* (familia *Flaviridae*) transmitido por los mismos vectores mosquitos que el virus Chikungunya (CHIKV) y el virus Dengue (DENV), Waggoner y Pinsky, 2016. Entre el brote actual en las Américas, ZIKV se ha asociado con manifestaciones neurológicas graves en adultos, incluyendo el síndrome de Guillain-Barré (GBS, Cao-Lormeau et al., 2016, Dirlikov et al., 2016, do Rosario et al., 2016, Dos Santos et al., 2016), mielitis aguda (Mecharles et al., 2016) y encefalitis (Carteaux et al., 2016; Soares et al., 2016). El GBS ha sido la presentación neurológica más estudiada en adultos y la asociación entre la reciente infección por ZIKV y GBS se ha demostrado principalmente en estudios que se han basado en pruebas serológicas para el diagnóstico de ZIKV (Cao-Lormeau et al., 2016; Dos Santos et al., 2016). Esto puede deberse a dificultades para diagnosticar infecciones agudas de ZIKV en adultos, ya que la detección de ZIKV en LCR ha sido poco frecuente (Parra et al., 2016, Rozé et al., 2016, Siu et al., 2016, Zambrano et al., 2016) y las pruebas serológicas pueden ser difíciles de interpretar en regiones endémicas de DENV (Waggoner y Pinsky, 2016).

ZIKV, CHIKV y DENV han co-circulado en muchas regiones de las Américas durante el año pasado. Mientras que las complicaciones neurológicas de la infección por ZIKV han sido motivo de gran preocupación durante este brote, se ha prestado menos atención a las manifestaciones neurológicas asociadas con infecciones agudas o recientes con CHIKV y / o DENV (Solomon et al., 2000; Gerardin et al., 2016). El diagnóstico clínico no puede distinguir con fiabilidad las infecciones sintomáticas causadas por estos virus (Wagoner et al., 2016b), lo que complica la interpretación de los resultados de los estudios basados en casos de Zika notificados (Dos Santos et al., 2016) o en pacientes con síntomas compatibles (Parra et al. Al., 2016). Además, las co-infecciones



entre estos virus pueden ser comunes en ciertos lugares (Villamil-Gómez et al., 2016, Waggoner et al., 2016b, Zambrano et al., 2016) y la detección de coinfecciones en casos de CNS Enfermedad no ha sido bien descrita (Zambrano et al., 2016).

Los primeros casos de infección por ZIKV en Ecuador fueron reportados en enero de 2016 en dos viajeros retornados. Poco después, la transmisión autóctona se documentó en el país. CHIKV se introdujo en Ecuador en 2014 y el DENV ha sido endémico en Ecuador desde 1988. Guayaquil, ubicada en el Océano Pacífico, es la ciudad más grande del Ecuador y tiene un alto porcentaje de infecciones arbovirales. Durante 2016, ZIKV, CHIKV y DENV co-circularon en Guayaquil. En el presente estudio se buscó determinar la prevalencia de ZIKV, CHIKV y / o DENV en pacientes adultos ingresados al Hospital Luis Vernaza de Guayaquil.

# CAPÍTULO I

## 1. EL PROBLEMA

### 1.1. Planteamiento del Problema

Las enfermedades producidas por arbovirus son un problema muy grave a nivel mundial, debido a que su vigilancia y prevención implica también la vigilancia de sus vectores, lo que hace difícil su control y casi imposible evitar su expansión a cualquier país tropical o subtropical, e incluso algunas regiones templadas. A nivel mundial, el dengue es la enfermedad por arbovirus más común con 40% de la población mundial viviendo en zonas de transmisión del virus del dengue. De las 390 millones de infecciones estimadas y 100 millones de casos anuales, una proporción pequeña de estos casos progresa a dengue grave. Aproximadamente uno de cada 2,000 casos de dengue causan la muerte; sin embargo, la tasa de letalidad de los pacientes con dengue grave se puede reducir de casi 10% a menos del 0.1% si se actúa rápidamente y con calidad en la atención clínica que reciben los pacientes. Un total de 12663 casos de Dengue se registran en el Ecuador, donde hay 1714 confirmados de Chikungunya, en Guayaquil 1473 casos de Dengue se han registrado y 287 de Chikungunya según el Ministerio de Salud Pública. Debido a estas viremias es necesario el diagnóstico molecular multiplex para determinar los arbovirus presentes en la ciudad de Guayaquil.

### 1.2. Formulación del problema

Déficit de técnicas moleculares con alta especificidad y sensibilidad en el Ecuador, para la detección simultánea de infecciones por arbovirus.

### 1.3. JUSTIFICACIÓN

El Dengue es una enfermedad prevalente en los trópicos y es un problema de salud pública en el Ecuador. Es una de las enfermedades que tienen una constante vigilancia epidemiológica por parte del Centro Nacional de Referencia. El Zika ha sido declarado por la OMS una enfermedad de problemática global. Es el único arbovirus que ha sido relacionado con efectos teratogénicos. El Chikungunya es una enfermedad que simula las manifestaciones clínicas de Dengue y Zika en los adultos, que comparte el mismo vector y semejantes características epidemiológicas. Si bien no es un flavivirus, como los anteriores, es importante diferenciarlas.

Tomando en cuenta que la ciudad de Guayaquil tiene una elevada presencia de *Aedes Aegypti* y está demostrada la circulación de los tres virus Zika, Chikungunya y Dengue, existe un gran número de infectados por alguno de estos virus así como también de co-infecciones, debido a que existe un gran problema de incremento de virus y deficiencia de técnicas moleculares.

Por lo anterior es importante aplicar una técnica multiplex basada en PCR en Tiempo Real que permita determinar clínicamente la presencia de estos virus en Guayaquil, Ecuador. Entre los métodos de diagnóstico de laboratorio para confirmar la infección por el virus del dengue se encuentran: la detección del virus, el ácido nucleico virus, antígeno o anticuerpos, o una combinación de estas técnicas. En general, las pruebas con alta sensibilidad y especificidad requieren tecnologías más complejas y los conocimientos técnicos, mientras que las pruebas rápidas pueden comprometer la sensibilidad y especificidad para la facilidad de rendimiento y velocidad. El aislamiento del virus y la detección de ácidos nucleicos son más mano de obra intensiva y costosa, pero también son más específicas que la detección de anticuerpos por medio de métodos serológicos.

## **1.4. OBJETIVOS**

### **1.4.1. Objetivo General**

Aplicar una técnica molecular multiplex para la detección simultánea de ácidos nucleicos de los virus de Zika, Chikungunya y Dengue para el estudio de muestras clínicas.

### **1.4.2. Objetivos Específicos**

- 1.4.2.1. Determinar la prevalencia de los arbovirus en el total de muestras de pacientes.
- 1.4.2.2. Definir la frecuencia de co-infecciones simples y múltiples por ZIKV, CHIKV Y DENV.
- 1.4.2.3. Establecer la presencia de arbovirus en la población estudiada en función del sexo y grupos etarios.

## **CAPÍTULO II**

### **2. MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Infecciones por Arbovirus**

Los arbovirus como patógenos causantes de enfermedades en el hombre se pueden encontrar en muchas páginas de la historia de la humanidad ya que han sido causales de un gran número de epidemias a lo largo de la historia universal. Hasta fines del siglo XIX se conocía la etiología de muchas enfermedades infecciosas, sin embargo para un gran número de enfermedades no solo del hombre sino de plantas y animales permanecía sin identificarse el agente causal, siendo hasta el siglo XX que se descubrieron a los virus como causantes de enfermedades infecciosas. Las primeras características diferenciales de los virus con respecto a otros agentes infecciosos fueron: el tamaño, estimado por su capacidad de atravesar filtros que retienen a las bacterias y la incapacidad para reproducirse en medios biológicos inertes, requiriendo para su propagación de animales o cultivos celulares, características que actualmente no son exclusivas de estos agentes. Según su definición los virus son parásitos intracelulares obligados de tamaño submicroscópico. Sin embargo, para contar con una definición adecuada es necesario adicionar algunas cláusulas adicionales como que las partículas virales son producidas a partir de componentes ensamblados o preformados, no crecen o se someten a división, esto en comparación con otros agentes que crecen por un incremento de la suma integrada de sus componentes y se reproducen por división. Además, los virus carecen de información genética que codifica para el aparato necesario para la generación de energía

metabólica o para la síntesis de proteínas por lo que depende absolutamente de la célula huésped para su funcionamiento.

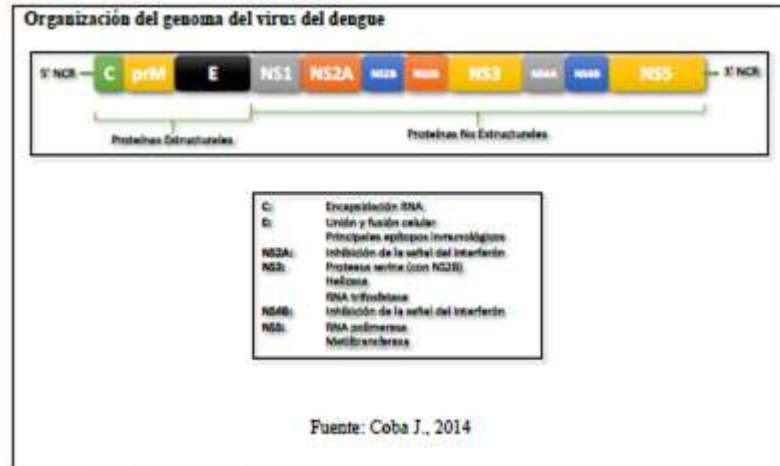
De acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), los Flavivirus (del latín flavi 'amarillo'), comprenden uno de los tres géneros que componen la familia viral Flaviviridae la cual comprende alrededor de 70 virus envueltos cuyo genoma está constituido por ARN de polaridad positiva, los otros dos son los géneros Pestivirus (del latín pestis 'plaga') y Hepacivirus (del griego hepar, hepatos 'hígado'), aunque estos últimos poseen estrategias de replicación similares a las de los flavivirus, estos grupos son antigénicamente distintos, no son transmitidos por artrópodos y representan linajes que divergieron tempranamente en la evolución de esta familia viral. Por otro lado, se sabe con certeza a través de la evidencia geográfica que el progenitor de las aproximadamente 80 especies que constituyen el género Flavivirus surgió en África. (Endy, T.P., S.C.Weaver, K.A. Hanley, S.C. Weaver, 2010).

Con el curso de la especiación, los flavivirus han mostrado una diversificación substancialmente ecológica, lo cual se puede evidenciar con las diversas formas de transmisión de los diferentes linajes de los flavivirus, ya que estudios filogenéticos del género sugieren que el ancestro pudo haber sido un virus de mosquitos solamente el cual, posteriormente adquirió la habilidad de infectar vertebrados, los demás flavivirus se dividen en virus transmitidos a vertebrados mediante vector, cuyos mayores grupos emplean garrapatas y mosquitos para su transmisión horizontal, y otro grupo el cual infecta vertebrados sin el uso de artrópodos vectores. Lo anterior no sugiere si los transmitidos por vector o sin vector fueron ancestrales pero la posición de los virus que infectan solamente mosquitos sugiere que la transmisión a través de mosquitos a los vertebrados precedió a la pérdida de la transmisión por vector.

La transmisión a través de garrapatas pudo haber evolucionado del linaje transmitido por mosquitos después de que el linaje que infecta solo vertebrados surgió.

A la fecha todos los flavivirus conocidos como patógenos de humanos son transmitidos por vectores, y con la excepción de los virus del Dengue todas son zoonosis. Destacando que las que representan amenazas significativas para la salud humana incluyen las ocasionadas por los virus de la Fiebre Amarilla, del Oeste del Nilo, del Dengue, de la Encefalitis Japonesa, y el de la Encefalitis por garrapata. Los virus que pertenecen al género Flavivirus se caracterizan por poseer una estructura esférica, un tamaño de entre 40-50 nm, los cuales están cubiertos por una envoltura lipídica. Otra de las características de los flavivirus es que estos tienen un grupo común de epítopes en la proteína de envoltura que resulta en extensivas reacciones cruzadas en las pruebas serológicas lo que hace difícil el diagnóstico serológico inequívoco de los flavivirus. La organización del genoma de los Flavivirus está conservado a través del género, siendo este, monocatenario de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 11,000 bases de longitud, con un CAP tipo I (m<sup>7</sup>GpppAmpN<sub>2</sub>) en el extremo 5', cuenta además con un solo marco de lectura abierto flanqueado por regiones no codificantes (UTR) en sus extremos 5' y 3', las cuales forman estructuras secundarias conservadas en forma de tallo-bucle las cuales son necesarias para la replicación y traducción del genoma viral, el único marco de lectura abierto codifica para una única poliproteína, la cual es procesada co- y postraduccionalmente para generar tres proteínas estructurales (cápside-premembrana/membrana-envoltura; CpRM/M-E) y siete no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5).

Figura 1. Organización de las proteínas estructurales y no estructurales en el genoma del virus del dengue y su función.



De las proteínas estructurales, la glicoproteína de envoltura es esencial para la entrada viral a la célula ya que contiene el sitio de unión para el aún no identificado receptor celular, dentro del endosoma la proteína de envoltura (E o Env) cambia de homodímero a homotrímero lo que permite la fusión con la membrana celular.

Específicamente para el Virus del Dengue, se han propuesto diferentes receptores de células de mamíferos, incluyendo el heparán sulfato, las proteínas de shock térmico 70 (HSP 70) y HSP90, GRP78/Bip, CD14 y el receptor de laminina de alta afinidad 37 kDa/67-KDa, así como la molécula de adhesión intercelular 3 específica de células dendríticas (ICAM-3) -no integrina (DC-SIGN) y la ICAM-3 no integrina específica de hígado/nódulo linfático.

Existen reportes donde en infecciones primarias por Virus del Dengue (DENV), el virus entra a las células blanco (según consenso son las células del linaje fagocítico mononuclear: monocitos, macrófagos y células dendríticas)



después de que la proteína E se adhiere a los receptores de superficie, como el ICAM 3 no integrina específica de 5 células dendríticas (del inglés Dendritic Cell-specific ICAM-3 grabbing non integrin).

Además los heparán sulfatos de superficie celular también están involucrados en la unión del virus del dengue a la superficie de células de mamíferos. Los heparán sulfatos son disacáridos repetidos de ácidos urónicos y L-idurónicos (derivados de glucosamina), y son variablemente o-glicosilados. Debido a estos esfuerzos, la unión y entrada viral a la célula sigue siendo deficiente. Coreceptores para la entrada del virus en las células dendríticas han sido identificados y analizados. Uno de los receptores es una lectina tipo C, CD209/DC-SIGN, y se cree que se unen a la proteína viral E, ayudando en la entrada a las células dendríticas. Otro hallazgo identificó al receptor de manosa presente en macrófagos presentando evidencia que los macrófagos dérmicos sirven como primera respuesta inmune celular innata, con la capacidad de proteger contra el virus del dengue después de la picadura del mosquito. Además, la familia de lectina tipo C dominio 5A (CLEC5A) puede servir como un receptor de reconocimiento de patrones para los macrófagos que interactúan con los virus del dengue para estimular la pro-liberación de citocinas inflamatorias.

Por su parte, las proteínas estructurales de los Flavivirus también han sido estudiadas reconociendo a la proteína NS5 como la ARN polimerasa dependiente de ARN, además posee una secuencia de localización nuclear así como actividad metiltransferasa, mientras que las proteínas NS2B y NS3 juntas actúan como proteasa viral. Sin embargo, la función de la mayoría de las proteínas no estructurales se desconoce.

El ciclo de replicación de los Flavivirus es muy similar. La infección con uno de los flavivirus transmitidos por artrópodos comienza cuando el vector toma

sangre y el virus es introducido al hospedero, posteriormente el virus se une y entra a células permisivas vía endocitosis mediada por receptor. Una vez internalizado, la acidificación del endosoma permite la fusión de membranas virales y celulares lo que permite la entrada de la nucleocápside al citoplasma donde se lleva a cabo el desnudamiento del genoma. Luego, la traducción de la cadena de ARN toma lugar. Posteriormente, el virus cambia de traducción a la síntesis de un intermediario de cadena negativa, la cual sirve como templado para la producción de múltiples copias de ARN viral de cadena positiva. Las sucesivas rondas de traducción producen altos niveles de proteínas virales; las proteínas estructurales de la y de envoltura (E) son ensambladas con el ARN viral para generar viriones, los cuales son transportados a través del aparato de Golgi y secretados.

### **2.1.1. Virus del Zika**

ZIKV es un virus de ARN que contiene 10.794 nucleótidos codificando 3419 aminoácidos. Está estrechamente relacionado con el virus Spondweni. Los parientes más cercanos son el virus de encefalitis; virus de la fiebre amarilla, el dengue, la encefalitis japonesa y virus del Nilo occidental. Los estudios en el Bosque Zika sugirieron que la infección ZIKV bloquea la viremia causada por el Virus de la fiebre amarilla en monos, pero no bloquea la transmisión del virus de la fiebre amarilla. La información respecto a patogénesis de ZIKV es escasa pero es un flavivirus transmitido por mosquitos, se cree que replica inicialmente en células dendríticas cerca del sitio de la inoculación diseminando a los ganglios linfáticos y el torrente sanguíneo. Aunque la replicación de este flavivirus se piensa que ocurre en el citoplasma celular, estudios sugieren que los antígenos ZIKV podrían ser encontrados en los núcleos de células infectadas. El virus se aisló de la muestra de suero de un mono 9 días después de la inoculación experimental. Se ha comprobado que el ZIKV es inhibido por permanganato de potasio, éter, y temperaturas más de

60 ° C; cabe mencionar que el virus no es neutralizado de manera efectiva por etanol al 10 %. (Hayes, 2009).

Aunque la infección por el virus Zika es leve, la alta prevalencia de la inmunidad en Nigeria tiene algún significado epidemiológico. Se demostró por Fabiyi y Macnamara en 1962 que una mejor respuesta inmune se encontró en personas sin previa inmunización para fiebre amarilla, el alto porcentaje de personas inmunes a ZIKV y otros flavivirus pueden influir el resultado de un programa de inmunización contra la fiebre amarilla. Henderson en 1970 demostró que tal inmunidad a flavivirus heterólogos podría modificar el curso de la infección de la fiebre amarilla. La alta prevalencia de anticuerpos contra Zika y otros virus relacionados podría contribuir a la ausencia de la fiebre amarilla en áreas de África; lo que habla de un proceso de reactividad cruzada. (Lee, 1969; Henderson, 1971; Carey 1972; Monath 1973; Fagbami, 1979).

En África central se presenta la primera evidencia directa de la epidemia ZIKV en un ambiente urbano durante los brotes de Chikungunya (CHIKV) y dengue (DENV) concomitantes en Libreville, capital de Gabón en 2007, informando también la primera detección de ZIKV en *Aedes albopictus* o también conocido como el mosquito de tigre asiático. (Faye, 2013; Grard, 2014)

En Senegal mediante investigaciones adicionales se aisló ZIKV a partir de *Aedes aegypti* en Malasia.; mientras que Olson en 1981 reportó 7 personas con evidencia serológicas de ZIKV en Indonesia, estudios posteriores indicaron que el (13%) de los voluntarios humanos en Lombok, Indonesia habían neutralizado el anticuerpo para ZIKV. (Haddow, 2012)

En abril del 2007 se informó un brote de ZIKV sobre la Isla de Yap en los Estados Federados de Micronesia. Se analizaron muestras de suero de pacientes en la fase aguda confirmando la presencia ZIKV y mostrando a su

vez que ZIKV se ha extendido fuera de su habitual rango geográfico. (Lanciotti, 2008; Hayes, 2009)

Debido a que el virus se ha propagado fuera de África y Asia, debe ser considerado un patógeno emergente. Afortunadamente, hasta la fecha la enfermedad del ZIKV ha sido leve y auto limitada, no obstante, se tendrá que mantener vigilada su evolución, ya que cabe mencionar que antes de que el virus del Nilo Occidental causara grandes brotes de enfermedad neuro invasiva en Rumania y en América del Norte, este era considerado como un patógeno relativamente inocuo, por lo que teniendo esto como antecedente, se deberá estar preparado.

En cuanto al continente Americano; la competencia de mosquitos para ZIKV se desconoce y esta cuestión debe abordarse; ya que la propagación de ZIKV a través del Pacífico podría ser difícil de detectar, pues recordemos que el descubrimiento de ZIKV en la comunidad de los aislados de la isla de Yap es un testimonio del potencial de los viajes o el comercio a propagar el virus a través de grandes distancias, un ejemplo de ellos es un médico voluntario que estaba en la isla de Yap durante el brote de Zika posteriormente se enfermó y era probable viremia con ZIKV; después de su regreso a los Estados Unidos, por ello es importante el reconocimiento de la propagación de ZIKV y del impacto en la salud humana ya que se requiere de la elaboración de médicos, funcionarios de salud pública y laboratorios para su identificación correcta ya que ZIKV podría ser fácilmente confundido con el dengue, para eso hay que tener en cuenta la epidemiología de transmisión de ZIKV e implementar estrategias para la prevención y control de enfermedades que incluya el uso de repelentes, insecticidas así como intervenciones para reducir la abundancia de vectores potenciales de mosquitos. (Hayes, 2009)

Aunque ZIKV circula ampliamente en el África subsahariana y el sudeste de Asia, poco se sabe de las relaciones genéticas entre aislados de estas dos regiones geográficas, que pueden tener diferentes ciclos de transmisión del vector huésped.

Además, el origen geográfico de la cepa responsable de la epidemia en la Isla de Yap y del caso de Camboya reciente ZIKV infección es desconocido. (Haddow, 2012)

El mosquito tigre Asiático, *Aedes stegomyia*, *Aedes albopictus* es considerado como un vector potencial de varios patógenos de importancia humana y veterinaria; y el aislamiento del virus y del vector en los estudios de competencia han demostrado que este mosquito es un eficiente vector de más de 20 arbovirus (entre ellos ZIKV), esta especie es notoriamente invasiva teniendo una amplia distribución geográfica.

En la actualidad el *Aedes albopictus* además de encontrarse en Asia, se puede encontrar en países de América, Europa, Oriente Medio, el Pacífico, islas, Australia y África con climas tropicales; por lo que se podría decir que la propagación mundial de *Aedes albopictus* es causada principalmente por las actividades humanas, como el aumento de la el comercio intercontinental, especialmente en las últimas tres décadas.

Cabe mencionar que en los lugares donde *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* coexisten, el primero es considerado como importante vector tanto del Dengue como del Chikungunya; su notoriedad como un vector importante salió a la luz durante el reciente brote mundial de Chikungunya. Según Tsetsarkin, una mutación en el gen de la envoltura del virus de Chikungunya (CHIKV) aumenta la infectividad del virus y la transmisibilidad de *Aedes albopictus*. La expansión global de *Aedes albopictus* continua siendo una creciente

preocupación ya que este mosquito puede alterar la transmisión dinámica de las enfermedades por parvovirus y aumentar los riesgos de los seres humanos a infecciones virales transmitidas por mosquitos. Esto ha estimulado mayor interés para determinar el grado de patógenos que este mosquito puede transmitir. (Wong, 2013)

En el año 2010, se informó de un caso de ZIKV que involucro a un niño de tres años en la provincia de Kampong Speu en Camboya, sin embargo, el vector responsable fue desconocido (Wong, 2013). Es por ello que la identificación de vectores y potenciales vectores de ZIKV o cualquier otra enfermedad transmitida por mosquitos en un área geográfica determinada tiene importante implicación cuando se trata de epidemiología, específicamente del control de brote de la enfermedad.

En la Polinesia Francesa, en octubre del 2013, se presentaron 28,000 casos de infección por virus Zika. Por otra parte, a principios del año 2014, se presentó el primer caso de transmisión perinatal. La historia clínica muestra que el recién nacido exhibió exantema maculopapular en el parto, además, la madre había presentado síntomas similares de ZIKV dos semanas antes, sin embargo, no se les realizaron los estudios serológicos correspondientes. También se plantea la hipótesis de la posible transmisión de ZIKV mediante la lactancia materna, dando positivo mediante la prueba RT-PCR en la muestra de suero del recién nacido, posteriormente después de haber tornado leche materna. (Besnard, 2014)

El 6 de noviembre del 2013 las autoridades de salud pública informaron un brote de ZIKV presentando dos casos relevantes en Japón, importados de la Polinesia Francesa. La red de vigilancia reporto 6630 casos sospechosos de ZIKV a la oficina de vigilancia sanitaria; 500 de estos casos se les realizaron pruebas en el laboratorio del instituto Malarde en Papeete para su debida

confirmación quedando; 333 confirmados para ZIKV mediante la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR).

Actualmente el 13 de enero del 2014 se reportaron 361 casos confirmados para ZIKV en Japón mostrando síntomas leves y autolimitados con una duración media de 3-6 días.

Poco tiempo después en nueva Caledonia se producen 26 casos importados a partir del brote en Japón. Por otro lado los casos exportados de ZIKV que se relacionaron con la polinesia francesa se identificaron en los viajeros que regresaron a África y el sudeste de Asia; estos incluyen un caso de ZIKV mediante transmisión sexual tras dos casos importados desde Senegal, y un caso de ZIKV de indonesia a Australia, y más tarde se reportaron dos casos importados de Tailandia, uno de Canadá y uno de Alemania. (Kutsuna, 2014)

El instituto de salud pública de Chile confirmó el 28 de febrero de 2014 mediante la prueba de laboratorio PCR el primer caso de infección por ZIKV en Chile, en un menor de 11 años residente de la isla de Pascua. La introducción del virus se daría en el contexto del brote concomitante a través del flujo de población entre la Polinesia Francesa e isla de pascua, específicamente desde Tahití donde existe vuelo directo a la isla. (Departamento de epidemiología división de planificación sanitaria ministerio de salud de Chile, 2014)

A inicios del año 2016 se reportaron los primeros casos autóctonos de infecciones por el virus de Zika. Este arbovirus también de la familia flaviviridae, la misma que los del dengue, tiene la particularidad de que no solo causa síntomas signos y problemas de morbi-mortalidad como los otros dos arbovirus, sino que puede afectar el desarrollo del sistema nervioso central,

por lo que se ha asociado a microcefalia y a otros problemas del sistema nervioso en los neonatos. Es la primera vez que la humanidad enfrenta un desafío de salud pública de estas características.

### **2.1.2. Fiebre Chikungunya**

La fiebre Chikungunya es una enfermedad tropical producida por un arbovirus causante de una poliartritis aguda de varias semanas a meses de duración. La fiebre Chikungunya es una enfermedad vírica transmitida al ser humano por mosquitos infectados. Además de fiebre y fuertes dolores articulares, produce otros síntomas, tales como dolores musculares, dolores de cabeza, náuseas, cansancio y erupciones cutáneas. Los dolores articulares suelen ser debilitantes y su duración puede variar. Algunos signos clínicos de esta enfermedad son iguales a los del Dengue, con el que se puede confundir en zonas donde este es frecuente. Como no tiene tratamiento curativo, el tratamiento se centra en el alivio de los síntomas.

Un factor de riesgo importante es la proximidad de las viviendas a lugares de cría de los mosquitos. La enfermedad se da en África, Asia y el subcontinente Indio. En los últimos decenios los vectores de la enfermedad se han propagado a Europa y las Américas. En 2007 se notificó por vez primera la transmisión de la enfermedad en Europa, en un brote localizado en el nordeste de Italia. Desde entonces se han registrado brotes en Francia y Croacia. Se describió por primera vez durante un brote ocurrido en el sur de Tanzania en 1952. Se trata de un virus ARN del género alfa-virus, familia Togaviridae. “Chikungunya” es una voz del idioma Kimakonde que significa “doblarse”, en alusión al aspecto encorvado de los pacientes debido a los dolores articulares.

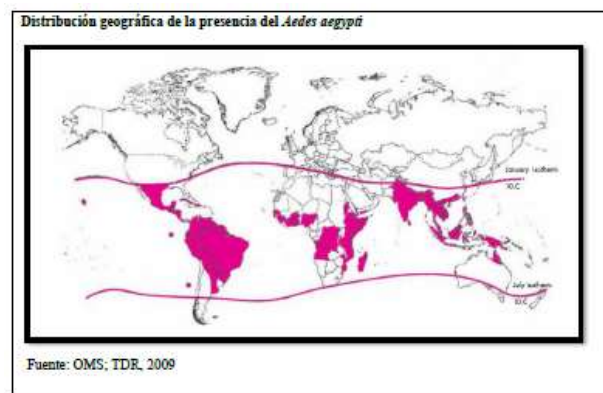


El virus Chikungunya fue introducido al Ecuador a finales del año 2014. Causa casos asociados a artralgia y aparentemente puede dejar secuelas graves en las articulaciones.

### 2.1.3. Dengue con signos de alarma y Dengue grave

El virus del Dengue es un arbovirus de la familia flaviviridae que durante larga data ha causado pandemias y epidemias, ha sido asociado con casos de Dengue Grave, causa de mucha morbilidad y mortalidad. Fue introducido en el Ecuador en 1987 y desde entonces ha estado presente de manera endémica. Los casos aumentan su frecuencia e inclusive su severidad en la temporada de lluvias.

Figura 2. Regiones del planeta donde la presencia del vector del dengue es constante durante todo el año.

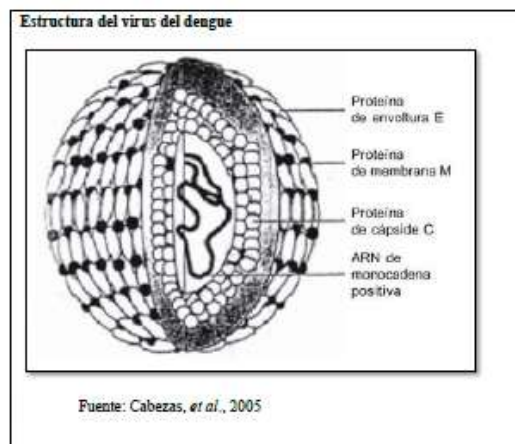


Cuando la infección del dengue se presenta en personas que no han sido infectados con un flavivirus o inmunizados con una vacuna contra flavivirus (por ejemplo, la fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis transmitida por garrapatas), los pacientes desarrollan una respuesta de anticuerpos primaria, la cual se caracteriza por un aumento lento de los anticuerpos específicos. Los

anticuerpos del isotipo IgM son las inmunoglobulinas de primera vez. Estos anticuerpos se detectan en el 50% de los pacientes por día 3-5 después de la aparición de la enfermedad, aumentando a 80% para el día 5 y el 99% a los 10 días. El pico de IgM se observa alrededor de dos semanas después de la aparición de los síntomas y luego los niveles se reducen en general a un nivel indetectable en 2-3 meses. Los anticuerpos anti-dengue IgG son generalmente detectables en títulos bajos al final de la primera semana de la enfermedad, aumentando poco a poco a partir de entonces, siendo detectables en el suero aun después de varios meses, y probablemente también durante toda la vida.

Durante una infección secundaria por dengue (la infección de un hospedero que ha sido infectado previamente por un virus del dengue, o, a veces después de la vacunación o infección por flavivirus diferentes al dengue), los títulos de anticuerpos aumentan rápidamente y reaccionan en términos generales en contra de muchos flavivirus. El isotipo de inmunoglobulina IgG generalmente se detecta en niveles altos, incluso en la fase aguda y persiste por períodos que duran de 10 meses o durante toda la vida. Los niveles de IgM en la etapa convaleciente son significativamente más bajos en las infecciones secundarias que en las primarias y puede ser indetectable en algunos casos.

Figura 3. Estructura del virus del dengue



#### **2.1.4. Co-infecciones**

Durante los brotes de dengue, o en países que históricamente sufren epidemias de dengue, los médicos tienden a no confirmar su diagnóstico en el laboratorio y se suele suponer que se trata de una infección por dengue. Más de la mitad de la población mundial habita en zonas de riesgo de infección por dengue. Los investigadores identificaron un total de 154 países que informaron sobre el dengue y 99 países que informaron de Chikungunya. De todos los países que informaron ambas enfermedades, 13 registraron co-infecciones.

El mosquito *Aedes aegypti* propaga tanto el dengue como el Chikungunya y es endémico en 174 países, y el mosquito *Aedes albopictus*, que también extiende a ambos virus, es adaptable a climas menos extremos. Las especies de vectores que propagan estos patógenos y también el virus Zika son los mismos, sin embargo, el número de países que han reportado casos de dengue es considerablemente más alta que los países que han informado de Chikungunya. Algo que para el investigador, Laith Yakob, puede ser causado por el diagnóstico erróneo generalizado de Chikungunya con el dengue.

#### **2.1.5. Introducción de los métodos de detección del Arbovirus**

El diagnóstico eficaz y preciso del dengue es de primordial importancia para la atención clínica del paciente es decir, la detección temprana de los casos más graves, la confirmación de casos y el diagnóstico diferencial con otras enfermedades infecciosas, además de las actividades de vigilancia, control de brotes, la patogénesis, la investigación académica, el desarrollo de vacunas y ensayos clínicos. Debido a lo anterior una variedad de métodos de diagnóstico de laboratorio se han desarrollado para apoyar el manejo del paciente y control de la enfermedad. La elección del método de diagnóstico depende de la

finalidad para la cual se realiza la prueba (por ejemplo, el diagnóstico clínico, estudio epidemiológico, el desarrollo, la vacuna), además del tipo de instalaciones de laboratorio, la experiencia técnica, los costos y el tiempo de toma de muestras.

Entre los métodos de diagnóstico de laboratorio para confirmar la infección por arbovirus se encuentran: la detección del virus, el ácido nucleico virus, antígeno o anticuerpos, o una combinación de estas técnicas. En general, las pruebas con alta sensibilidad y especificidad requieren tecnologías más complejas y los conocimientos técnicos, mientras que las pruebas rápidas pueden comprometer la sensibilidad y especificidad para la facilidad de rendimiento y velocidad. El aislamiento del virus y la detección de ácidos nucleicos son más mano de obra intensiva y costosa, pero también son más específicas que la detección de anticuerpos por medio de métodos serológicos.

Después de la aparición de la enfermedad, el virus puede ser detectado en el suero, el plasma, las células sanguíneas y otros tejidos durante 4-5 días. Durante las primeras 23 etapas de la enfermedad, el aislamiento del virus, el ácido nucleico o detección del antígeno se puede utilizar para diagnosticar la infección. Al final de la fase aguda de la infección, la serología es el método de elección para el diagnóstico. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos a la infección varía según el estado inmunológico del huésped.

#### **2.1.5.1. Diagnóstico inmunológico**

El diagnóstico de estos virus es complejo, en primer lugar por la sintomatología que representa un reto para el médico, la cual es similar en los tres virus. Los síntomas más comunes de los arbovirus son fiebre, sarpullido, dolor en las

articulaciones que incluyen dolor muscular, dolor de cabeza, y/o conjuntivitis (enrojecimiento de los ojos).

Se incluye otro factor en cuanto a dificultad clínica, que mayoría de la gente infectada por los arbovirus no produce sintomatología, este porcentaje oscila entre el 80% y equivale a que una persona presenta síntomas de cinco personas que portan el virus y son posibles fuentes de transmisión.

#### **2.1.5.2. Cultivo Viral**

Para el diagnóstico por el laboratorio: Apoyándose en la literatura y recomendaciones dadas por organizaciones internacionales de salud este se divide en: directas que se basan en identificación y aislamiento del virus (PCR-RT y cultivo del virus) y en pruebas indirectas o serológicas que están relacionadas a la respuesta del sistema inmunológico. En el área de diagnóstico molecular, lo ideal es realizar la identificación del ADN de los tres tipos de virus: Dengue, Chikungunya y Zika.

El diagnóstico molecular debe ser acompañado con el diagnóstico serológico como lo recomienda el CDC, porque en algunos casos este periodo de viremia puede pasar desapercibido, de igual manera se comporta la sintomatología en embarazadas que son el grupo de mayor riesgo y se les debe llevar un seguimiento riguroso.

En el caso del diagnóstico indirecto o serológico, este se vuelve más complejo por dos condiciones especiales, en primer lugar la co-infección comprobada que significa que una misma persona puede presentar simultáneamente infección por dos virus a la vez, ya que el zancudo que lo pica en ese momento era portador de ambos virus y por ende se los transmitió. Se han registrado casos en los cuales existe co-infección de Zika con Dengue 1 y 3, y de virus

Dengue con Chikungunya, (Estudio realizado en las islas Yap Micronesia, 2007).

La segunda condición que complica el diagnóstico serológico es la probabilidad de reactividad cruzada entre los virus Dengue y Zika, ya que ellos son de la misma familia viral, esto los hace ser bastante parecidos morfológica y antigénicamente, debido a ello nuestro sistema inmune produce anticuerpos que se pueden cruzar en la reacción inmunológica in vitro esto quiere decir que anticuerpos que originalmente se produjeron frente al virus del Dengue pueden dar positivo en una prueba para virus Zika. Hasta el momento no se tiene un verdadero valor de reacción cruzada, es por ello que la sensibilidad y especificidad de las pruebas debe ser alta.

### **2.1.5.3. Métodos de biología molecular**

Las técnicas de laboratorio que se usan para aislar ADN o extraerlo en alta pureza, visualizarlo para ver su estado, cortarlo y pegarlo (nacimiento de la Ingeniería genética), amplificar una región en una enorme cantidad de moléculas (clonación de fragmentos en bacterias u otros vectores como virus y PCR), corte de una determinada región con enzimas de restricción para ver si por una mutación se gana o se pierde un sitio de restricción (análisis de mutaciones por RFLP o Restriction fragment length polymorphism), que significa: diferencias en los tamaños de los fragmentos de restricción debido a polimorfismos en el ADN entre otras.

#### **2.1.5.3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se

puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos, diseñadas, como veremos más adelante, de manera especial.

**Agentes intercalantes** Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (hot-start PCR) lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para ello se pueden usar polimerasas recombinantes modificadas que sólo funcionan después de ser activadas a temperaturas elevadas o anticuerpos que bloquean el centro activo de la polimerasa hasta que la reacción alcanza temperaturas altas en las que el anticuerpo se desnaturaliza liberando la polimerasa y permitiendo

su actividad. Además, la mayoría de los equipos para PCR a tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados ( $T_m$  = temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene un  $T_m$  característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Por otra parte, los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia diana.

**Sondas de hibridación específicas** Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas molecular beacons y las sondas FRET.

1. **Sondas de hidrólisis.** Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y receptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En la tabla 1 se relacionan los fluorocromos más empleados y sus espectros de excitación y emisión.



Tabla 1. Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la PCR a tiempo real

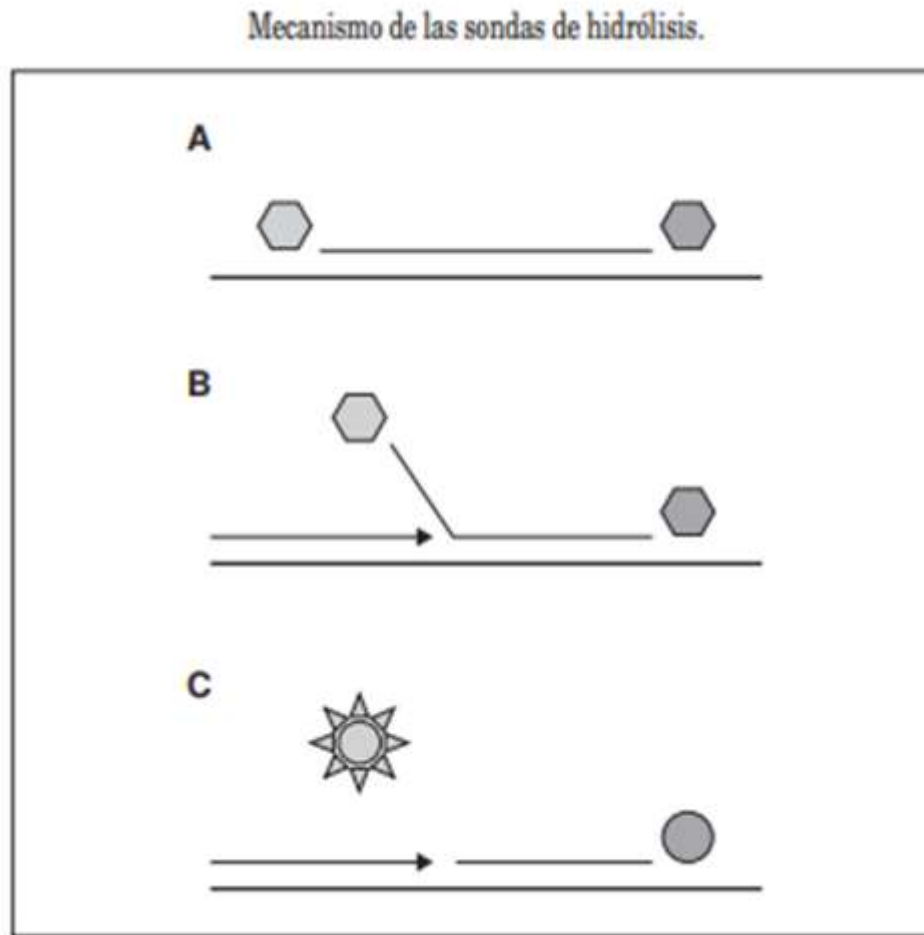
Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la PCR a tiempo real		
Fluorocromo	Máx $\lambda_{abs}$ (nm)	Máx $\lambda_{em}$ (nm)
Cascade blue (varios)	374-403	422-430
YOYO-1	491	509
Bodipy	503	512
Fluoresceína (FITC)	494	520
SYBR Green I	497	520
TOTO-1	513	532
FAM	495	535
Luciferina	430	540
TET	522	550
JOE	525	555
HEX	530	560
Cy3	552	565
POPO-3	534	570
Rodamina	540	570
NED	553	575
TAMRA	560	580
Naranja de acridina	460,502	526,650
Cy5	643	667
Quantum Red/Red 670	480,565	670
Bromuro de etidio	526	605
ROX	580	605
Red 613	480,565	613
Rojo de Tejas	596	615
Homodímero de etidio	534	616
Yoduro de propidio	536	617
IRD 700	685	705
Cy7	743	767
IRD 800	795	849

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador

y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (fig. 4).

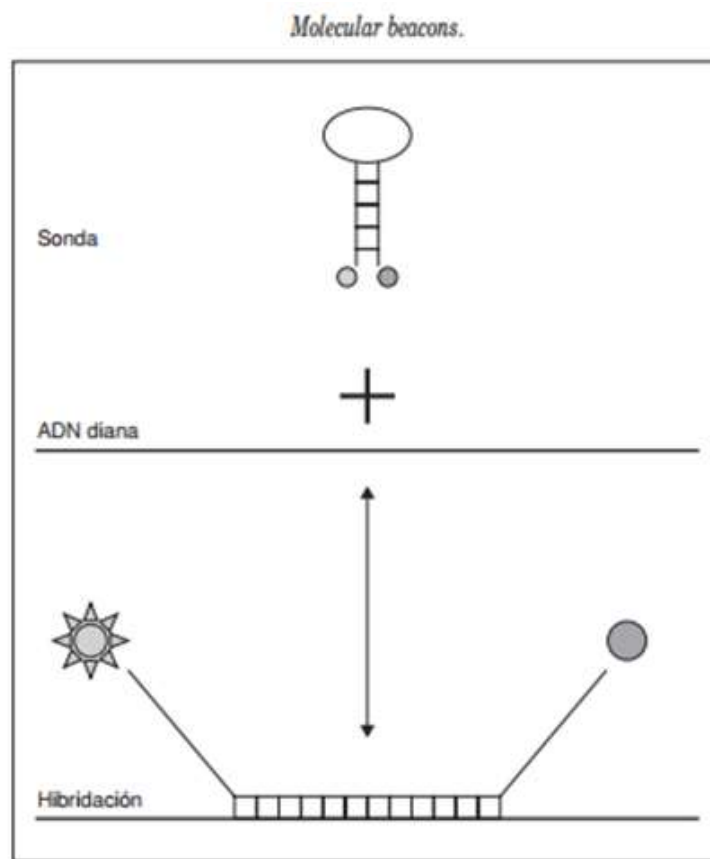
Figura 4. Mecanismo de las sondas de hidrólisis



2. Molecular beacons. Son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptor en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación

la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero (fig. 5).

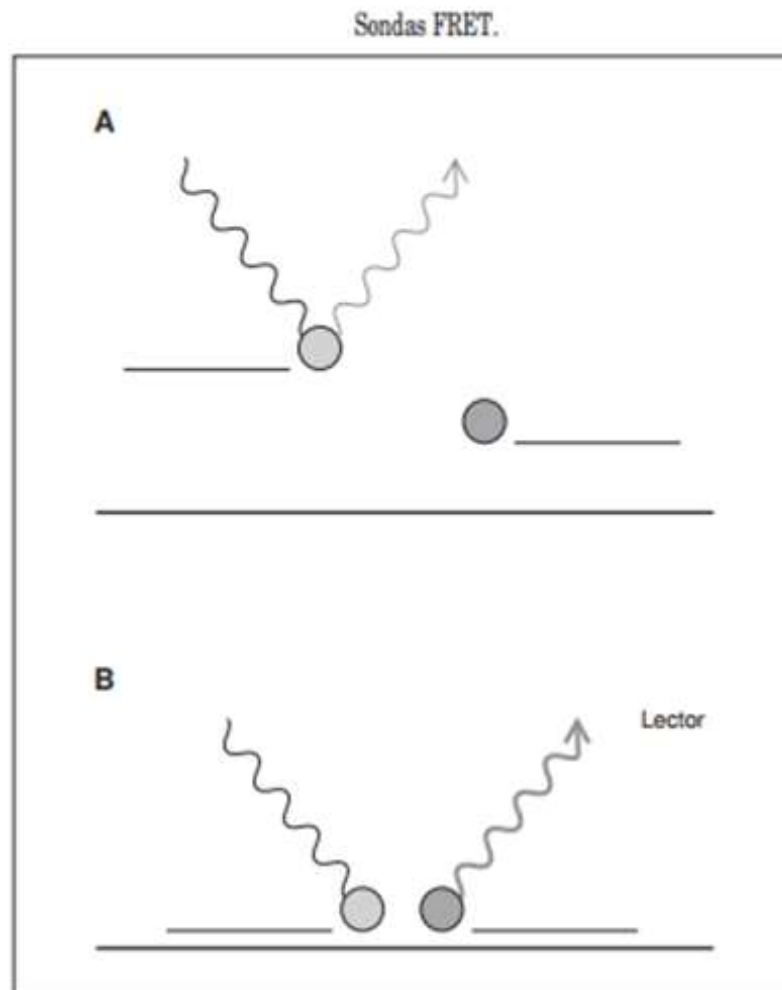
Figura 5. Molecular *beacons*



3. Sondas FRET. El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el

donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo (fig. 6).

Figura 6. Sondas FRET.



En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o

mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil.

#### **2.1.6. Prueba ZCD para diagnóstico de arbovirus**

El reciente aumento de los casos de microcefalia y de otros trastornos neurológicos posiblemente asociados a la infección por el virus de Zika ha provocado un aumento de la demanda de pruebas de laboratorio para detectar dicha infección. Los grupos prioritarios para la realización de pruebas diagnósticas son los pacientes sintomáticos y las embarazadas asintomáticas posiblemente expuestas al virus.

La estrategia adoptada por cada laboratorio debería ser determinada por los recursos disponibles y su flujo de trabajo. Los enfoques utilizados con estas estrategias variarán dependiendo de la prevalencia de los virus que se sabe que están circulando en la zona donde los pacientes estuvieron expuestos. La OMS recomienda las estrategias siguientes:

La serología es el método preferido en muestras de pacientes cuyos síntomas hayan empezado hace más de 7 días. Si se utilizan análisis de ácidos nucleicos, los resultados negativos deben interpretarse con cautela, pues no descartan la infección, dado que la viremia disminuye rápidamente 7 días después del inicio de los síntomas y puede no ser detectada por las pruebas en el límite inferior de la sensibilidad.

## **CAPÍTULO III**

### **3. METODOLOGÍA O DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1. Materiales y Métodos**

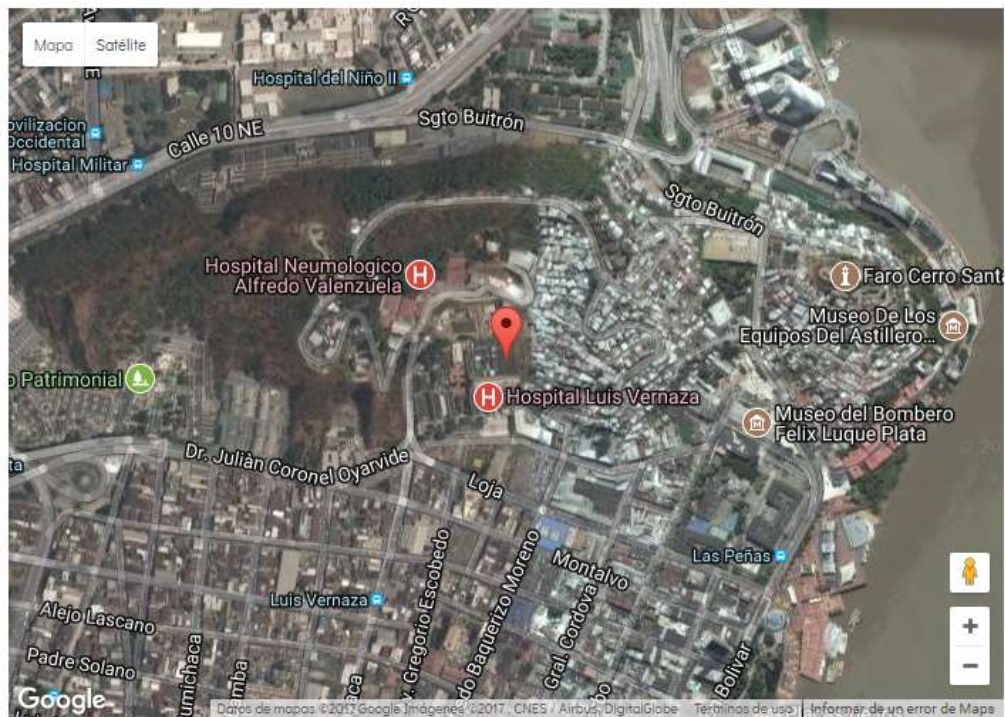
##### **3.1.1. Manejo y ejecución de la investigación**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Luis Vernaza de la ciudad de Guayaquil, en donde se procesó las muestras de los pacientes atendidos en dicho centro médico.

##### **3.1.2. Localización socio-geográfica**

La institución involucrada en la presente investigación, se encuentra ubicada en la ciudad de Guayaquil – Ecuador. La ciudad de Guayaquil está localizada en la región costera del país, tiene cerca de 3.113.725 habitantes y su población es muy heterogénea, tiene zonas muy modernas, pero también existen áreas marginales, tiene serios problemas de higiene y saneamiento, en donde vive un conjunto poblacional susceptible de adquirir infecciones de todo tipo.

Figura 7. Localización socio-geográfica.



### 3.1.3. Recursos empleados

Se procedió a verificar los recursos humanos y económicos factibles para proceder al estudio. Se realizó los trámites pertinentes para la autorización de la presente investigación en el área de biotecnología molecular del Centro de Salud donde se realizó este proyecto.

#### 3.1.3.1. Recursos humanos

- ✓ Investigadores
- ✓ Personal de apoyo
- ✓ Asesores

### **3.1.3.2. Recursos de laboratorio y oficina**

- ✓ Sala de trabajo
- ✓ Laboratorio
- ✓ Equipo
- ✓ Materiales

### **3.1.4. Materiales**

- ✓ Termociclador en tiempo real. Cobas Z 480 (Roche, Basilea, Suiza).
- ✓ Agua Grado Molecular
- ✓ Kit
- ✓ Primers
- ✓ Polimerasa
- ✓ Control positivo: Plásmidos con secuencias conocidas de Zika - Chikungunya - Dengue.
- ✓ Control negativo

### **3.1.5. Diseño de la investigación**

Esta investigación es Descriptiva.

#### **3.1.5.1. Tipo de investigación**

Al ser un problema interés social, mediante esta investigación detallaremos el objetivo y características del estudio permitiendo tener una medición cualitativa



de los resultados obtenidos en los pacientes en estudio, siendo comparado con todos los datos e información obtenida.

#### **3.1.5.2. Enfoque clínico de la presente investigación**

En la presente investigación se realizaron exámenes de laboratorio y evaluación clínico de los pacientes para obtener resultados referenciales y diferenciales para detección simultánea de infecciones de los arbovirus, Zika, Chikungunya y Dengue.

En virtud del tamaño de la muestra, se trabajó con toda la población que asistió durante el periodo que se efectuó la investigación, la misma que está constituida de 108 pacientes que fueron atendidos en la Consulta externa del Hospital Luis Vernaza.

#### **3.1.5.3. Universo de recolección de datos.**

En general el momento más adecuado para realizar la toma de muestra es entre las 7:00-9:30 de la mañana, (las determinaciones que necesiten extraerse en otra banda horaria deberán de especificarse por el laboratorio), extraer la muestra antes de iniciar procedimientos diagnósticos o terapéuticos que puedan interferir. Se debe registrar la hora exacta de la toma de muestra y enviar ésta al laboratorio en el contenedor adecuado.

#### **3.1.5.4. Muestreo**

En esta investigación el universo estuvo conformado por 108 muestras de pacientes que se evaluaron para este estudio. Los pacientes habían ingresado en el Hospital Luis Vernaza en Guayaquil, Ecuador.

#### **3.1.5.5. Criterios de inclusión**

- ✓ Pacientes con signos y síntomas de Zika.
- ✓ Pacientes con signos y síntomas de Chikungunya.
- ✓ Pacientes con signos y síntomas de Dengue.
- ✓ Pacientes que presentan fiebre más de tres días.
- ✓ Pacientes con fiebre recurrente durante unos varios días o semanas.
- ✓ Pacientes que firmaron voluntariamente el consentimiento informado.

#### **3.1.5.6. Criterios de exclusión**

- ✓ Pacientes que presentan fiebre menor a 3 días
- ✓ Pacientes con enfermedades catastróficas o hereditarias.
- ✓ Pacientes que no firmaron el consentimiento informado.

#### **3.1.5.7. Aspectos éticos y legales**

Todos los datos obtenidos reposan en las historias clínica del Hospital Luis Vernaza, lo cual no se revelará los nombres de los pacientes bajo ninguna circunstancias. Se ejecutó un consentimiento informado sencillo, ya que la

información que se brinda en la misma no afecta a la integridad de los pacientes, y voluntariamente aceptaron participar en este estudio. Los investigadores del estudio declararon no tener ningún tipo de conflicto de intereses con ninguna institución hospitalaria, tipo de tratamiento o prueba diagnóstica que se incluyen en esta investigación.

#### **3.1.5.8. Métodos y técnicas de laboratorio.**

Un conjunto de muestras de 108 pacientes se evaluaron para este estudio. Los pacientes ingresaron en el Hospital Luis Vernaza en Guayaquil, Ecuador y recibieron la atención de rutina. Los pacientes ingresaron del 18 de enero al 31 de agosto de 2016 y fueron inicialmente evaluados por un neurólogo o un médico del hospital, se tomaron muestras de sangre se almacenaron a  $-20^{\circ}$  C hasta que se pudo realizar la extracción de ADN.

#### **3.1.5.9. Toma de muestra de sangre periférica.**

- ✓ Preparar los elementos necesarios.
- ✓ Identificar al paciente y explicarle el procedimiento que se va a realizar.
- ✓ Etiquetar los tubos.
- ✓ Registrar el procedimiento en los formatos designados.

#### **3.1.5.10. Procedimiento para la toma de muestra**

La toma de muestras se realizó en la consulta externa, luego fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular para su procesamiento.

### **3.1.5.11. Extracción de ADN viral**

Para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre se siguieron los pasos recomendados por el fabricante Roche del juego de diagnóstico comercial.

Se procedió a dar vórtex a cada muestra y se colocaron en un tubo ependorf. Para la lisis de la muestra se agregó la proteinasa K y buffer del kit. Se realizó la incubación. Luego se preparó el DNA para que tuviera las condiciones óptimas de acople a las columnas de sílica; para ello se agregó 260 micro litros de Etanol absoluto, grado molecular y se le dio vórtex por 10 segundos aproximadamente. Las muestras así preparadas estaban listas para el paso de acople. Se puso las columnas de sílica de kit en un tubo colector. Todo el volumen de la muestra se lo agregó a la columna.

Después se centrifugó a una velocidad de 11.000 g por un minuto. Se descartó el centrifugado. El ADN se encuentra en la columna de sílica, aunque en estado impuro. Para limpiar las impurezas, se realizan dos series de lavados. El primer lavado se lo hizo con el buffer W. A la columna de sílica se le agrega 500 microlitros de buffer W. Luego se los centrifugó a 11.000 g por un minuto. Se descartó el líquido y se pusieron las columnas en nuevos tubos. El segundo lavado es con 600 microlitros del buffer B 5. Una vez añadido el volumen, en cada columna, se los centrifugó a 11.000 g por un minuto. Se descartó el líquido y se pusieron las columnas en nuevos tubos colectores.

El siguiente paso fue secar las columnas. Con esa finalidad se centrifugó por 1 minuto a 11.000 g cada columna. La idea es, con este paso, deshacerse de

todo el etanol que se agregó. El último paso es la “elución” o el desprendimiento del ADN de las columnas de sílica. Para este paso se colocaron las columnas en tubos ependorf de 1.5 mL. A las columnas se le agregó 100 µL de buffer BE. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y se procedió a centrifugar por 1 minuto a 11.000 g. La solución de ADN así contenida se la guardó a -20° hasta su procesamiento.

#### **3.1.5.12. Reactivos utilizados para extracción de ADN.**

En todas las muestras de los pacientes se usó el kit QIAamp Viral RNA Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) y un volumen de elución de 60 µl, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN se extrajo de muestras de suero, utilizando el mismo protocolo y volúmenes de muestra.

#### **3.1.5.13. PCR en tiempo real**

Para determinar la presencia de arbovirus en los extractos de ADN obtenidos a partir de muestras, se realizaron corridas de PCR en Tiempo Real. Con esta finalidad se utilizó el kit para detección y cuantificación. Este kit está validado para la detección y medición de carga viral en sangre.

El test ZCD es un ensayo multiplex desarrollado en la Universidad de Stanford, de Estados Unidos. El investigador Benjamín Pinsky, del laboratorio de Virología Clínica, diseñó una prueba que permite detectar los virus del Zika, Chikungunya y Dengue. Este ensayo fue testeado y validado en principio en el Termociclador Abi7500 de la empresa Applied Biosystems, y luego en el Termociclador Rotorgene Q de la empresa Qiagen.

El master mix se prepara mezclando los volúmenes de los componentes del kit. El buffer, que contiene las sales de potasio y otros componentes necesarios para la reacción, el set de primers y sondas de hidrólisis, el control interno y el agua grado molecular.

Se agregan 15  $\mu\text{L}$  de buffer, 2  $\mu\text{L}$  de primers y sondas, 0.5  $\mu\text{L}$  de control interno y 2.5  $\mu\text{L}$  de agua por reacción. El total de la master mix es de 20  $\mu\text{L}$ . El volumen total de la PCR es de 30  $\mu\text{L}$  pues a los 20  $\mu\text{L}$  de la master mix se debe de agregar 10  $\mu\text{L}$  de la solución de ADN obtenida en la extracción. Para cada corrida de PCR, además de las muestras, se agrega un control positivo y un control negativo.

Los fluoróforos para marcar tanto los segmentos 5' y el 3' para las sondas en el ensayo IC-ZCD (Biosearch Technologies, Novato, CA) fueron los siguientes: DENV, fluoresceína, Black Hole Quencher (BHQ) -1; RNasa P, Cal Fluor 540, BHQ - 1; ZIKV, Cal Fluor 610, BHQ - 2; CHIKV, Quasar 670, BHQ - 2.

Cada ciclo se compone de una fase de desnaturalización de 95 grados Celsius por 15 segundos seguido la fase de elongación a 64 grados por 1 minuto que es cuando se hace la detección de la señal de fluorescencia.

#### **3.1.5.14. Detección de arbovirus**

La detección del virus se realizó mediante los ciclos térmicos con ayuda de sondas de oligonucleótidos con marcadores fluorescentes que actúan como emisor (reportero) y un enmascarador (quencher). Conforme avanza la

amplificación, las sondas complementarias del amplicón se unieron a las secuencias de ADN bicatenario específicas y luego se escinden por la actividad de las nucleasas 5' a 3' de la ADN polimerasa. Una vez que el marcador emisor se separa del enmascarador por la actividad de la nucleasa, emite una señal de fluorescencia con una longitud de onda característica cuando se excita con el espectro lumínico adecuado.

Primero se calentó la mezcla de reacción de la PCR para activar la ADN polimerasa y desnaturalizar el ADN vírico. A medida que se enfrió la mezcla tanto en sentido ascendente como descendente, los cebadores inician la fase de alineamiento con las secuencias del ADN objetivo.

Se elaboró un modelo de recolección de datos en Microsoft Excel mediante un programa utilizado en laboratorio de genética molecular llamado Datalab, el que permitió la recolección de información de los pacientes que acudieron al hospital Luis Vernaza.

## CAPÍTULO IV

### 4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS

La investigación se realizó con 108 pacientes que fueron atendidos en Hospital Luis Vernaza, en Guayaquil, Ecuador, en el periodo de enero-agosto del 2016.

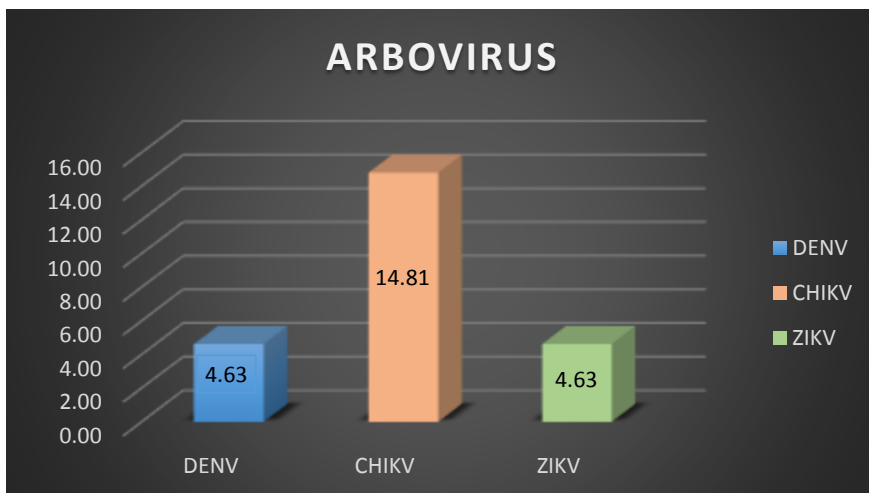
#### 4.1. RESULTADOS

**Resultados Objetivo 1:** Determinar la prevalencia de los arbovirus en el total de muestras de pacientes.

De la población total de 108 personas (100%), se observó que 26 (24.07%) personas presentan arbovirus, se evidenció la prevalencia de Chikungunya en 16 (14.81%) personas, mientras el Dengue y Zika fue detectado en 5 (4.63%) de personas respectivamente.



**Gráfico 1. Resultados de prevalencia de los arbovirus.**



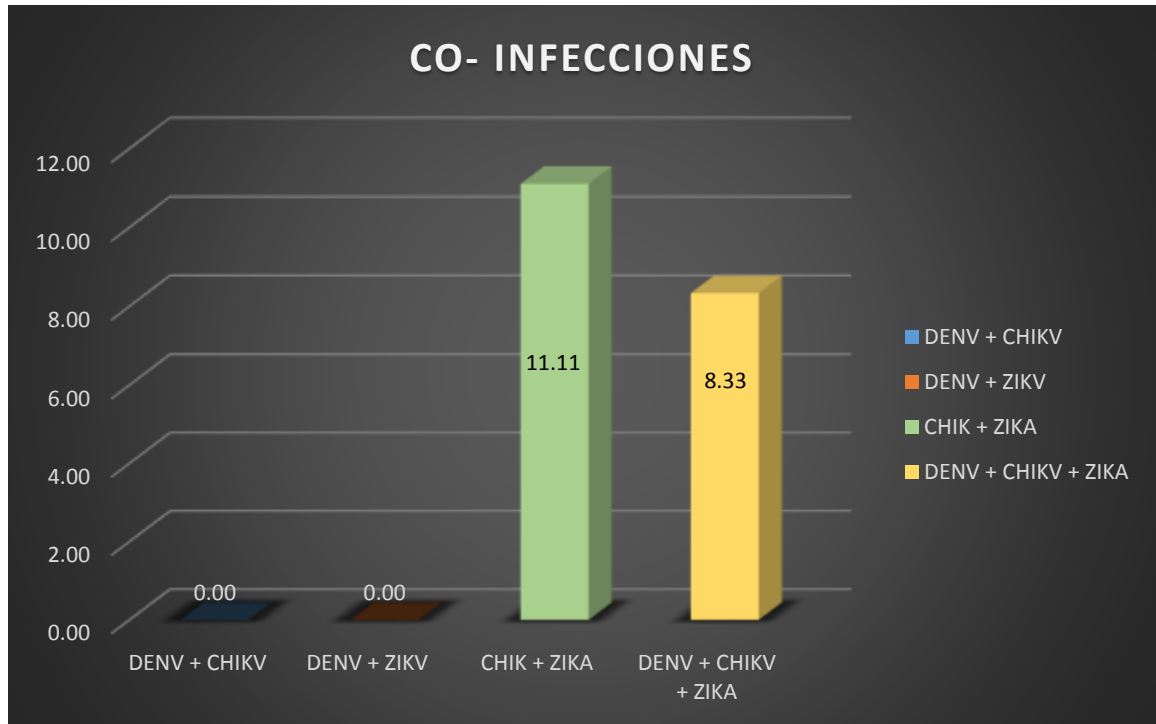
Elaborado por: Armijos, Israel

Fuente: Resultados de laboratorio. (Anexo N° 1)

**Resultados Objetivo 2:** Definir la frecuencia de co-infecciones simples y múltiples por ZIKV, CHIKV Y DENV.

De la población total de 108 (100%) personas, se observó que 21 (19.44%) personas presentaron co-infecciones, así mismo pudimos establecer que 12 (11.11%) personas presentaron CHIK/ZIKA, 9 (8.33%) personas DCZ, pero no se encontró resultados positivos en las co-infecciones de DENV/CHIKV y DENV/ZIKV.

**Gráfico 2. Resultados de frecuencia de co-infecciones.**



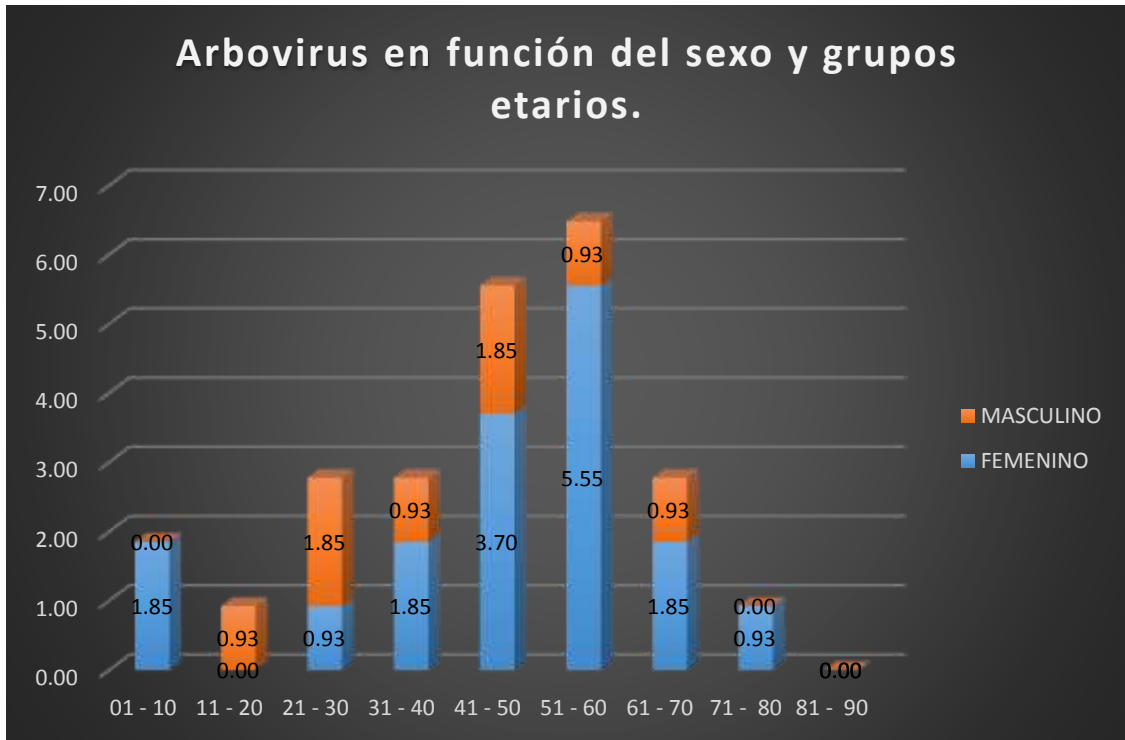
Elaborado por: Armijos, Israel

Fuente: Resultados de laboratorio. (Anexo N° 1)

**Resultados Objetivo 3:** Establecer la presencia de arbovirus en la población estudiada en función del sexo y grupos etarios.

De una población de 108 (100%) personas en estudio, se observó que 26 (24.07%) personas presentaron arbovirus, en función del sexo se pudo precisar que las mujeres presentan 18 (16.66%), mayor a los hombres 8 (7.41%) y en función del grupo etario se determinó que 7 (6.48%) personas entre hombres y mujeres se encontraron entre los 51 a 60 años.

**Gráfico 3. Resultados de arbovirosis en función del sexo y grupos etarios.**



Elaborado por: Armijos, Israel

Fuente: Resultados de laboratorio. (Anexo N° 1)

## 4.2. DISCUSIÓN

*Aedes albopictus* es otro de los principales vectores que transmite el virus del Chikungunya, enfermedad que ha causado estragos en el país durante años. En la última década este mosquito ha tenido un gran aumento en su distribución geográfica. Se lo puede encontrar en Europa, Asia (donde es originario) y en América y cada vez se establece en más países. En Sudamérica se lo puede encontrar en Brasil, Venezuela, Colombia, Paraguay y Argentina.

Ecuador ha estado exento de la presencia de este mosquito, hasta ahora. (Ponce, Morales, Argoti, Cevallos, 2017) la presencia de *Aedes albopictus* en la ciudad de Guayaquil. Específicamente, se encontraron 21 especímenes (16 hembras, y 5 machos) en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) usando trampas BG en el mes de marzo del 2017. Debido a también los cambios de patrones climáticos y de temperatura asociados al cambio climático global. Pequeños cambios de temperatura, humedad y precipitaciones pueden afectar a la distribución global de los vectores, de los mosquitos, que pueden ampliar su hábitat o territorio de actuación y extender así la enfermedad. Como la enfermedad es muy debilitante y las clases sociales menos favorecidas son las más vulnerables, la relación entre cambio climático, enfermedad y pobreza es evidente.

En este estudio se evidenció la prevalencia de arbovirus de la población total de 108 personas, se observó que 26 (24.07%) personas presentan arbovirus, Chikungunya en 16 (14.81%) personas debido a que los síntomas suelen ser más intensos e incluso estar durante un año en los niños y en los ancianos, lo que confirma el ministerio de salud en el 2016 reportando 1714 casos confirmados, mientras el Dengue y Zika fue detectado en 5 (4.63%) de

personas respectivamente, estos valores de positividad guarda relación con las características de la muestra estudiada y los criterios de inclusión del estudio, dado que se analizaron pacientes que acudieron a la consulta para un chequeo de rutina. Otros autores como (Wagoner 2016) no diferencian con exactitud de acuerdo a los síntomas clínicos a los pacientes con ZIKV, CHIKV y DENV.

La frecuencia de la infección por ZIKV, CHIKV y DENV en los diversos estudios puede variar en función de la sensibilidad de los métodos utilizados para la detección de los virus, la procedencia geográfica de los pacientes estudiados y las características del estudio, de la población total de 108 personas, se observó que 21 (19.44%) personas presentaron co-infecciones, destacar que es uno de los primeros reportes de co-infecciones de arbovirus en Ecuador, las co-infecciones pueden cursar con manifestaciones clínicas similares, se debe considerar la co-infección en aquellos pacientes procedentes de áreas endémicas. Es posible que la doble o triple infección pueda producir manifestaciones más graves, en especial en pacientes adultos mayores, así mismo pudimos establecer que 12 (11.11%) personas presentaron CHIK/ZIKA, 9 (8.33%) personas DCZ, pero no se encontró resultados positivos en las co-infecciones de DENV/CHIKV y DENV/ZIKV, otro autor (Siu 2016) establece que en base a los síntomas neurológicos se presentan co-infecciones. Es por ello que la Biología Molecular constituye en la actualidad una importante herramienta para la detección temprana de diversas patologías, y permite un diagnóstico oportuno aún en pacientes asintomáticos. En general, las técnicas moleculares tienen una mayor sensibilidad y alta especificidad en comparación a técnicas como la detección de anticuerpos. El sistema inmunológico juega un papel importante en la defensa contra todas las infecciones. Los Arbovirus en particular estimulan la producción de interferones y anticuerpos (inmunidad humoral), que ayudan a disminuir el grado de viremia. La inmunidad celular también es menos importante aquí, aunque cumple su papel.

Con los resultados de los arbovirus en función del sexo se pudo precisar que las mujeres presentan 18 (16.66%) mayor a los hombres 8 (7.41%) (Iván Allende 2010) de Dirección General de Vigilancia de la Salud indica que son las mujeres las que están más tiempo en los domicilios: son amas de casa, y la mayoría de las transmisiones del virus se dan en los barrios es una posibilidad. Así mismo se diagnosticó las infecciones por arbovirus en función de grupos etarios y se pudo precisar que la población más susceptible para contraer arbovirus es entre 51 a 60 años, la explicación que se ha dado al comportamiento de la infección en relación con la edad, es que está vinculado con la virulencia de la cepa o a otros factores del hospedero como son: edad menor a 5 años o mayor a 65. (Victoria Frantchez, Richard Fornelli, Graciela Pérez Sartori, Zaida Arteta, Susana Cabrera, Leonardo Sosa, Julio Medina 2016).

Ante la confirmación de la circulación de virus Zika el 15 de mayo del 2016 en el Nordeste de Brasil y el 16 de Octubre en Colombia, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) instaron a los Estados Miembros a establecer y mantener la capacidad para detectar y confirmar casos de infección por virus Zika, ante lo cual el Ministerio de Salud del Ecuador, a través de la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica el 20 de Octubre del 2015 emitió una alerta epidemiológica ante la posible introducción del virus Zika en el país, elaborando el Plan de Preparación y Respuesta, además de los Lineamientos Técnicos Operacionales que incluyen definición de caso, diagnóstico diferencial entre Dengue, Chikungunya, y Zika, toma y transporte de muestras al laboratorio de referencia, notificación y reporte. En Colombia, el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública reporta que a partir de la confirmación de la circulación de virus Zika en el país y el inicio de la fase epidémica desde el mes de octubre del 2015, se han notificado 1.612 casos confirmados por laboratorio y por diagnóstico clínico 34.464 casos, distribuidos en 33 de los 37

departamento del país. Se han confirmado un total de 42.706 casos por clínica y existen 6630 casos sospechosos en estudio. Con respecto a mujeres embarazadas en Colombia, se han notificado 7653 casos de Zika. De ellas, 522 gestantes tienen resultado para RT-PCR positivo notificado por el laboratorio, 6078 gestantes confirmadas por clínica y 1053 gestantes notificadas como sospechosas de la enfermedad. La zona con mayor casos reportados el departamento de Norte de Santander con 1 947. En el Ecuador se identificó el primer caso de fiebre de Zika por laboratorio, en el mes de enero de este año en la ciudad de Quito, procedente de la ciudad de Neiva en Colombia y hasta la semana epidemiológica (SE) 8 se han diagnosticado 66 casos confirmados por nexo epidemiológico y la mayoría por laboratorio. Hasta la SE 8 se han notificado 2 casos de mujeres embarazadas por laboratorio, ubicadas en las provincias de Los Ríos y Galápagos a quienes se les está realizando el monitoreo y seguimiento pertinente.

## **CAPÍTULO V**

### **5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1. CONCLUSIONES**

En base a los objetivos planteados en esta investigación mediante la exposición de los resultados se concluye:

De la población total de 108 personas, se observó que 26 (24.07%) personas presentan arbovirus, se evidencio la prevalencia de Chikungunya en 16 (14.81%) personas, mientras el Dengue y Zika fue detectado en 5 (4.63%) de personas respectivamente, lo que permite concluir que los métodos de diagnóstico de ADN para la detección de arbovirus deben sustentarse en protocolos, los que por obligación deben conocerse. Los tres virus deben considerarse en el diagnóstico diferencial para pacientes con nuevos síntomas en áreas endémicas del mundo, y estos datos respaldan el uso de un diagnóstico múltiple para las pruebas de ZIKV, CHIKV y DENV.

Se identificó que 21 (19.44%) personas presentaron co-infecciones, así mismo pudimos establecer que 12 (11.11%) personas presentaron CHIK/ZIKA, 9 (8.33%) personas DCZ, pero no se encontró resultados positivos en las co-infecciones de DENV/CHIKV y DENV/ZIKV. De manera particular la utilización de técnicas moleculares de alta sensibilidad y especificidad como la empleada en este estudio, permite la detección múltiples agentes virales.



Con los resultados de los arbovirus en función del sexo se pudo precisar que las mujeres presentan 18 (16.66%) mayor a los hombres 8 (7.41%) y según la función de los grupos etarios se pudo precisar que la población más susceptible para contraer arbovirus es entre 51 a 60 años.

Las infecciones simples y múltiples detectadas en mujeres, nos indica que deberán llevar un control obligatorio de los programas de prevención para afrontar posibles casos de infección.

## **5.2. RECOMENDACIONES**

- 1.** Tras la presentación de los resultados de esta investigación se conoce la verdadera prevalencia a nivel hospitalario, se sugiere elaborar protocolos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de estos virus dentro de la institución para que los médicos impartan los conocimientos adquiridos a sus pacientes.
- 2.** Considerar la prevalencia de este estudio para realizar estudios moleculares, con el fin de disminuir el número de casos a futuro.
- 3.** Capacitar a sectores urbanos y rurales sobre esta problemática.
- 4.** Continuar con investigaciones, ampliar la población de estudio para conocer de forma más concreta implementaciones de técnicas multiplex para la detección de arbovirus.
- 5.** Determinar la sensibilidad y especificidad de la detección de arbovirus en mujeres que cursan las primeras semanas de embarazo

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Calvet, G.A., Filippis, A.M., Mendonca, M.C., Sequeira, P.C., Siqueira, A.M., Veloso, V.G., y col. (2016). Primera detección de transmisión autóctona del virus del Zika en un paciente infectado con VIH en Río de Janeiro, Brasil. *J. Clin. Virol* 74 1-3. 10.1016 / j.jcv.2015.11.014
2. Cao-Lormeau VM, Blake A., Mons S., Lastere S., Roche C., Vanhomwegen J., y col. (2016). Síndrome de Guillain-Barre asociado a la infección por el virus del Zika en la Polinesia Francesa: un estudio de casos y controles. *Lancet* 387 1531-1539. 10.1016 / S0140-6736 (16) 00562-6
3. Carteaux G., Maquart M., Bedet A., Contou D., Brugieres P., Fourati S., et al. (2016). El virus del Zika asociado con Meningoencefalitis. *N. Engl. J. Med.* 374 1595-1596. 10.1056 / NEJMc1602964
4. Dirlikov E., Major CG, Mayshack M., Medina N., Matos D., Ryff KR, et al. (2016). Síndrome de Guillain-barre durante la transmisión del virus del Zika en curso - puerto rico, 1 de enero - 31 de julio de 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65 910-914. 10.15585 / mmwr.mm6534e1
5. Do Rosario MS, De Jesus PA, Vasilakis N., Farias DS, Novaes MA, Rodrigues SG, et al. (2016). Síndrome de Guillain-barre después de la infección por el virus del Zika en Brasil. *A.m. J. Trop.Medicina. Hyg.* 95 1157-1160. 10.4269 / ajtmh.16-0306
6. Dos Santos T., Rodríguez A., Almiron M., Sanhueza A., Ramón P., De Oliveira WK, y col. (2016). El virus del Zika y el síndrome de guillain-barre: serie de casos de siete países. *N. Engl. J. Med.* 3751598-1601. 10.1056 / NEJMc1609015

7. Gerardin P., Couderc T., Bintner M., Tournebize P., Renouil M., Lemant J., et al. (2016). Encefalitis asociada al virus Chikungunya: un estudio de cohortes en La Reunión, 2005-2009. *Neurología* 8694-102. 10.1212 / WNL.0000000000002234
8. Mecharles S., Herrmann C., Poullain P., Tran TH, Deschamps N., Mathon G., et al. (2016). Mielitis aguda debido a la infección por el virus del Zika. *Lancet* 387 : 1481 10.1016 / S0140-6736 (16) 00644-9
9. Parra B., Lizarazo J., Jiménez-Arango JA, Zea-Vera AF, González-Manrique G., Vargas J., y col.(2016). Síndrome de Guillain-barre asociado con la infección por el virus del Zika en Colombia. *N. Engl. J. Med.* 375 1513-1523. 10.1056 / NEJMoa1605564
10. Rozé B., Najioullah F., Signate A., Apetse K., Brouste Y., Gourgoudou S., et al. (2016). Detección del virus del Zika en el líquido cefalorraquídeo de dos pacientes con encefalopatía, Martinica, febrero de 2016. *Euro. Surveill.* 21 10.2807 / 1560-7917.ES.2016.21.16.30205
11. Sarmiento-Ospina A., Vásquez-Serna H., Jiménez-Canizales CE, Villamil-Gómez WE, Rodríguez-Morales AJ (2016). Muertes asociadas al virus del Zika en Colombia. *Lancet Infect. Dis.* 16 523-524.10.1016 / S1473-3099 (16) 30006-8
12. Siu R., Bukhari W., Todd A., Gunn W., Huang QS, Timmings P. (2016). Infección aguda por Zika con aparición simultánea del síndrome de Guillain-Barre. *Neurología* 87 1623-1624. 10.1212 / WNL.0000000000003038

13. Soares CN, Brasil P., Carrera RM, Sequeira P., De Filippis AB, Borges VA, y col. (2016). Encefalitis fatal asociada con la infección por el virus del Zika en un adulto. *J. Clin. Virol* 83 63-65. 10.1016 / j.jcv.2016.08.297
14. Solomon T., Dung NM, Vaughn DW, Kneen R., Thao LT, Raengsakulrach B., y col. (2000) Manifestaciones neurológicas de la infección por dengue. *Lancet* 355 1053-1059. 10.1016 / S0140-6736 (00) 02036-5
15. Swaminathan S., Schlaberg R., Lewis J., Hanson KE, Couturier MR (2016). Infección fatal del virus del Zika con transmisión no sexual secundaria. *N. Engl. J. Med.* 375 1907-1909. 10.1056 / NEJMc1610613
16. Villamil-Gomez WE, Gonzalez-Camargo O., Rodriguez-Ayubi J., Zapata-Serpa D., Rodriguez-Morales AJ (2016). Dengue, chikungunya y Zika coinfección en un paciente de Colombia. *J. Infect. Salud Pública* 9 684-686. 10.1016 / j.jiph.2015.12.002
17. Waggoner JJ, Gresh L., Mohamed-Hadley A., Ballesteros G., Davila MJ, Tellez Y., et al. (2016a). PCR de transcripción inversa multiplex de reacción simple para la detección de virus Zika, Chikungunya y Dengue. *Emerg. Infectar. Dis.* 22 1295-1297. 10.3201 / eid2207.160326
18. Wagoner JJ, Gresh L., Vargas MJ, Ballesteros G., Tellez Y., Soda KJ, et al. (2016b). Viremia y presentación clínica en pacientes nicaragüenses infectados con virus Zika, virus Chikungunya y virus del dengue. *Clin. Infectar. Dis.* 63 1584-1590. 10.1093 / cid / ciw589
19. Wagoner JJ, Pinsky BA (2016). Virus del Zika: diagnóstico de una nueva amenaza de pandemia. *J. Clin. Microbiol.* 54 860-867. 10.1128 / JCM.00279-16

20. Watt G., Kantipong P., Jongsakul K. (2003). Disminución de la carga de virus tipo 1 de la inmunodeficiencia humana durante la fiebre aguda del dengue. *Clin. Infectar. Dis.* 36 1067-1069.10.1086 / 374600.
21. Endy, T.P., S.C.Weaver, and K.A. Hanley, *DengueVirus:Past,Present and Future*, in *Frontiers in Dengue Virus Research*, K.A. Hanley and S.C. Weaver, Editors. 2010, Caister Academic Press: Norfolk, UK.
22. Carvalho/, Roberta Gomes, Lourenço-de-Oliveira, Ricardo, & Braga, Ima Aparecida. (2014). Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(6), 787-796. <https://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140304>
23. Patricio Ponce, Diego Morales, Adriana Argoti, Varsovia E Cevallos; First Report of *Aedes*(*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae), the Asian Tiger Mosquito, in Ecuador, *Journal of Medical Entomology*, , tjx165, <https://doi.org/10.1093/jme/tjx165>

# ANEXOS

## Anexo 1. Datos Binarios

H.C.	Fecha de la recolección de muestra (Date of Sample Collection):	Fecha de presentación (Date of Presentation, if different):	Fecha de nacimiento (Date of Birth):	Age	m	f	Fecha de procesamiento de la muestra (Sample processing date)	Motivo de consulta (Chief complaint):	Fecha de inicio fiebre (Date of First Fever):	
2474241	no disp.	09/06/2016	26/05/1961	54	0	1	0	disuria	09/06/2016	hipotiroidismo
20809141	0	0	0/0/0	0	0	1	0/0/0	0	0	pte de Maternidad
2927761	18/01/2016	16/01/2016	15/12/1976	39	1	0	18/01/2016	0	0	refiere chik hace 5 meses
2734451	20/04/2016	01/04/2016	02/04/1980	35	0	1	20/04/2016	cefalea	10/04/2016	hiv no reactivo. Dg ingreso hepatopatía mas Sd febril en estudio.hematología proplable linfoma (adenopatias). Solicito alta.
2941571	28/01/2016	0	20/04/1987	29	1	0	28/01/2016	0	0	DZC Negativo
2941601	28/01/2016	0	09/11/1977	39	0	1	28/01/2016	no datos	0	DZC Negativo
945351	02/02/2016	31/01/2016	20/02/1962	53	0	1	02/02/2016	cefalea/febr	31/02/2016	app HTA, chik neg.
1019041	03/02/2016	0	30/08/1934	82	1	0	03/02/2016	0	0	PCR DCZ neg.
1845711	11/02/2016	09/02/2016	06/01/1975	41	0	1	11/02/2016	fiebre	09/02/2016	dengue 4 neg DCZ 16/02/2016. aftas paladar blando
2939761	03/02/2016	12/02/2016	10/06/1972	44	1	0	03/02/2016	fiebre	12/02/2016	fx femur + extracción de OTS. Fiebre hospit.Chik: D neg. ZC pos. Enf con etio viral.
1943761	22/02/2016	22/02/2016	22/10/1980	35	0	1	22/02/2016	disnea	22/02/2016	chik neg.-/ Chik: D neg. Z-C pos 23/02/2016
2987781	24/02/2016	0	05/04/1972	0	1	1	24/02/2016	no datos	0	ckik posi. /chik y zika posi
2994151	26/02/2016	22/02/2016	19/05/1973	42	1	0	26/02/2016	fiebre	22/02/2016	ing. SD Febril/ dengue 4 sero. Chik posi
2979061	18/02/2016	12/02/2016	15/01/1993	23	0	1	18/02/2016	cefalea	12/02/2016	ing. Meningitis en estudio/pte fallece/posi Quantiferon.(02.03.2013 Chik posi test multi)paraparesia flácida de extremidades inferiores. PL se le realizo
2430041	07/04/2016	07/04/2016	11/05/1959	56	0	1	07/04/2016	dolor abdo	0	DMII+HTA+Vaculitis. Ing. Sd abdominal.
2982441	19/02/2016	19/02/2016	07/09/1984	31	1	0	20/02/2016	Qx electrica	04/03/2016	ing. Qx electrica+Rabdomiolisis.(04.03.2016 Chik positivo. D y Z nega)
3014221	11/03/2016	no datos	02/04/1980	36	0	1	11/03/2016	no datos	0	dengue 4 sero. Nega ZCD
10614766	no datos	no datos	05/11/1944	69	0	1	0/0/0	epigastralgia	0	atencion mayo 2014. hc 1314871
3006541	08/03/2016	29/02/2016	02/06/1962	53	0	1	08/03/2016	paresias de manos	0	ingresa con paraparesias y parestesias en manos y cara. Disartria. Deng 3 ser. D neg. Ch y Z positivo. Dg polineuropatía sensitivo motora axonal.
2971401	0 feb. 2016		29/01/1981	35	0	1	0/0/0	dolor pierna derec	0	paciente acude a control07/03/2016. App de 1 mes atrás con chik posi. 18/03/2016 chik. Dengue neg. Ch y z posit
206611	18/03/2016	11/03/2016	20/04/1970	45	1	0	15/03/2016	fiebre	11/03/2016	hta + irc con transplante cadaverico en el 2013. Chik posi 18/03/2016.
2841321	18/03/2016	23/02/2016	17/03/2016	38	0	1	18/03/2016	poliartralgias	23/02/2016	app asma. Chik y zika Positivo 18/03/2016.
3029321	19/03/2016	14/03/2016	01/08/1997	18	1	0	19/03/2016	parestesias	0	ingresa con parestesias de Miemb. Inf. + trastornos del habla. Chik-D-Z posi 24/03/2016



3115471	28/05/1964	0	16/08/1964	51	0	1	28/05/2016	poliartralgias	0	28-05-2016 Chikungunya detectado.
3021071	16/05/2016	0	24/12/1969	46	1	1	26/05/2016	artralgias	0	ojo y boca seca en la atencion. 28/05/2016 chikungunya detectado
3067741	20/05/2016	19/05/2016	12/11/1992	23	1	0	20/05/2016	cefalea	0	paciente luego de 22 dias de hosp. Fallece
2789491	27/07/2016	0	14/04/1972	44	0	1	27/07/2016	artralgias	0	app anemia cronica. En atencio ojo y boca seca
176071	02/06/2016	chik hace 1 año	26/04/1971	45	0	1	0	artralgias/parestes	0	app hipotiroidismo. Chik hace 1 año.
853601	24/08/2016	ferero	09/01/1969	47	0	1	24/08/2016	artralgias	0	app hipotiroidismo. 24/08/2016 chik
3139671	11/06/2016	0	12/03/1962	54	1	1	00/01/1900	artralgias	0	11/06/2016 Chik detectado DCZ
348351	04/07/2016	inespecif	03/08/1980	35	0	1	04/07/2016	poliartralgias	0	en evolucion refiere que tuvo fiebre chikungunya. 04/07/2016 chik negativo
3145741	21/06/2016	hace 1 año	07/02/1959	57	0	1	0	artralgias y paresia	0	app chik el año 2015. ojo y boca seca. 21/06/2016 negativo par CHI -Z-D
3140591	12/06/2016	08/06/2016	02/12/1992	23	1	0	12/06/2016	Fiebre/disnea	0	21/06/2016 chik negativo / zika positivo. Pte fallece 18/06/2016
3116431	23/05/2016	ingresa por ivu	26/10/1963	52	0	1	23/05/2016	disnea	0	
319291	25/06/2016	inespecif	29/07/1962	53	0	1	0	paresias/artralgias	0	25/06/2016 chik no detectado.
3159001	29/06/2016	hace 1 año	07/01/1964	52	0	1	0	artralgias	0	hace 1 año Chik. (29/06/2016 negativo para chi - Zika- Dengue)
3160301	28/06/2016	20/06/2016	14/07/1956	60	1	0	28/06/2019	paresias MMI	0	ingreso por paresias y debilidad de miembr. Inferiores. conDG Guillan Barre. 30/06/2016 LCR positivo Chik.
3145181	15/06/2016	09/06/2016	30/01/1978	38	0	1	15/06/2016	fiebre/deter. Sens	0	30/06/2016 zika x ARN Positivo/ Dengue x a serot. Negativo/ Chikungunya Positivo. DG Meningoencefalitis + Neurosifilis + status convulsivo. Pte fallece.
2269211	27/06/2016	0	06/09/1978	37	0	1	27/06/2016	cefalea/parestesia	0	ingresa con parestesia en cara y miembros superiores, con DG Sd. Paraneoplasico a dc. 01/07/2016 chik. Positivo. Egres con DG Dermatomiostis + neumopatia intersticial + fibromialgia
3034201	28/07/2016	0	10/10/1972	43	0	1	28/07/2016	artralgias	0	28/07/2016 chik positivo
492971	18/07/2016	hace 1 año	19/10/1962	53	0	1	0	poliartralgias	0	18/07/2016 chik positivo
478331	18/07/2016	hace 1 año	07/05/1952	64	0	1	0	artralgias	0	hace 1 año fiebre chikungunya. 18/07/2016 chik negativo
3176791	17/07/2016	14/06/2016	23/01/1954	62	1	0	14/07/2016	fiebre/ paraplejia	0	ingresa con tos, fiebre, paraplejia. 18/07/2016 dengue 4 genotipos positivo en LCR, CHIK positivo en LCR. Zika negativo( no refiere q sea LCR)
2320701	19/07/2016	15/07/2016	05/02/1990	26	1	0	19/07/2016	fiebre/mialgias	0	21/07/2016 Zika - Chikungunya negativo.
2999103	0	0	13/10/2014	2	1	0	0	0	0	20/07/2016. dengue 4 genotipos negativo.
3053381	05/04/2016	22/03/2016	11/09/1990	25	0	1	05/04/2016	cefalea +fiebre	22/03/2016	Tiene TC de cerebro simple nada importante
2774591	06/04/2016	06/04/2016	23/12/1968	47	1	0	06/04/2016	confusion + fiebre	0	APP: DM" + HTA + artropatia gotosa

3049021	01/04/2016	22/03/2016	13/07/1993	22	1	0	01/04/2016	parestias	22/03/2016	ing. diplopia, parestias de miembros inferiores. <b>Chik posit.</b> Egresada con sd Guillan barre
2769651	0	ene-16	14/05/1952	64	0	1	0/0/0	poliartralgias	0	chik posi. D-Z neg 12/04/2016.
3059691	12/04/2016	11/04/2016	01/07/1940	75	0	1	12/04/2016	poliartralgias	0	chik posi . D y Z neg 12/04/2016. Tuvo fiebre chikungunya el año pasado según medico q la atiende.
2923491	06/06/2016	13/04/2016	12/03/1968	48	0	1	06/06/2016	poliartralgias	0	chik posi 06/06/2016
2913671	08/06/2016	14/04/2016	22/06/1970	45	0	1	08/06/2016	poliartralgias	0	chik negativo.
1909471	0	2015	26/05/1948	67	0	1	0/0/0/	poliartralgias	0	app. <b>Chikungunya hace 1 año.</b> DM II + Hta
11471637	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
1510271	11/06/2015	07/06/2015	10/10/1970	44	1	0	11/06/2016	0	0	Pte con liquen plano eritrodermico. <b>No cuenta con examen chik.</b>
2497761	22/04/2016	18/04/2016	27/08/1967	48	0	1	18/04/2016	poliartralgias	0	<b>chikungunya + Zika positivo 22/04/2016.</b>
3071711	26/04/2016	may-15	07/03/1965	51	0	1	26/04/2016	poliartralgias	0	chik negativo 26/04/2016
3071941	27/04/2016	19/04/2016	10/11/1960	55	0	1	27/04/2016	poliartralgias	0	APP Artritis Reumatoide+HTA
407621	28/04/2016	20/04/2016	03/04/1959	57	0	1	28/04/2016	poliartralgias	0	hta. Chik neg 28/04/2016
171221	14/04/2016	12/04/2016	03/06/1965	50	0	1	14/04/2016	poliartralgias	0	gastritis cronica. D-Chk-Z negativo 26/04/2016.
3078391	24/06/2016	27/06/2016	18/03/1978	38	0	1	24/06/2016	fiebre	27/06/2016	chik negativo 24/06/2016. ingreso edema en cara. App HTA.
1977471	no hay datos	especificos	05/07/1964	51	0	1	0/0/0	0	0	12/05/2016 D-C-Z Negativo.
3080741	11/05/2016	varios datos	01/10/1994	21	1	0	11/05/2016	0	0	app Fiebre Reumatica. Chik negatico 11/05/2016.
2969251	0	05/05/2016	22/10/1959	56	0	1	0/0/0	artralgias	0	Chk y Zica negativo , Denge positivo 06/05/2016
3085321	0	2015 abril	14/07/1966	49	0	1	0/0/0	artralgias	0	29/04/2016 D Z C negativo
2753501	0	19/04/2016	28/03/1967	49	0	1	0/0/0	artralgias	0	05/05/2016 Denge neg., /CH y Z positivo.
1933231	0	chik hace 1 año	15/04/1969	47	0	1	0/0/0	cervicalgia	0	06/05/2016 D-C-Z negativa.
3089101	03/05/2016	30/04/2016	09/10/1999	16	1	0	03/05/2016	cefalea	30/04/2016	No TIENE PEDIDO CHIK. Ing Sd confusional vs Neuroinfeccion
1442551	27/06/2016	hace 3 meses	13/11/1965	50	0	1	27/06/2016	artralgias	0	27/06/2016 Chik negativo
3089791	06/05/2016	años artralg	10/06/1959	56	0	1	0	arteomalgias	0	app Artrosis + DM2. ingresa a control. 06/05/2016 chik negativo
450001	12/05/2016	03/05/2016	09/03/1956	60	0	1	12/05/2016	fiebre	03/05/2016	app: HTA + Chikungunya(no hay resultados positivos de CH)
478291	28/06/2016	hace 8 meses	03/06/1957	58	0	1	28/06/2016	artralgias	0	chikungunya hace 8 meses de su consulta. 28/06/2016 <b>chikungunya positivo</b>
481801	29/06/2016	05/05/2016	15/10/1960	55	0	1	29/06/2016	artralgias	0	app: DM2 + HTA. Chik hace 1 año. 29/06/2016 posi chikungunya.
3090311	16/05/2016	hace 3 meses	13/08/1962	53	0	1	16/05/2016	artralgias	0	hace 3 meses fiebre chik. 16/05/2016 chikungunya positivo.
2968971	12/05/2016	0	12/05/2016	68	0	1	12/05/2016	artralgias	0	12/05/2016 negativo para zik-chik-dengue
2814271	08/07/2016	may-16	08/08/1947	66	0	1	08/07/2016	artralgias	0	artrosis, osteoporosis
1893641	24/05/2016	0	14/04/1941	75	0	1	24/05/2016	artralgias	0	DM2 + HTA . 17/05/2016 positivo chik-Dengue- Zika .
3100451	19/05/2016	hace 1 año	26/10/1979	1	0	1	19/05/2016	poliartralgias	0	hace 1 año la artritis

3075661	22/04/2016	15/04/2016	10/03/1988	28	0	1	22/04/2016	fiebre		APP: Tb pulmonar. Ingres a Glasgow 11/15 0 Ocular: 3, Verbal: 4 Motara: 4
3081181	26/04/2016	25/04/2016	06/05/1951	65	0	1	26/04/2016	insuf. Respiratoria		APP: HTA. DG SHOCK SEPTICO, de foco 0 pulmonar .
3132881	05/06/2016	05/06/2016	16/12/1985	30	1	0	05/06/2016	politrauma por acc		0 ingresa por accidente de transito
3142231	13/06/2016	30/05/2016	28/02/1968	48	1	0	13/06/2016	fiebre	30/06/2016	HIV reactivo +Mening x cripto
3145071	15/06/2016	01/06/2016	12/04/1997	19	1	0	15/06/2016	trauma/ desorient		0 status convulsivo/ alta a peticion
3145181	15/06/2016	10/06/2016	30/01/1978	60	0	1	15/06/2016	cefalea +fiebre		DX DE MENINGOENCEFALITIS POR ZIKA + 0 CHIKUNGUNYA / pte fallece. LCR positivo Zika + Chik 30/06/2016. /zik + Chik 0 12/07/2016.
3182581	22/07/2016	0	05/11/1969	46	1	0	0/0/0		0	0
2592891	12/05/2016	0	01/01/1958	58	0	1	12/05/2016		0	0 Transplante hepatico
1996451	03/08/2016	03/08/2016	27/11/1981	34	1	0	03/08/2016	desorientado		Dx:Síndrome 0 Convulsivante+Neuroinfección+PTT+SDRA/ 0 pte fallece dengue positivo (16/09/2016)APP: Diabetes 0 mellitus, dislipidemia.
465411	15/09/2016	10/06/2016	10/12/1952	63	0	1	16/09/2016	ARTRALGIAS		0
3240861	16/09/2016	09/09/2016	17/02/1950	66	0	1	16/09/2016	FIEBRE/ARTRALGI	09/09/2016	CHIK NEGATIVO (17/09/2016)
3242721	19/09/2016	19/08/2016	30/12/1955	60	1	0	19/09/2016	PARESTESIAS		SD. GUILLAN BARRE. CHIK NEGATIVO 0 20/09/2016 EN LIQUIDO CFR
3241991	19/09/2016	10/09/2016	26/05/1988	28	1	0	29/09/2016	fiebre/astenia	11/09/2016	CHIK NEGATIVO (20/09/2016) hiv POSITIVO
3250321	24/09/2016	20/09/2016	27/02/1975	41	0	1	24/09/2016	CONVULSIONES	20/09/2016	
3247701	22/09/2016	19/09/2016	03/04/1985	31	0	1	22/09/2016	DISNEA		28/09/2016 CHIK NEGATIVO. 28/09/2016 0 DENGUE 4 SER NEGATIVO.
3250621	26/09/2016	25/09/2016	08/08/1983	33	0	1	26/09/2016	CEFALEA	25/09/2016	
3252411	27/09/2016	27/08/2016	25/08/2016	68	0	1	27/09/2016	SINCOPE/FIEBRE	25/08/2016	HIV POSITIVO
897088	28/10/2016	0	04/01/1961	55	0	1	28/01/2016	ARTRALGIAS		0
131661	06/10/2016	05/09/2016	03/04/1956	60	0	1	06/10/2016	FIEBRE/ARTRALGIA	05/09/2016	X RT-PCR ZIKA POSITIVO/CHIK NEGATIVO/ DENGUE IGM-IGG NEGATIVO
157711	19/10/2016	1AÑO	15/02/1968	48	0	1	19/10/2016	ARTRALGIAS		CHIK NEGATIVO 19/10/2016 (POSTCHIK 2015 0 CONTROLDE ARTRITIS POSINFECCION)
3270841	14/10/2016	09/10/2016	01/02/1960	56	0	1	14/10/2016	CEFALEA		PTE INGRESO CON 0 CONVULSIONES,INTUBADA Y FALLECIO. 21/10/2016 CHIK X PCR NEGATIVO Y DENGUE 0 4 SEROTIPOS NEGATIVO
3264901	09/10/2016	08/09/2016	23/08/1969	47	0	1	09/10/2016	DESORIENTACION		0 HIV REACTIVO
3273691	18/10/2016	15/10/2016	27/03/1976	40	0	1	18/10/2016	CEFALEA		APP: TRASPLANTE RENAL
2263871	24/10/2016	23/10/2016	17/08/1980	36	0	1	24/10/2016	FIEBRE	23/10/2016	DG ENCEFALITIS AUTOINMUNE/ 0 ZIKA X PCR POSITIVO ORINA/ PTE SEPTICO
3285021	29/10/2016	24/10/2016	28/12/1978	39	1	0	29/10/2016	CEFALEA/IRRITABL	14/10/2016	FALLECIO
3307771	03/12/2016	03/12/2016	03/04/1954	62	1	0	03/12/2016	FIEBRE	03/10/2016	ZIKA X PCR POSITIVO
3314261	04/12/2016	01/12/2016	27/08/1997	19	1	0	04/12/2016	FIEBRE/CEFALEA	01/12/2016	FALLECIO
1628191	11/12/2016	02/12/2016	03/12/1967	49	1	0	11/12/2016	FIEBRE/IRRITABLE	02/12/2016	ZIKA X PCR POSITIVO
779261	06/01/2017	1AÑO	01/05/1977	38	0	1	06/01/2017	ARTRALGIAS		ZIKA PCR EN LCR/ DG MTB MENINGEA 0 CHIK EL AÑO PASADO AHORA ARTRALGIAS
3345631	07/01/2017	01/01/2016	19/10/1998	18	1	0	07/01/2017	FIEBRE	01/01/2017	DENGUE IGM POSI/ ZIKA POSITIVO X PRC 10/01/2017

H.C.	DENV	CHIKV	ZIKA	DENG/CHIKV	DENG/ZIKA	CHIKV/ZIKA	DCZ	NEGATIVO	CP				
									DENGUE	IC	ZIKA	CHIKV	
2474241	0	0	0	0	0	0	0	1		40,03			
20809141	0	0	0	0	0	0	0	1		33,72			
2927761	0	0	0	0	0	0	0	1		36,2			
2734451	0	0	0	0	0	0	0	1		31,6			
2941571	0	0	0	0	0	0	0	1		36,56			
2941601	0	0	0	0	0	0	0	1		40,18			
945351	0	0	0	0	0	0	0	1		38,7			
1019041	0	0	0	0	0	0	0	1		16,05			
1845711	0	0	0	0	0	0	0	1		35,18			
2939761	0	0	0	0	0	1	0	0		36,1	30,93	30,52	
1943761	0	1	0	0	0	1	0	0		38,75	37,18	37,76	
2987781	0	1	0	0	0	0	0	0		38,75	0	37,76	
2994151	0	1	0	0	0	0	0	0		36,54		36,8	
2979061	0	1	0	0	0	0	0	0		36,54		36,8	
2430041	0	1	0	0	0	0	0	0		37,58		25,15	
2982441	0	1	0	0	0	0	0	0		31,6		14,32	
3014221	0	1	0	0	0	0	0	0		31,6		24,32	
10614766	0	0	0	0	0	0	0	1		32,15			
3006541	0	0	0	0	0	1	0	0		34,28	37,57	37,17	
2971401	0	1	0	0	0	0	0	0		14,1		32,54	
206611	0	1	0	0	0	0	0	0		14,1		32,54	
2841321	0	0	0	0	0	1	0	0		31,99	33,82	33,5	
3029321	0	0	0	0	0	0	1	0		36,92	34,67	35,42	35,76

3049021	0	1	0	0	0	0	0	0		35,6		36,15
2769651	0	1	0	0	0	0	0	0		35,6		36,15
3059691	0	1	0	0	0	0	0	0		34,96		36,29
2923491	0	1	0	0	0	0	0	0		34,5		36,9
2913671	0	0	0	0	0	0	0	1		35,92		
1909471	0	0	0	0	0	0	0	1		37,07		
11471637	0	0	0	0	0	0	0	1		30,58		
1510271	0	0	0	0	0	0	0	1		31,85		
2497761	0	0	0	0	0	1	0	0		32,99	35,71	34,88
3071711	0	0	0	0	0	0	0	1		36,57		
3071941	0	0	0	0	0	0	0	1		37,03		
407621	0	0	0	0	0	0	0	1		34,8		
171221	0	0	0	0	0	0	0	1		36,92		
3078391	0	0	0	0	0	0	0	1		36,71		
1977471	0	0	0	0	0	0	0	1		37,02		
3080741	0	0	0	0	0	0	0	1		35,75		
2969251	1	0	0	0	0	0	0	0	40	35,77		
3085321	0	0	0	0	0	0	0	1		36,09		
2753501	0	0	0	0	0	1	0	0		34,1	40	40
1933231	0	0	0	0	0	0	0	1		33,69		
3089101	0	0	0	0	0	0	0	1		36,66		
1442551	0	0	0	0	0	0	0	1		36,66		
3089791	0	0	0	0	0	0	0	1		37,65		
450001	0	0	0	0	0	0	0	1		34,43		
478291	0	0	0	0	0	0	0	1		35,6		
481801	0	0	1	0	0	0	0	0		37,36	38,69	
3090311	1	0	0	0	0	0	0	0	40	35,77		
2968971	0	0	0	0	0	0	0	1		31,71		
2814271	1	0	0	0	0	0	0	0	40	28,21		
1893641	0	0	0	0	0	0	1	0	34,13	22,5	36,99	32,79
3100451	1	0	0	0	0	0	0	0	36,36	35,66		

3115471	0	0	0	0	0	0	1	0	37,2	33,31	36,22	37,09
3021071	0	0	0	0	0	1	0	0		35,5	37,67	38,17
3067741	0	0	0	0	0	0	1	0	39,09	32,52	37,89	37,03
2789491	0	0	0	0	0	0	0	1		34,11		
176071	0	1	0	0	0	0	0	0		31,8		38,99
853601	0	1	0	0	0	0	0	0		34,02		36,96
3139671	0	1	0	0	0	0	0	0		30,75		35,55
348351	0	0	0	0	0	0	0	1		38,08		
3145741	0	0	0	0	0	0	0	1		37,3		
3140591	0	0	1	0	0	0	0	0		28,32	37,63	
3116431	0	0	0	0	0	0	0	1		34,46		
319291	0	0	0	0	0	0	0	1		35,31		
3159001	0	0	0	0	0	0	0	1		34,15		
3160301	0	0	0	0	0	0	1	0	37,09	31,98	36,45	35,85
3145181	0	0	0	0	0	1	0	0		29,05	36,98	40
2269211	0	0	0	0	0	1	0	0		35,47	36,59	36,61
3034201	0	0	0	0	0	0	0	1		36,15		
492971	0	1	0	0	0	0	0	0		33,18		33,97
478331	0	0	0	0	0	0	0	1		35,83		
3176791	0	0	0	0	0	0	1	0	34,03	31,2	32,99	34,09
2320701	0	0	0	0	0	0	0	1		31,2		
2999103	0	0	0	0	0	0	1	0		33,48		
	0	0	0	0	0	0	1	0	35,67	31,87	35,33	35,21
3053381	0	0	0	0	0	1	0	0		33,49	33,84	33,03
2774591	0	0	0	0	0	1	0	0		33,49	33,84	33,03

3075661	0	0	0	0	0	0	0	1		35,03		
3081181	1	0	0	0	0	0	0	0	35,32	37,3		
3132881	0	0	0	1	0	0	0	0	39,15	36,64	39,83	
3142231	0	0	0	0	0	0	0	1		36,76		
3145071	0	0	0	0	0	0	0	0		29,05		40
3145181	0	0	0	0	0	0	0	1		36,79		
3182581	0	0	0	0	0	0	1	0	37,7	33,99	36,74	36,74
2592891	0	0	0	0	0	0	0	1		40		
1996451	0	0	0	0	0	0	0	1		30,1		
465411	0	0	0	0	0	0	0	1		36,75		
3240861	0	0	0	0	0	0	0	1		33,2		
3242721	0	0	0	0	0	0	0	1		32,56		
3241991	0	0	0	0	0	0	0	1		33,95		
3250321	0	0	0	0	0	0	0	1		36,2		
3247701	0	0	0	0	0	0	0	1		31,87		
3250621	0	0	0	0	0	0	1	0	35,67	34,1	35,33	35,21
3252411	0	0	0	0	0	0	0	1		32,15		
897088	0	0	0	0	0	0	0	1		36,2		
131661	0	0	1	0	0	0	0	0		33,52	35,1	
157711	0	0	0	0	0	0	0	1		39,4		
3270841	0	0	0	0	0	0	0	1		32,57		
3264901	0	0	0	0	0	0	0	1		35,11		
32733691	0	0	0	0	0	0	0	1		32,22		
2263871	0	0	0	0	0	0	0	1		35,58		
3285021	0	0	0	0	0	0	0	1		30,92		
3307771	0	0	0	0	0	0	0	1		36,58		
3314261	0	0	0	0	0	1	0	0	37,58	32,14	32,15	
1628191	0	0	1	0	0	0	0	0		30,24	32,14	
779261	0	0	0	0	0	0	0	1		31,25		
3345631	0	0	1	0	0	0	0	0		32,48	35,14	

## Anexo 2. Análisis de muestras en el equipo Cobas Z 480



## Anexo 3. Preparación de Muestras

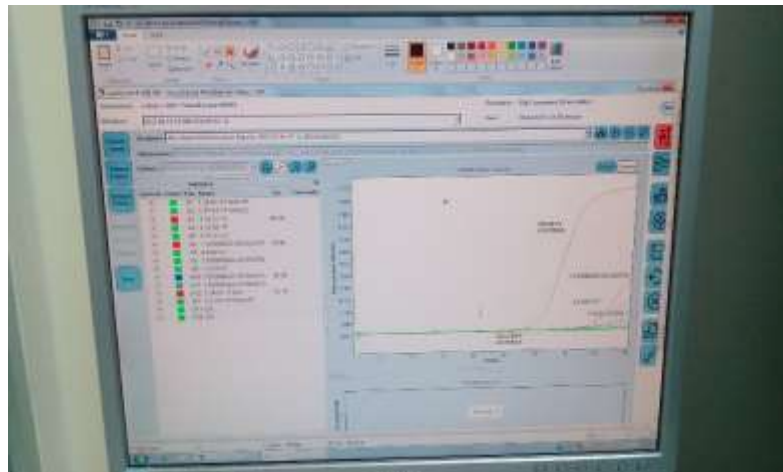




Anexo 4. Reactivos empleados para la utilización de extracción y amplificación de muestras



Anexo 5. Procesamiento de muestras y lectura de resultados



Anexo 6. Cebadores y sondas incluidos en el ensayo ZCD

Primers and probe	Sequence (5' → 3')	Concentration†	Location‡
<b>Zika virus</b>			
Forward	CAGCTGGCATCATGAAGAAAYC	300nM	7332–7352
Reverse 1	CACTTGTCCCATCTTCTTCTCC	300nM	7411–7432
Reverse 2	CACCTGTCCCATCTTTTCTCC	300nM	7411–7432
Probe§	CYGTTGTGGATGGAATAGTGG	100nM	7355–7373
<b>CHIKV</b>			
Forward	CATCTGCACYCAAGTGTACCA	300nM	2578–2598
Reverse	GCGCATTTTGCCTTCGTAATG	300nM	2654–2674
Probe§	GCGGTGTACACTGCCTGTGACYGC	100nM	2614–2637
<b>DENV</b>			
-1, -2, -3 Forward	CAGATCTCTGATGAACAACCAACG	350nM	86–109
-2 Forward C→T	CAGATCTCTGATGAATAACCAACG	350nM	87–110
-3 Forward C→T	CAGATTTCTGATGAACAACCAACG	300nM	85–108
-4 Forward	GATCTCTGGAAAAATGAAC	450nM	81–99
-1, 3 Reverse	TTTGAGAATCTCTTCGCCAAC	300nM	179–199, 178–197†
-2 Reverse	AGTTGACACGCGGTTTCTCT	350nM	152–171
-2 Reverse A→G	AGTCGACACGCGGTTTCTCT	350nM	152–171
-4 Reverse	AGAATCTCTTCACCAACC	450nM	173–190
Probe A	CTCGCGGTTTCAGCATAT	100nM	136–154
Probe B	CTCTCGGTTTCAGCATAT	100nM	137–155
Probe C	CTCTCAGTTTCAGCATATTG	100nM	135–155
Probe D	CTCAGCGTTCAGCATAT	100nM	135–153