

Diagnóstico por laboratorio para la enfermedad por el virus del Zika

Este documento está dirigido a aquellos laboratorios que cuentan con capacidad instalada para la detección (molecular, antigénica y/o serológica) de Dengue (DENV), Zika (ZIKV) y Chikungunya (CHIKV), y como parte del diagnóstico diferencial para Arbovirus. Para la manipulación de muestras sospechosas, se requiere un nivel de contención BSL2.

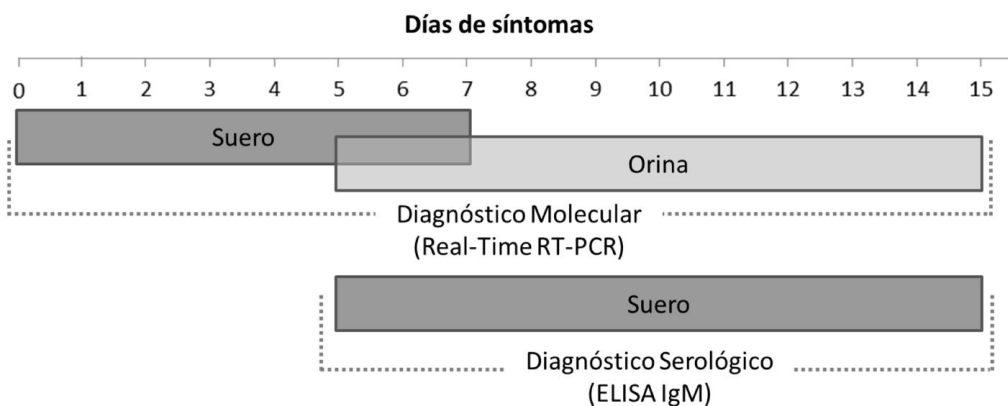
Diagnóstico virológico de la infección por ZIKV

Detección molecular (Algoritmos A y B)

Tipo de muestra: suero u orina.

Si bien el periodo de viremia aún no ha sido plenamente establecido, el virus ha sido detectado en suero con mayor frecuencia hasta el día 5 tras iniciados los síntomas y en algunos casos hasta el día 7. Por otro lado, en algunos casos registrados en las Américas se ha podido detectar RNA viral en orina hasta 15 días después de iniciado los síntomas. Esto es consistente con la detección de altas cargas virales en orina durante un tiempo prolongado de la fase aguda. Por todo esto y para aumentar la sensibilidad del diagnóstico, se recomienda tomar muestra de suero en conjunto con orina (máximo hasta el día 15) para ser procesadas por RT-PCR o por serología, teniendo en cuenta la dinámica de infección indicada en la figura 1

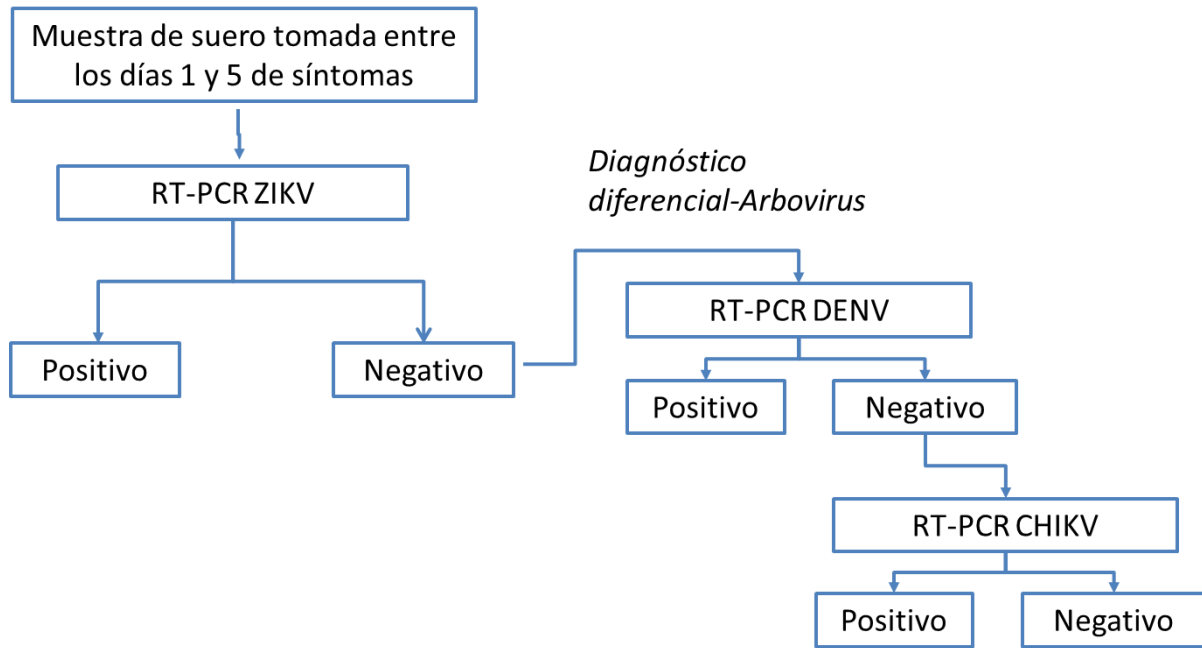
Figura 1. Indicaciones para el diagnóstico según día de inicio de síntomas



En una gran proporción de casos los síntomas iniciales pueden pasar desapercibidos o los pacientes consultar tardíamente con lo cual disminuye la oportunidad para la toma de la muestra.

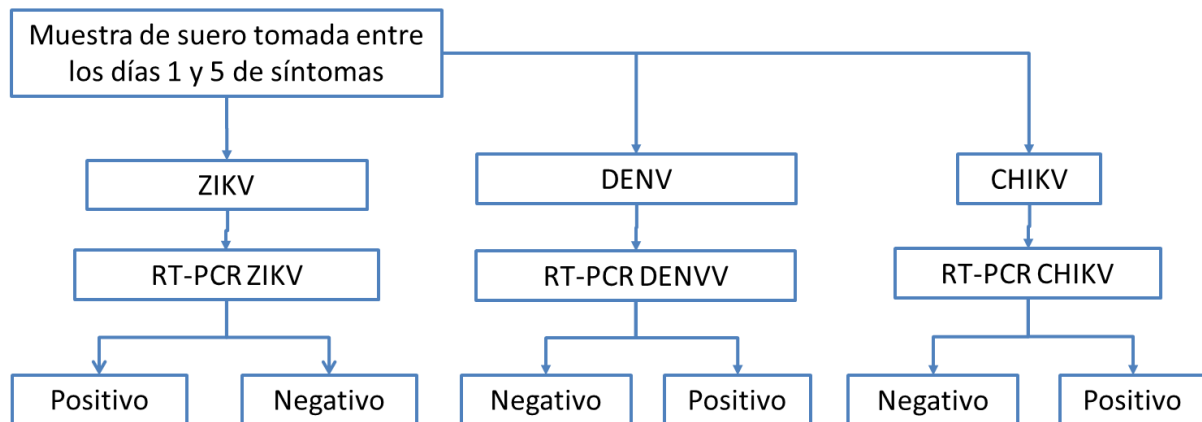
Algoritmo A

Confirmación virológica de casos sospechosos de infección por ZIKV en áreas donde circulan otros arbovirus



Algoritmo B

Confirmación virológica de casos sospechosos de infección por ZIKV en áreas donde circulan otros arbovirus (PCR múltiplex).



Diagnóstico serológico de la infección por ZIKV

(Algoritmo C)

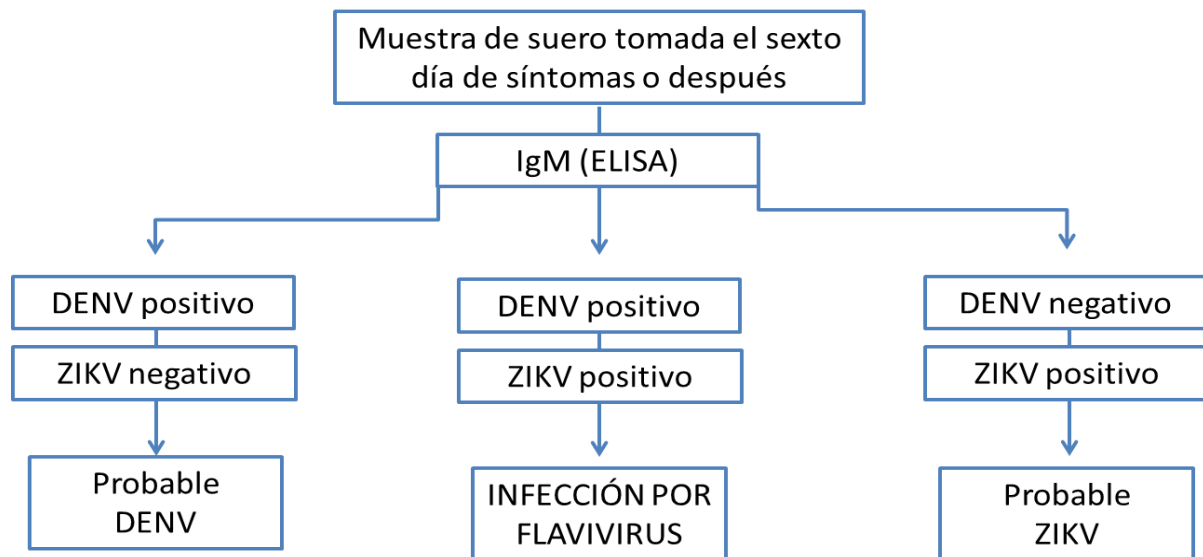
Tipo de muestra: suero

Para el diagnóstico serológico se recomiendan la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos IgM específicos contra ZIKV a partir del día 6 de iniciados los síntomas. El diagnóstico a partir de una única muestra de suero en fase aguda es presuntivo, por lo que se recomienda la toma de una segunda muestra, una a dos semanas después de la primera muestra para demostrar seroconversión (negativo a positivo) o incremento hasta cuatro veces del título de anticuerpos (con una prueba cuantitativa).

Si bien la técnica de neutralización por reducción de placas (PRNT), ofrece una mayor especificidad para detección de anticuerpos neutralizantes (IgG), se ha documentado la reacción cruzada con otros flavivirus especialmente dengue, fiebre amarilla y fiebre del Nilo Occidental. Además, el ensayo de PRNT es relativamente complejo y demanda mucho tiempo. Hasta el momento no existen estuches comerciales (validados formalmente) para determinación de ZIKV por PRNT, por lo cual la obtención de reactivos es muy limitada.

Algoritmo C

Detección serológica en casos sospechoso de infección por ZIKV
en áreas donde circulan otros arbovirus



Los resultados de técnicas serológicas deben ser cuidadosamente interpretados y los reactivos optimizados para casos específicos, y no para vigilancia de rutina o desarrollo de encuestas serológicas.

Interpretación de los resultados obtenidos por serología

En infecciones primarias (primera infección con un flavivirus) se ha demostrado que los anticuerpos no presentan reacción cruzada con otros virus genéticamente relacionados. Sin embargo, en sueros de individuos con historia previa de infección por otros flavivirus (especialmente dengue, fiebre amarilla y virus del Nilo Occidental) pueden presentar reacción cruzada en estos ensayos. Esto aplica tanto a la detección de IgM por ELISA como por la técnica de anticuerpos neutralizantes por PRNT.

En estos casos los criterios clínicos y epidemiológicos son fundamentales para la interpretación de los resultados. Por ejemplo, en un caso de SGB con resultado positivo a infección por flavivirus (DENV y ZIKV positivo) debería tenerse en cuenta la infrecuente presentación del SGB posterior a una infección por dengue, apuntado en este caso a infección por ZIKV.

Sin embargo, en casos donde ZIKV constituye la primera infección por flavivirus, (por ejemplo recién nacidos o en áreas donde no se ha descrito la circulación de dengue u otros flavivirus) de IgM (ELISA) o de anticuerpos neutralizantes (PRNT), es específica y sugestiva de infección reciente por ZIKV.

Conservación de las muestras

- Mantener refrigerada (4 °C – 8 °C) si será procesada (o enviada a un laboratorio de referencia) dentro de 48 horas
- Mantener congelada (-10 °C a -20 °C) si será procesada después de las primeras 48 horas o durante un periodo no mayor de 7 días.
- Mantener congelada (-20 a -70 °C) si será procesada después de una semana. La muestra se conserva adecuadamente durante periodos prolongados de tiempo.

Envío de las muestras por vía aérea al laboratorio de referencia

- Se debe garantizar la cadena de frío de las muestras. Enviar (en lo posible) con hielo seco o como mínimo con geles refrigerantes. Utilizar siempre triple empaque.
- Enviar durante las primeras 48 horas.
- Las muestras originales deben ser empacadas, marcadas etiquetadas (si se utiliza hielo seco) y documentadas como categoría B.
- Enviar siempre la ficha clínica y epidemiológica completa.

Diagnóstico por laboratorio de ZIKV asociado a Guillain-Barré y otras complicaciones neurológicas

EL diagnóstico de ZIKV asociado al SGB y otras complicaciones neurológicas, puede realizarse de acuerdo a los criterios descritos previamente para la infección viral en fase aguda o convaleciente.

Si bien se puede intentar la detección viral en suero mediante la técnica de RT-PCR, normalmente la sospecha de un síndrome neurológico ocurre fuera del período de viremia; en estos casos, se recomienda intentar la detección molecular en una muestra de orina. Asimismo y durante la fase convaleciente, se recomienda realizar la detección de anticuerpos IgM en muestra de suero mediante la técnica de ELISA.

Por otro lado, una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) recolectada bajo una indicación médica para el diagnóstico del síndrome neurológico, puede utilizarse para análisis virológico (RT-PCR) y detección de anticuerpos IgM (ELISA) contra el virus del Zika .

*Ver tablas 1 y 2 para muestras recomendadas.

Diagnóstico por laboratorio de ZIKV asociado a síndrome congénito

El diagnóstico de infección por ZIKV en mujeres embarazadas puede ser realizado según los criterios descritos previamente y según la fase de la infección. Sin embargo y ya que la infección vertical ha sido descrita para ZIKV, es importante realizar un seguimiento estricto tanto a la madre como al recién nacido.

Por otro lado, una muestra de líquido amniótico recolectada bajo una indicación médica para el diagnóstico de otros síndromes, puede utilizarse para detección molecular por PCR.

*Ver tablas 1 y 2 para muestras recomendadas.

Diagnóstico por laboratorio de ZIKV asociado a mortinatos indicativos de infección congénita

En casos de aborto espontáneo y mortinatos, se debe asegurar una muestra de suero (si es posible) para detección de anticuerpos IgM (ELISA) y en cualquier caso garantizar una muestra de tejido (cerebro, riñón, hígado, o diferentes cortes de tejido indiferenciado). Asimismo, se recomienda analizar en paralelo muestras de suero de la madre para determinación de anticuerpos IgM.

Por otro lado, y si se dispone de una muestra de líquido amniótico (recolectada bajo una indicación médica para el diagnóstico de otros síndromes) esta puede ser utilizada para detección molecular por PCR.

*Ver tablas 1 y 2 para muestras recomendadas.

Diagnóstico por laboratorio de ZIKV asociado a microcefalia

Ya que la infección vertical ha sido descrita para ZIKV, es importante realizar un seguimiento estricto tanto a la madre como al recién nacido.

Así, se ha demostrado que durante una infección intrauterina por ZIKV, el material genético viral puede ser detectado por un periodo de tiempo prolongado mediante técnicas moleculares. Por esta razón, se recomienda intentar la detección en suero tanto del recién nacido como de la madre ó en cordón umbilical. Asimismo y dado que la baja posibilidad de una infección previa con flavivirus, la detección de anticuerpos IgM contra ZIKV en suero del recién nacido (en ausencia de IgM para otros flavivirus) constituye un hallazgo importante que demuestra infección intrauterina del feto.

*Ver tablas 1 y 2 para muestras recomendadas.

Tabla 1. Muestras recomendadas, días tras inicio de síntomas y ensayos de laboratorio indicados para la detección del virus.

Muestra	Días tras inicio de síntomas	Cantidad	Medio de transporte	Condiciones de transporte	Conservación >1 semana	Ensayo de laboratorio
Suero	1 a 5	5-7 mL	Sin aditivos	4 / 8 oC	-20 /-70 oC	PCR
Suero	5 a 7	5-7 mL	Sin aditivos	4 / 8 oC	-20 /-70 oC	PCR, ELISA IgM
Suero	7 en adelante	0,5-1mL	Sin aditivos	4 / 8 oC*	-20 /-70 oC	ELISA IgM
Orina	5 a 15	5-7 mL	Sin aditivos	4 / 8 oC	-20 /-70 oC	PCR
LCR**		0,5 mL	Sin aditivos	4 / 8 oC	-20 /-70 oC	PCR, ELISA IgM

* La refrigeración de la orina resulta crítica para evitar sobrecrecimiento bacteriano

** Bajo indicación médica para diagnóstico de enfermedad neurológica

Tabla 2. Otras muestras recomendadas, condiciones de conservación y transporte, y ensayos de laboratorio indicados para la detección del virus.

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

*Temperatura ambiente

** Bajo indicación médica por sospecha de síndrome neurológico

***Casos fatales: Cerebro, hígado, riñón, producto de aborto, otros

Comentarios y recomendaciones adicionales

- Existen diferentes protocolos (iniciadores y sondas) para la detección de ZIKV por RT-PCR (tanto convencional como tiempo real). Teniendo en cuenta la sensibilidad, se recomiendan los protocolos utilizados por el centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Estos protocolos deben ser estandarizados para su uso diagnóstico a nivel local. Recomendaciones adicionales serán entregadas una vez se caractericen los primeros casos.
- La determinación de IgM puede hacerse por diferentes técnicas (ELISA o IF). Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con estuches comerciales (avalados o validados) para determinación serológica de ZIKV. En cualquier caso, la mejor sensibilidad está dada en aquellas plataformas *in house* que utilizan como antígeno el virus completo: sin embargo, aquellas que utilizan proteínas (o péptidos) recombinantes generalmente brindan mayor especificidad.
- El aislamiento viral no se considera como una técnica diagnóstico, y se recomienda únicamente para ensayos de investigación complementarios a la vigilancia en salud pública.
- Los laboratorios que no cuentan con la capacidad para confirmación virológica (RT-PCR, aislamiento viral, secuenciación) o serológica (PRNT), deberán enviar las muestras a un laboratorio de referencia o centro colaborador de la Organización Mundial de la Salud. Antes de realizar cualquier envío, por favor comunicarse con las personas de contacto en cada centro y con la oficina de la Organización Panamericana de la Salud en Washington DC.

Contactos

Centro Colaborador de OMS:

National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Division of Vector-Borne Diseases, Arboviral Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

CDC/DVBD/ADB
3156 Rampart Road
Fort Collins, CO 80521
Tel. +1 970-221-6400
United States of America

Organización Panamericana de la Salud, Oficina Regional de OMS (OPS/OMS)

Enfermedades Transmisibles y Análisis en Salud (CHA)
Alerta y Respuesta a Epidemias, Reglamento Sanitario Internacional (IR)
epidemics@paho.org
Washington D.C.
USA

Referencias:

- Organización Panamericana de la Salud. Guía para la vigilancia de la enfermedad por el virus del Zika y sus complicaciones. Washington, DC: OPS, 2016.
- Gourinat A, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(1):84-86.
- Lanciotti R, Kosoy O, Laven J, Velez J, Lambert A, Johnson A et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232-1239.
- Hayes E. Zika Virus Outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1347-1350.
- Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *Journal of clinical microbiology.* 2000 May 1;38(5):1823-6.
- Hunsperger E, Yoksan S, Buchy P, Nguyen V, Sekaran S, Enria D et al. Evaluation of Commercially Available Anti-Dengue Virus Immunoglobulin M Tests. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):436-440.