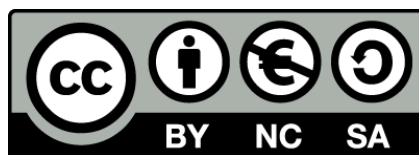




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Diagnóstico y vigilancia de las infecciones por arbovirus

Izaskun Alejo Cancho



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari

ISGlobal Instituto de
Salud Global
Barcelona

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Departament de Fonaments Clínics

Programa de Doctorat de Medicina i Recerca Translacional

DIAGNÓSTICO Y VIGILANCIA DE LAS INFECCIONES POR ARBOVIRUS

Memòria de tesi doctoral presentada per **Izaskun Alejo Cancho** per optar al grau
de doctora per la Universitat de Barcelona.

Dirigida per **Miguel Julián Martínez Yoldi**

Universitat de Barcelona – Hospital Clínic de Barcelona – Institut de Salut Global de Barcelona

Barcelona, Noviembre de 2020



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari

ISGlobal Instituto de
Salud Global
Barcelona

El Dr. MIGUEL JULIÁN MARTÍNEZ YOLDI, Profesor Asociado Médico del Departamento de Fundamentos Clínicos de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona, Consultor-1 del Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona e Investigador Asociado del Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal)

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “Diagnóstico y vigilancia de las infecciones causadas por arbovirus”, presentado por IZASKUN ALEJO CANCHO, se ha llevado a cabo en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona, bajo su dirección y supervisión y que cumple todo los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa frente al Tribunal correspondiente.

Barcelona, Noviembre de 2020,

Dr. Miguel Julián Martínez Yoldi

Director de la tesis doctoral

Izaskun Alejo Cancho

Doctoranda

AGRADECIMIENTOS

A ama y aita, por dármele todo y por enseñarme que puedo hacer todo lo que me proponga.

A Juan, por animarme a abandonar todo cuando se tuerce (nada mejor para que me obceque en acabarlo).

A mi family, que me apoya en cada uno de mis proyectos descabellados (sabéis que no puedo mencionaros uno a uno o la tesis ocuparía el doble de espacio).

A mi Kuadrilla, Capicúa, Ada, Laura, tato, Enara, Irene, Malen... por aguantar disertaciones lastimeras a cualquier hora intempestiva.

A toda la familia del Clínic, de la que tanto he aprendido y que convirtió Barcelona en un segundo hogar al que siempre tengo ganas de volver.

A Mikel, por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo sobre un tema que ya de R1 me cautivó.

Guztioi bihotz bihotzez, mila esker

諦めるより怖いことなどないのだから・浜崎あゆみ・

Porque no hay nada que de más miedo que rendirse. (Ayumi Hamasaki)



ÍNDICE



ÍNDICE

TABLA DE ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN.....	21
INTRODUCCIÓN.....	27
ARBOVIRUS.....	29
DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN	29
EPIDEMIOLOGÍA.....	32
CLÍNICA.....	40
VIRUS DENGUE.....	42
VIROLOGÍA	42
PATOGENESIS.....	43
EPIDEMIOLOGÍA.....	44
TRANSMISIÓN	46
CLÍNICA.....	48
DIAGNÓSTICO	52
TRATAMIENTO	59
PREVENCIÓN.....	60
VIRUS CHIKUNGUNYA	61
VIROLOGÍA	61
PATOGENESIS.....	61
EPIDEMIOLOGÍA.....	62
TRANSMISIÓN	65
CLÍNICA.....	66
DIAGNÓSTICO	68

TRATAMIENTO	71
PREVENCIÓN.....	71
VIRUS ZIKA.....	73
VIROLOGÍA	73
PATOGENESIS.....	73
EPIDEMIOLOGÍA.....	74
TRANSMISIÓN	76
CLÍNICA.....	78
DIAGNÓSTICO	79
TRATAMIENTO	82
PREVENCIÓN.....	83
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	84
CLÍNICA.....	84
PARÁMETROS ANALÍTICOS.....	85
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO.....	86
SITUACIÓN EN NUESTRO MEDIO.....	89
VECTORES	89
RIESGO DE CASOS AUTÓCTONOS.....	91
PREVENCIÓN Y CONTROL	94
ARTÍCULO 1	97
<u>HIPÓTESIS.....</u>	<u>113</u>
<u>OBJETIVOS</u>	<u>117</u>
<u>MATERIAL Y MÉTODOS Y RESULTADOS</u>	<u>121</u>
OBJETIVO 1:.....	125
ARTÍCULO 2	127
ARTÍCULO 3.....	133

OBJETIVO 2:	139
ARTÍCULO 4	141
OBJETIVO 3:	147
ARTÍCULO 5	149
OBJETIVO 4:	157
ARTÍCULO 6	159
OBJETIVO 5:	173
RESULTADOS ADICIONALES 1	175
RESULTADOS ADICIONALES 2	189
RESULTADOS ADICIONALES 3	211
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>227</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>245</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>249</u>
<u>ANEXO</u>	<u>273</u>
ANEXO 1	275



TABLA DE ABREVIATURAS



TABLA DE ABREVIATURAS

ADE	Antibody dependent enhancement, potenciación dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
C	Proteína de la cápside
CDC	Centers for Disease Control and Prevention, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
CLIA	Chemiluminescent immunoassay, inmuno-ensayo quimioluminiscente
E	Proteína de envoltura
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control, Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
ECSA	Linaje Este/Centro/Sur Africano (virus chikungunya)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ICT	Inmunocromatografía
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IMA	Immuno-magnetic agglutination, aglutinación inmuno-magnética
IOL	Indian Ocean Lineage, linaje del océano Índico (virus chikungunya)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Proteína de membrana

NGS	Next Generation Sequencing, secuenciación de nueva generación
NS	Non-structural protein, proteína no estructural (virus dengue y Zika)
nsP	Non-structural protein, proteína no estructural (virus chikungunya)
OMS	Organización Mundial de la Salud
prM	Proteína premembrana
PRTN	Plaque reduction neutralizing test, ensayo de reducción de la neutralización en placa
RT-PCR	reverse transcriptase - polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
TAN	Título de anticuerpos neutralizantes
VCHIK	Virus chikungunya
VDEN	Virus dengue
VDEN-1	Virus dengue serotipo 1
VDEN-2	Virus dengue serotipo 2
VDEN-3	Virus dengue serotipo 3
VDEN-4	Virus dengue serotipo 4
VFA	Virus de la fiebre amarilla
VMAY	Virus mayaro
VNO	Virus del Nilo Occidental
VONN	Virus o'nyong-nyong
VRR	Virus Ross River
VZIK	Virus Zika
WNV	West Nile Virus, virus del Nilo Occidental

ARTÍCULOS QUE COMPONEN LA TESIS

Tesis en formato de compendio de artículos. La tesis consta de 5 objetivos y 6 artículos.

Introducción: Artículo 1

- Autores:
 - **Izaskun Alejo-Cancho**, Miguel J. Martínez Yoldi, María Velasco Arribas y Grupo de Trabajo de Enfermedades Emergentes de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI)
- Título:
 - Arbovirosis emergentes y reemergentes: dengue, chikungunya, Zika y fiebre del Nilo Occidental. Revisión de su distribución geográfica, mecanismos de transmisión y diagnóstico.
- Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:
 - Revista de Enfermedades Emergentes, 19 (1): 19-32, 2020
- Factor de impacto:
 - Revista no indexada
- Cuartil:
 - Revista no indexada

Objetivo 1: Artículo 2

- Autores:
 - **Izaskun Alejo-Cancho**, Nuria Torner, Inés Oliveira, Ana Martínez, José Muñoz, Mireia Jane, Joaquim Gascón, Ana Requena-Méndez, Anna Vilella, M^a Ángeles Marcos, María Jesús Pinazo, Verónica Gonzalo, Natalia Rodríguez, Miguel J Martínez
- Título:
 - Twenty-four cases of imported Zika virus infections diagnosed by molecular methods
- Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:
 - Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases, 86 (2): 160-162, Octubre 2016

- Factor de impacto:
 - 2,401
- Cuartil:
 - Journal Citation reports (JCR): Q3
 - Scimago Journal Rank: Q1
- Doi:
 - 10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.016

Objetivo 1: Artículo 3

- Autores:
 - Inés Oliveira Souto, **Izaskun Alejo-Cancho**, Joaquim Gascón Brustenga, Aida Peiró Mestres, Jose Muñoz Gutiérrez, Miguel J. Martínez Yoldi
- Título:
 - Persistence of Zika virus in semen 93 days after the onset of symptoms
- Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:
 - Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 36 (1): 21-23, Enero 2018
- Factor de impacto:
 - 1,685
- Cuartil:
 - Journal Citation reports (JCR): Q3
 - Scimago Journal Rank: Q3
- Doi:
 - 10.1016/j.eimc.2016.10.009

Objetivo 2: Artículo 4

- Autores:
 - Elena Sulleiro, Ariadna Rando*, **Izaskun Alejo***, Anna Suy, Anna Gonce, Carlota Rodó, Nuria Torner, Azucena Bardají, Victoria Fumadó, Antoni Soriano-Arandes, José Muñoz, Ana Martínez, Mireia Jané, Elena Marbán-Castro, M Paz Sánchez-Seco, Ana Vázquez, Fernando De Ory, Tomás Pumarola, Miguel J Martínez
- *: contribuyeron por igual en este trabajo

- Título:
 - Screening for Zika virus infection in 1057 potentially exposed pregnant women, Catalonia (northeastern Spain)
- Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:
 - Travel Medicine and Infectious Disease, 29: 69-71 Mayo-Junio 2019
- Factor de impacto:
 - 4,868
- Cuartil:
 - Journal Citation reports (JCR): Q1
 - Scimago Journal Rank: Q1
- Doi:
 - 10.1016/j.tmaid.2019.03.006

Objetivo 3: Artículo 5

- Autores:
 - Elisa Rubio, **Izaskun Alejo-Cancho**, Cristian Aylagas, Daniel Camprubí, Roser Ferré, M. Rosa Albarracín, Verónica Gonzalo, Josep Barrachina, Miriam José Álvarez-Martínez, María Eugenia Valls, Jordi Mas, Jordi Vila, Irene Losada, Miguel J. Martínez, Climent Casals-Pascual
- Título:
 - Diagnostic value of platelet and leukocyte counts in the differential diagnosis of fever in the returning traveler
- Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:
 - American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 100 (2): 470-475, Febrero 2019
- Factor de impacto:
 - 2,315
- Cuartil:
 - Journal Citation reports (JCR): Q2
 - Scimago Journal Rank: Q1
- Doi:
 - 10.4269/ajtmh.18-0736

Objetivo 4: Artículo 6

- Autores:
 - **Izaskun Alejo-Cancho**, Jessica Navero-Castillejos, Aida Peiró-Mestres, Rosa Albarracín, Josep Barrachina, Alexander Navarro, Verónica Gonzalo, Víctor Pastor, José Muñoz, Miguel J Martínez
- Título:
 - Evaluation of a novel microfluidic immuno-magnetic agglutination assay method for detection of dengue virus NS1 antigen
- Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:
 - PLOS Neglected Tropical Diseases, 14 (2), Febrero 2020
- Factor de impacto:
 - 4,487
- Cuartil:
 - Journal Citation reports (JCR): Q1
 - Scimago Journal Rank: Q1
- Doi:
 - 10.1371/journal.pntd.0008082

El objetivo 5 se completó con resultados adicionales no publicados.



RESUMEN



RESUMEN

TÍTULO: Diagnóstico y Vigilancia de las Infecciones por Arbovirus.

INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son un grupo heterogéneo de virus transmitidos por vectores artrópodos. Entre ellos destacan los virus dengue (VDEN), chikungunya (VCHIK) y Zika (VZIK), que presentan similitudes en cuanto a su distribución geográfica, vectores transmisores y cuadro clínico que ocasionan. Existe un alto riesgo de emergencia y re-emergencia de los mismos debido, entre otros, al gran número de viajeros entre zonas endémicas y no endémicas y a la expansión de diferentes vectores. Unas técnicas diagnósticas fiables y rápidas son de vital importancia para hacer frente a este riesgo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Una evaluación rigurosa de diferentes métodos diagnósticos y de la cinética de los marcadores de infección permitirá la creación de algoritmos diagnósticos que mejoren el diagnóstico de las arbovirosis. La revisión de los resultados obtenidos por los protocolos vigentes permitirá estimar el riesgo de infección y afectación fetal por VZIK en embarazadas.

Los objetivos de este trabajo son: estudiar la cinética de la infección por VZIK, evaluar el cribado serológico de VZIK llevado a cabo en embarazadas en Cataluña, analizar la utilidad de los parámetros analíticos para orientar el diagnóstico del síndrome febril en viajeros, evaluar el rendimiento de un nuevo ensayo de inmuno-aglutinación magnética (IMA) para detectar antígeno NS1 de VDEN e investigar la utilidad de otras técnicas serológicas para el diagnóstico de las infecciones por VDEN, VCHIK y VZIK.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudió la presencia de VZIK en muestras de suero y orina de 24 pacientes con infección por VZIK mediante RT-PCR en tiempo real. Se investigó la presencia de VZIK en semen en un paciente mediante métodos moleculares y cultivo celular utilizando muestras seriadas. Se evaluaron los resultados del cribado de VZIK y el impacto sobre el embarazo en 1.057 gestantes cribadas para VZIK en Cataluña en 2016. Se estudiaron los valores de plaquetas y leucocitos en 1.218 viajeros provenientes del trópico para determinar la utilidad de la plaquetopenia y leucopenia en el diagnóstico de malaria y arbovirosis. Se estudió el rendimiento diagnóstico de un método de IMA para detectar antígeno NS1 de VDEN en un panel de 135 muestras que incluía los cuatro serotipos de VDEN, y se comparó con las técnicas de ELISA e inmunocromatografía (ICT). También se exploró la utilidad diagnóstica de un test rápido de dengue, de un ELISA basado en la proteína NS1 de VZIK para detectar anticuerpos y de un ensayo de inmunoblot para diferenciar infecciones por VDEN, VZIK y VCHIK, comparando los resultados con los de las técnicas diagnósticas de rutina.

RESULTADOS PRINCIPALES

Se detectó la presencia del VZIK por RT-PCR en tiempo real en muestras de suero y orina fuera de los períodos considerados óptimos en aquel momento por las recomendaciones de organismos internacionales.

Se detectó la presencia de ARN de VZIK en semen 93 días desde el inicio de los síntomas, sin poder aislar el virus en cultivo celular.

Los datos del cribado serológico de VZIK de 1.057 embarazadas en Cataluña mostraron un 13,4% de gestantes con alguna evidencia serológica de infección por VZIK, siendo la prevalencia de efectos fetales adversos (aborto o microcefalia) del 3,1%.

La leucopenia ($<4 \times 10^9$ leucocitos/L) y la trombocitopenia ($<150 \times 10^9$ plaquetas/L) mostraron un valor predictivo negativo del 98,1% para el diagnóstico de arbovirosis y malaria respectivamente, en viajeros con síndrome febril a la vuelta de un viaje al trópico.

El ensayo de IMA para detectar NS1 de VDEN mostró una elevada sensibilidad (91,9%) y especificidad (98,4%), comparables a la técnica de ELISA pero obteniendo los resultados de forma tan rápida como una ICT.

El test rápido para VDEN basado en ICT mostró una buena sensibilidad (89,3%) para la detección de IgM frente al virus.

La técnica de ELISA para la detección de IgG utilizando como antígeno NS1 de VZIK mostró una sensibilidad del 92,9% y una especificidad del 87,0% comparándola con el ensayo de microneutralización.

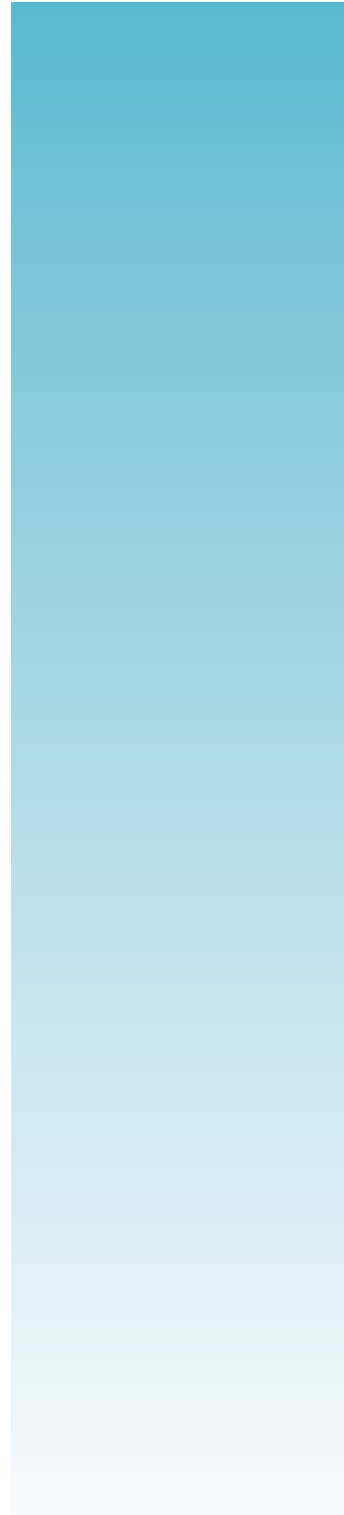
El ensayo basado en inmunoblot mostró una baja sensibilidad ($<40\%$) para la detección de IgM frente a VDEN, VZIK y VCHIK.

CONCLUSIONES

El testado simultáneo de suero y orina mediante métodos moleculares aumenta el rendimiento diagnóstico para la detección de infecciones por VZIK. El VZIK puede persistir en semen durante periodos prolongados de tiempo. La frecuencia de desenlaces adversos por VZIK en embarazadas atendidas en Cataluña fue similar a la descrita en la literatura en algunas zonas endémicas. Los valores de leucocitos y plaquetas pueden ayudar en el despistaje clínico inicial de pacientes con fiebre a la vuelta de un viaje al trópico. El ensayo de IMA es una herramienta útil para el diagnóstico rápido de dengue agudo. La evaluación de nuevas técnicas diagnósticas para arbovirosis es necesaria para determinar su utilidad a fin de intentar solucionar las limitaciones del diagnóstico serológico.



INTRODUCCIÓN



ARBOVIRUS

DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

El término arbovirus deriva de la frase “ARthropod-BORne virus” (virus transmitido por artrópodos) y es un término ecológico que hace referencia a un grupo heterogéneo de virus que se caracterizan por ser transmitidos por vectores artrópodos (fundamentalmente mosquitos, garrapatas y moscas de la arena). No son un grupo filogenético, sino una serie de virus pertenecientes a distintas familias que comparten la forma de transmisión. Al menos 8 familias diferentes engloban los 14 géneros dentro de los cuales se han descrito especies de arbovirus. Estas familias son: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae* y *Asfarviridae*, siendo las tres primeras las más relevantes a nivel clínico. En total se han descrito más de 500 arbovirus, de los cuales cerca de 150 son capaces de causar infección en el ser humano (1). La Tabla 1 muestra un resumen de los arbovirus más importantes causantes de enfermedad en el ser humano.

Familia	Género	Virus	Vector	Cuadro clínico	Distribución geográfica
Togaviridae	Alphavirus	Chikungunya	M	FAR	CSA, A, SEA
		Ross River	M	FAR	Aus
		Mayaro	M	FAR	CSA
		O'nyong-nyong	M	FAR	A
		Sindbis	M	FAR	E, A, As
		Encefalitis	M	N	NA, CSA

		equina del Este			
		Encefalitis equina del Oeste	M	N	NA, CSA
		Encefalitis equina venezolana	M	N	NA, CSA
		Dengue	M	FAR, H, N	CSA, A, As, SEA
		Fiebre amarilla	M	H	CSA, A
Flaviviridae	Flavivirus	Encefalitis japonesa	M	N	SEA
		Fiebre del Nilo Occidental	M	FAR, N	NA, CSA, E, A, SEA, Aus
		Zika	M	FAR, N	CSA, A, SEA
		Encefalitis del Valle Murray	M	N	Aus
		Encefalitis de St Louis	M	N	NA
		Fiebre del bosque Kyasanur	G	H	As
		Fiebre hemorrágica	G	H	As

		de Omsk			
		Encefalitis transmitida por garrapatas	G	N	E, As
		Powassan	G	N	NA, As
Bunyaviridae	Nairovirus	Fiebre hemorrágica Crimea-Congo	G	H	A, As, E
	Orthobunya virus	Encefalitis de La Crosse	M	N	NA
		Oropouche	M	FAR, H, N	CSA
	Phlebovirus	Heartland	G	FAR	NA
		Fiebre del valle Rift	M	H	A
		Toscana	MA	FAR,N	E, A

Tabla 1. Características de los principales arbovirus causantes de enfermedad en humanos. Vector: M (mosquito), G (garrapata), MA (mosca de la arena). Cuadro clínico: FAR (fiebre-artralgia-rash), N (neurológico), H (hemorrágico); Distribución geográfica: E (Europa), NA (Norteamérica), CSA (Centro y Sudamérica), A (África), As (Asía), SEA (Sudeste Asiático), Aus (Australia).

La definición original del término arbovirus hace referencia únicamente a virus que se transmiten entre huéspedes vertebrados empleando para ello vectores hematófagos. Se han descrito otros virus en los que este ciclo puede observarse pero no es necesario para su subsistencia, pudiendo prescindir de él. Son ejemplos de éstos el virus Gamboa o el virus de la estomatitis vesicular Indiana (2). Otro grupo de virus de reciente descripción

son los virus “insecto-específicos”, que están genéticamente relacionados con los arbovirus pero que sólo se han detectado en artrópodos, sin haber podido probarse su capacidad de replicación en células de vertebrados. Se desconoce si estos virus podrían evolucionar hasta convertirse en nuevos patógenos emergentes, o si pueden afectar a la capacidad vectorial de los artrópodos, ya que se han detectado de forma simultánea a arbovirus patógenos en algunos insectos (3). Es un nuevo campo que requiere una mayor investigación y en el que nuevos descubrimientos podrían cambiar la clasificación y definición actuales del término arbovirus.

La clasificación completa de los arbovirus conocidos hasta la fecha puede consultarse en el Catálogo Internacional de Arbovirus (The International Catalog of Arboviruses <https://wwwn.cdc.gov/Arbocat/Default.aspx>).

EPIDEMIOLOGÍA

CICLOS DE TRANSMISIÓN

Todos los arbovirus conocidos hasta el momento son patógenos zoonóticos: se transmiten a los humanos desde sus huéspedes animales. Son virus que requieren unos complejos ciclos de transmisión en los que participan huéspedes vertebrados (frecuentemente aves y roedores) y artrópodos vectores. Los virus se multiplican en el vector sin causar infección y se transmiten a su hospedador vertebrado cuando el vector se alimenta del mismo; en este hospedador el virus se multiplica (hospedador amplificador) causando infección y, durante el periodo en el que el virus se mantiene en sangre (periodo virémico), puede ser ingerido por un nuevo vector que se alimente de este hospedador, cerrando así el ciclo (4).

Habitualmente estos ciclos tienen lugar en zonas selváticas, entre vectores y huéspedes vertebrados salvajes (ciclo selvático o enzoótico) (Figura 1). La proximidad de los vectores y huéspedes habituales a núcleos urbanos permite la interacción con el ser

humano o animales domésticos, dando lugar al establecimiento de ciclos rurales o epizoóticos. Generalmente estos ciclos no suelen contribuir al ciclo de transmisión, ya que el virus no se replica de forma efectiva en los nuevos huéspedes y estos son un callejón sin salida para la transmisión del virus, siendo lo que se conoce como huéspedes terminales. No obstante, hay varios virus que se han adaptado al ser humano y que pueden transmitirse de forma estable entre vectores y seres humanos, sin requerir otros huéspedes amplificadores. Estos ciclos reciben el nombre de ciclos urbanos y se han descrito, por ejemplo, en el caso de virus dengue (VDEN), virus de la fiebre amarilla (VFA), virus Zika (VZIK), virus Chikungunya (VCHIK) y virus Ross River (VRR) entre otros (5).

Habitualmente en los ciclos enzoóticos o selváticos los huéspedes son asintomáticos o presentan una clínica muy leve. En los ciclos rurales o epizoóticos el patógeno afecta a animales que no están habitualmente expuestos, por lo que pueden dar lugar fácilmente a epidemias y causar una gran morbilidad y mortalidad.



Figura 1. Esquema de los diferentes ciclos de transmisión en los arbovirus (Imagen creada con BioRender (<https://biorender.com>)).

EMERGENCIA Y RE-EMERGENCIA DE LOS ARBOVIRUS

Las enfermedades causadas por arbovirus se conocen desde hace siglos, si bien no fue hasta 1927 cuando se aisló el primer arbovirus: el virus de la fiebre amarilla (VFA) (6). Durante los siguientes años, debido principalmente a los numerosos estudios financiados por la Fundación Rockefeller, se describieron la gran mayoría de arbovirus que se conocen actualmente (7). A partir de los años 70 la investigación de campo sobre arbovirus disminuyó. No obstante, en los últimos años las nuevas tecnologías de secuenciación masiva o Next Generation Sequencing (NGS) han propiciado la descripción de multitud de nuevos virus. Sin embargo, la falta de aislamiento de los mismos hace que aún se conozca poco sobre su ecología, ciclo y huéspedes implicados (7), así como su importancia en salud pública.

Los arbovirus son una importante causa de enfermedad a nivel mundial. En general, presentan una distribución global, siendo mayor el número de virus en las regiones tropicales y subtropicales debido, entre otros factores, a la abundancia de vectores competentes en las mismas. Cada virus tiene, a su vez, una distribución geográfica específica delimitada principalmente por la distribución de los vectores y huéspedes necesarios para mantener su ciclo primario. Los factores que influyen en estas distribuciones son, entre otros, temperatura, precipitaciones y otros factores ecológicos que afectan a los requerimientos de supervivencia de los vectores y huéspedes principales.

En los últimos años del siglo XX se observó un repunte de las enfermedades causadas por arbovirus que se mantiene en la actualidad. Algunas de estas enfermedades son debidas a virus recientemente descubiertos, como por ejemplo el virus del bosque de Barmah en Australia. Sin embargo, el mayor problema deriva de la reaparición y aumento de casos de enfermedades que se creían previamente controladas, como son el dengue, la fiebre amarilla y la fiebre del Nilo Occidental. La Tabla 2 muestra un resumen de los virus que han emergido o re-emergido recientemente dando lugar a diferentes epidemias en distintas regiones del mundo.

Familia	Virus/enfermedad
Flaviviridae	Dengue
	Zika
	Fiebre amarilla
	Fiebre del Nilo Occidental
	Encefalitis japonesa
	Enfermedad del bosque Kyasanur
Togaviridae	Chikungunya
	Mayaro
	Encefalitis equina de Venezuela
	Ross River
	Barmah Forest
Bunyaviridae	Fiebre del Valle del Rift
	Oropouche
	Encefalitis de California
	Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo
	Virus del síndrome febril severo y trombocitopenia

Tabla 2. Arbovirus de las tres familias principales causantes de enfermedad en humanos que han emergido o re-emergido en los últimos años. Tabla adaptada de (1) y (8).

Factores de riesgo para la emergencia y re-emergencia de arbovirus

Los complejos ciclos de los arbovirus pueden verse alterados por múltiples factores. Cambios en el ambiente, el clima, los huéspedes, los vectores e incluso en el propio virus tienen impacto en los ciclos y pueden acarrear cambios en la epidemiología de estas enfermedades (Figura 2). Los diferentes factores no actúan de manera aislada, ya que están íntimamente relacionados entre sí y cambios en alguno de ellos pueden

desencadenar modificaciones en otras variables del ciclo. No obstante, con el objetivo de simplificar el estudio de estos factores que afectan a la emergencia y re-emergencia de los arbovirus, los agruparemos en aquellos asociados al clima y el medioambiente, los asociados al ser humano, los asociados a los vectores y los asociados al propio virus.

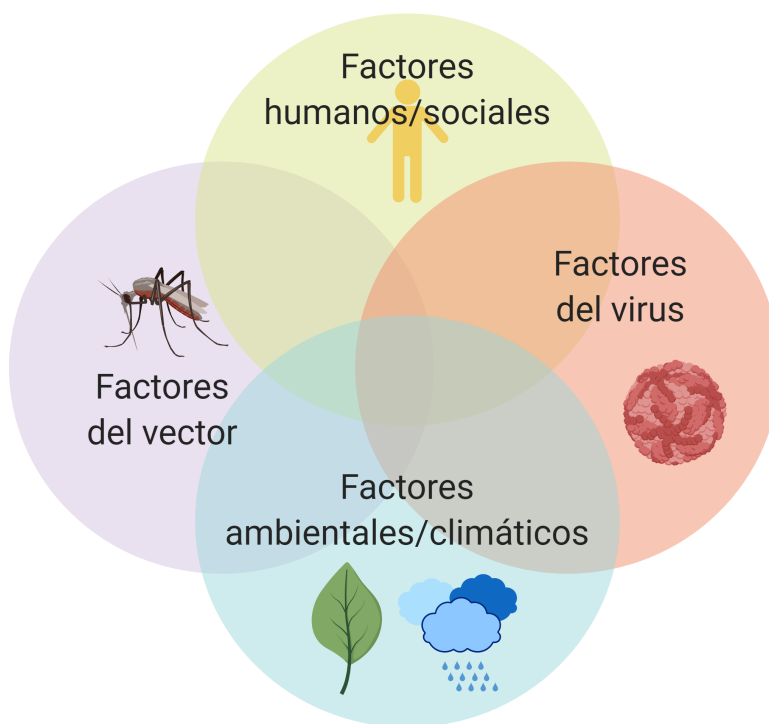


Figura 2. Esquema de las interacciones entre los diferentes factores asociados a la emergencia de los arbovirus. Adaptado de (5) (Imagen creada con BioRender (<https://biorender.com>)).

Factores humanos y sociales

El último informe demográfico de las Naciones Unidas realizado en 2017 cifraba la población mundial en 7.550 millones de personas. Esto supone un gran aumento desde la primera estimación que realizó esta entidad en 1950, cuando se calculaba una población de aproximadamente 2.600 millones de personas (<https://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html>). El aumento de población es más acusado en las regiones tropicales, que también son las regiones donde más frecuentes son las infecciones por arbovirus (<https://population.un.org/wpp/Maps/>).

Esto supone un aumento de huéspedes susceptibles en las zonas que hoy en día se consideran de especial riesgo.

Además, el aumento de la población afecta a la organización sociocultural y a las políticas de urbanización. Cada vez un mayor número de personas vive en las grandes urbes y el crecimiento de estas tiene un fuerte impacto en el medioambiente. El cambio de usos de la tierra para destinarla a cultivos y construcción y la deforestación asociada a estas políticas han provocado que el contacto entre el ser humano y el patógeno sea cada vez más frecuente, aumentando así el riesgo de transmisión.

Otro factor a tener en consideración es el constante movimiento en el que se encuentra la población mundial. Los desplazamientos son hoy en día más rápidos y asequibles, lo cual incrementa el número de personas que realiza viajes y la probabilidad de que algunos se desplacen desde zonas endémicas durante el periodo de incubación de alguna arbovirosis (9). No se deben obviar tampoco aquellos desplazamientos derivados de conflictos armados o desastres naturales, donde una gran parte de la población se desplaza de forma simultánea y acaba hacinada en lugares donde las condiciones sanitarias son muy deficientes, dificultando el control y prevención de las enfermedades.

Factores ambientales y ecológicos

Los cambios de usos de la tierra tienen un gran impacto en el medioambiente. Estos cambios alteran los ecosistemas naturales, favoreciendo la introducción de nuevas especies o el aumento de algunas ya existentes. Por ejemplo, la urbanización en zonas que previamente eran selváticas puede poner en contacto al ser humano con vectores selváticos transmisores de arbovirosis (9). El aumento de zonas urbanas propicia también la adaptación de los mosquitos a la cría en recipientes artificiales, frente a aquellos lugares de cría que emplean en ecosistemas naturales.

Aunque el cambio climático se ha postulado como un factor de gran importancia en la emergencia y re-emergencia de las arbovirosis, su papel genera controversia. Los

primeros estudios predecían un aumento de las infecciones debido al aumento de la temperatura global, que aumentaría las zonas óptimas para el desarrollo de los vectores. A pesar de ser esto así, el cambio climático es un proceso complejo en el que no se puede tener en cuenta únicamente el factor “temperatura”. Para comprender bien su alcance y realizar previsiones realistas habría que conocer bien como afectan todas sus variables a la transmisión de las diferentes enfermedades. En general, el impacto global que tendrá sobre las arbovirosis es difícil de medir, pero parece ser que, por el momento, el impacto del cambio climático en la transmisión de las arbovirosis es menor que el causado por otros factores, que a su vez tienen un impacto directo en el propio cambio climático (deforestación, desplazamientos, cambios en el uso de la tierra...) (9). El cambio climático ilustra una vez más como los factores se entrelazan, al tratarse de un factor ambiental causado por la acción del ser humano.

Factores del vector

Uno de los factores de mayor importancia en la expansión de los arbovirus es la expansión de los vectores competentes. Esta expansión está muy ligada a la actividad humana, ya que los mosquitos se han transportado a lugares lejanos de su hábitat habitual siguiendo rutas de transporte marítimo, aéreo o por carretera. Si en el lugar de llegada se cumplen los requisitos necesarios para su desarrollo, el vector se puede afincar e ir aumentando su área de actuación. Un claro ejemplo es la gran expansión en las últimas décadas de *Aedes albopictus* (10), un vector de origen asiático que ha colonizado gran parte de la cuenca mediterránea y cuya presencia ha permitido la transmisión autóctona de diferentes arbovirus en lugares donde hasta el momento no se habían descrito (11).

Factores del virus

Los arbovirus presentan una gran capacidad de adaptación a los vectores y a sus huéspedes vertebrados (12). A pesar de su diferente taxonomía, los arbovirus poseen

ciertas características en común, como es su genoma ARN (excepto en el caso de los Asfarvirus, que son virus ADN) (13), lo cual hace que los virus suelen estar formados por diversas poblaciones o quasi especies, debido a los errores que se comenten durante el proceso de replicación. Esto les permite adaptarse con rapidez a las características cambiantes del ambiente, del huésped y del vector. Como hemos visto, los arbovirus se caracterizan por un ciclo complejo en el cual son necesarios un vector artrópodo y un huésped vertebrado, por lo que la diversidad de los virus se verá limitada por la capacidad de replicarse y transmitirse tanto en el huésped como en el vector, seleccionando únicamente aquellas mutaciones que no afecten negativamente a estos pasos. Por el contrario, los cambios que generen una ventaja pueden tener un gran impacto en la epidemiología de estos virus. Un ejemplo podría ser el observado con el virus del Nilo Occidental (VNO o West Nile Virus, WNV) en Estados Unidos, donde la aparición de la cepa WNV02 desplazó a la cepa WNV-NY99, ya que la nueva cepa mostraba un menor tiempo de incubación extrínseco (14). Otro ejemplo sería el VCHIK, en el que mutaciones en las proteínas E1 y E2 mostraron una mayor infectividad y diseminación en el vector *Aedes albopictus*, favoreciendo así la transmisión por este vector (15)(16).

La actual emergencia y re-emergencia de los arbovirus depende, como se ha visto hasta ahora, de múltiples factores, algunos de ellos posiblemente desconocidos aún, por lo que realizar predicciones sobre las futuras epidemias de arbovirosis es un trabajo complejo, ya que no es posible tener todas las variables en consideración. Debido a la dificultad de predecir la aparición de nuevos riesgos y la expansión de los ya existentes, es necesario contar con programas de control que permitan detectar de forma rápida los nuevos casos para tratar de frenar los posibles brotes que se den en un futuro.

CLÍNICA

Los cuadros clínicos causados por arbovirus se han agrupado clásicamente en tres síndromes clínicos: síndrome de fiebre-artralgia-rash, síndrome de fiebre hemorrágica y síndrome neurológico (Figura 3) (17).

La mayoría de infecciones cursan con cuadros febriles inespecíficos. Además, el mismo virus puede dar lugar a diferentes síndromes en diferentes pacientes, y diferentes virus pueden dar lugar a cuadros clínicos muy similares. Por todo ello, es difícil realizar un diagnóstico etiológico basado en la clínica, más aún en regiones donde circulan de forma simultánea diferentes arbovirus. Además, los cuadros inespecíficos que presentan habitualmente los arbovirus (fiebre, malestar, cefalea, mialgias...) pueden ser iguales a los que presentan las infecciones causadas por otros patógenos como malaria, leptospira, etc.

En un gran número de casos las infecciones por arbovirus son asintomáticas, aspecto importante a tener en cuenta en un contexto epidémico, donde la incidencia puede ser mucho más elevada de lo que parece si sólo se tiene en cuenta el número de pacientes sintomáticos. Tener este dato presente es vital a la hora de desarrollar estrategias de control de la infección y de salud pública.

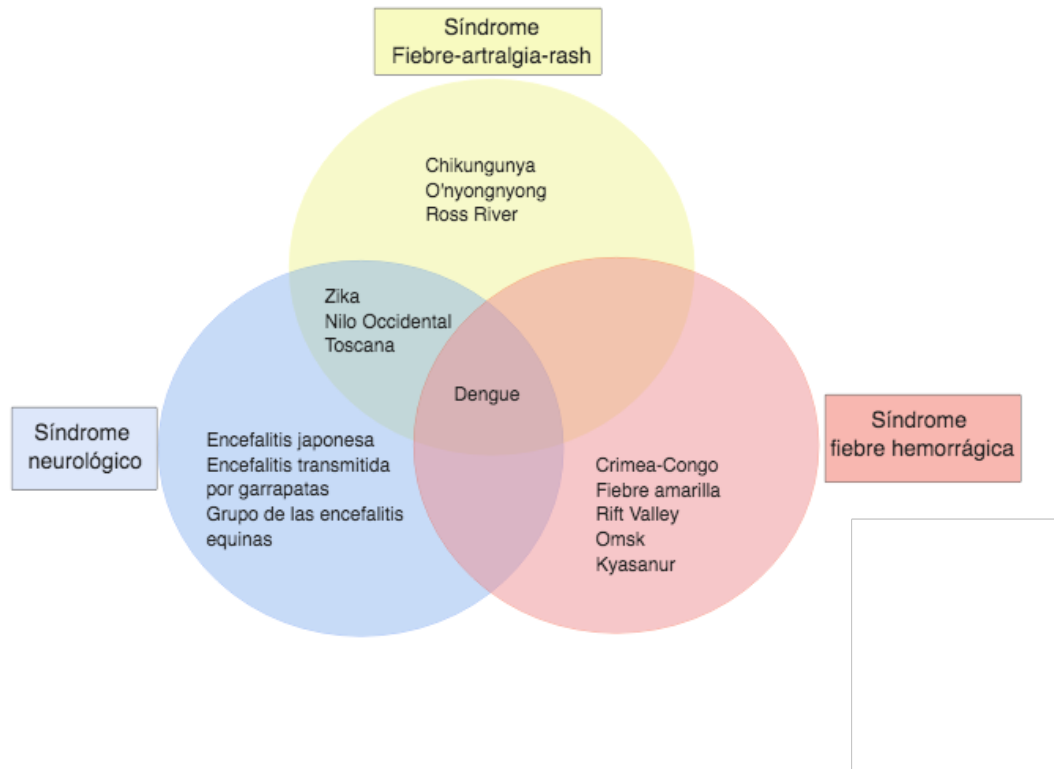


Figura 3. Agrupación de los arbovirus basados en el síndrome clínico principal que causan, adaptado de (17).

En el caso de pacientes embarazadas hay que tener presente que la infección por arbovirus presenta unos riesgos adicionales como son la transmisión del virus al feto antes, durante o después del parto (pudiendo provocar alteraciones o muerte del feto o una infección grave en el recién nacido) o un cuadro más severo en la mujer gestante (18).

Tal y como se ha visto hasta el momento, los arbovirus son unos patógenos en expansión y un gran número de virus podrían emerger o re-emerger en un futuro cercano. Este trabajo se centra en especial en tres arbovirus que, por su prevalencia y emergencia/re-emergencia recientes, son de especial interés en nuestro trabajo diario: virus dengue, virus chikungunya y virus Zika.

VIRUS DENGUE

VIROLOGÍA

El virus dengue (VDEN) pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Es un virus icosaédrico, envuelto y con genoma ARN de polaridad positiva. El genoma se compone de una hebra simple de ARN de aproximadamente 11kb con un único marco de lectura abierta que codifica 10 proteínas: 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales (Figura 4). Las proteínas estructurales son la proteína premembrana (prM), membrana (M), envoltura (E) y cápside (C). Las proteínas no estructurales (non-structural, NS) son las siguientes: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. Estas últimas juegan un papel en la replicación viral y en el empaquetamiento de las partículas virales (19).

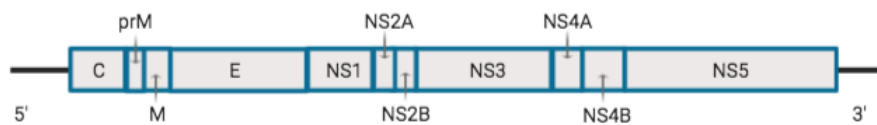


Figura 4. Esquema del genoma del VDEN que incluye las proteínas estructurales (C: cápside, pr: premembrana, M: membrana y E: envoltura) y las proteínas no estructurales (non-structural NS, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5).

Se han descrito cuatro serotipos de VDEN diferentes: VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4. En 2013 se sugirió la existencia de un quinto serotipo, VDEN-5, en muestras de suero de una epidemia ocurrida en Malasia en 2007 (20), si bien este hallazgo no ha sido suficientemente confirmado. Los cuatro serotipos de dengue son relativamente diferentes genéticamente (60-75% de aminoácidos similares). Los virus del mismo serotipo difieren aproximadamente en un 3% a nivel de aminoácidos y en un 6% a nivel de nucleótidos, y se subdividen a su vez en diferentes genotipos y cepas (21).

PATOGÉNESIS

La infección por VDEN comienza cuando el mosquito inocula el virus al alimentarse del huésped. El VDEN infecta células de la dermis y la epidermis como macrófagos, células dendríticas y células de Langerhans. Las células infectadas migran a los nódulos linfáticos, desde donde se inicia una fase de viremia mediante la cual se disemina la infección por todo el organismo (22).

La respuesta del organismo frente al virus depende de múltiples factores y se basa en el equilibrio que se establezca entre factores del huésped (genéticos e inmunológicos) y del virus (21). La primera respuesta frente al virus parte de la respuesta inmune innata, tras el reconocimiento del virus por los receptores Toll-like que inducen una respuesta de interferón α/β . Esta respuesta es capaz de inhibir la infección por VDEN, por lo que el virus ha desarrollado estrategias para frenar dicha respuesta (21). La infección por VDEN también provoca la activación de las células CD8+, que producen una gran cantidad de citocinas pro-inflamatorias, aumentando los niveles de interleucinas y produciendo lo que se conoce como “tormenta de citocinas” en los casos de dengue grave. El sistema del complemento, que se activa ante la presencia de la proteína NS1, juega un rol importante en la patogénesis, ya que puede desencadenar la extravasación de plasma que se observa en los casos graves y contribuye además a la tormenta de citocinas ya mencionada.

El sistema inmune también se encarga de fabricar anticuerpos frente al virus. Tras la primera infección se generan anticuerpos específicos frente al serotipo causante de la infección que parecen aportar protección de por vida frente a dicho serotipo (21). Durante un periodo de tiempo breve estos anticuerpos podrían proteger frente al resto de serotipos. No obstante, estos anticuerpos serotipo-específicos podrían desencadenar una potenciación inmunitaria frente a una segunda infección por un serotipo diferente (antibody-dependent enhancement, ADE por sus siglas en inglés) (23). En este fenómeno los anticuerpos pre-existentes de la infección anterior no sólo no neutralizan al serotipo infectante sino que facilitan la infección de macrófagos, lo que resulta en una replicación

viral aumentada y una mayor carga viral. No obstante, la potenciación mediada por anticuerpos no parece explicar por completo el desarrollo de los cuadros graves de dengue, ya que éstos pueden ocurrir también en infecciones primarias (en las que no existen anticuerpos previos).

EPIDEMIOLOGÍA

Los diferentes serotipos de VDEN evolucionaron de un ancestro común y dieron lugar a los cuatro virus conocidos hoy en día. Los diferentes serotipos se mantenían en ciclos selváticos entre mosquitos y primates no humanos y posteriormente fueron dando el salto a los ciclos urbanos (24). La presencia de ciclos enzoóticos bien establecidos de los cuatro serotipos en el Sudeste Asiático hace pensar que el virus pudo originarse allí (25). El mosquito *Aedes albopictus* podría haber sido el vector causante de los casos humanos inicialmente, dado que era el vector presente en aquella región geográfica (26). Posteriormente *Aedes aegypti*, que presumiblemente llegó a Asia desde África mediante las rutas de comercio naval, se convirtió en el principal vector de la enfermedad (27). En los siglos XVIII y XIX los barcos de esclavos transportaron el vector *Ae. aegypti* expandiéndolo por diferentes regiones tropicales causando los primeros brotes por VDEN y estableciendo la enfermedad en todas las regiones tropicales. En los siglos XX y XXI la globalización ha acelerado la expansión y ha propiciado la introducción de nuevos serotipos en diferentes regiones, haciendo que las regiones se vuelvan hiperendémicas (regiones en las que diferentes serotipos circulan de forma simultánea).

No se conoce con exactitud el origen del término dengue. Una teoría es que deriva de la expresión swahili “ki-dinga pepo”, cuya traducción sería “calambre causado por un mal espíritu”. Sin embargo el uso del término en brotes previos en Cuba no descarta que el origen de la palabra sea alguna expresión latina (28). El estudio retrospectivo de los brotes descritos como “dengue” o “ki-dinga pepo” ha mostrado que, probablemente, las

infecciones por VCHIK y VDEN se han confundido a lo largo de los siglos y que la diferente terminología ha contribuido a aumentar aún más la confusión entre los diferentes cuadros clínicos y brotes registrados (29)(30).

Hoy en día, el VDEN es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más prevalente a nivel global. Se estima que ocurren 390 millones de infecciones por VDEN al año, 96 millones de las cuales producen enfermedad clínica (hasta un 75% de las infecciones son asintomáticas). Esto supone un número de casos 30 veces superior al que se observaba hace 50 años (31). El virus circula por aproximadamente 125 países de zonas tropicales, poniendo a 3.600 millones de personas en riesgo, es decir, a la mitad de la población mundial. Su distribución abarca países del Sudeste Asiático, Centro y Sudamérica, Pacífico occidental, África y el este del Mediterráneo (Figura 5) (32).

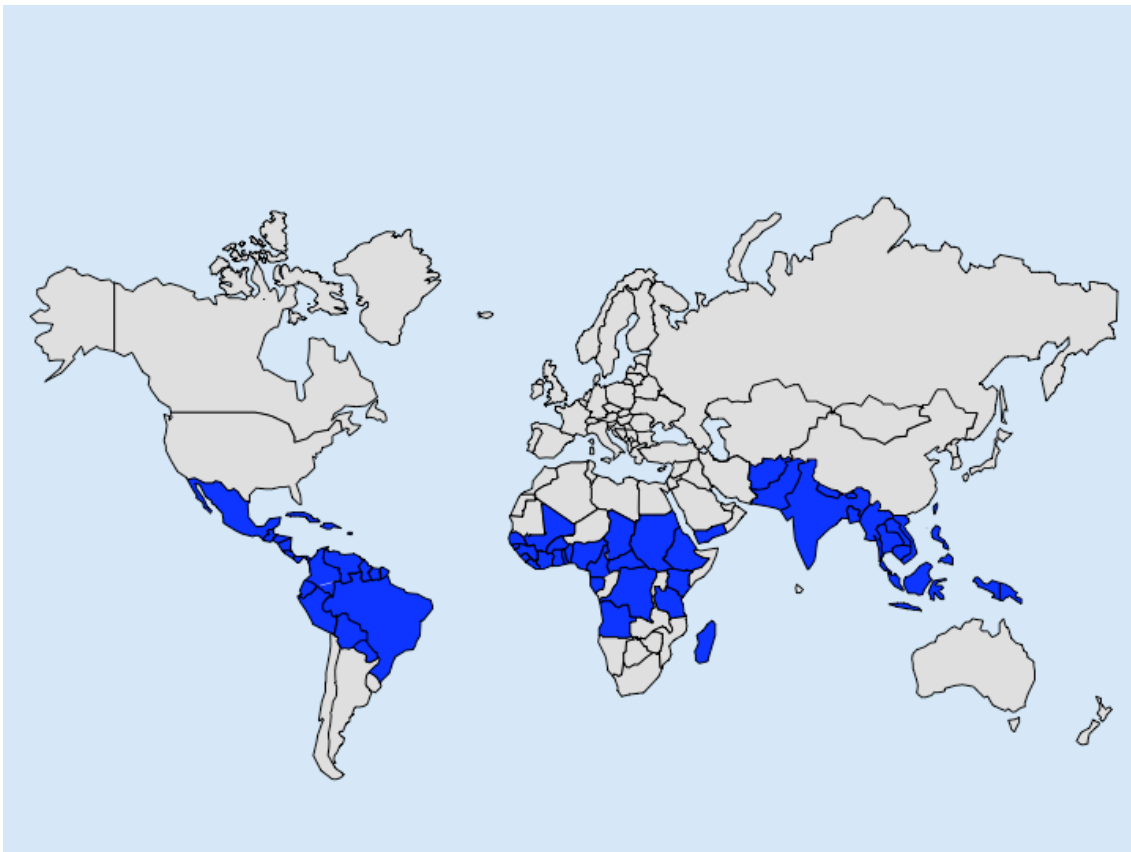


Figura 5. Mapa de áreas con transmisión autóctona sostenida de VDEN.

TRANSMISIÓN

La principal vía de transmisión de VDEN es la vectorial: la infección ocurre cuando el mosquito vector se alimenta del ser humano e inyecta el virus. Hoy en día el VDEN se mantiene en un ciclo urbano en el que toman parte el ser humano y el mosquito vector. El VDEN está altamente adaptado al ser humano, por lo que ya no requiere los ciclos selváticos de los cuales se originó, en los que tomaban parte primates no humanos y sus vectores (24). Estos ciclos siguen existiendo pero se desconoce su verdadero impacto en términos de salud pública (25).

La hembra del mosquito *Aedes* se infecta al alimentarse de un huésped durante el periodo virémico, es decir, mientras el virus se encuentra en la sangre. Entonces comienza el periodo de incubación extrínseco, que es el tiempo que el virus tarda en infectar las células del tracto intestinal del mosquito, replicarse en diferentes tejidos y llegar finalmente a las glándulas salivares, momento en el cual el mosquito se vuelve infeccioso. Todo el proceso se lleva a cabo en 5-12 días (habitualmente entre 8-10) y está influenciado por la temperatura ambiental (ambientes más cálidos aceleran el proceso), la cepa viral y la competencia del vector (19).

Una vez el virus se encuentra en las glándulas salivares del mosquito, éste ya es infectivo y puede inyectar el virus cuando se alimenta de la sangre del siguiente huésped. El rango de temperatura en el que ocurre la transmisión oscila entre 18-34°C, siendo máxima entre 26 y 29°C (33). El mosquito sigue siendo infectivo de por vida (el adulto puede vivir entre dos y cuatro semanas habitualmente), pudiendo infectar a múltiples huéspedes en dicho periodo. Además, la hembra del mosquito puede transmitir la infección de forma vertical a su descendencia. La importancia de esta transmisión vertical en la epidemiología del VDEN está en discusión y, si bien podría explicar la persistencia del virus en la naturaleza tras la aparición de factores adversos para la supervivencia de los mosquitos adultos (34)(35), algunos estudios sugieren que los datos obtenidos hasta el momento no son suficientes para realizar esta afirmación (36).

El vector principal de VDEN es *Ae. aegypti*, especie que presenta una amplia distribución en las áreas endémicas de VDEN. *Aedes albopictus* es un vector más susceptible a la infección por VDEN, aunque juega un papel limitado en la transmisión de infección entre humanos. Se cree que el mosquito tigre, *Ae. albopictus*, fue originalmente el vector de VDEN hasta la aparición de *Ae. aegypti*, que con su comportamiento fuertemente antropofílico y peridoméstico permitió la transmisión mantenida entre humanos y el establecimiento de los ciclos urbanos (25). La importancia actual de *Ae. albopictus* radica en su amplia distribución y su gran capacidad de colonización y expansión, lo que unido a su capacidad vectorial podría derivar en el establecimiento del virus en regiones hasta ahora libres del mismo. Además de estas dos especies principales, se han descrito otros géneros de *Aedes* capaces de transmitir VDEN (*Aedes polynesiensis*, *Aedes hensilii*, etc) (37)(38).

Ae. aegypti se originó en África y hoy en día presenta una amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales. Es un mosquito de actividad diurna y principalmente antropofílico (tiene preferencia por alimentarse del ser humano), pudiendo picar en ambientes interiores o exteriores. Además, es frecuente que durante la ingesta se alimente de varios individuos. Son mosquitos peridomésticos, que se encuentran principalmente en el entorno más próximo a las viviendas. Crían en pequeños depósitos, empleando habitualmente recipientes artificiales como macetas, platos y neumáticos que pueden encontrarse fácilmente en los ambientes urbanos (33).

Ae. albopictus se originó en Asia y se cree que fue exportado a otras regiones entre otras cosas gracias al comercio de neumáticos. Presenta una distribución similar a la de *Ae. aegypti* en zonas tropicales, aunque en general su presencia es inferior. Sin embargo, su capacidad de sobrevivir en zonas más templadas explica su expansión reciente y su aparición en zonas templadas de Europa y Estados Unidos. Es un mosquito de actividad diurna y se alimenta principalmente en el exterior. Se alimenta de diferentes animales,

aunque en algunas circunstancias ha mostrado una tendencia fuertemente antropofílica. Su hábitat se encuentra en zonas rurales y periurbanas, donde cría en pequeños recipientes de agua. Además de los recipientes artificiales que usa *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* cría en reservorios naturales como los huecos de los árboles. Una preferencia por estas zonas de cría podría explicar por qué esta especie se ve más afectada por factores externos como las precipitaciones (39).

Aunque la transmisión vectorial es la de mayor importancia, se han descrito también otras vías de transmisión: casos asociados a accidentes de laboratorio o exposición accidental a la sangre de un paciente y casos asociados a transfusiones sanguíneas y trasplantes de órgano sólido de donantes infectados (40). En el caso de las mujeres embarazadas, se ha descrito la transmisión vertical al feto durante el embarazo o el parto, observándose desde pérdidas fetales hasta casos graves de infección en los recién nacidos (18)(41). El virus también se ha detectado en leche materna, por lo que la lactancia materna también podría ser una vía posible de transmisión (42). Recientemente se han descrito dos casos de probable transmisión por vía sexual del virus (43)(44).

CLÍNICA

El periodo de incubación intrínseco, aquel que va desde la picadura del mosquito hasta la aparición de los síntomas, es habitualmente de 4-8 días (rango entre 3-14 días) (19). El espectro de síntomas es amplio, pudiendo darse desde casos severos con shock y disfunción orgánica hasta casos asintomáticos o subclínicos. Se estima que la mayoría de infecciones son asintomáticas o de carácter leve. La mayor parte de los pacientes sintomáticos presentan una enfermedad debilitante autolimitada, después de la cual se tiene una recuperación completa. Una pequeña proporción de pacientes pueden desarrollar una enfermedad más severa con síntomas hemorrágicos.

Clásicamente, la infección clínica por VDEN se dividía en fiebre indiferenciada, fiebre por dengue o fiebre hemorrágica por dengue (Figura 6.A). A su vez la fiebre hemorrágica por dengue se dividía en diferentes niveles de gravedad, siendo el más grave el síndrome de shock por dengue. Esta clasificación era muy rígida y no permitía la correcta clasificación de algunos casos, dificultando así su manejo. Por ello en 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) cambió la clasificación a dengue con o sin signos de alarma y dengue severo (Figura 6.B), para tratar de mejorar el manejo de los pacientes (31).

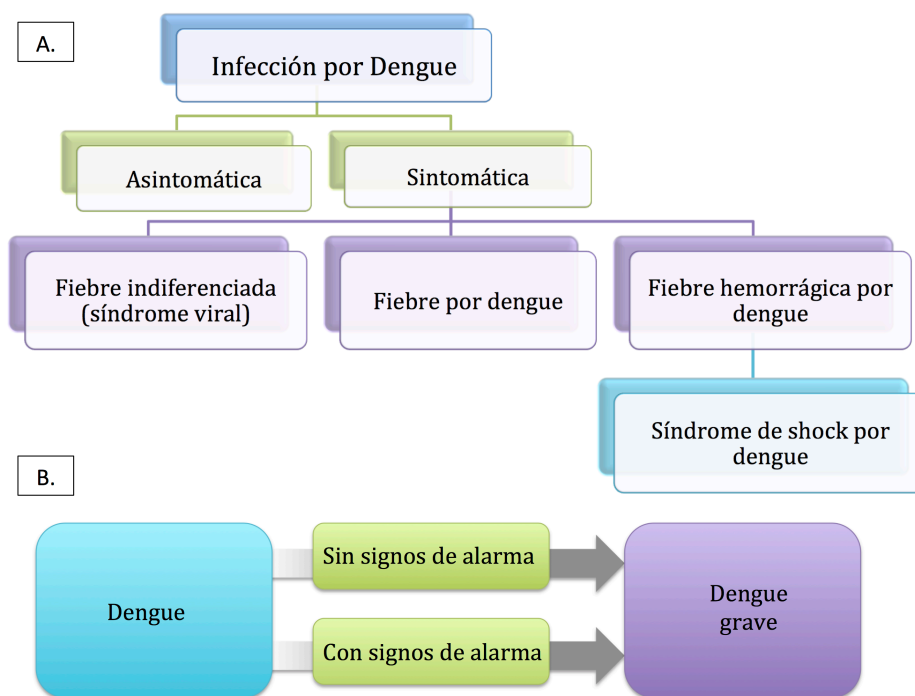


Figura 6. A. Clasificación clásica de los cuadros clínicos causados por VDEN (1997). B. Clasificación actual de cuadros clínicos causados por VDEN (2009).

La clasificación actual considera caso probable aquel que vive en áreas endémicas o ha viajado a las mismas y presenta fiebre y dos o más de los siguientes criterios: náuseas o vómito, erupción cutánea, molestias o dolores, prueba del torniquete positiva, leucopenia o cualquiera de los signos de alarma. Los casos pueden presentar, en ocasiones, los

siguientes signos de alarma: dolor abdominal intenso o dolor abdominal a la palpación, vómitos persistentes, acumulación de líquidos, sangrado de mucosas, letargia o agitación, hepatomegalia >2cm o alteraciones de laboratorio como hematocrito aumentado junto a una plaquetopenia brusca.

La infección por dengue, con o sin signos de alarma, puede evolucionar a un dengue grave, que se define como la presencia de extravasación plasmática (que puede derivar en shock), hemorragia grave o compromiso grave de órganos (como por ejemplo afectación hepática con transaminasas elevadas, afectación del sistema nervioso central con alteración de la conciencia, etc).

En el curso clínico del dengue se aprecian tres fases: febril, crítica y de recuperación (Figura 7). En la primera fase el paciente desarrolla de manera súbita fiebre elevada, acompañada de otros síntomas inespecíficos como rash, mialgias, artralgias y cefalea. En la fase crítica se observa un descenso de la fiebre. En algunos pacientes la permeabilidad capilar aumenta en esta fase. Esto provoca una extravasación de plasma que puede durar 24-48 horas. Esto suele ir precedido de leucopenia y plaquetopenia. Los pacientes que no presentan extravasación mejoran en esta fase y se considera que tienen un dengue sin signos de alarma, mientras que aquellos que si la presentan pueden sufrir un empeoramiento de su condición clínica, con manifestación de signos de alarma que pueden desembocar en un dengue severo. Los casos con signos de alarma pueden mejorar con rehidratación intravenosa, si bien en algunos casos la extravasación es tan importante que puede derivar en un cuadro grave con shock. El shock puede causar un fallo multiorgánico, coagulación intravascular y hemorragias. Estas últimas provocarán un descenso del hematocrito y un aumento del recuento de leucocitos (contrario a la leucopenia que se suele observar en estas fases).

En la fase de recuperación, los pacientes que superan la fase crítica van reabsorbiendo los fluidos del compartimento extravascular. En esta fase mejora el estado

general del paciente y es en este momento donde algunos pacientes muestran el rash conocido como “islas blancas en un océano rojo”, característico de la infección por VDEN (31).

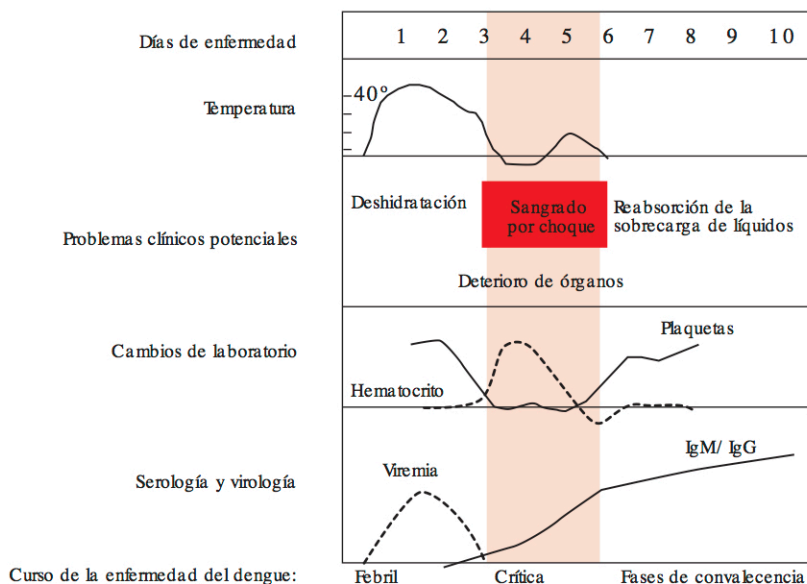


Figura 7. Curso de la enfermedad del dengue. Imagen tomada de “Dengue: guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control” (31) con autorización.

Como ya se ha mencionado previamente, se han descrito cuatro serotipos de VDEN. Tradicionalmente se ha considerado que la infección por cada uno de ellos confiere protección de por vida frente a infecciones del mismo serotipo, pero que la protección cruzada frente al resto de serotipos es débil, por lo que una persona puede infectarse por los cuatro serotipos de VDEN a lo largo de su vida. Sin embargo, algunos estudios apuntan a que es posible re-infectarse por el mismo serotipo, aunque la frecuencia de reinfecciones por el mismo serotipo y factores de riesgo asociados no se conocen bien (45).

La primera infección por uno de los serotipos se conocerá como dengue primario, mientras que las infecciones sucesivas recibirán el nombre de dengue secundario. En el dengue secundario la presencia de anticuerpos frente a otro serotipo puede desencadenar el fenómeno conocido como ADE: los anticuerpos frente al serotipo de la primera infección

no son capaces de neutralizar el nuevo serotipo viral pero sí forman complejos inmunes que facilitan la infección de macrófagos y un aumento de replicación (46). Un meta-análisis mostró que las infecciones secundarias por cada uno de los serotipos eran más graves que las infecciones primarias por el mismo serotipo, apoyando la teoría del ADE (47). También se ha observado que a mayor tiempo entre la infección primaria y la secundaria, mayor es el riesgo de casos severos de dengue (48).

En principio, los cuatro serotipos de VDENV causan un cuadro clínico similar. Sin embargo, debido a sus diferencias genéticas, se ha planteado la posibilidad de que algunos serotipos sean más virulentos que otros, si bien es difícil descartar que otros factores como la inmunidad de la población no jueguen un papel en estas observaciones (19). A la hora de evaluar estos estudios también hay que tener en cuenta el cambio de clasificación de casos realizado por la OMS, ya que en la primera clasificación había que cumplir todos los criterios para ser considerado un cuadro grave. Todo ello hace que hoy en día no se pueda asegurar que un serotipo en concreto de lugar a cuadros clínicos más severos.

DIAGNÓSTICO

La infección por VDENV puede dar lugar a un amplio abanico de cuadros clínicos: desde el síndrome febril inespecífico hasta los cuadros de dengue severo con hemorragia y shock. Realizar un diagnóstico etiológico de VDENV basándose en la clínica no es posible, ya que los síntomas que suelen referir los pacientes son superponibles a los causados por otras arbovirosis u otras infecciones no virales, sobre todo en los primeros estadios de la infección, cuándo más interesa filiar correctamente el cuadro.

Se han propuesto diferentes algoritmos o listados de síntomas para ayudar al diagnóstico clínico del dengue, que incluyen también parámetros analíticos como la leucopenia. La sospecha clínica y epidemiológica son fundamentales, pero para obtener un diagnóstico definitivo se requieren métodos de diagnóstico microbiológico (49).

Las pruebas diagnósticas de VDEN se dividen en dos grupos: pruebas directas, que detectan la presencia del virus o sus componentes, y pruebas indirectas o serológicas, que detectan la respuesta inmune del huésped frente al virus. Para realizar las pruebas adecuadas en cada momento de la infección es importante realizar una buena historia clínica y conocer la cinética del virus y sus marcadores. La presencia de VDEN en la sangre del paciente puede detectarse desde 24-48 horas antes del inicio de la fiebre y hasta 5-6 días tras el inicio de la misma. En este periodo inicial en el cuál el virus se encuentra en el organismo es cuando pueden emplearse las técnicas directas.

Teniendo en cuenta el tiempo desde el inicio de los síntomas se llevarán a cabo unas pruebas u otras para tratar de alcanzar un diagnóstico definitivo. A continuación, se explican brevemente las diferentes técnicas diagnósticas de VDEN (Figura 8).

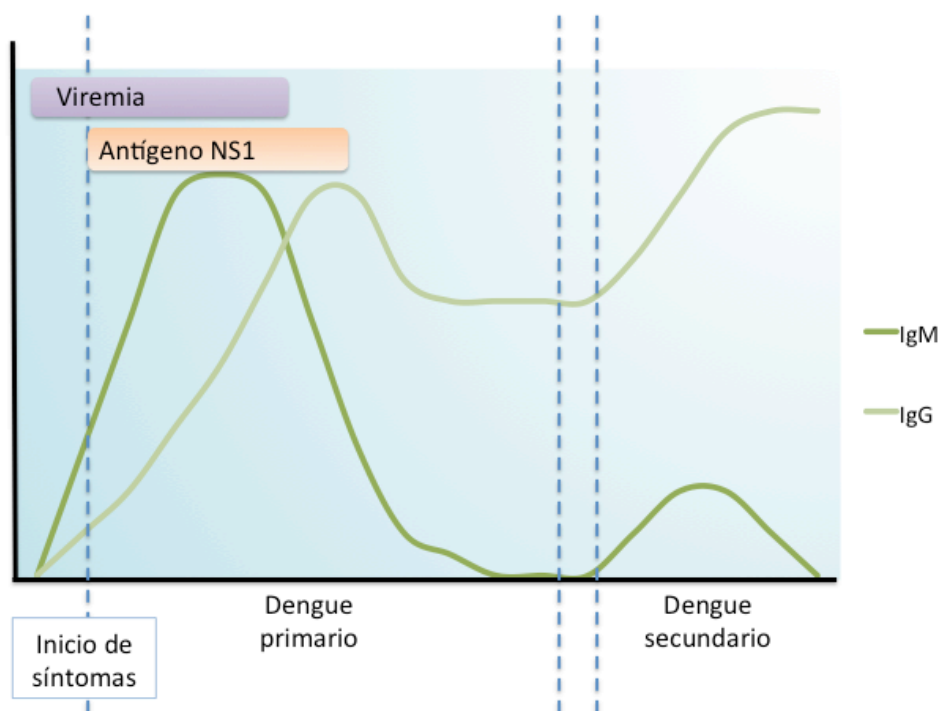


Figura 8. Principales marcadores diagnósticos de la infección por VDEN. Imagen adaptada de(50).

TÉCNICAS DIRECTAS

Aislamiento viral

El cultivo viral para aislamiento del virus puede realizarse en muestras de suero, plasma o sangre total durante el periodo de duración de la viremia (entre 24-48 horas antes del inicio de los síntomas hasta 5-6 días después). En los casos secundarios este periodo puede verse reducido por la presencia de anticuerpos de las infecciones previas que pueden interferir y disminuir la sensibilidad del cultivo (51).

El aislamiento viral puede realizarse inoculando el virus en mosquitos, en el cerebro de ratones o en diferentes líneas celulares. Hoy en día lo más empleado es el aislamiento en líneas celulares, siendo la línea C6/36, que deriva de células de *Ae. albopictus*, la más adecuada para el aislamiento de VDEN. También pueden emplearse células de mamíferos como las células Vero, LLC-MK2 o BHK-21, que son líneas celulares con las que se trabaja con mayor frecuencia en los laboratorios de diagnóstico clínico, aunque son menos sensibles que C6/36 (49). El aislamiento viral es un proceso lento que puede tardar semanas en obtener resultado, por lo que hoy en día no se emplea para el diagnóstico rutinario.

Amplificación de ácidos nucleicos

La detección del ARN viral permite un diagnóstico directo de la infección por VDEN. En general, la técnica más empleada es la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (reverse transcriptase - polymerase chain reaction, RT-PCR). Dentro de las RT-PCR hay diferentes tipos como las clásicas en tiempo final o aquellas en tiempo real en las que la detección se puede realizar con sondas o mediante marcadores fluorescentes. También se han desarrollado técnicas anidadas (nested RT-PCR) para aumentar la sensibilidad de las RT-PCR a tiempo final. En general, las técnicas de amplificación aportan resultados rápidos y fiables que pueden mejorar el manejo del

paciente y por ello se han convertido en el método de elección para el diagnóstico en la fase aguda.

Una de las técnicas más empleadas es una RT-PCR casera descrita por Lanciotti, en formato multiplex, que permite diferenciar los cuatro serotipos de VDENV de forma simultánea (52). Sin embargo, se describieron cepas de dengue con variaciones en la región de unión de los cebadores o la sonda que no eran detectadas (53). Esto pone de relieve la necesidad de una continua evaluación de las pruebas moleculares, ya que la multitud de cepas circulantes y su variabilidad genética pueden hacer que el rendimiento de una prueba sea subóptimo con el paso del tiempo. Se han descrito múltiples técnicas tanto caseras como comerciales que emplean diferentes cebadores o primers. El principal problema es la falta de estudios extensos que comparen las diferentes técnicas y la falta de estandarización de las mismas (51). La principal desventaja de estas técnicas es que requieren equipamiento específico y personal entrenado para llevarlas a cabo, por lo que no son técnicas útiles para estudios en lugares remotos que carecen de estos recursos.

Recientemente se han descrito ensayos de amplificación isotérmica para la detección de VDENV. Son técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en los cuales la amplificación se lleva a cabo a una temperatura constante. Esto requiere un equipamiento más sencillo (un baño de agua a temperatura constante o una estufa), por lo que podrían ser una herramienta útil en lugares que no cumplen los requisitos necesarios para realizar técnicas de RT-PCR (54).

Todas estas técnicas se realizan habitualmente en muestras de sangre total, plasma o suero, aunque se ha descrito su utilidad también en orina y saliva. El empleo de muestras de orina podría ampliar la ventana diagnóstica, ya que se han obtenido resultados positivos entre 6 y 16 días tras el inicio de los síntomas (49).

Detección de antígenos

La detección de antígenos circulantes es otra aproximación diagnóstica de gran utilidad en el caso de VDEN. Dentro de las proteínas no estructurales previamente mencionadas, destaca por su importancia a nivel diagnóstico la glicoproteína NS1, que participa en la replicación temprana del ARN y se presenta en tres formas diferentes: unida al retículo endoplasmático, anclada a la membrana o en la forma secretada. Esta última puede detectarse en la sangre desde los primeros días de síntomas y sus niveles en sangre se corresponden con el pico de viremia por lo que es la diana empleada en las pruebas de diagnóstico rápido (19). En ocasiones prolonga la ventana de diagnóstico, pudiendo detectarse cuando los ácidos nucleicos ya no son detectables.

La detección de antígeno NS1 puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas. Los métodos basados en ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) presentan una mayor sensibilidad y especificidad, tardan unas horas en obtener el resultado y son técnicas medianamente laboriosas. Por el contrario, las técnicas basadas en inmunocromatografía (ICT) son útiles como técnicas de diagnóstico rápido, requiriendo poco entrenamiento de los profesionales y aportando resultados en 15-30 minutos. Sin embargo, la sensibilidad de estas técnicas es menor que las de aquellas basadas en ELISA.

En el caso de infecciones secundarias, la presencia de anticuerpos circulantes puede propiciar la formación de inmunocomplejos que dificultan la detección de NS1 (55). Así pues, la sensibilidad de la detección de antígeno en los cuadros de dengue secundario es habitualmente inferior a la observada en los casos de dengue primario (49).

TÉCNICAS INDIRECTAS: SEROLOGÍA

Tras la primera semana desde el inicio de los síntomas el virus suele desaparecer del organismo y aparecen los anticuerpos generados por el huésped frente a la infección. Las primeras en aparecer son las inmunoglobulinas M (IgM), que pueden detectarse desde el

3-5º día tras el inicio de los síntomas y pueden persistir positivas durante 2-3 meses (19). Las inmunoglobulinas G (IgG) aparecen más tarde, sobre los días 7-10 tras el inicio del cuadro, y suelen persistir positivas de por vida (50).

En el caso del dengue secundario se detectan las IgG desde el primer momento (correspondiente a los anticuerpos formados frente a la primera infección), observando un rápido aumento en su titulación. La respuesta de IgM frente a la infección secundaria puede ser baja o nula.

Para la detección de anticuerpos se han descrito múltiples técnicas, siendo las más sensibles y las más empleadas las técnicas ELISA. También se emplean test de diagnóstico rápido basados en ICT para la detección de anticuerpos. Más recientemente se han descrito nuevos ensayos basados en quimioluminiscencia (CLIA).

Dentro de la serología, las técnicas de neutralización son consideradas las técnicas de referencia. Estas técnicas son capaces de distinguir anticuerpos específicos frente a diferentes virus de la misma familia, por ejemplo, diferentes flavivirus, o incluso diferentes serotipos de VDEN. Los anticuerpos neutralizantes son capaces de inhibir la infección uniéndose al virus y neutralizándolo. Tomando esta característica como base, las técnicas de neutralización ponen en contacto el suero del paciente con el virus en un cultivo celular. Si el suero contiene anticuerpos neutralizantes, estos se unirán al virus impidiendo la infección celular. En caso de no haber anticuerpos neutralizantes el virus infectará el cultivo celular. Una de las técnicas de detección de anticuerpos neutralizantes más empleada es la prueba de reducción en placa (plaque reduction neutralizing test, PRNT). Este ensayo se basa en la observación de una reducción en el número de placas de lisis causadas por el virus en un cultivo celular cuando existen anticuerpos neutralizantes. El título de anticuerpos se define como la última dilución a la cual se observa una reducción del número de placas determinado (50% o 90% según el protocolo). Otro ensayo comúnmente utilizado es la microneutralización en placa. El principio es el mismo que

para el PRNT, pero en este caso no se contabilizan las placas de lisis sino la dilución del suero a la cual se bloquea la infección de los pocillos de cultivo. Ambos ensayos se llevan a cabo en laboratorios altamente especializados. Sin embargo, se están desarrollando nuevas técnicas de detección de anticuerpos neutralizantes e introduciendo modificaciones como el empleo de virus recombinantes, que podrían facilitar el empleo de estas técnicas en laboratorios con un menor nivel de bioseguridad del ahora requerido (56).

Aunque se consideran pruebas muy específicas, las técnicas de detección de anticuerpos neutralizantes presentan también cierto grado de reactividad cruzada. La recomendación es realizar el estudio de dos muestras (una de la fase aguda y otra de la fase convaleciente) de forma paralela para objetivar un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos neutralizantes.. Además, para realizar una correcta interpretación de los resultados, debería realizarse el estudio de forma simultánea frente a todos los serotipos de VDENV, otros flavivirus potencialmente circulantes y algún arbovirus que no sea de la familia *Flaviviridae* (57). Otra limitación a tener en cuenta es el fenómeno conocido como “pecado original antigénico”, que consiste en que, ante una nueva infección, el título de anticuerpos neutralizantes frente a la infección actual se mantiene bajo, mientras que se produce un aumento del título de anticuerpos neutralizantes frente al virus causante de la infección previa. Esto se ha descrito entre diferentes flavivirus y entre diferentes serotipos de VDENV (56).

Pese a ser una valiosa herramienta, estas técnicas presentan limitaciones como un largo tiempo hasta los resultados y la necesidad de laboratorios de bioseguridad nivel 3, por lo que no se emplean de forma rutinaria en el diagnóstico.

Tras un uso adecuado de las técnicas ahora mencionadas, podremos clasificar los casos como dengue probable o dengue confirmado (Tabla 3) (58). Se considerará un caso

sospechoso de dengue secundario aquel en el que se detecten los ácidos nucleicos del virus o se logre su aislamiento en presencia de una IgG positiva (49).

Dengue probable	Dengue confirmado
<p>Una de las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - IgM positiva aislada 	<p>Una de las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - RT-PCR positiva - Cultivo viral positivo - Detección de antígeno NS1 - Detección de IgM específica y confirmación con neutralización - Seroconversión o aumento de cuatro veces el título en muestras pareadas

Tabla 3. Criterios de laboratorio para el diagnóstico de VDEN.

TRATAMIENTO

La infección por VDEN, como ya hemos visto, puede dar lugar a un amplio abanico de cuadros clínicos. A día de hoy no existe ningún tratamiento antiviral específico frente a VDEN, por lo que el manejo de los pacientes se basa en administrar tratamiento de soporte, fluidoterapia y solución de las posibles complicaciones.

A la hora de manejar estos casos es de vital importancia un buen triaje y un alto grado de sospecha, así como contar con herramientas de diagnóstico adecuadas y preferiblemente rápidas. Muchos de los cuadros serán leves y no requerirán ingreso hospitalario, pero en otros casos habrá que estar alerta ante la aparición de síntomas de alarma para poder ingresar al paciente, monitorizarlo y administrar el tratamiento de soporte de manera óptima. El manejo correcto de la infección reduce significativamente la mortalidad de los cuadros de dengue severo (59).

PREVENCIÓN

La principal vía de transmisión de VDEN es la picadura de mosquito, por lo que la principal medida para evitar la transmisión sería evitar las picaduras de mosquitos infectados. Algunas medidas que han sido exitosas con la malaria (como las mosquiteras impregnadas en insecticida) no son de utilidad en este caso porque los mosquitos vectores presentan una actividad diurna.

Otra estrategia para prevenir la infección por VDEN es el desarrollo de vacunas efectivas. Esta es una tarea complicada, que se ha visto enlentecida por el temor a que la inducción de una respuesta inmune frente a un serotipo aumentara el riesgo de cuadros de dengue severo en futuras infecciones por otros serotipos y por la complejidad de entender cómo funciona con exactitud la inmunidad protectora frente a VDEN. Una vacuna eficaz debería provocar una inmunidad duradera frente a los cuatro serotipos, ya que una pérdida de inmunidad con el tiempo o la inmunidad frente a un único serotipo podría dar lugar a casos más graves por el fenómeno ADE (19). Se han desarrollado diferentes candidatos vacunales contra dengue y varios de ellos se han completado. Una vacuna tetravalente frente a los cuatro serotipos de dengue basada en la vacuna de la fiebre amarilla (Dengvaxia®, Sanofi Pasteur) demostró protección contra dengue y contra cuadros de dengue severo en ensayos clínicos de fase 3, aunque la protección contra el serotipo 2 fue inferior. Esta vacuna ya ha sido aprobada en algunos países, pero no estaría indicada en niños menores de 9 años de edad por posibles problemas de seguridad. Análisis posteriores revelaron sorprendentemente la posibilidad de una menor seguridad en personas que no habían estado expuestas al dengue previamente. Por ello, la recomendación preferente actual es la de vacunación de personas seropositivas al dengue (60)(61)(62).

VIRUS CHIKUNGUNYA

VIROLOGÍA

El virus chikungunya (VCHIK) es un virus del género *Alphavirus*, familia *Togaviridae*, que se engloba dentro del complejo antigénico del virus de bosque Semliki y está relacionado con otros virus causantes de cuadros de artralgias como el virus O'nyong-nyong (VONN), el virus Mayaro (VMAY), VRR, etc (63). Es un virus ARN de cápside icosaédrica y con cubierta, compuesto por una única hebra de 11-12kb de sentido positivo. Su genoma presenta dos marcos de lectura: el primero codifica una poliproteína no estructural que da lugar a cuatro proteínas no estructurales (non-structural protein, nsP (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4)) y el segundo codifica cinco proteínas estructurales (capside (C), envoltura (E1, E2, E3) y 6K) (Figura 9) (64).



Figura 9. Esquema del genoma de VCHIK que incluye las proteínas no estructurales (non-structural protein nsP (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4)) y las proteínas estructurales (C: cápside, E: envoltura (E1, E2 y E3) y 6K)

Los análisis filogenéticos muestran tres genotipos o linajes principales del virus: linaje asiático, linaje ECSA (Este/Centro/Sur Africano) y linaje del África del Oeste (65). La cepa del océano Índico (Indian Ocean Lineage, IOL) deriva del linaje ECSA (66).

PATOGÉNESIS

Los alphavirus se dividen en dos grupos conocidos como “alphavirus del Nuevo Mundo” y “alphavirus del Viejo Mundo”. La evolución sufrida por los virus en las distintas

regiones ha hecho que estos difieran en sus mecanismos patogénicos y en la clínica que producen. En general, los virus del Nuevo Mundo se asocian a cuadros de encefalitis mientras que los del Viejo Mundo, entre los que se incluye VCHIK, se asocian habitualmente a cuadros de rash y artralgias (67).

La infección por VCHIK ocurre tras la inoculación del virus por la picadura de un mosquito infectado. El virus se replica en los fibroblastos del epitelio y después se disemina a los nódulos linfáticos. A través del torrente sanguíneo el virus alcanza otras regiones, como las articulaciones. En los casos graves puede darse replicación en el hígado y en el sistema nervioso central (algunas células gliales también son susceptibles a la infección por VCHIK, las neuronas no) (67)(68). La distribución y replicación del virus por todo el organismo da lugar a una alta carga de virus circulante (64). Durante esta fase virémica es cuando aparecen los síntomas.

La patogénesis del virus y la activación de la respuesta inmune frente al mismo no están aún descritas al detalle. Se sabe que la infección estimula la producción de interferón tipo I, el cual juega un papel fundamental en el aclaramiento de la infección. Además se potencia la producción de múltiples citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento (64). Se ha observado también una activación de linfocitos T CD8+ en las lesiones cutáneas y de linfocitos T CD4+ en las articulaciones (68).

Como se verá más adelante, la infección por VCHIK puede dar lugar a un cuadro de artralgias crónicas. Esto parece deberse a la presencia residual de antígenos víricos y a la respuesta inmune generada por los mismos, más que a una replicación activa del virus, ya que este no ha logrado aislarse en los casos con sintomatología articular crónica (69).

EPIDEMIOLOGÍA

El virus fue descubierto en 1952 en Tanzania (70) y recibe su nombre de la palabra que en el dialecto Makonde significa “aquello que dobla”, en referencia a la postura que

presentan los pacientes debido a las artralgias (31). Aunque su descripción inicial se hizo en la década de los 50, se cree que el virus llevaba siglos en África y que su expansión fuera de África pudo ocurrir durante los siglos XVIII y XIX, junto a la expansión del vector *Aedes aegypti* gracias al transporte marítimo. De hecho, es posible que los primeros brotes de la enfermedad inicialmente denominada kidinga-pepo (nombre del que presumiblemente deriva lo que hoy conocemos como dengue) pudieran ser en realidad infecciones por VCHIK (70).

Inicialmente el virus circulaba en África en ciclos selváticos en los que tomaban parte primates no humanos y mosquitos arbóreos. Fue en África donde el virus dio el salto a ciclos urbanos y se dieron los primeros casos humanos. En la década de los 50, tras su descripción en Tanzania, el virus también se aisló en Uganda y en otros países subsaharianos (66). La primera descripción del virus fuera de África se realizó en Tailandia en un brote en 1958 (30). En los años posteriores se fueron describiendo brotes esporádicos tanto en África como en Asia.

Antes de 2004 los tres linajes descritos (linaje del África del Oeste, linaje ECSA y linaje asiático) rara vez se encontraban fuera de la región de la que reciben su nombre. En ese momento una cepa originaria de Kenia (linaje ECSA) causó grandes brotes en las islas del Océano Índico, especialmente en la isla La Reunión. El estudio de la cepa causante del brote concluyó que se trataba de una nueva cepa derivada del linaje ECSA que recibió el nombre de IOL. La expansión epidémica de esta cepa hizo que se detectase un gran número de casos importados en viajeros y que se describiesen también los primeros casos autóctonos en países no endémicos, que tenían como caso índice a viajeros que habían regresado de dichas regiones. Por ejemplo, en 2007, Italia sufrió un brote de unos 200 casos tras la llegada de un paciente virémico proveniente de la India (66). El vector en esta epidemia fue *Ae. albopictus* y este evento marcó el primer aviso del riesgo de introducción de arbovirosis en zonas hasta ahora libres de enfermedad como es el caso de Europa. En los años 2010 y 2014 se notificaron algunos casos de infección de transmisión local en

Francia (71)(72) y más recientemente, en 2017, tanto Francia como Italia detectaron nuevos casos autóctonos (73)(74).

Hasta 2013 la presencia de VCHIK se había limitado a las regiones hasta ahora citadas. Ese año el genotipo asiático de VCHIK se introdujo en el continente americano, en el que hasta entonces no se había descrito ningún caso de VCHIK en al menos 200 años (30), causando una gran epidemia (66). Se constató transmisión en más de 45 países y se cuantificaron más de 1,7 millones de casos. Tras el periodo epidémico inicial, el virus continúa circulando de forma endémica en el continente americano a un nivel notablemente inferior (75), sumándose al resto de regiones donde el virus ya era endémico previamente (Figura 10).

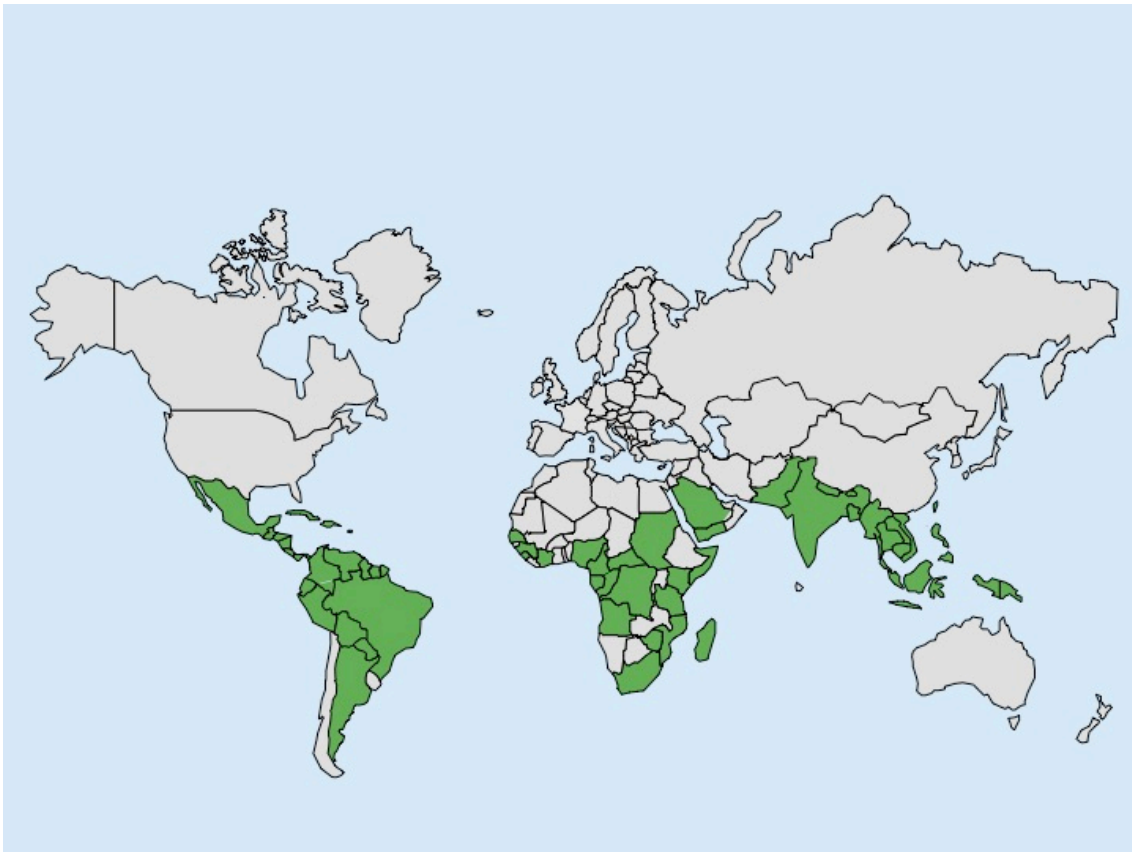


Figura 10. Mapa de áreas con transmisión autóctona sostenida de VCHIK.

TRANSMISIÓN

La principal vía de transmisión de VCHIK es la vectorial, mediante la picadura de un mosquito hembra del género *Aedes*. El periodo de incubación extrínseco, aquel que va desde que el mosquito ingiere el virus hasta que se vuelve infectivo, es de unos 7-10 días (69).

En África se han descrito ciclos selváticos bien establecidos entre mosquitos selváticos y primates no humanos (76). Estos ciclos actúan como reservorio de la enfermedad y pueden dar lugar a nuevas epidemias al entrar en contacto con el ser humano. En Asia y América no hay datos que certifiquen el establecimiento de ciclos selváticos (77). Durante las fases epidémicas se establece un ciclo urbano que es suficiente para mantener la transmisión, sin necesidad de otros reservorios del virus para mantener el brote activo. La razón por la que antes del siglo XX los brotes de VCHIK fuera de África se daban con grandes fases de inactividad entre uno y otro podría deberse a reintroducciones del virus, ya que el virus podría no haber establecido un ciclo selvático que permitiese una transmisión endémica de forma continuada.

Los vectores que toman parte en los ciclos selváticos de VCHIK son abundantes especies de *Aedes*, como *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes furcifer-taylori*, *Aedes vittatus* y *Aedes fulgens* (77). En el caso de los ciclos urbanos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* son los principales vectores, cuyas características principales ya se han revisado previamente (ver apartado de transmisión de VDENV). Hasta 2004 *Ae. aegypti* se consideraba el vector principal de VCHIK, que tras su expansión fuera de África llevó consigo los primeros brotes de VCHIK. En la epidemia de 2005 acaecida en la isla de la Reunión, sin embargo, el vector principal fue *Ae. albopictus*. El estudio exhaustivo de la cepa causante del brote mostró que se trataba de una cepa derivada del linaje ECSA que presentaba una mutación en la proteína E1, encargada de la fusión viral. La mutación consistía en un cambio de alanina por valina en la posición 226 (E1-A226V) (15) que

mejoraba la habilidad de VCHIK para infectar las células de los vectores. Esta mutación es la responsable de un aumento de la infectividad para *Ae. albopictus*, permitiendo una diseminación más eficiente en el mosquito y en la transmisión a los huéspedes. Esta mutación no afecta a la replicación en *Ae. aegypti*, por lo que esta nueva cepa puede ser transmitida de forma efectiva por ambos vectores. Posteriormente se han descrito otras mutaciones en la proteína E2 que también mejoran la transmisión por *Ae. albopictus* (16). El linaje asiático presenta una interacción epistática entre las posiciones 226V y 98T de la proteína E1 que impide su adaptación a *Ae. albopictus* por la mutación A226V (78), motivo por el cual probablemente las cepas A226V no han emergido previamente en Asia. Se ha descrito transmisión vertical del virus en los mosquitos, lo que unido a la resistencia de los huevos a condiciones climáticas adversas, podría explicar la supervivencia del virus en los periodos interepidémicos en aquellas regiones donde no se ha establecido un ciclo selvático (78).

En el ser humano, además de la transmisión vectorial, se han descrito casos de transmisión materno-fetal (79). La transmisión durante el parto da lugar a una infección grave del recién nacido, que puede cursar con encefalitis (18). A día de hoy no se han documentado casos de VCHIK debidos a transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos, algo que sí se ha descrito en otros arbovirus. Si hay constancia de algún caso de transmisión por accidentes de laboratorio (80).

CLÍNICA

El periodo de incubación intrínseco de VCHIK es de 1-12 días, tras el cual un gran número de pacientes desarrollan síntomas (69). El porcentaje de pacientes sintomáticos es superior al de otras infecciones por arbovirus y la mayoría de estudios citan un porcentaje de asintomáticos cercano al 15%. No obstante, nuevos estudios indican que la tasa de asintomáticos podría ser mayor y que el linaje de VCHIK podría afectar al

porcentaje de pacientes sintomáticos. Así, por ejemplo, un estudio reciente apunta a que en las epidemias debidas al linaje asiático son sintomáticos el 50% de los pacientes, mientras que este porcentaje aumenta hasta el 80% cuando el linaje ECSA es el implicado (81). Conocer el porcentaje de pacientes asintomáticos es de gran importancia a la hora de tomar medidas de salud pública y evaluar la posible expansión de una epidemia (82).

En los casos sintomáticos el primer síntoma en aparecer suele ser la fiebre, que se inicia de manera brusca. Otros síntomas habituales son artralgias, cefalea, mialgias y exantema. El comienzo de los síntomas coincide con la presencia del virus en sangre y el cuadro se resuelve tras la desaparición de la viremia, aproximadamente una semana después del inicio. Los estudios muestran que el nivel de viremia causado por VCHIK es elevado, y que puede estar correlacionado con la presencia y severidad de los síntomas (69). La poliartralgia es uno de los síntomas más característicos, aparece habitualmente a la vez que la fiebre y se ha descrito hasta en un 85-90 % de los casos. Es típicamente bilateral aunque no siempre simétrica, afectando a articulaciones periféricas y algunas grandes articulaciones. La artritis es menos frecuente, pero puede verse en cerca del 30% de los casos. El rash, que es otro de los síntomas característicos, suele ser macular o maculopapular y aparece en cerca de la mitad de los pacientes, siendo en ocasiones pruriginoso. Otras manifestaciones menos frecuentes son los trastornos gastrointestinales, astenia, conjuntivitis o eritema (81).

La mayoría de infecciones por VCHIK dan lugar a cuadros no complicados en la mayoría de pacientes. Los factores del huésped también afectan a la presentación clínica del cuadro, y se ha visto que los niños pequeños y los pacientes mayores de 65 años pueden presentar cuadros de mayor gravedad, así como los pacientes con enfermedades de base. Estos cuadros son atípicos y se dan en aproximadamente un 1% de los pacientes. Pueden cursar con encefalopatía, encefalitis, miocarditis, hepatitis, Síndrome de Guillain-Barré (SGB) o fallo multiorgánico, llegando en algunos casos a ser mortales (81). La tasa de

mortalidad estimada es de 1/1.000, y la mayoría de decesos se dan en estos grupos de riesgo (83).

Tras la resolución del cuadro agudo la infección por VCHIK puede dar lugar a una sintomatología crónica en un 30-40% de los pacientes, que se caracteriza principalmente por poliartralgias y/o poliartritis. La afectación suele ser simétrica y las pequeñas articulaciones de las manos son las que se ven afectadas con mayor frecuencia. Esta sintomatología puede resultar muy incapacitante y su duración oscila desde semanas hasta años. Esta poliartralgia mantenida en el tiempo parece estar asociada a la persistencia de componentes virales y antígenos que desatan una respuesta inflamatoria en las articulaciones más que a la persistencia del virus en sí, ya que no se ha logrado aislamiento del virus en estos casos (69). Algunos factores que se han visto asociados a la persistencia de artralgias en la fase crónica es una mayor edad, alteraciones previas en las articulaciones, sexo femenino e infección por el linaje IOL (artralgias persistentes en el 50% de los casos, frente al 36% de los casos en el linaje asiático) (84).

DIAGNÓSTICO

La presentación clínica de la infección por VCHIK es similar a la de otros arbovirus, lo cual unido a una distribución geográfica compartida con arbovirus como VDEN y VZIK hacen que el diagnóstico clínico no sea definitivo. Es necesario realizar un diagnóstico etiológico mediante técnicas de laboratorio, ya que permitirán un mejor manejo del paciente tanto en la fase aguda como en la crónica.

Al igual que en el resto de arbovirus, contamos con técnicas directas e indirectas para realizar el diagnóstico. Las técnicas directas se basan en la detección del virus o de sus componentes virales, mientras que las pruebas indirectas son las pruebas serológicas, que detectan la respuesta inmune del huésped frente a la infección. En el caso de VCHIK se observa una viremia de mayor duración que la vista, por ejemplo, para VDEN.

TÉCNICAS DIRECTAS

Aislamiento viral

Aunque durante décadas el cultivo viral se consideró la técnica de referencia para la detección de virus, hoy en día ha caído en desuso por ser un método lento y laborioso que requiere además de un nivel 3 de bioseguridad, por lo que no puede llevarse a cabo en todos los laboratorios. Como ventaja, el aislamiento viral permite una mejor caracterización de la cepa. El VCHIK puede aislarse en muestras de suero recogidas hasta 7 días tras el inicio de los síntomas. También se ha conseguido su aislamiento a partir de líquido cefalorraquídeo (LCR) (81).

Las líneas celulares adecuadas para el aislamiento de VCHIK pueden ser de mosquito o de mamífero. En las células de *Ae. albopictus* C6/36 se logra una infección persistente sin cambios citopáticos y se consiguen altos títulos virales. En las células de mamífero se producen unos fuertes daños citopáticos. Las más empleadas habitualmente son las células Vero, pero también se ha aislado el virus en las células LLC-MK2, BHK-21 y 293T (81).

Amplificación de ácidos nucleicos

Los métodos moleculares siguen siendo el pilar del diagnóstico en los cuadros agudos. La carga viral de VCHIK parece ser más elevada y prolongada (7-8 días) que en otras arbovirosis, especialmente en neonatos (64). Existen diferentes técnicas moleculares empleadas para el diagnóstico de VCHIK: RT-PCR convencionales, RT-PCR en tiempo real o métodos de amplificación isotérmica (85). El empleo de ensayos multiplex basados en estas técnicas permite la detección simultánea de múltiples patógenos. Las muestras más frecuentemente empleadas son suero y plasma, aunque también se han empleado otras como LCR. En este último parece haber una menor carga viral pero el virus podría persistir durante más tiempo (81).

Detección de antígenos

Se ha desarrollado un test basado en ICT con anticuerpos monoclonales frente a la proteína E1 de VCHIK (86), pero en los estudios preliminares parece ser útil principalmente frente al linaje ECSA (sensibilidad del 89%) y no frente al asiático (sensibilidad del 33%), con una especificidad del 75% (87). Estos datos no apoyan el uso de estos test para el diagnóstico de VCHIK, aunque los mejores resultados obtenidos en los casos causados por el linaje ECSA abren la puerta a su utilización en situaciones concretas donde sea este linaje el causante de la mayoría de los casos (88). A día de hoy estos métodos de detección de antígeno para VCHIK no están comercializados.

TÉCNICAS INDIRECTAS: SEROLOGÍA

La IgM puede detectarse a los pocos días del comienzo del cuadro (4-5 días), pero puede mantenerse positiva durante meses o incluso un año. La IgG aparece de forma más tardía (7 días) y puede permanecer positiva de por vida (81).

Se han desarrollado diferentes técnicas para la detección de anticuerpos frente a VCHIK, basados en ELISA, inmunofluorescencia indirecta (IFI) o incluso ICT. En general, las primeras son las más empleadas y las más sensibles y específicas. Para la detección de anticuerpos IgM se emplean ensayos de captura, que aumentan la sensibilidad. Las ICT serían útiles para el diagnóstico rápido, pero parecen tener una menor sensibilidad y especificidad. El VCHIK forma parte del complejo antigénico del virus del bosque Semliki, y puede presentar reacciones cruzadas con otros alphavirus de este grupo como son VONN y VMAY. Los estudios de neutralización pueden emplearse para diferenciar mejor entre estos virus (81).

Teniendo en cuenta la cinética de los marcadores hasta ahora mencionados, hay que adecuar la realización de las diferentes pruebas al momento de obtención de las muestras.

Los resultados nos permitirán clasificar los casos como casos de infección por VCHIK probables o confirmados según los criterios que aparecen en la Tabla 4 (58).

Chikungunya probable	Chikungunya confirmado
<p>Una de las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - IgM positiva aislada 	<p>Una de las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - RT-PCR positiva - Cultivo viral positivo - Seroconversión o aumento de cuatro veces el título en muestras pareadas - Detección de IgM específica Y confirmación por neutralización

Tabla 4. Criterios de laboratorio para el diagnóstico de VCHIK.

TRATAMIENTO

No existe ningún tratamiento antiviral disponible para el tratamiento de las infecciones por VCHIK, aunque estudios in vitro muestran que algunos compuestos podrían tener efecto, todavía no hay estudios que prueben su eficacia clínica, por lo que el manejo de estas infecciones se basa en medidas de soporte y sintomáticas (89). Para el tratamiento sintomático se recomienda el uso de antiinflamatorios no esteroideos que no tengan acción sobre la agregación plaquetaria para tratar las artralgias y la fiebre.

PREVENCIÓN

La principal medida de prevención frente a VCHIK es evitar las picaduras de sus vectores. La expansión de los mosquitos *Aedes*, junto a las mutaciones observadas en el virus que facilitan su transmisión por el mosquito tigre, hacen que el riesgo de aparición

del virus en nuevas regiones sea elevado, por lo que hay que implementar programas de control de mosquitos para frenar el avance del virus.

Múltiples estudios están tratando de desarrollar una vacuna frente a VCHIK, empleando diferentes opciones como son las vacunas basadas en virus atenuados, las que emplean partículas víricas o las quiméricas, pero aún no se dispone de una vacuna efectiva con la que poder inmunizar a la población en riesgo (89).

VIRUS ZIKA

VIROLOGÍA

El virus Zika (VZIK) es un virus icosaédrico y envuelto del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, al igual que VDEN. Presenta un genoma ARN de aproximadamente 11kb de polaridad positiva. Tiene un único marco de lectura abierta que codifica proteínas estructurales (cápsula (C), premembrana (prM), y envoltura (E)) y no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B y NS5) (Figura 11) (90)(91).

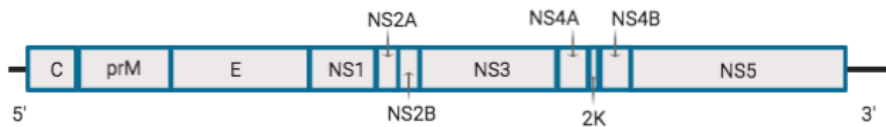


Figura 11. Esquema del genoma de VZIK que incluye las proteínas estructurales (C: cápside, prM: premembrana y E: envoltura) y las proteínas no estructurales (non-structural NS, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B y NS5).

Inicialmente se describieron dos linajes de VZIK, el africano y el asiático. Recientemente ha aparecido el linaje americano, que deriva del asiático, y que algunos investigadores clasifican como tercer linaje y otros como un sub-linaje del asiático (92)(93).

PATOGÉNESIS

Tras la inoculación del virus mediante la picadura de una hembra del mosquito *Aedes*, el virus infecta los fibroblastos y células dendríticas que se encuentran en la piel, empleando diferentes receptores celulares. Una vez ha infectado las células del huésped se desencadena la respuesta inmune, que incluye la liberación de múltiples citocinas. La

infección por VZIK activa la respuesta inflamatoria, así como las vías de apoptosis y de regulación de células gliales. La activación de estas vías contribuye a explicar los diferentes aspectos clínicos y complicaciones observados en las infecciones por VZIK (90)(94). EL VZIK es capaz de atravesar la barrera placentaria, infectando los macrófagos y los citotrofoblastos de la placenta. El virus también muestra cierto tropismo por células progenitoras neurales, motivo por el cual puede causar graves alteraciones neurológicas en los fetos (90).

Se ha planteado la posibilidad de que el aumento de patogenicidad observado en las infecciones por VZIK pueda deberse a un fenómeno de ADE desencadenado por la presencia de anticuerpos pre-existentes frente a VDEN. La mayoría de estudios in vitro parecen mostrar un mayor título viral en presencia de anticuerpos anti-VDEN, mientras que los estudios in vivo realizados en animales los resultados son contradictorios, aunque en la mayoría no se observa este aumento en el título viral. La falta de amplios estudios epidemiológicos impide confirmar esta hipótesis en el ser humano (95).

Por otro lado, se ha planteado también la posibilidad de que la infección por VZIK potencie una posterior infección por VDEN. Esto tendría una gran importancia clínica, ya que podría dar lugar a casos graves de dengue primario, como si se tratase de casos de dengue secundario. Aunque los estudios in vitro llevados a cabo parecen hallar títulos virales más elevados, los datos epidemiológicos muestran un descenso de casos de VDEN tras la epidemia de VZIK, lo que podría indicar cierto grado de neutralización cruzada entre ambos virus (95).

EPIDEMIOLOGÍA

El VZIK se describió por primera vez en 1947 en el bosque Zika, en Uganda, donde la Fundación Rockefeller estaba llevando a cabo estudios sobre el VFA. El VZIK se aisló por

primera vez en un primate no humano y no fue hasta 1954 cuando se describieron los primeros casos humanos en Nigeria. En años posteriores se describieron nuevos casos en el continente africano. En 1966 se aisló el virus en un mosquito en Malasia, pero no fue hasta 1977 cuando se describieron los primeros casos humanos en Asia (92).

Aunque los datos serológicos indican que el virus llevaba unos 70 años circulando tanto en África como en Asia, apenas se habían descrito una veintena de casos humanos y no se había documentado ningún brote del mismo. La escasa sintomatología y las reacciones cruzadas con otros flavivirus que podrían estar circulando por esas regiones pueden ser la causa de que el número de casos fuera infraestimado. En 2007 el virus se introdujo en la isla de Yap (Micronesia), donde dio lugar al primer gran brote conocido de VZIK. Estudios de seroprevalencia mostraron que cerca del 75% de la población resultó infectada. Este brote se siguió en 2013 por otro ocurrido en la Polinesia Francesa, siendo el virus probablemente introducido desde el Sudeste Asiático (96).

Se estima que en 2014 el virus se introdujo en Brasil desde la Polinesia Francesa (97), lo que acabaría dando lugar a la epidemia de VZIK más grande conocida en la historia, afectando a múltiples países del continente americano y causando más de un millón de casos (98). En estos momentos el virus sigue circulando en el continente americano a un nivel residual (Figura 12). En los últimos años se han seguido detectando brotes en diferentes regiones, como Cabo Verde, Singapur, Angola e India (99)(100)(101)(102).

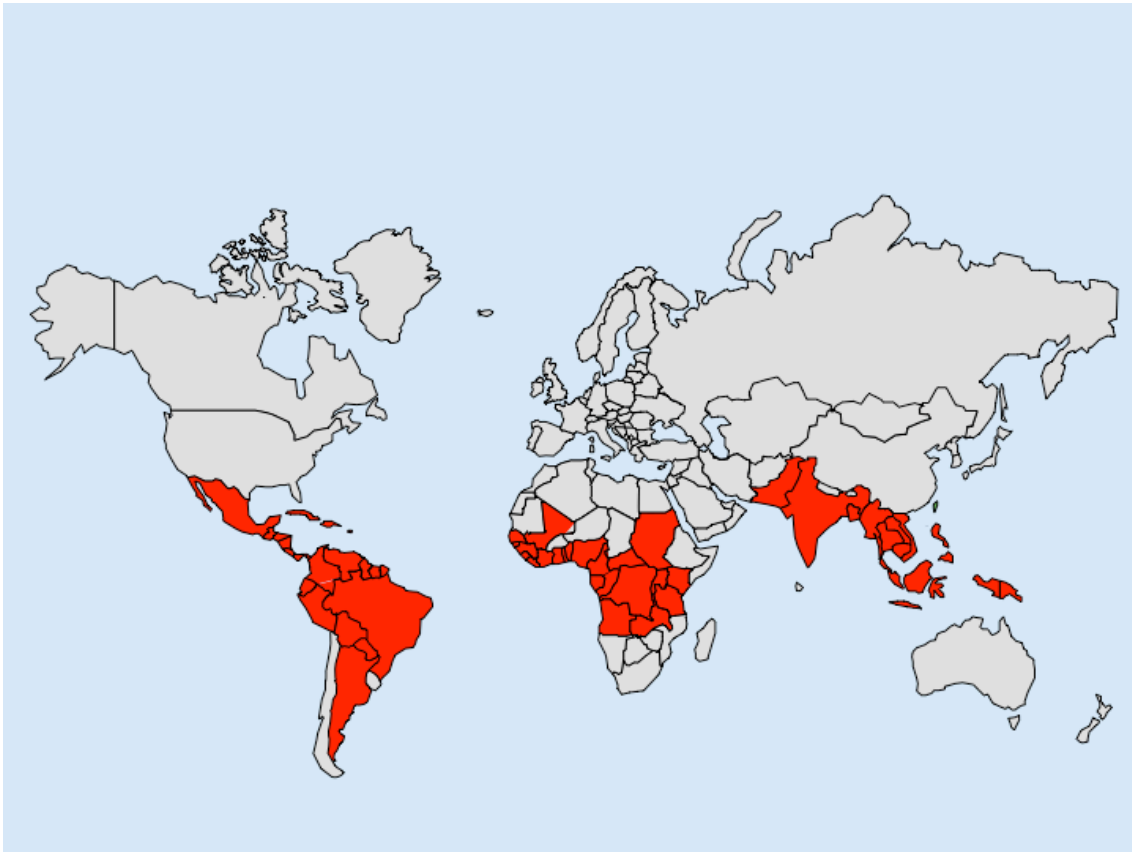


Figura 12. Mapa de áreas con transmisión autóctona sostenida de VZIK.

TRANSMISIÓN

La principal vía de transmisión de VZIK es la picadura de la hembra de mosquito *Aedes* infectada. Tras el descubrimiento del virus se creía que únicamente existía el ciclo selvático y que los casos en humanos suponían un callejón sin salida para el virus. Sin embargo, en el brote de Yap, donde no hay primates, se estableció un ciclo de transmisión urbano donde no hubo necesidad de otros reservorios. Las epidemias ocurridas desde entonces se han debido al establecimiento de ciclos urbanos. En África existen ciclos selváticos entre vectores y primates no humanos, y cabe la posibilidad de que estos ciclos estén presentes también en Asia. En América se ha especulado con el riesgo del establecimiento de estos mismos ciclos, si bien aún no hay ningún dato que apoye esta hipótesis (76).

El periodo de incubación extrínseco de VZIK es de 7-10 días, a partir de los cuales el mosquito es infectivo (103). Se ha descrito la transmisión vertical en mosquitos, con huevos de *Aedes* infectados por VZIK bien por vía transovárica o durante la inseminación (104). *Ae. aegypti* se considera el vector principal, mientras que *Ae. albopictus* también parece ser un vector competente. En el brote de Yap, donde *Ae. aegypti* apenas estaba presente, parece que *Ae. hensilii* fue el vector principal (105). En el brote de la Polinesia Francesa se cree que *Ae. aegypti* fue el vector principal, ya que la capacidad vectorial de *Ae. polynesiensis*, otro vector abundante en dicha región, parece ser reducida (104).

Tras las epidemias de VZIK acaecidas en los últimos años se han realizado múltiples estudios para poder evaluar el papel de vectores de mosquitos tanto del género *Aedes* como de otros géneros, principalmente *Culex*. Aunque hay resultados discrepantes, la competencia vectorial sólo se ha observado para los mosquitos del género *Aedes* ya mencionados (104). Lo que si se ha observado en dichos estudios es que la competencia vectorial va muy ligada al genotipo de VZIK, así como a las diferentes poblaciones de mosquitos de una misma especie (103).

La irrupción de VZIK a nivel global ha supuesto un cambio de paradigma, ya que es el primer arbovirus que además de por vía vectorial, se transmite de forma efectiva por vía sexual (al contrario que el VDENV, del que sólo se han descrito casos aislados de transmisión sexual). Se han descrito casos de transmisión sexual de hombre a mujer, de mujer a hombre y entre hombres, siendo la más frecuente la primera (106). Además, también se ha descrito transmisión vertical al feto, con graves consecuencias para el mismo que van desde la muerte fetal y graves malformaciones hasta otros tipos de déficits neurológicos (107). La transmisión puede darse en todos los trimestres, aunque parece que el riesgo para el feto es mayor en el primero. Se ha descrito transmisión fetal tanto en madres sintomáticas como en asintomáticas (108). Se ha detectado presencia de VZIK en leche materna, si bien no se ha podido confirmar que haya habido infecciones asociadas a

la lactancia materna (109). Finalmente, aunque no hay casos descritos, los datos sugieren que VZIK podría transmitirse también por transfusiones sanguíneas o accidentes de laboratorio (110).

CLÍNICA

Se estima que la mayoría de infecciones por VZIK son asintomáticas (50-80%). En aquellas en las que sí se desarrollan síntomas, el periodo de incubación intrínseco es de 3 a 14 días. Al contrario que en las infecciones por VCHIK y VDEN el comienzo no es abrupto y, en general, se observa un cuadro leve en el que los síntomas más frecuentes son fiebre, artralgias, conjuntivitis no purulenta, rash y astenia (108)(94).

Antes del primer brote importante en 2007 en la isla de Yap se consideraba que la infección por VZIK causaba un cuadro leve y autolimitado sin ninguna complicación asociada. Esto puede deberse a que el número de casos estudiados hasta ese momento era inferior a la veintena. Sin embargo, tras los primeros grandes brotes, se evidenció su relación con diferentes complicaciones. En los primeros brotes se observó por primera vez un aumento en la incidencia del SGB asociado a la infección por VZIK. El SGB es una polineuropatía aguda inmunomediada que se desarrolla en ocasiones tras un cuadro infeccioso (se ha descrito con frecuencia tras infecciones por *Campylobacter sp*, pero también tras otros arbovirus como los tratados en este trabajo). Tras una infección ocurre una activación de la respuesta inmune que actúa de forma cruzada frente a componentes de los nervios periféricos, dando lugar a este cuadro clínico. En el brote de Yap se observó por primera vez un aumento de incidencia de SGB en pacientes que habían sufrido previamente un cuadro clínico compatible con VZIK(94). Posteriormente, esto también se observó en países del continente americano (111).

Otra de las complicaciones observadas tras la infección por VZIK fue la que propició la activación de la Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional por parte de

la OMS en Febrero de 2016. En 2015 en Brasil comenzó a registrarse un aumento alarmante de los casos de microcefalia en los recién nacidos y se comenzó a trabajar con la hipótesis de que esto pudiese estar relacionado con la epidemia de VZIK. Un estudio retrospectivo del brote de Yap mostró también un aumento de la incidencia de las malformaciones fetales del sistema nervioso central en la misma época(94). Los estudios han concluido que la afectación fetal por la infección por VZIK puede dar lugar a pérdidas fetales, graves malformaciones como la microcefalia hasta u otro tipo de defectos neurológicos más sutiles que pueden incluso pasar desapercibidos en el momento del parto y apreciarse en etapas posteriores del desarrollo del recién nacido. Se calcula que un 20-30% de los fetos expuestos acaban infectándose, causando la pérdida fetal en un 4-7% de los casos, Síndrome de Zika congénito (un patrón concreto de malformaciones y/o defectos al nacimiento (112)) en un 5-14% de los casos y siendo asintomáticos los restantes. No obstante, aunque al nacimiento los bebés no presenten alteraciones, no se descarta que puedan aparecer trastornos a medio-largo plazo como pérdida de audición, problemas de visión y retrasos del desarrollo (108).

DIAGNÓSTICO

La infección por VZIK da lugar a un cuadro autolimitado leve que cursa con fiebre o febrícula, rash y artralgias entre otros. Hay un alto porcentaje de pacientes asintomáticos, pero hay situaciones en las que es necesario realizar el cribado de VZIK en asintomáticos debido a sus implicaciones en salud pública (riesgo de transmisión sexual y de transmisión materno-fetal).

El diagnóstico de laboratorio de VZIK se basa, al igual que en otros arbovirus, en pruebas directas o indirectas.

TÉCNICAS DIRECTAS

Aislamiento viral

El VZIK crece bien en diferentes líneas celulares, como LLC-MK2, Vero E6 y líneas celulares de mosquitos. Sin embargo, es un método poco sensible como herramienta diagnóstica debido en parte a la baja carga viral que presentan habitualmente las muestras de suero (113). El cultivo viral es un método laborioso y lento que hoy en día no juega un papel importante para el diagnóstico de las enfermedades virales.

Amplificación de ácidos nucleicos

La técnica de amplificación más empleada en el diagnóstico de VZIK es la RT-PCR y la muestra más frecuentemente empleada para el diagnóstico es el suero, donde habitualmente se puede detectar el virus durante la primera semana, aunque algunos estudios muestran que puede persistir positiva dos semanas e incluso más tiempo en el caso de mujeres embarazadas. La detección de virus en orina puede realizarse hasta 10-20 días tras el inicio de los síntomas (114). Se ha probado la utilidad de la RT-PCR en otras muestras como saliva o LCR. La saliva es una muestra no invasiva, por lo que un buen rendimiento haría de ella una muestra interesante para el diagnóstico. No obstante, el bajo rendimiento de esta muestra ha descartado su uso en la rutina diagnóstica (115).

Otras muestras a las que se les ha prestado especial interés son las muestras genitales, por el potencial riesgo de transmisión por vía sexual. Las muestras vaginales pueden ser positivas, pero el periodo de tiempo en el que persisten positivas es breve (114). En el caso del semen, se ha detectado ARN viral en periodos superiores a los 6 meses (116), aunque no se ha detectado virus viable más allá de los 69 días (117)(118) y en la mayoría de pacientes la persistencia de virus viable no supera los 30 días (119).

Aunque la RT-PCR es la técnica más empleada hasta el momento, también se han desarrollado métodos de amplificación isotérmica con resultados prometedores (120)(121).

Detección de antígenos

A día de hoy aún no hay disponibles técnicas comerciales de detección de antígeno para el diagnóstico de VZIK. Se han publicado estudios con métodos novedosos para la detección de antígenos de VZIK basados en biosensores o en citometría de flujo, pero su uso aún no se ha extendido y es necesaria una evaluación más extensa para valorar su aplicabilidad (122)(123).

TÉCNICAS INDIRECTAS: SEROLOGÍA

El diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos IgM e IgG frente a VZIK. La IgM aparece sobre el 5-7º día tras el inicio de los síntomas y persiste positiva durante unos meses. Se han descrito casos en los que la IgM no se ha positivizado, relacionados con pacientes que habían sufrido una infección por VDENV con anterioridad (124). Cuando se obtiene un resultado de IgM positiva aislada se recomienda el envío de una nueva muestra a las 2-3 semanas para evaluar la seroconversión. Se han descrito casos en los que no ha ocurrido seroconversión, lo que podría dificultar el diagnóstico definitivo de la infección (125). La IgG comienza a detectarse a partir de una semana tras el inicio de los síntomas y puede permanecer positiva durante años o décadas.

La principal limitación de las técnicas serológicas en el caso de VZIK es la alta tasa de reacciones cruzadas que presenta. Al ser un flavivirus, se han descrito reacciones cruzadas con todos los serotipos de VDENV, virus que es endémico en las regiones donde se ha detectado también la presencia de VZIK. Por el momento, y a falta de otras herramientas que permitan una mejor discriminación entre anticuerpos frente a diferentes arbovirus,

los test de neutralización se siguen considerando la técnica de referencia. No obstante, como ya se ha comentado previamente, son métodos laboriosos y lentos y no están disponibles en todos los laboratorios. Además, la interpretación de los resultados es compleja y no siempre permite distinguir cuál es el flavivirus causante del cuadro actual (126).

En la Tabla 5 se resumen los criterios de laboratorio para el diagnóstico de VZIK (58).

Zika probable	Zika confirmado
<p>Una de las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - IgM positiva aislada 	<p>Una de las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - RT-PCR positiva - Cultivo viral positivo - Seroconversión o aumento de cuatro veces el título en muestras pareadas - Detección de IgM específica Y confirmación por neutralización

Tabla 5. Criterios de laboratorio para el diagnóstico de VZIK.

TRATAMIENTO

El tratamiento de las infecciones por VZIK se basa en las medidas de soporte. Al igual que para los otros arbovirus comentados, no se han descrito compuestos con actividad antiviral específica. En general, la infección por VZIK es un cuadro clínico autolimitado que se soluciona en aproximadamente una semana. En el caso de aparición

de complicaciones como el SGB, habrá que seguir el manejo clínico específico de las mismas. El manejo de los niños con Síndrome de Zika congénito es complejo y requiere una atención multidisciplinaria para los niños y sus familias.

PREVENCIÓN

Al igual que en el resto de arbovirosis, la principal forma de prevención es evitar la picadura de los mosquitos vectores. En el caso del VZIK se ha descrito la transmisión por vía sexual, por lo que la abstinencia sexual y el uso de métodos barrera son medidas útiles para evitar la transmisión por esta vía (127)(128). Tras la gran epidemia de VZIK en las Américas se comenzaron a desarrollar diferentes vacunas frente al virus. La mayoría de ellas están en estudios clínicos de fase 1, pero el gran descenso de casos registrados no permite la instauración de los estudios clínicos de fase 2 y 3 (108).

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Los virus dengue, chikungunya y Zika presentan una distribución geográfica solapada y comparten los mismos vectores. Además los cuadros clínicos que pueden causar los tres virus son inespecíficos y similares entre sí. Por este motivo, realizar el diagnóstico diferencial de estos cuadros puede ser difícil. Cuando hay una sospecha de arbovirosis en la historia han de recogerse con exactitud la duración del viaje, las regiones visitadas y la posible exposición previa a otras arbovirosis. Además, hay que indicar claramente el momento del inicio de los síntomas y el tiempo transcurrido desde el comienzo de los mismos. Todos estos datos posibilitarán el manejo correcto de las muestras en el laboratorio y la realización de las pruebas diagnósticas más adecuadas en cada momento.

CLÍNICA

Los cuadros clínicos causados por las tres arbovirosis no son específicos, por lo que el diagnóstico diferencial es muy amplio. Además de otras patologías relacionadas con el viaje, como puede ser la malaria, también pueden confundirse con leptospirosis, enfermedades exantemáticas, gripe, gastroenteritis... Realizar una buena historia clínica y una buena exploración del paciente ayudará a orientar correctamente la etiología del cuadro. Los síntomas que presentan los diferentes arbovirus pueden ser los mismos, si bien la frecuencia y la intensidad de los mismos suele variar según el virus causante del cuadro. En la Tabla 6 se resumen los síntomas más frecuentes observados en estas arbovirosis (17)(69)(129).

Signos y síntomas	Dengue	Chikungunya	Zika
Causa de consulta habitual	Fiebre, mialgia	Dolor articular, fiebre	Exantema o prurito
Fiebre	>38°C Duración: 4-7 días	>38°C Duración: 3-5 días	<38°C Duración: 1-3 días
Rash	Frecuente	Frecuente	Muy frecuente
Conjuntivitis	Infrecuente	Infrecuente	Muy frecuente
Cefalea	Frecuente. Intensa	Leve o moderada.	Leve o moderada.
Dolor retroorbital	Frecuente. Intenso	Infrecuente	Infrecuente
Artralgia	Infrecuentes	Muy Frecuentes	Frecuentes
Mialgia	Muy frecuente. Intensa	Frecuente. Moderada-intensa	Infrecuente
Edema	Infrecuente	Infrecuente	Frecuente

Tabla 6. Signos y síntomas de las infecciones por dengue, chikungunya y Zika. Adaptado de (17)(69)(129).

PARÁMETROS ANALÍTICOS

Las infecciones por arbovirus pueden causar alteraciones de ciertos parámetros analíticos. Estos hallazgos analíticos no son exclusivos de las arbovirosis, pero pueden orientar el diagnóstico en algunos casos. Por ejemplo, si bien la plaquetopenia puede darse en los tres arbovirus tratados en este trabajo, una plaquetopenia marcada es más frecuente en los casos de VDEN. La leucopenia puede observarse también en los tres casos, pero si esta va acompañada de linfopenia se asocia más a la infección por VCHIK (81).

En la Tabla 7 se resumen algunos parámetros analíticos que con frecuencia pueden verse alterados en estas arbovirosis (17)(69)(129).

Parámetro analítico	Dengue	Chikungunya	Zika
Leucopenia	Muy frecuente	Frecuente	Infrecuente
Linfopenia	Infrecuente	Frecuente	Infrecuente
Trombocitopenia	Frecuente	Muy Frecuente	infrecuente
Proteína C reactiva	Normal	Elevada	Elevada
Hematocrito	Elevado (signo de alarma)	Normal	Normal

Tabla 7. Parámetros analíticos más observados en las infecciones por VDEN, VCHIK y VZIK.

Adaptado de (17)(69)(129)

Además de para realizar el diagnóstico diferencial entre arbovirus, estos parámetros también pueden ser útiles a la hora de hacer el diagnóstico diferencial con otras entidades. Así, por ejemplo, las infecciones bacterianas suelen cursar con leucocitosis, y la malaria, aunque también presenta frecuentemente trombocitopenia, no cursa con leucopenia. La proteína C reactiva también se altera con mayor frecuencia en malaria y en fiebre entérica que en infecciones por VDEN (130).

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Si bien la clínica y los datos de laboratorio nos pueden hacer sospechar una posible arbovirosis, el diagnóstico definitivo requerirá siempre de técnicas microbiológicas. Para ello contamos, como se ha visto previamente, con técnicas directas que detectan la presencia del virus o sus componentes o con técnicas indirectas o serológicas. Las técnicas directas darán un diagnóstico de certeza, si bien la ventana de tiempo en la que pueden ser empleadas es estrecha. Por el contrario las técnicas serológicas amplían la ventana

diagnóstica, aunque es más difícil alcanzar un diagnóstico de certeza únicamente con estas técnicas.

Los flavivirus se agrupan en 8 complejos antigénicos diferentes, y los alphavirus en 7. En las pruebas serológicas es frecuente observar reacciones cruzadas no sólo dentro del mismo complejo antigénico, sino frente a virus de otros complejos antigénicos. Estas reacciones cruzadas se observan con mayor frecuencia con los anticuerpos IgG. Debido a estos problemas, no se puede prescindir de técnicas serológicas más específicas como son las pruebas de neutralización, más complejas y laboriosas que las habitualmente empleadas en los laboratorios de diagnóstico clínico (131). La recomendación para realizar un correcto diagnóstico de arbovirosis mediante técnicas de neutralización es testar de forma simultánea todos los virus que circulan en la región que ha visitado el paciente y que podrían ser responsables del cuadro. Sin embargo, las técnicas de neutralización tampoco son infalibles y no siempre permiten diferenciar anticuerpos frente a distintos virus. En general, en las infecciones primarias causadas por flavivirus un resultado de un título cuatro veces superior frente a un virus que frente a los demás virus relacionados sugiere que dicho virus puede ser el causante del cuadro. No obstante, en infecciones secundarias esta técnica no permite diferenciar correctamente anticuerpos frente a VZIK de anticuerpos frente a VDEN (132).

A la hora de abordar el diagnóstico de una posible infección por arbovirus es fundamental tener en cuenta el tiempo de evolución del cuadro, ya que esto marcará la idoneidad de realizar unas técnicas u otras. La publicación de algoritmos diagnósticos de arbovirosis facilita la toma de muestras adecuada en cada momento para lograr optimizar el diagnóstico (Figura 13).

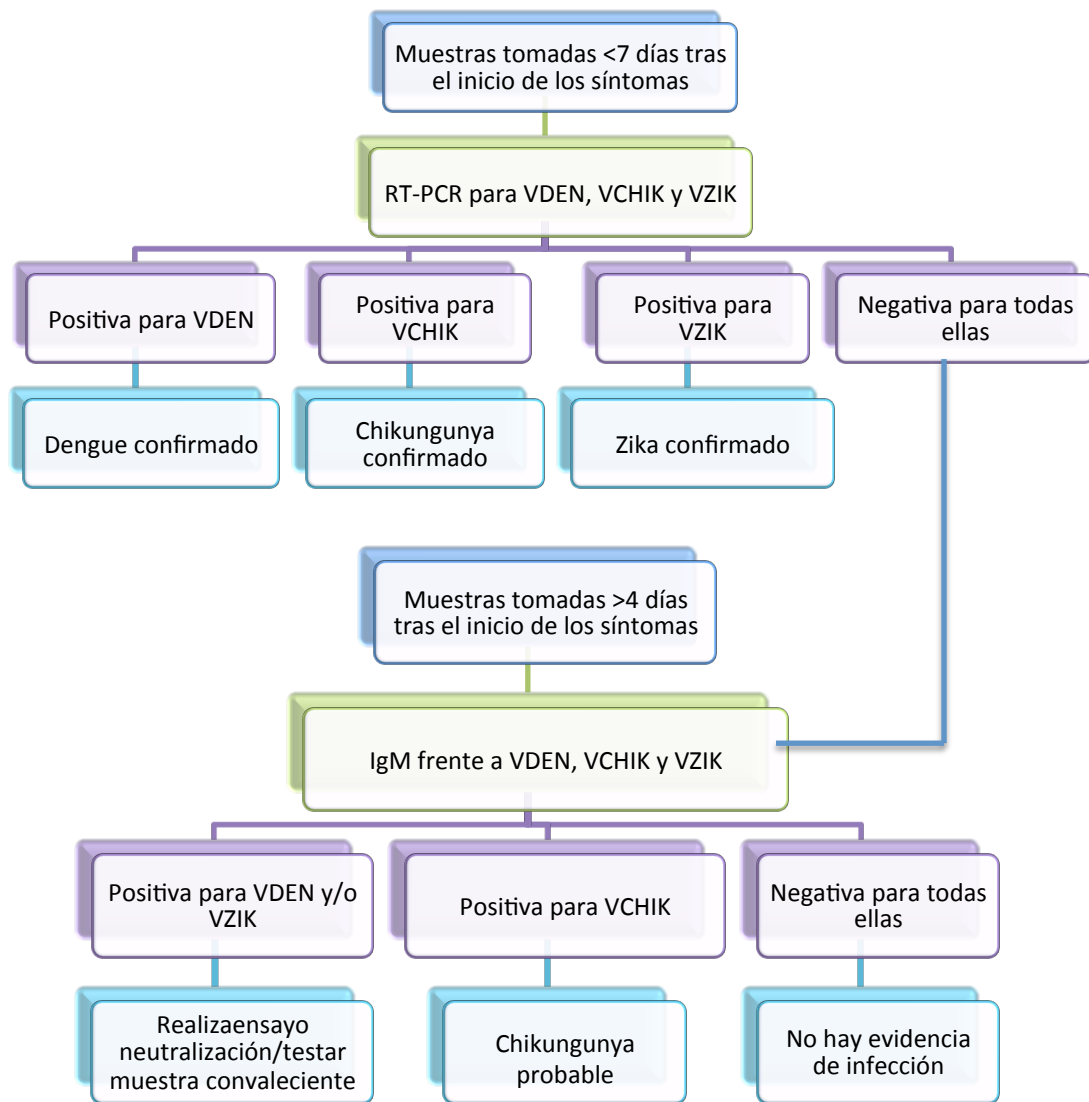


Figura 13. Algoritmo diagnóstico de arbovirosis. Adaptado de (69) (132).

SITUACIÓN EN NUESTRO MEDIO

En Europa los virus VDEN, VZIK y VCHIK no son endémicos. No obstante, el número de viajeros a zonas tropicales va en aumento y los vectores de estas enfermedades están presentes y extendiéndose en Europa, lo cual ha creado el caldo de cultivo perfecto para que esporádicamente se hayan detectado los primeros casos de transmisión autóctona de estas arbovirosis en diferentes países europeos. A continuación se resume el estado de los vectores en nuestra región, así como los casos autóctonos que se han descrito en los últimos años.

VECTORES

Ae. aegypti es el vector principal de las arbovirosis mencionadas en este trabajo. Históricamente era una especie endémica en todos los países mediterráneos así como en Portugal y en los archipiélagos de las Canarias y las Azores, hasta que durante la primera mitad del siglo XX se consiguió su erradicación. A partir de 2004 el mosquito volvió a ser detectado en la isla de Madeira y en estos momentos también está establecido en países del Este de Europa, alrededor del Mar Negro (133). En diciembre de 2017 *Ae. aegypti* fue detectado en Fuerteventura, aunque no se considera que se haya establecido en la isla. La Figura 14 muestra la distribución en Europa a Mayo de 2020.

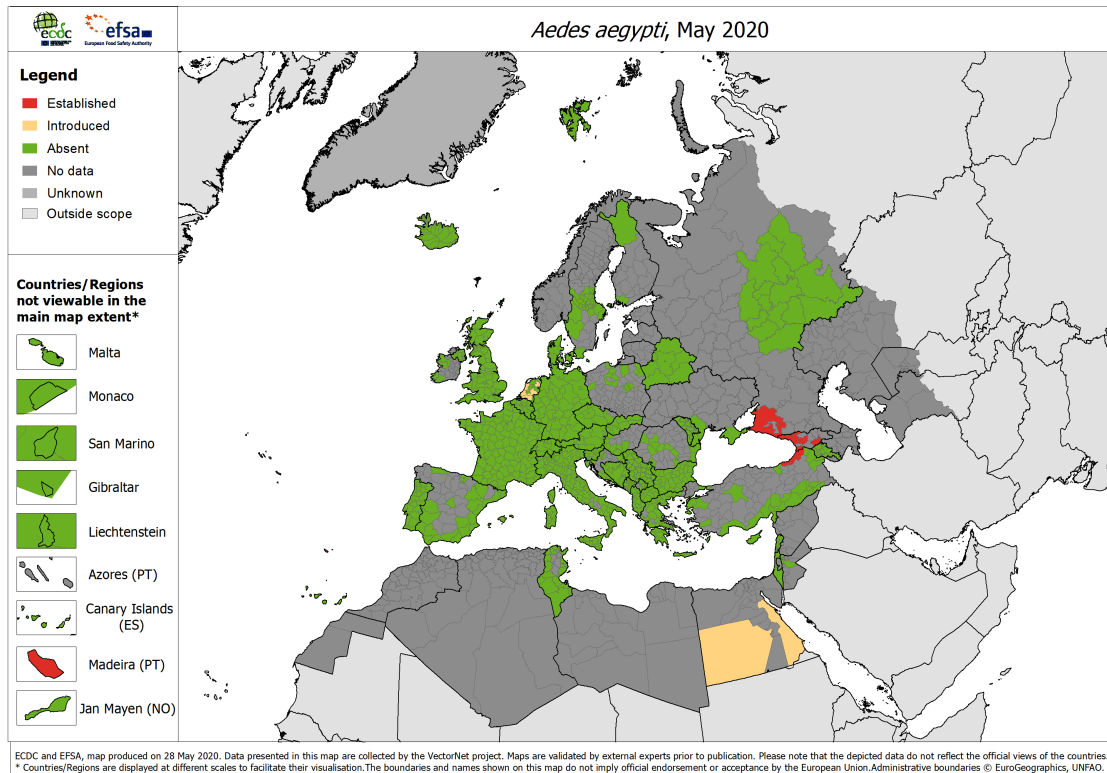


Figura 14. Distribución conocida de *Aedes aegypti* en Europa, Mayo de 2020.

(<https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>).

Ae. albopictus ha demostrado ser un vector competente para VDEN, VCHIK y VZIK, siendo especialmente importante en el caso de la cepa de VCHIK que presenta la mutación A226V. Esta especie invasora de mosquito se detectó en Europa por primera vez en 1979 en Albania (134). Posteriormente, en 1990 el mosquito fue identificado en Italia, y a partir de ahí comenzó su expansión por Europa, donde cada año aparecen nuevas regiones donde se ha certificado la presencia del vector. Se cree que una de las principales vías de entrada del mosquito fue el comercio de neumáticos usados (135). La Figura 15 muestra la distribución del vector en Europa en Mayo de 2020.

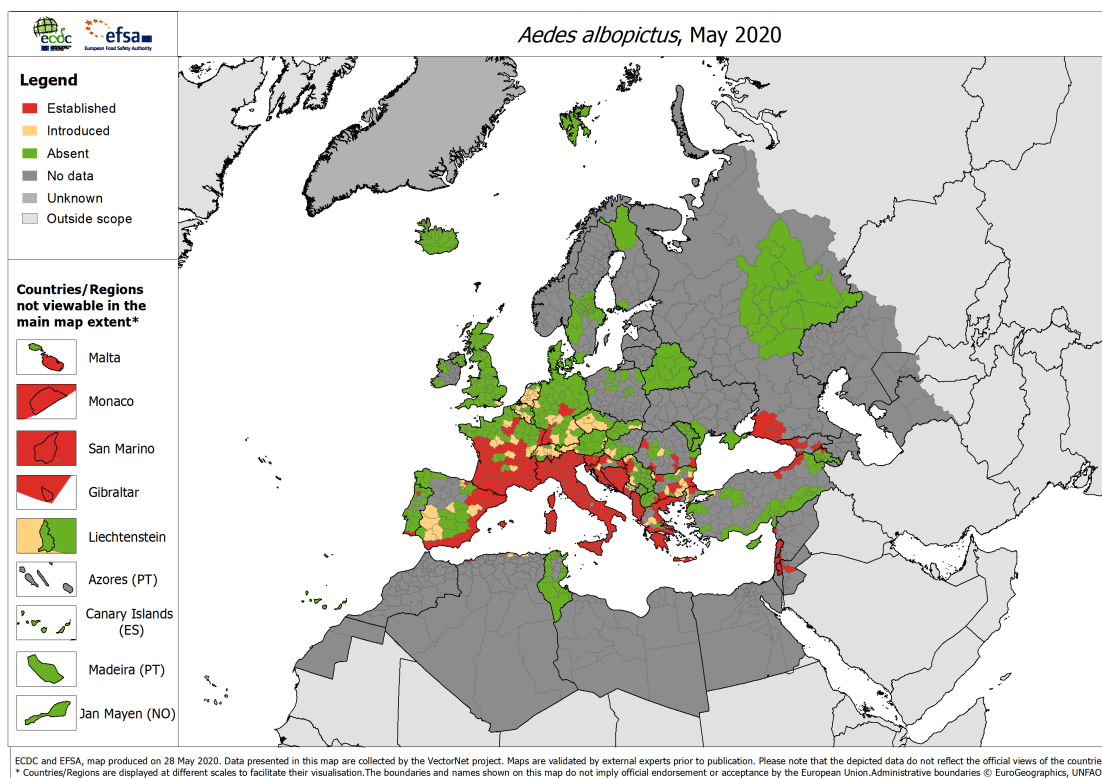


Figura 15. Distribución conocida de *Aedes albopictus* en Europa, Mayo de 2020.

(<https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>).

Su presencia en España se detectó por primera vez en 2004 en Sant Cugat del Vallés (135)(136). Desde entonces, el mosquito no ha dejado de colonizar nuevos territorios, haciendo que a día de hoy esté establecido por toda la cuenca mediterránea y que año tras año su presencia se vaya detectando en nuevas regiones. Recientemente se ha establecido en el País Vasco, en su frontera con Francia, y también se han detectado introducciones del mosquito en Extremadura (137)(138).

RIESGO DE CASOS AUTÓCTONOS

Hasta mediados del siglo XX, cuando *Ae. aegypti* aún era una especie habitual en ciertas regiones de Europa, ocurrían brotes de VDEN con cierta frecuencia, siendo uno de los últimos registrados el que ocurrió en Grecia en 1927-1928 (133). Tras la desaparición del mosquito no volvieron a detectarse casos autóctonos de la enfermedad. Sin embargo,

el nuevo establecimiento de los vectores junto con el alto número de viajeros que regresan de zonas endémicas de estos arbovirus ha hecho que a comienzos del siglo XXI estemos observando nuevamente casos autóctonos y brotes de diferentes arbovirosis en Europa.

En el año 2010 se describieron los primeros casos de VDEN autóctono en Europa. Por un lado, se detectó un primer caso en Francia de un paciente que no había viajado previamente, pero había recibido visitas de unos amigos que residían en una zona endémica. Un tiempo después se detectó un segundo caso en el mismo vecindario (139). Ese mismo año un paciente que regresaba de Croacia fue diagnosticado de infección por VDEN en Alemania. Era el primer dato que hacía sospechar la transmisión de VDEN en la zona, por lo que se inició un estudio que acabó encontrando otro caso de dengue autóctono en Croacia. Posteriores estudios serológicos obtuvieron resultados que respaldaban la hipótesis de que el virus estaba circulando en la zona (140).

El VDEN causó un brote en la isla de Madeira en 2012, en el que se diagnosticaron más de 2.100 casos y que dio lugar a casos importados en múltiples países europeos (11). Estudios posteriores mostraron una seroprevalencia de hasta un 7,8%, un porcentaje de afectados mayor de lo calculado inicialmente teniendo en cuenta los casos confirmados en el brote (141). En este caso el vector fue *Ae. aegypti*.

Otro caso de dengue autóctono fue descrito en Francia en 2013, siendo el caso índice diagnosticado tras la investigación desarrollada por la detección del caso autóctono (142).

En verano de 2015 hubo un pequeño brote de dengue autóctono en Francia, donde se detectaron 7 casos de dengue autóctono y se pudo identificar al caso primario, que era un paciente que había regresado de la Polinesia Francesa y había sido diagnosticado de VDEN-1 a su regreso a Francia (143).

En los años 2018 y 2019 se han descrito los primeros casos autóctonos de dengue en España. En 2018 se describieron 5 casos en la región de Murcia, tres en Agosto y otros dos en Septiembre. En Octubre se detectó un caso en Cataluña, sin relación con los casos

previos. Todos ellos eran VDEN-1 (144). En Septiembre de 2019 se ha detectado un caso más en Cataluña. En Francia se han detectado cinco casos autóctonos entre Agosto y Septiembre de 2019 (145). En todos los casos, excepto en el brote de Madeira, el vector fue *Ae. albopictus*. En 2019 se ha descrito el primer caso autóctono de VDEN en España por transmisión sexual, y segundo descrito en el mundo con esta vía de transmisión (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Communicable-disease-threats-report-9-nov-2019.pdf>).

El VCHIK causó los primeros casos autóctonos en Europa en un brote en 2007 en Italia. El caso índice fue un paciente que había regresado de India. Hubo 337 casos sospechosos de los que se confirmaron más de 200 casos. La cepa de VCHIK implicada en este brote presentaba la mutación A226V (11). En 2017 se dieron dos brotes en Italia, el primero en la región central y el segundo en el sur, derivado del primero. En total se dieron cerca de 500 casos y la cepa implicada no presentaba la mutación A226V (146)(147).

En 2010 se detectó el primer brote en Francia, por una cepa que no presentaba la mutación A226V (11). Posteriormente, en 2014 se diagnosticaron 12 casos de chikungunya en Montpellier (73) y en 2017 se detectó otro brote de 9 casos autóctonos en la región francesa de Var (148). En estos dos últimos brotes las cepas presentaban la mutación A226V.

En España por el momento no se ha registrado ningún caso autóctono de VCHIK.

La posibilidad de transmisión sexual de VZIK hizo que los primeros casos autóctonos tuvieran lugar por esta vía de transmisión, involucrando a pacientes que regresaban infectados de regiones donde había una epidemia activa por VZIK y transmitían la infección a pacientes que no habían viajado. Se describieron casos de

transmisión sexual en diferentes países Europeos (149)(150)(151)(152) y también se describieron casos de afectación neonatal por el virus (153).

En Agosto de 2019 se han descrito los primeros casos de VZIK por transmisión vectorial en Francia. En este caso el vector habría sido *Ae. albopictus*, ya que es el único que se encuentra en la zona (154). En España no se ha detectado ningún caso de transmisión autóctona de VZIK hasta el momento (sí se describieron casos de transmisión sexual (<https://www.redaccionmedica.com/secciones/sanidad-hoy/sanidad-confirma-un-segundo-caso-en-espana-de-zika-por-transmision-sexual-8022>)), pero un estudio ha demostrado la presencia de vectores competentes en el entorno de casos importados, por lo que existe riesgo de que se den casos autóctonos (**Anexo 1**).

PREVENCIÓN Y CONTROL

La situación actual hace que cada vez sean más necesarios los protocolos de control de arbovirosis. Teniendo en cuenta que el vector ya está establecido en nuestro medio, hay que prestar especial atención a la introducción del virus, que ocurre normalmente en forma de viajeros infectados que regresan de zonas endémicas.

Para llevar a cabo el control de estas arbovirosis el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad publicó en Abril de 2016 el “Plan Nacional de Preparación y Respuesta frente a Enfermedades Transmitidas por Vectores. Parte I: Dengue, chikungunya y Zika” (https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/DocsZika/Plan_Nac_enf_vectores_20160720_sin_CC.pdf), que tiene como objetivos mejorar los sistemas de vigilancia epidemiológicos y entomológicos, establecer criterios para la gestión del vector, reforzar mecanismos de coordinación y comunicación, apoyar la elaboración de planes autonómicos y locales y reforzar la comunicación del riesgo a la población.

Previamente Cataluña ya contaba con el protocolo para la vigilancia y control de las arbovirosis importadas transmitidas por mosquitos en Cataluña (Protocol per a la vigilància i el control de les arbovirosis importades transmeses per mosquits a Catalunya, http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_Professionals/Vigilancia_epidemiologica/documents/arxius/protocol_arbovirosis_cat.pdf), cuyos objetivos principales son detectar los casos de arbovirosis importados o autóctonos en Cataluña e implementar medidas de control epidemiológico y de vectores, para tratar de evitar la aparición de nuevos casos autóctonos. Es un protocolo que se actualiza con frecuencia para incluir las últimas recomendaciones de diagnóstico y vigilancia.

La epidemia de VZIK que comenzó en la región de las Américas en 2015 propició la declaración de una Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional por parte de la OMS debido a los casos de fetos con microcefalia que se detectaron asociados a esta infección. El Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, con el apoyo de varias asociaciones científicas, publicó el “Procedimiento de manejo de la infección por virus Zika durante el embarazo y en recién nacidos”, que se actualizó por última vez en Abril de 2017 (https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/DocsZika/BIS-Procedimiento-manejo-conjunto-Zika_20170428_sin_marca.pdf).

En Cataluña existe un protocolo de actuación frente a casos de fiebre de Zika en el ámbito obstétrico y pediátrico de Cataluña (Protocol d'actuació davant de casos de febre vírica de Zika en l'àmbit obstètric i pediàtric de Catalunya http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_A-Z/Z/zika/documents/ProtocolObstetric_prov.def.pdf). Este protocolo, actualizado por última vez en Marzo de 2019, incluye las últimas indicaciones de manejo de las pacientes y los recién nacidos, así como los algoritmos diagnósticos recomendados para confirmar la infección en estos casos.

El diagnóstico y control de las arbovirosis requiere pruebas diagnósticas rápidas y fiables que permitan clasificar correctamente los casos sospechosos. Para ello, hay que evaluar las técnicas diagnósticas disponibles para seleccionar las más idóneas en cada momento. Hay que poner especial énfasis en la circulación simultánea de varios virus con cuadros clínicos solapados y, frecuentemente, relacionados genéticamente, lo que requerirá la reevaluación de las técnicas empleadas hasta el momento para valorar su utilidad en la situación actual.

ARTÍCULO 1

Arbovirosis emergentes y reemergentes: dengue, chikungunya, Zika y fiebre del Nilo Occidental. Revisión de su distribución geográfica, mecanismos de transmisión y diagnóstico.

Autores:

Izaskun Alejo-Cancho, Miguel J. Martínez Yoldi, María Velasco Arribas y Grupo de Trabajo de Enfermedades Emergentes de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI)

Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:

Revista de Enfermedades Emergentes, 19(1): 19-32, 2020

Factor de impacto - Cuartil: Revista no indexada

Resumen:

Los arbovirus no son un grupo filogenético, sino un conjunto de virus pertenecientes a distintas familias que comparten la vía de transmisión a través de artrópodos. Hoy día suponen una amenaza para la salud global. Suelen ser virus ARN, lo que les permite una mayor adaptación a los huéspedes susceptibles y a cambios en el ambiente. Muchos arbovirus causan zoonosis con complejos ciclos de transmisión en los que participan huéspedes vertebrados y artrópodos vectores. Los ciclos pueden ser enzoótico o selvático, doméstico y urbano. Los principales vectores de estos arbovirus son mosquitos de los géneros *Aedes* (virus dengue, chikungunya y Zika) y *Culex* (virus del Nilo Occidental), aunque para los diferentes virus también se han descrito otros medios de transmisión como trasplantes, transfusiones y accidentes de laboratorio. En el caso del virus Zika también existe la transmisión sexual y vertical. Los virus analizados en esta revisión comparten en gran medida distribución geográfica (América Latina, África

subsahariana, subcontinente indio y Sudeste Asiático) con excepción del virus del Nilo Occidental, que presenta mayor diseminación en el planeta. Este último virus es el único arbovirus de los cuatro que es autóctono en España. En los últimos 20 años se han producido grandes epidemias de estos arbovirus debido a la expansión de vectores competentes y a la introducción de virus en regiones donde no se habían descrito (virus Zika). El diagnóstico de estos virus puede realizarse por técnicas directas como reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en distintas muestras clínicas (sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, etc.), con ventanas de detección diferentes en cada caso o mediante serología. El inconveniente del diagnóstico serológico es la tasa de reacciones cruzadas que requieren la realización de pruebas de neutralización, mucho más complejas, para conseguir un diagnóstico más específico. Es necesario conocer la clínica, distribución y métodos diagnósticos de estas arbovirosis para poder realizar un correcto diagnóstico y tratamiento de las mismas en zonas no endémicas.

Arbovirosis emergentes y reemergentes: dengue, chikungunya, Zika y fiebre del Nilo Occidental. Revisión de su distribución geográfica, mecanismos de transmisión y diagnóstico

Izaskun Alejo-Cancho¹, Miguel J. Martínez Yoldi¹, María Velasco Arribas² y Grupo de Trabajo de Enfermedades Emergentes de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI)³

¹Departamento de Microbiología, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Instituto de Salud Global de Barcelona. Universidad de Barcelona. ²Sección de Infecciosas y Medicina Tropical. M.Interna. Hospital Universitario Fundación Alcorcón. Universidad Rey Juan Carlos. ³Miembros del Grupo de Trabajo de Enfermedades Emergentes de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI).

Miembros del Grupo de Trabajo de Enfermedades Emergentes de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI):

Jesús Roche. Escuela Nacional de Sanidad, Madrid.

Basilio Valladares. Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (Universidad de La Laguna).

Cesar Velasco. ISGlobal, Barcelona Ctr. Int. Health Res. (CRESIB). Hospital Clínic - Universitat de Barcelona. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).

Diana Pou. Unidad de Medicina Tropical Drassanes/Vall d'Hebron. Programa de Salud Internacional del ICS (Prosics). Barcelona.

Jesús García Calleja. WHO.

Milagros García Hortelano. Unidad de Adopción Internacional y Consulta del Niño Viajero. Servicio de Pediatría hospitalaria, Enfermedades Infecciosas y Tropicales. Hospital Universitario Infantil La Paz-Carlos III. Madrid.

María Paz Sánchez-Seco y Anabel Negrodo Antón. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

Miguel Mínguez. Asesor AMSE (Asociación de Médicos de Sanidad Exterior).

José Muñoz. Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Instituto de Salud Global de Barcelona.

Francisco Giménez. Instituto Balmis de Vacunas. Instituto Hispalense de Pediatría.

Marta Arsuaga. Unidad de Medicina Tropical y del Viajero del Hospital La Paz-Carlos III.

Fernando de la Calle-Prieto. Unidad de Medicina Tropical y del Viajero del Hospital La Paz-Carlos III.

Resumen

Los arbovirus no son un grupo filogenético, sino un conjunto de virus pertenecientes a distintas familias que comparten la vía de transmisión a través de artrópodos. Hoy día suponen una amenaza para la salud global. Suelen ser virus ARN lo que les permite una mayor adaptación a los huéspedes susceptibles y a cambios en el ambiente. Muchos arbovirus causan zoonosis con complejos ciclos de transmisión en los que participan huéspedes vertebrados y artrópodos vectores. Los ciclos pueden ser enzoótico o selvático, doméstico y urbano. Los principales vectores de estos arbovirus son mosquitos de los géneros *Aedes* (virus dengue, chikungunya y Zika) y *Culex* (virus del Nilo Occidental), aunque para los diferentes virus también se han descrito otros medios de transmisión como trasplantes, transfusiones y accidentes de laboratorio. En el caso del virus Zika también existe la transmisión sexual y vertical. Los virus analizados en esta revisión comparten en gran medida distribución geográfica (América Latina, África subsahariana, subcontinente indio y sudeste asiático) con excepción del virus del Nilo Occidental, que presenta mayor diseminación en el planeta. Este último virus es el único arbovirus de los 4 que es autóctono en España. En los últimos 20 años se han producido grandes epidemias de estos arbovirus debido a la expansión de vectores competentes y a la introducción de virus en regiones donde no se habían descrito (virus Zika). El diagnóstico de estos virus puede realizarse por técnicas directas como reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en distintas muestras clínicas (sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, etc.), con ventanas de detección diferentes en cada caso o mediante serología. El inconveniente del diagnóstico serológico es la tasa de reacciones cruzadas que requieren la realización de pruebas de neutralización, mucho más complejas, para conseguir un diagnóstico más específico. Es necesario conocer la clínica, distribución y métodos diagnósticos de estas arbovirosis para poder realizar un correcto diagnóstico y tratamiento de las mismas en zonas no endémicas.

Palabras clave:

Arbovirus.
Distribución geográfica.
Mecanismos de transmisión.
Prevención.

Emergent and re-emergent arbovirolosis: dengue, chikungunya, Zika and West Nile fever. Review of geographical distribution, transmission and diagnosis

Summary

Arboviruses are not a phylogenetic group, but a group of viruses belonging to different families that share the route of transmission through arthropods. Today they pose a threat to global health. They are usually RNA viruses, which allows them greater adaptation to susceptible hosts and environmental change. Many arboviruses are zoonoses with complex transmission cycles involving vertebrate hosts and arthropod vectors. The cycles can be enzootic or wild, domestic and urban. The main vectors are mosquitoes of the genera *Aedes* (dengue, chikungunya and Zika virus) and *Culex* (West Nile virus). However, alternative transmission mechanisms have been described, such as transplantation, blood transfusion and laboratory exposure. Zika virus can also be transmitted sexually. The viruses analyzed in this review largely share geographical distribution (Latin America, sub-Saharan Africa, Indian subcontinent and Southeast Asia) with the exception of West Nile virus, which is the most widespread on the planet and is the only autochthonous arbovirus in Spain among the viruses reviewed in this paper. Large epidemics of these arboviruses have occurred in the last 20 years due to the expansion of competent vectors and the introduction of viruses in regions where they had not been described (Zika virus). The diagnosis of these viruses can be made by direct techniques such as polymerase chain reaction with RT-PCR reverse transcriptase in different clinical samples (blood, urine, saliva, cerebrospinal fluid, etc.), with different detection windows in each case or by serology. The drawback of the serological diagnosis is the rate of cross reactions that require neutralization tests, much more complex, to achieve a more specific diagnosis. It is necessary to know the clinical, distribution and diagnostic methods of these arbovirolosis to be able to make a correct diagnosis and treatment of them in non-endemic areas.

Key words:

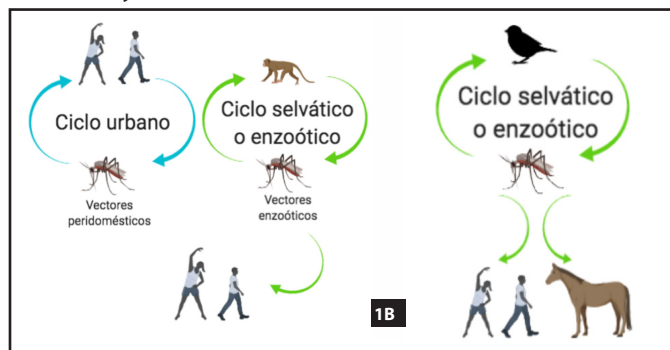
Arbovirus.
Geographical distribution.
Transmission. Diagnosis.
Prevention.

Introducción

El término arbovirus (*arthropod-borne virus*) hace referencia a un grupo heterogéneo de virus que se caracteriza por ser transmitidos por vectores artrópodos (fundamentalmente mosquitos, garrapatas y moscas de la arena). Los arbovirus no son un grupo filogenético, sino un grupo de virus pertenecientes a distintas familias que comparten la vía de transmisión¹. La mayoría de ellos son virus ARN (con la única excepción del género *Asfavirus*), lo que les permite adaptarse fácilmente a nuevos huéspedes y a cambios en el ambiente.

Muchos de los arbovirus causan zoonosis que se mantienen mediante unos complejos ciclos de transmisión en los que participan huéspedes vertebrados y artrópodos vectores (Figura 1). A grandes rasgos, los arbovirus presentan un ciclo enzoótico o selvático en el cuál la transmisión se da entre los vectores artrópodos y el principal huésped vertebrado. En este ciclo el animal salvaje no suele presentar clínica debida a la infección, o si la presenta es muy leve. El ciclo epizoótico o rural es aquel que tiene lugar entre el vector principal u otros vectores y animales domésticos o peridomésticos. Esto puede dar lugar a epidemias en animales que habitualmente no están expuestos al patógeno, causando una gran morbimortalidad. Finalmente, en el ciclo urbano, la transmisión ocurre principalmente entre humanos y vectores. Este ciclo se desarrolla tras la entrada en contacto del ser humano con alguno de los ciclos previos (el selvático o el rural). En algunos casos (virus dengue, virus chikungunya) el ciclo urbano es suficiente para mantener la transmisión entre humanos, sin requerir los otros ciclos para la persistencia de la enfermedad

Figura 1. 1A. Ciclo de transmisión de los virus dengue, Zika y chikungunya. Los principales hospedadores vertebrados son representados arriba del ciclo y los vectores artrópodos abajo: *Aedes aegypti*/*Ae. albopictus* para el ciclo urbano y otras especies de *Aedes* para el ciclo selvático. 1B. Ciclo de transmisión del virus del Nilo Occidental. El ser humano y caballos son huéspedes terminales y los vectores artrópodos son *Culex* y *Aedes*.

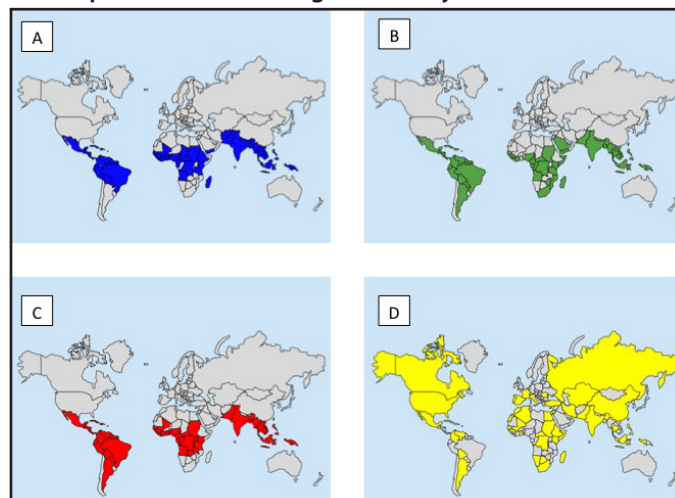


en una región. Sin embargo, en otros casos como el del virus del Nilo Occidental, los humanos no son buenos amplificadores del virus, por lo que se convierten en huéspedes terminales que no pueden volver a infectar al vector y por lo tanto no permiten que se complete el ciclo. En estos casos los ciclos selvático y rural son los que tienen un papel importante en el mantenimiento de la enfermedad, mediante la presencia de huéspedes vertebrados que son buenos amplificadores del virus².

Los arbovirus son una importante causa de enfermedad a nivel mundial³. Un gran número de los arbovirus conocidos circulan en regiones tropicales y subtropicales, donde hay gran abundancia de vectores competentes. El virus dengue (DENV) y el virus del Nilo Occidental (VNO) son dos ejemplos de arbovirus con una amplia distribución mundial (Figura 2)^{4,5}. Otros arbovirus tienen una distribución geográfica más limitada, siendo endémicos de regiones donde se encuentran los vectores y las condiciones óptimas para su transmisión. No obstante, la expansión de vectores competentes y la introducción de virus en regiones donde previamente no se habían descrito ha dado lugar en los últimos años a grandes epidemias de diferentes arbovirus, como la de VNO en Nueva York en 1999⁶, las de chikungunya en la isla La Reunión en 2005 y en las Américas en 2013⁷ y la más reciente epidemia de Zika que comenzó en Brasil en 2015⁸.

La emergencia de los arbovirus no puede explicarse por un único factor⁹⁻¹¹. La globalización, con viajes internacionales cada vez más frecuentes y rápidos; la expansión de vectores competentes; el establecimiento del ser humano en regiones previamente no urbanizadas, la posibilidad de mutaciones virales o el comportamiento humano son algunos de los factores que

Figura 2. Mapas de áreas con transmisión autóctona sostenida de dengue (A), chikungunya (B), Zika (C) y virus del Nilo Occidental (D). La falta de datos en algunas regiones puede hacer que las áreas de riesgo sean mayores.



juegan un papel importante en la emergencia y re-emergencia de estos patógenos.

Debido a su amplia distribución y a las recientes epidemias, es de vital importancia la sospecha clínica ante los casos sugestivos de arbovirosis. Se requieren también herramientas adecuadas para realizar un diagnóstico etiológico rápido y certero de estos cuadros, que permita implementar las medidas de control y terapéuticas adecuadas frente a cada patógeno. El diagnóstico de laboratorio de las arbovirosis se basa en técnicas de detección directa y en técnicas serológicas o indirectas^{12,13}. Las técnicas directas incluyen el aislamiento del virus, la detección del genoma viral mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, del inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*), y la detección de antígenos virales. Estas técnicas pueden llevarse a cabo durante la fase aguda, cuando el virus o sus compuestos se encuentran en el organismo. Aportan un diagnóstico de confirmación, pero la ventana de tiempo en la que pueden realizarse es por lo general limitada (según el periodo de viremia o de excreción de cada patógeno).

Las técnicas indirectas o serológicas se basan en la detección de anticuerpos producidos frente al patógeno. Estas permiten ampliar la ventana diagnóstica, pero requieren muestras pareadas para confirmar el diagnóstico mediante seroconversión o aumento de título. Además hoy en día, con múltiples arbovirus de la misma familia circulando en las mismas regiones, las pruebas serológicas muestran graves problemas de reacciones cruzadas que limitan su utilidad diagnóstica¹⁴. En la medida de lo posible, se debe combinar el uso de técnicas directas e indirectas a fin de incrementar las posibilidades de un diagnóstico de confirmación.

Los arbovirus representan hoy en día una importante amenaza para la salud global^{9,15}. La sospecha clínica y unas herramientas diagnósticas adecuadas son indispensables para hacer frente a este problema y tratar de evitar la expansión de estas enfermedades. El objetivo de este trabajo es revisar la distribución geográfica, transmisión y diagnóstico de cuatro de los arbovirus con mayor importancia actual: DENV, CHIKV, ZIKV y VNO.

Dengue

Aunque no se sabe con seguridad, se cree que el término dengue deriva de la frase en swahili "*ki-dinga pepo*", que quiere decir calambre causado por un mal espíritu. El DENV es un arbovirus del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, del que se han descrito cuatro serotipos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). Se considera la enfermedad viral transmitida por mosquitos más prevalente a nivel mundial, con una estimación de 390 millones de infecciones por DENV al año, 96 millones de las

cuales producen enfermedad clínica⁴. En 2013 se sugirió la existencia de un quinto serotipo (DENV-5) en muestras de suero de una epidemia de malaria ocurrida en 2007¹⁶, si bien este hallazgo no ha sido suficientemente confirmado.

Distribución geográfica

Se cree que DENV se originó en el continente africano y durante los siglos XVIII y XIX se expandió por todas las regiones tropicales, acompañando la expansión de su principal vector *Aedes aegypti*¹⁷. En siglos posteriores la introducción de diferentes serotipos y nuevas cepas en dichas regiones derivó en la situación actual, en la que la mayoría de regiones tropicales son hiperendémicas, es decir, múltiples serotipos circulan en ellas de forma simultánea.

En la actualidad, el DENV se encuentra en regiones tropicales y subtropicales, afectando aproximadamente a 125 países y poniendo en riesgo a 2.500 millones de personas, casi la mitad de la población mundial⁴. Su distribución abarca países del Sudeste Asiático, Centro y Sudamérica, Pacífico occidental y África, afectando así a 5 de las 6 regiones definidas por la OMS (todas excepto la europea; <https://www.who.int/about/regions/es/>).

Algunos factores como la expansión de los vectores y la rapidez de los viajes internacionales hacen que el riesgo de introducir DENV en nuevas zonas sea alto, dando lugar a epidemias por nuevos serotipos en zonas endémicas o brotes en lugares previamente no endémicos¹⁵. Así, se han descrito casos autóctonos aislados o pequeños brotes en algunos países europeos, como Francia y Croacia¹⁸⁻²⁰ e incluso grandes epidemias, como la descrita en la isla portuguesa de Madeira en 2012²¹. Recientemente se han descrito también 6 casos autóctonos de dengue en España²².

Transmisión

La principal vía de transmisión del DENV es la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes*. En el caso del DENV el ciclo urbano es el que mantiene la presencia de la enfermedad en zonas endémicas, teniendo el ciclo selvático en el que toman parte primates no-humanos un papel de dudosa importancia desde el punto de vista de salud pública.

Aedes aegypti es el vector principal y el que se encuentra más ampliamente distribuido en las zonas endémicas. El mosquito *Aedes albopictus*, también conocido como mosquito tigre, es igualmente capaz de transmitir la enfermedad, aunque su capacidad como vector es inferior a la de *Aedes aegypti*. No obstante, el mosquito tigre es de gran importancia por su capacidad para expandirse y colonizar nuevas áreas, como ha ocurrido en la región Europea²³.

Tanto *Ae. aegypti* como *Ae. albopictus* son mosquitos de actividad diurna, por lo que las mosquiteras impregnadas con insecticida que se emplean para controlar otras enfermedades transmitidas por mosquitos nocturnos son menos eficientes en este caso. *Aedes aegypti* habita principalmente en ambientes peridomésticos de regiones tropicales y subtropicales y es principalmente antropófilo, alimentándose tanto en ambientes exteriores como interiores²⁴. Es frecuente su patrón de alimentaciones parciales, picando varios individuos durante la ingesta. Esta especie de mosquito cría en pequeños reservorios de agua como floreros o pequeños recipientes de agua y existe transmisión vertical del virus desde la hembra del mosquito a los huevos que deposita. Los hábitats de ambas especies son similares, necesitando únicamente pequeños depósitos de agua para criar²³. En general, *Ae. albopictus* es abundante en zonas rurales y periurbanas, puede sobrevivir en zonas más templadas (al contrario que *Ae. aegypti*) y se alimenta de diferentes especies de animales, aunque en ambientes urbanos tiene un comportamiento principalmente antropofílico²⁵. El rango medio de temperatura en el que ocurre la transmisión oscila entre 18-34 °C, siendo máxima entre 26 y 29 °C²⁶.

Los mosquitos se infectan al alimentarse de la sangre de una persona en fase virémica (fase aguda de la enfermedad en la que el virus circula en la sangre del paciente). En ese momento comienza el periodo de incubación extrínseco, que es el que transcurre entre la ingesta de la sangre hasta que el virus alcanza las glándulas salivares del mosquito, momento en el cual se vuelve infeccioso. El periodo de incubación extrínseco puede durar unos 8-12 días, pero se ve afectado por factores como la temperatura, siendo más breve en ambientes más cálidos. El periodo de incubación intrínseco es el que va desde la infección (tras la picadura del mosquito) hasta la aparición de los síntomas en el ser humano (3-14 días)²⁷.

Además de la transmisión vectorial se han descrito otras vías de transmisión menos frecuentes, como la transmisión a partir de transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos, accidentes de laboratorio o transmisión vertical durante el embarazo^{28,29}.

Diagnóstico

La infección por DENV puede ser asintomática o provocar desde un cuadro leve hasta un cuadro grave con síntomas hemorrágicos³⁰. Entre los síntomas más frecuentes se encuentran cefalea, fiebre, rash, malestar general, mialgias, etc. Los síntomas son muy inespecíficos, por lo que se requieren pruebas específicas para realizar un diagnóstico etiológico que permita diferenciarlo de otras enfermedades tropicales.

La detección del genoma viral mediante RT-PCR puede llevarse a cabo durante el periodo virémico, desde 24-48 horas

antes del inicio de los síntomas hasta 5-6 días después del inicio, detectándose en casos aislados hasta 8 días después del inicio de los síntomas. Otro método de diagnóstico directo de gran utilidad en el caso de la infección por DENV es la detección de antígeno NS1 circulante. Esta también se detecta durante el periodo virémico y puede prolongar un poco más la ventana de diagnóstico. La detección de antígeno puede llevarse a cabo mediante técnicas rápidas como las basadas en inmunocromatografía, que permiten la obtención de resultados en escasos minutos, pero presentan una sensibilidad limitada. Otro método para la detección de antígeno NS1 es el ELISA, el cual tiene un mayor rendimiento diagnóstico pero es una técnica más lenta y laboriosa²⁷.

La RT-PCR puede emplearse también en muestras de orina y saliva. La orina puede dar resultados positivos entre los días 6 y 16 tras el inicio de los síntomas, lo que permitiría ampliar la ventana diagnóstica³¹.

Los anticuerpos IgM, una de las pruebas más empleadas a nivel global para el diagnóstico, pueden detectarse a partir de 3-5 días tras el inicio de los síntomas y pueden persistir positivos unos meses³². Los anticuerpos IgG positivizan unos 7-10 días tras el inicio del cuadro y se mantienen positivos durante toda la vida³¹.

El DENV presenta una peculiaridad que no se da en otros *arbovirus*, y es que una persona a lo largo de la vida puede padecer la infección hasta 4 veces, una por cada uno de los serotipos. La primera infección por dengue, sea cual sea el serotipo, se conoce como dengue primario. A partir de esta infección, todas las posteriores se conocen como dengue secundario. La infección por un segundo serotipo de dengue puede dar un cuadro clínico más grave que el del dengue primario. Uno de los mecanismos más aceptados que explican este fenómeno es la potenciación inmunitaria o ADE (*Antibody Dependent Enhancement*). Brevemente, los anticuerpos presentes frente al serotipo previo se unen al virus pero no son capaces de neutralizarlo y acaban favoreciendo su multiplicación en células como los macrófagos causando una infección más grave³³. Sin embargo, también son posibles casos de dengue severo e incluso hemorrágico en infecciones primarias y otros mecanismos fisiopatogénicos además del ADE pueden jugar un papel en el desarrollo de cuadros severos por dengue.

El diagnóstico del dengue secundario tiene unas características que difieren del diagnóstico del dengue primario. En el dengue secundario al inicio de la infección pueden detectarse anticuerpos IgG frente al dengue previo, y la respuesta IgM frente al episodio actual puede ser baja o nula. Estos anticuerpos circulantes pueden ligarse al antígeno NS1 formando inmunocomplejos que dificultan su detección, por lo que la sensibilidad de la detección de antígenos disminuye en las infecciones secundarias. Por todo ello, el diagnóstico de dengue secundario puede alcanzarse mediante detección del genoma por RT-PCR en presencia de una IgG positiva³¹.

Tabla 1. Criterios de laboratorio para el diagnóstico de virus dengue.

Dengue probable	Dengue confirmado
Una de las siguientes: - IgM positiva aislada	Una de las siguientes: - RT-PCR positiva - Cultivo viral positivo - Detección de antígeno NS1 - Detección de IgM específica y confirmación con neutralización - Seroconversión o aumento de cuatro veces el título en muestras pareadas

Se obtiene el diagnóstico de confirmación para DENV (Tabla 1) mediante las técnicas directas o con la observación de seroconversión o de un aumento de cuatro veces del título de anticuerpos en dos muestras pareadas. Una IgM aislada sólo permitirá etiquetar el caso como probable³⁴.

El diagnóstico de DENV se ha visto dificultado por la circulación de diferentes *flavivirus* en la misma región. Los resultados obtenidos por serología han de ser tomados con cautela, ya que se ha observado un alto grado de reactividad cruzada entre DENV y ZIKV. Las técnicas de neutralización son las más específicas, pero su realización es costosa, compleja y laboriosa, y para ser correctamente interpretadas deben realizarse frente a todos los *flavivirus* circulantes en la región y en muestras pareadas, por lo que no se emplean para el diagnóstico de rutina. Actualmente, se recomienda realizar algoritmos diagnósticos que permitan un diagnóstico simultáneo de DENV, CHIKV y ZIKV³⁵.

Chikungunya

El virus chikungunya es un virus del género *Alphavirus*, familia *Togaviridae*. Se han descrito tres genotipos principales (Asiático, ECSA (Este/Centro/Sur Africano) y genotipo del África del oeste)³⁶; el linaje del océano Índico (IOL) deriva del ECSA. El chikungunya está relacionado con otros *alphavirus* que también causan cuadros clínicos de fiebre y artralgias (O'nyong-nyong, Barmah, Ross River, Semliki, Mayaro y Sindbis). El nombre chikungunya en el dialecto Makonde de Tanzania quiere decir "enfermedad que dobla las articulaciones", nombre que hace referencia a las incapacitantes artralgias e incluso artritis que provoca la infección³⁷.

Distribución geográfica

El CHIKV se describió por primera vez durante un brote en Tanzania en 1952³⁷, pero se cree que probablemente llevaba siglos circulando en África y que ya se importó a Asia y América durante los siglos XVIII y XIX mediante el comercio de esclavos,

en barcos gracias a los cuales también se expandió el vector *Aedes aegypti*²⁴. De hecho, se cree que algunos de los brotes de dichas épocas clasificados como dengue, pudieron deberse en realidad al virus chikungunya según las descripciones clínicas de los mismos³⁸.

No obstante, no fue hasta 1952 cuando se describió formalmente su presencia en Tanzania, y posteriormente en Uganda y en otros países sub-saharianos. La primera descripción del virus fuera de África se hizo en 1958, en un brote en Tailandia³⁶.

En 2004 se describió la aparición de una nueva cepa derivada del genotipo ECSA originada en Kenia, la cepa del África del oeste, que causó grandes brotes en islas del Océano Índico, entre los que cabe destacar el brote de la isla La Reunión³⁹.

Como consecuencia de esta expansión epidémica, numerosos países comenzaron a detectar infecciones por chikungunya en sus viajeros. Uno de ellos proveniente de la India dio lugar a una epidemia de la enfermedad en Italia en 2007⁴⁰, donde se detectaron más de 200 casos y el vector responsable de la transmisión fue *Aedes albopictus*. Este evento alertó sobre el riesgo de introducción de CHIKV en zonas hasta ahora libres de enfermedad y posteriormente, en los años 2010 y 2014 se notificaron algunos casos autóctonos en Francia^{41,42}. En 2017 se reportaron nuevamente casos en Francia y un brote epidémico en Italia^{43,44}.

En 2013 el CHIKV se introdujo en el continente Americano, detectándose su transmisión rápidamente en más de 45 países y causando más de 1,7 millones de casos. Se ha establecido de forma endémica en el continente Americano, si bien tras la explosiva epidemia inicial ahora circula a un nivel notablemente más bajo.

Transmisión

La transmisión de CHIKV depende de los mosquitos del género *Aedes*. En África predominan los ciclos enzoóticos que afectan a primates no-humanos, en los cuales diferentes especies de *Aedes* han sido descritas como posibles transmisores (*Ae. africanus*, *Ae. furcifer*, *Ae. Taylori*, etc...) mientras que en Asia predominan los ciclos de transmisión urbana en los que *Ae. aegypti* es el principal vector, seguido de *Ae. Albopictus*⁴⁵. Debido a su hábitat natural *Ae. albopictus* suele ser vector en ciclos rurales o epizooticos, no obstante, en las zonas donde no se ha detectado presencia de *Ae. aegypti* se ha constatado que *Ae. albopictus* ha tenido el papel de principal vector en ciclos urbanos.

En el brote descrito en la isla La Reunión en 2005 se detectó que las cepas presentaban una mutación de la glicoproteína E1 en la posición 226 (mutación A226V9). Esta mutación aumentaba la eficiencia como vector de *Ae. albopictus*⁴⁶, pudiendo detectar el virus en las glándulas salivares del mosquito a partir del día 2 post-infección (suponiendo una reducción del periodo de incu-

bación extrínseco). Esta mutación aumenta la capacidad vectorial de *Ae. albopictus*, que cuenta con una distribución geográfica más amplia, lo que podría haber contribuido a la expansión de CHIKV en los últimos años.

Además de la transmisión vectorial, se han descrito casos de transmisión vertical de CHIKV, con una mayor tasa de transmisión cuando más cerca esté el momento del parto. La morbimortalidad de estos casos es elevada⁴⁷. No hay evidencia de transmisión sexual, a pesar de haberse encontrado el virus en semen⁴⁸, ni tampoco transmisión durante la lactancia.

Otra vía de transmisión sería la exposición laboral a sangre de pacientes infectados y las transfusiones sanguíneas o los trasplantes de órganos en los que el donante estuviese infectado⁴⁹.

Diagnóstico

El cuadro clínico de la infección por CHIKV cursa con fiebre, rash y unas artralgias muy incapacitantes que se pueden acabar cronificando. No todos los pacientes muestran todos los síntomas ni con la misma intensidad, por lo que la clínica no permite diferenciar bien el cuadro de otras arbovirosis.

El diagnóstico de laboratorio puede alcanzarse mediante técnicas de RT-PCR en el periodo virémico, hasta 8 días tras el inicio de los síntomas, o mediante aislamiento del virus⁵⁰. Actualmente, aunque existen algunos ensayos, no existen técnicas de detección de antígeno ampliamente utilizadas para el diagnóstico de CHIKV de la forma que ocurre para DENV.

El diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos IgM e IgG. La IgM aparece aproximadamente a los 5 días tras el inicio de los síntomas, pudiendo persistir durante semanas o meses. La conversión de IgG puede observarse a partir de las dos semanas desde la infección y puede mantenerse positiva de por vida.

Los criterios de laboratorio para el diagnóstico de casos de infección por CHIKV son los descritos en la Tabla 2³⁴.

Tabla 2. Criterios de laboratorio para el diagnóstico de virus chikungunya y Zika.

Chikungunya y Zika probables	Chikungunya y Zika confirmados
Una de las siguientes: - IgM positiva aislada	Una de las siguientes: - RT-PCR positiva - Cultivo viral positivo - Seroconversión o aumento de cuatro veces el título en muestras pareadas - Detección de IgM específica y confirmación por neutralización

Zika

El virus Zika (ZIKV) es un virus del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Se conocen dos linajes del mismo, uno africano y otro asiático, siendo este último el predominante y el causante de las últimas epidemias^{51,52}. Algunos estudios sugieren la existencia de un tercer linaje (África 2) que representaría una etapa intermedia entre las cepas africanas y las cepas asiáticas⁵³. Se consideraba un arbovirus de escaso potencial patógeno⁵⁴ hasta que las últimas epidemias han mostrado su relación con la microcefalia en hijos de mujeres infectadas durante el embarazo, y con el síndrome de Guillain Barre.

Distribución geográfica

ZIKV fue descrito por primera vez en 1947 en el bosque Zika en Uganda, donde se llevaban a cabo estudios sobre el ciclo enzoótico de la fiebre amarilla subvencionados por la Fundación Rockefeller⁵⁵. El virus se aisló por primera vez en un primate no humano, y no fue hasta 1954 cuando se describieron los primeros casos en humanos en Nigeria. En los años posteriores se diagnosticaron casos esporádicos en África. La primera detección del virus en Asia ocurrió en Malasia en 1966. Los estudios de seroprevalencia parecían mostrar una amplia distribución del virus en África y Asia⁵⁶, si bien el número de casos de enfermedad en humanos descrito era muy bajo^{57,58}.

En 2007 tuvo lugar el que fue el primer brote importante de la enfermedad, en la isla de Yap (Micronesia)⁵⁹. Estudios de seroprevalencia mostraron que cerca del 75% de la población se vio afectada por el mismo.

A partir del año 2013 se detectó la presencia de Zika en la Polinesia Francesa, tras una introducción probablemente desde el sudeste asiático⁶⁰. A finales de 2014 aparecieron los primeros casos de ZIKV en el nordeste de Brasil y el virus continuo su expansión dando lugar a una epidemia de grandes dimensiones⁶¹. Además, la asociación de la infección por ZIKV con los casos de microcefalia provocaron la declaración de una emergencia de salud pública de importancia internacional (ESPII) por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en febrero de 2016.

En los últimos años también se han detectado brotes de ZIKV en África (Cabo Verde) y Singapur^{62,63}.

Transmisión

Al igual que DENV y CHIKV, ZIKV se transmite por la picadura de la hembra de mosquito *Aedes* infectada. Se han descrito múltiples especies dentro del género *Aedes* como vectores potenciales de este virus, pero se considera que el principal vector es

Ae. aegypti. El mosquito *Ae. albopictus* también parece ser capaz de transmitir la enfermedad y *Aedes hensilii* se postula como el vector principal en el brote de Yap⁶⁴, donde era la especie de mosquito más abundante. En el brote de la Polinesia Francesa además de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis* también pudo actuar como vector. Se han realizado múltiples estudios sobre mosquitos naturalmente infectados y sobre la capacidad de diferentes especies para transmitir el virus, sin embargo, aún está por determinar la capacidad de algunas especies del género *Aedes* y de otros géneros vectoriales como transmisores de ZIKV⁶⁵. Los estudios con mosquitos del género *Culex*, aunque algunos presentan resultados contradictorios, no parecen indicar que el virus pueda transmitirse por estos vectores.

Hasta las más recientes epidemias, se creía que ZIKV se mantenía en ciclos selváticos en primates, siendo los humanos huéspedes terminales. No obstante, la ausencia de primates en el brote de Yap y la rápida expansión observada en los recientes brotes hacen pensar que se ha desarrollado un ciclo urbano de transmisión⁶⁶.

La irrupción de ZIKV a nivel global ha supuesto un cambio de paradigma, ya que se trata del primer arbovirus que además de por vía vectorial, ha demostrado consistentemente transmitirse también por vía sexual. Esta transmisión se ha descrito principalmente de hombres a mujeres⁶⁶, pero también de mujeres a hombres⁶⁷ y entre hombres⁶⁸. Una revisión sistemática de los casos descritos prueba que es una vía de transmisión válida y que la transmisión puede darse a partir de pacientes asintomáticos y largo tiempo después de haber estado expuesto al virus⁶⁹.

Inicialmente la OMS y los *Centers for Disease Control* (CDC) recomendaban un periodo de ocho semanas de relaciones protegidas para evitar la transmisión por vía sexual, que posteriormente y tras analizar los datos que se iban obteniendo, se aumentó a seis meses tras la presentación de los síntomas o desde el momento en el que acabó la posible exposición al virus⁷⁰. Recientemente CDC ha publicado sus nuevas recomendaciones, en donde rebajan a tres meses el periodo a esperar antes de tener relaciones sexuales desprotegidas⁷¹. En el caso de embarazo, se recomienda abstinencia o relaciones protegidas durante todo el embarazo por el riesgo de afectación fetal en caso de infección.

En los casos de ZIKV puede observarse transmisión vertical durante el embarazo. La transmisión intrauterina de la infección puede dar lugar a malformaciones fetales, siendo la microcefalia una de las manifestaciones más características. En estos casos, el ZIKV se ha podido aislar en líquido amniótico, placenta y tejidos fetales⁷². El efecto de haber padecido infecciones seriadas por *flavivirus* es difícil de determinar y no está claro en la actualidad, aunque algunos estudios sugieren que infecciones previas por dengue podrían aumentar la posibilidad de efectos adversos

por Zika⁷³. También se ha descrito la presencia de partículas virales en la leche materna, si bien no se ha podido establecer su potencial infectivo⁷⁴. La transmisión intrauterina se ha descrito también para otros *arbovirus*, incluyendo los analizados en esta revisión. No obstante, aunque se han descrito casos puntuales de pérdidas fetales y algún caso de afectación del recién nacido tras la infección, ninguno de ellos se ha asociado a malformaciones del mismo modo que ZIKV⁷⁵.

Finalmente, al igual que en otros *arbovirus*, la transmisión puede deberse a la exposición laboral a muestras infectivas, por transfusiones sanguíneas o por trasplantes de órganos⁷⁶.

Diagnóstico

La infección por ZIKV se caracteriza por fiebre, rash, artralgias y conjuntivitis no purulenta, si bien las infecciones asintomáticas se consideran muy frecuentes y podrían ser mayoritarias. La clínica puede ser similar a la de otras arbovirosis, por lo que es necesario realizar un diagnóstico etiológico mediante técnicas de laboratorio.

Al igual que el resto de arbovirosis tratadas en esta revisión, el diagnóstico de ZIKV puede alcanzarse mediante técnicas directas, dentro de las cuales destaca la RT-PCR que puede ser positiva en sangre durante una semana y en orina hasta 10-20 días después del inicio de los síntomas. ECDC emitió unas recomendaciones iniciales sobre el tipo de muestra a analizar en función del tiempo desde el inicio de los síntomas⁷⁷. No obstante, nuevos estudios muestran una ventana de detección más amplia de la recomendada al comienzo de la epidemia^{78,79}. Un reciente estudio muestra que la RT-PCR puede persistir positiva en suero hasta 2 semanas después del inicio de los síntomas, siendo mucho más amplio en mujeres embarazadas⁸⁰; y hasta una semana en orina, por lo que las recomendaciones actuales de los CDC se han adaptado a estos datos y recomiendan testar suero y orina hasta 14 días después del inicio de los síntomas⁸¹. El empleo de sangre total en lugar de suero también parece aumentar la sensibilidad y la ventana de detección⁸². En el caso de las embarazadas, se recomienda la realización de RT-PCR hasta 12 semanas después de los síntomas o de la exposición en los casos asintomáticos, debido a las viremias prolongadas que se han descrito en este grupo de pacientes.

Además de en suero y orina, se ha detectado la presencia de RNA de ZIKV en otras muestras biológicas como saliva y líquido cefalorraquídeo^{80,83}. Se ha puesto especial énfasis en la detección del virus en muestras genitales, debido a su potencial transmisión por vía sexual. Las muestras de exudado vaginal no parecen ser positivas durante un largo periodo de tiempo⁸⁰, mientras que el virus se ha encontrado en semen en periodos superiores a los

6 meses⁸⁴. La detección de RNA no es sinónimo de virus viable e infectivo, y el periodo máximo de detección de virus viable es de 69 días^{85,86}, aunque la mayoría de estudios no muestran infectividad más allá de los 30 días⁸⁷.

El diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos IgM e IgG frente al virus. La IgM aparece a partir del 5º día y en caso de ser positiva se recomienda una nueva toma 2-3 semanas después para evaluar la seroconversión. La IgM podría mantenerse negativa en caso de haber padecido una infección por DENV previamente⁸⁸. Algunos estudios han descrito la posibilidad de que en algunos casos no se observe seroconversión, lo cual podría implicar que no se pueda llegar al diagnóstico del cuadro en algunos casos⁸⁹. La alta tasa de reacciones cruzadas con anticuerpos frente a DENV hace que el diagnóstico serológico sea difícil y requiere el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico serológico que minimicen las reacciones cruzadas. Se recomienda la realización de pruebas de neutralización para alcanzar un diagnóstico más certero, pero son técnicas laboriosas, complejas y limitadas a laboratorios de referencia, por lo que no son de utilidad para el diagnóstico rutinario. Además, estas técnicas requieren la realización en paralelo de dos muestras, una aguda y otra convaleciente, y el estudio en paralelo de la reacción frente a todos los *flavivirus* circulantes en la zona, por lo que la interpretación de las mismas resulta compleja.

Los criterios de laboratorio para el diagnóstico de infecciones por ZIKV se muestran en la Tabla 2³⁴.

Virus del Nilo Occidental

El virus del Nilo Occidental (VNO) es un *arbovirus* del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Se han descrito diversos linajes, de los cuales los linajes 1 y 2 son los principales causantes de brotes en humanos. El linaje 1 se divide a su vez en tres sublinajes: 1a, localizado en África, Oriente Medio, Europa y América; 1b, llamado también virus Kunjin, que circula en ciclos enzoóticos en Australia, y el 1c localizado en India. El linaje 2 circula en ciclos enzoóticos en África y se ha descrito en los últimos años en Europa Central⁹⁰ y recientemente en aves en Cataluña⁹¹. Los linajes 3 y 4 se han descrito en Europa pero su importancia médica está por determinar y el linaje 5 parece estar presente únicamente en India⁹.

Distribución geográfica

El VNO se aisló por primera vez en Uganda en 1937 y fue causante de brotes esporádicos en África, Asia y Australia. Posteriormente se detectó su circulación en el sur de Europa. En 1999 se detectó su presencia en Nueva York por primera vez y en los años posteriores se expandió rápidamente por todos los Estados

Unidos, América Central, Sudamérica y Canadá, dando lugar a una epidemia con miles de personas afectadas⁶.

Así, hoy en día, el VNO presenta una extensa distribución a nivel mundial, estando presente en el sur de Europa, América, África, Oriente Medio, Rusia occidental, sudeste asiático y Australia, debido probablemente a la capacidad del virus de infectar numerosas especies de mosquitos y aves⁹². La introducción, epidemia y posterior establecimiento endémico del VNO en Estados Unidos es un claro ejemplo del potencial emergente de un arbovirus. Se han producido varios brotes de VNO durante las últimas décadas. Por ejemplo, se diagnosticaron casos autóctonos de fiebre humana del Nilo Occidental en 2010-2015 en Grecia e Italia, 624 y 148 casos respectivamente⁹³. Durante el año 2018, se produjo un número récord de casos con más de 1500 infecciones humanas por VNO y un total de 180 muertes en Europa⁹⁴ siete veces más que el número de infecciones reportadas en el año anterior.

En España se tiene constancia de la circulación de al menos tres linajes: 1, 2 y 4^{95,91,96}. El primer caso humano se describió en 2004, y el primer brote en humanos y caballos en 2010. En 2016 se dio otro brote en Andalucía⁹⁷ y recientemente se ha diagnosticado un caso importado de Rumanía de VNO linaje 2 (datos sin publicar), probablemente relacionado con el mayor número de casos detectados en Europa durante 2018^{97,98}. Además de los casos en humanos, se han ido produciendo brotes anuales en caballos desde 2016 y hay datos serológicos que sustentan la presencia del virus en aves en Andalucía. Todos los casos observados en humanos y animales, así como las evidencias obtenidas en estudios de seroprevalencia indican que el VNO circula en nuestro medio, si bien parece que a un nivel bajo⁹⁹.

Transmisión

El VNO se mantiene en la naturaleza en un ciclo enzoótico entre aves y mosquitos, y puede infectar a un amplio rango de animales vertebrados. El ser humano y animales como los caballos se consideran huéspedes terminales, es decir, pueden infectarse y sufrir la enfermedad pero no participan en el mantenimiento natural del virus, ya que la viremia es insuficiente para contagiar a nuevos mosquitos. Los huéspedes que sí desarrollan altos niveles de viremia y que permiten el mantenimiento del ciclo son las aves.

El VNO se ha detectado en diferentes géneros de mosquitos, como *Culex* y *Aedes*⁹². Todos ellos pueden ser vectores competentes, pero se ha demostrado que los principales vectores de la enfermedad y quienes permiten el mantenimiento del ciclo enzoótico son los mosquitos del género *Culex*¹⁰⁰. Estos vectores presentan una distribución cosmopolita. En regiones tropicales la transmisión se da durante todo el año, mientras que en regiones

templadas los casos tienen lugar durante el pico de actividad de los mosquitos *Culex*, normalmente entre agosto y septiembre¹⁰¹.

Otras vías de transmisión menos frecuentes que la vectorial son la transmisión por accidentes de laboratorio, transfusión de sangre o trasplante de órganos^{102,103}. Si bien estas formas de transmisión son minoritarias y no producen un riesgo de expansión del virus, tienen importancia a nivel de salud pública, ya que en zonas donde circule el virus podría ser necesario el cribado de donantes. En el caso de mujeres embarazadas, se ha descrito la transmisión intrauterina y por lactancia materna¹⁰⁴.

Diagnóstico

La infección por VNO es asintomática hasta en el 80% de los casos. Aproximadamente un 20% de las infecciones cursan con un síndrome febril similar al de otras arbovirosis y menos del 1% de los casos desarrolla una enfermedad neuroinvasiva potencialmente mortal.

Durante la fase febril se puede detectar el VNO por RT-PCR en suero, aproximadamente durante una semana tras el inicio de los síntomas, aunque en algunos casos se ha descrito una viremia de hasta 13 días. No obstante, la viremia es de baja intensidad y aclara rápidamente por lo que el cultivo viral pocas veces obtiene un resultado positivo¹⁰⁵. Algunos estudios sugieren que el uso de sangre total en vez de suero podría aumentar la sensibilidad y la detección de VNO en orina mediante RT-PCR también podría ser un método para alargar el periodo de detección^{106,107}.

Debido a esta corta duración y baja intensidad de la viremia, en el caso de VNO la mayoría de diagnósticos se realizan mediante pruebas serológicas. La mediana de tiempo desde la detección de ARN a las seroconversiones de IgM e IgG es de 4 y 8 días respectivamente¹⁰⁵. La detección de IgM en un contexto de cuadro clínico compatible se considera indicativo de infección reciente, aunque pueden persistir positivas hasta un año después de la infección. Las pruebas serológicas muestran una gran reactividad cruzada con los anticuerpos dirigidos frente a otros *flavivirus* (virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de Sant Louis, virus Usutu), por lo que normalmente deben confirmarse mediante ensayos de neutralización. En general, dada la reactividad cruzada en las pruebas serológicas, se recomiendan intentar la detección por RT-PCR en suero, sangre total y orina, a fin de obtener un diagnóstico de confirmación.

Los criterios diagnósticos de laboratorio para las infecciones por VNO se muestran en la Tabla 3³⁴.

En las infecciones con afectación del sistema nervioso central, la fase de viremia precede al inicio de los síntomas neurológicos, por lo que una vez establecidos éstos la RT-PCR en suero es de escaso valor diagnóstico. No obstante, podría detectarse el virus en líquido cefalorraquídeo, así como IgM. La detección de IgM en

Tabla 3. Criterios de laboratorio para el diagnóstico de virus del Nilo Occidental.

Virus del Nilo Occidental probable	Virus del Nilo Occidental confirmado
Una de las siguientes: - Respuesta serológica frente a VNO en suero	Una de las siguientes: - RT-PCR positiva - Cultivo viral positivo - Detección de IgM específica en líquido cefalorraquídeo - Detección de IgM específica a título alto y detección de IgG con confirmación por neutralización

líquido cefalorraquídeo de pacientes con encefalitis en los que se han excluido otras causas es altamente predictiva de encefalitis por VNO, especialmente si se demuestra la integridad de la barrera hematoencefálica (síntesis intratecal de IgM).

Conclusiones

Los virus tratados en esta revisión han sufrido una gran expansión en los últimos años, causando brotes epidémicos en lugares libres de los mismos hasta el momento⁶⁻⁸. Ser conscientes del riesgo de introducción de estos virus y conocer sus presentaciones clínicas es de vital importancia para reconocer cuadros clínicos sugestivos en zonas no endémicas y poder realizar un correcto diagnóstico y manejo de los mismos.

Actualmente en España se ha detectado VNO de linaje 1, dando casos esporádicos o brotes en caballos y seres humanos^{97,108}, VNO linaje 4⁹⁶ y recientemente se ha detectado también la presencia de VNO de linaje 2 en un ave en Cataluña⁹¹. En 2018 se han registrado los primeros casos por transmisión autóctona de dengue²². En el caso de chikungunya y Zika no se han descrito aún casos autóctonos por transmisión vectorial (sí se ha descrito transmisión de Zika por vía sexual), pero se han detectado numerosos casos importados sobre todo en los años de mayor actividad epidémica¹⁰⁹⁻¹¹¹, lo cual unido a la expansión de un vector potencial de estas infecciones como es *Ae. albopictus* hace que el riesgo de transmisión local de estos virus en nuestro medio no sea nada despreciable¹¹², tal y como ha ocurrido en otros países de nuestro entorno.

Los arbovirus son un problema de salud pública a nivel mundial y la aparición de nuevas epidemias y nuevos virus es difícil de predecir. No obstante, no hay que bajar el nivel de alerta, ya que una rápida identificación y un correcto diagnóstico de los casos es primordial para poder llevar a cabo campañas de control que limiten los posibles brotes epidémicos.

Bibliografía

1. Scherer WF. International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates. *Am J Trop Med Hyg.* 1976;25(1):204–5.
2. Go YY, Balasuriya UBR, Lee C. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res.* 2014;3(1):58.
3. Sukhralia S, Verma M, Gopirajan S, Dhanaraj PS, Lal R, Mehla N, et al. From dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(1):3–14.
4. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504–7.
5. Kramer LD, Styler LM, Ebel GD. A Global Perspective on the Epidemiology of West Nile Virus. *Annu Rev Entomol.* 2008;53(1):61–81.
6. Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med.* 2001;344(24):1807–14.
7. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(4):e107–17.
8. Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun.* 2016;68:1–13.
9. Weaver SC, Reisen WK. Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral Research.* 2010;85:1–36.
10. Marm Kilpatrick A, Randolph SE, Kilpatrick M, Randolph SE. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. 2013;380(9857):1946–55.
11. Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect.* 2015;4(3):1–5.
12. Lambert AJ, Lanciotti RS. Laboratory Diagnosis of Arboviruses. In: *Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control.* Caister Academic Press; 2016. p. 271–80.
13. Negrodo Antón AI, De Ory Manchón F, Sánchez-Seco Fariñas MP, Franco Narváez L, Gegúndez Cámara MI, Navarro JM, et al. Diagnóstico microbiológico de arbovirosis y robovirosis emergentes. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(3):197–205.
14. Charrel RN. Diagnosis of arboviral infections e A quagmire of cross reactions and complexities. *Travel Med Infect Dis.* 2016;14(1):11–12.
15. Barzon L. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol.* 2018;107:38–47.
16. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med journal, Armed Forces India.* 2015;71(1):67–70.
17. Halstead SB. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. *World Health Stat Q.* 1992;45(2–3):292–8.
18. Succo T, Leparç-Goffart I, Ferré J, Roiz D, Broche B, Maquart M, et al. Autochthonous dengue outbreak in Nîmes. *Euro Surveill.* 21(21):30240.
19. Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobučar A, Pem-Novosel I, et al. Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Eurosurveillance.* 2011;16(9):1–4.
20. Tomasello D, Schlegelhauf P. Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007–2012. *Travel Med Infect Dis.* 2013;11(5):274–84.
21. Sousa CA, Clairouin M, Seixas G, Viveiros B, Novo MT, Silva AC, et al. Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira, Portugal: Preliminary report. *Eurosurveillance.* 2012;17(49):8–11.
22. European centre for disease prevention and control. Local transmission of dengue fever in France and Spain - 2018. Stockholm: ECDC; 2018.
23. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife.* 2015;4.
24. Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. Emerging arboviruses: Why today? *One Heal.* 2017;4:1–13.
25. European centre for disease prevention and control. *Aedes albopictus* - Factsheets for experts [Internet]. Factsheets for experts. 2016 [cited 2019 Aug 2]. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/aedes-albopictus>
26. Ryan SJ, Carlson CJ, Mordecai EA, Johnson LR. Global expansion and redistribution of Aedes-borne virus transmission risk with climate change. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;13(3):1–20.
27. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2:1–26.
28. Pedrosa PB, Cardoso TA. Viral infections in workers in hospital and research laboratory settings: a comparative review of infection modes and respective biosafety aspects. *Int J Infect Dis.* 2011;15(6):e366–76.
29. Wiwanitkit V. Unusual mode of transmission of dengue. *J Infect Dev Ctries.* 2010;4(01):051–4.
30. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Spec Program Res Train Trop Dis.* 2009;147.
31. Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(8):895–907.
32. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12supp):S30–7.
33. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol.* 2013;158(7):1445–59.
34. Commission implementing decision (EU) 2018/945. On the communicable diseases and related special health issues to be covered by epidemiological surveillance as well as relevant case definitions En <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0945&from=EN#page=10>. Acceso 17, octubre, 2019.
35. Pan American Health Organization, World Health Organization. Zika virus (ZIKV) Surveillance in the Americas: Laboratory detection and diagnosis. Algorithm for detecting Zika virus (ZIKV) [Internet].

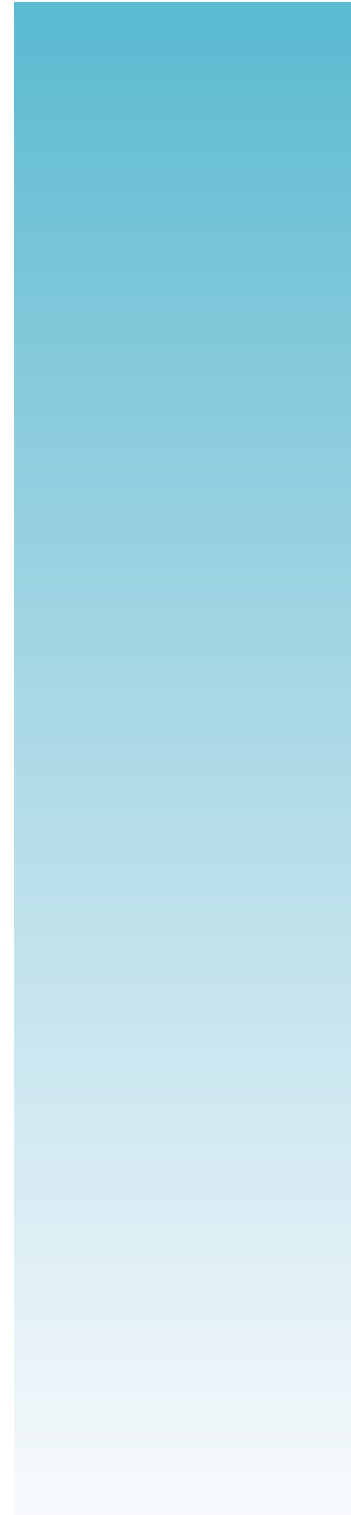
- En <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2015-cha-algorithm-detecting-zikv.pdf>. Acceso 17, octubre, 2019.
36. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res.* 2015;120:32–9.
 37. Ross RW. The Newala Epidemic. *J Hyg.* 1956;54(2):177–91.
 38. Halstead SB. Reappearance of chikungunya, formerly called Dengue, in the Americas. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(4):557–61.
 39. Borgherini G, Poubeau P, Staikowsky F, Lory M, Moullec NL, Becquart JP, et al. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients. *Clin Infect Dis.* 2007;44(11):1401–7.
 40. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli A, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet.* 2007;370(9602):1840–6.
 41. Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge JM, Souarès Y, Failloux AB, et al. Chikungunya virus, Southeastern France. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):910–3.
 42. Delisle E, Rousseau C, Broche B, Leparac-Goffart I, Lambert G, Cochet A, et al. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Eurosurveillance.* 2015;20(17):21108.
 43. Lindh E, Argentini C, Remoli ME, Fortuna C, Faggioni G, Benedetti E, et al. The Italian 2017 outbreak chikungunya virus belongs to an emerging aedes albopictus-adapted virus cluster introduced from the Indian subcontinent. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(1).
 44. Calba C, Guerbois-Galla M, Franke F, Jeannin C, Auzet-Caillaud M, Grard G, et al. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France. *Euro Surveill.* 2017;22(39).
 45. Higgs S, Vanlandingham D. Chikungunya Virus and Its Mosquito Vectors. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2015;15(4):231–40.
 46. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007;3(12):1895–906.
 47. Ramful D, Carbonnier M, Pasquet M, Bouhmani B, Ghazouani J, Noormahomed T, et al. Mother-to-child transmission of chikungunya virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26(9):811–5.
 48. Carlos A, Soares G, França V, Rocha D, Solano B, Souza DF, et al. IDCases Prolonged shedding of Chikungunya virus in semen and urine : A new perspective for diagnosis and implications for transmission. *ID Cases.* 2016;6:100–3.
 49. Shah K V, Baron S. Laboratory infection with chikungunya virus: a case report. *Indian J Med Res.* 1965;53(7):610–3.
 50. Johnson BW, Russell BJ, Goodman CH. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. *J Infect Dis.* 2016;214(suppl 5):S471–4.
 51. Beaver JT, Lelutiu N, Habib R, Skountzou I. Evolution of two major Zika virus lineages: Implications for pathology, immune response, and vaccine development. *Frontiers in Immunology.* 2018;9:1640.
 52. Wang L, Valderramos SG, Wu A, Ouyang S, Li C, Brasil P, et al. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. Vol. 19, *Cell Host and Microbe.* 2016;19: 561–5.
 53. Gubler DJ, Vasilakis N, Musso D. History and Emergence of Zika Virus. *J Infect Dis.* 2017;216(Suppl 10):S860–7.
 54. Simpson DIH. Zika virus infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964;58(4):335–8.
 55. Dick GW, Kitchen S., Haddock A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):509–20.
 56. Wikan N, Smith DR. Review Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:e119–26.
 57. Fagbami AH. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. Vol. 83, *J Hyg Camb.* 1979.
 58. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981; 75(3):389–93.
 59. Duffy M, Chen T, Hancock T, Powers A, Kool J, Lanciotti R, Pretrick M. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360:2536–43.
 60. Musso D, Bossin H, Mallet HP, Besnard M, Broult J, Baudouin L, et al. Review Zika virus in French Polynesia 2013–14: anatomy of a completed outbreak. *Lancet Infect Dis.* 2018;18:e172–82.
 61. Pan American Health Organization. Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015–2018 En [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=casos-acumulados-pdf-8866&alias=43298-casos-acumulados-zika-4-enero-2018-298&Itemid=270&lang=es]. Acceso 17, octubre, 2019
 62. Monteiro Rodrigues J, Lourenço J, Rodrigues Faria N, Tomás T, Monteiro M, Pybus O. Epidemiology of the Zika Virus Outbreak in the Cabo Verde Islands, West Africa. *PLoS Curr.* 2018;1–7.
 63. Ho ZJM, Hapuarachchi HC, Barkham T, Chow A, Ng LC, Lee JMV, et al. Outbreak of Zika virus infection in Singapore: an epidemiological, entomological, virological, and clinical analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(8):813–21.
 64. Ledermann JP, Guillaumot L, Yug L, Saweyog SC, Tided M. Aedes hensilli as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(10):3188.
 65. Epelboin Y, Talaga S, Epelboin L, Dusfour I. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. Vol. 11, *PLoS Neglected Tropical Diseases.* *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11(11): e0005933.
 66. Russell K, Hills SL, Oster AM, Porse CC, Danyluk G, Cone M, et al. Male-to-female sexual transmission of zika virus-United States, January-April 2016. *Clin Infect Dis.* 2017;64(2):211–3.
 67. Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected female-to-male sexual transmission of zika virus — New York city, 2016. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(28):716–7.
 68. Trew Deckard D, Chung WM, Brooks JT, Smith JC, Woldai S, Hennessey M, et al. Male-to-male sexual transmission of Zika virus — Texas, January 2016. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(14):372–4.
 69. Moreira J, Peixoto TM, Siqueira AM, Lamas CC. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(5):296–305.
 70. World Health Organization. Prevention of sexual transmission of Zika virus Interim guidance update. En http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2015_terminology_guidel. Acceso 17, octubre, 2019.

71. Polen KD, Gilboa SM, Hills S, Oduyebo T, Kohl KS, Brooks JT, *et al.* Update: Interim Guidance for Preconception Counseling and Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus for Men with Possible Zika Virus Exposure — United States, August 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2018;67(31).
72. Doenças E, Agudas F, Calvet G, De Flavivírus L, Cruz O, Bsc A, *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:653–60.
73. Hermanns K, Göhner C, Kopp A, Schmidt A, Waltraut M, Markert UR, *et al.* Zika virus infection in human placental tissue explants is enhanced in the presence of dengue virus antibodies in-vitro. Zika virus infection in human placental tissue explants is enhanced in the presence of dengue virus antibodies in-vitro. *Emerg Microbes Infect.* 2019;17:51.
74. Colt S, Garcia-Casal MN, Peña-Rosas JP, Finkelstein JL, Rayco-Solon P, Weise Prinzo ZC, *et al.* Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(4).
75. Charlier C, Beaudoin MC, Couderc T, Lortholary O, Lecuit M. Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. *Lancet Child Adolesc Heal.* 2017;1(2):134–46.
76. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance.* 2014;19(14):20761.
77. European centre for disease prevention and control. Interim guidance for healthcare providers and Zika virus laboratory diagnosis En <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/zika-virus-guidance-healthcare-providers-and-laboratory-diagnosis.pdf>. Acceso el 17, octubre, 2019.
78. Sánchez-Montalvá A, Pou D, Sulleiro E, Salvador F, Bocanegra C, Treviño B, *et al.* Zika virus dynamics in body fluids and risk of sexual transmission in a non-endemic area. *Trop Med Int Heal.* 2018;23(1):92–100.
79. Alejo-Cancho I, Torner N, Oliveira I, Martínez A, Muñoz J, Jane M, *et al.* Twenty-four cases of imported Zika virus infections diagnosed by molecular methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;86(2):160–2.
80. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, *et al.* Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. *N Engl J Med.* 2018;379(13):1234–43.
81. Centers for Disease Control and Prevention. Testing Guidance. Zika Virus. 2017.
82. Mansuy JM, Mengelle C, Pasquier C, Chapuy-Regaud S, Delobel P, Martin-Blondel G, *et al.* Zika virus infection and prolonged viremia in whole-blood specimens. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(5):863–5.
83. Rozé B, Najjioullah F, Signate A, Apetse K, Brouste Y, Gourgoudou S, *et al.* Zika virus detection in cerebrospinal fluid from two patients with encephalopathy, Martinique, February 2016. *Eurosurveillance.* 2016;21(16):pii=30205.
84. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Lavezzo E, Trevisan M, Sgarabotto D, *et al.* Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. *Eurosurveillance.* 2016;21(32):30316.
85. García-Bujalance S, Gutiérrez-Arroyo A, De la Calle F, Díaz-Menéndez M, Arribas JR, García-Rodríguez J, *et al.* Persistence and infectivity of Zika virus in semen after returning from endemic areas: Report of 5 cases. *J Clin Virol.* 2017;96:110–5.
86. Arsuaga M, García Bujalance S, Díaz-Menéndez M, Vázquez A, Arribas JR. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:1107.
87. Joguet G, Mansuy J-M, Matusali G, Hamdi S, Walschaerts M, Pavili L, *et al.* Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *Lancet Infect Dis* 2017;17:1200–08
88. Barzon L, Percivalle E, Pacenti M, Rovida F, Zavattoni M, Del Bravo P, *et al.* Virus and Antibody Dynamics in Travelers With Acute Zika Virus Infection. *Clin Infect Dis.* 2018;66(8):1173–80.
89. Lustig Y, Cotar AI, Ceianu CS, Castillett C, Zelena H, Burdino E, *et al.* Lack of Zika virus antibody response in confirmed patients in non-endemic countries. *J Clin Virol.* 2018;99–100:31–4.
90. Cotar AI, Elena F, Dinu S, Necula A, Bîrlu V, Ceianu CS, *et al.* West Nile virus lineage 2 in Romania , 2015 – 2016: co-circulation and strain replacement. 2018;1–5.
91. Busquets N, Laranjo-González M, Soler M, Nicolás O, Rivas R, Talavera S, *et al.* Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transbound Emerg Dis.* 2019;66(2):617–21.
92. Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. West Nile virus: Review of the literature. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2013;310(3):308–15.
93. Gossner CM, Marrama L, Carson M, Allerberger F, Calistri P, Dilaveris D, *et al.* West Nile virus surveillance in Europe: Moving towards an integrated animal-human-vector approach. *Eurosurveillance.* 2017;22(18):1–10.
94. Zannoli, Sambri. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms.* 2019;7(7):184.
95. García-Bocanegra I, Jaén-Téllez JA, Napp S, Arenas-Montes A, Fernández-Morente M, Fernández-Molera V, *et al.* West Nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010. *Emerging Infectious Diseases.* 2011(17):2397–9.
96. Vázquez A, Sánchez-Seco MP, Ruiz S, Molero F, Hernández L, Moreno J, *et al.* Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(3):549–52.
97. López-Ruiz N, Montaño-Remacha M del C, Durán-Pla E, Pérez-Ruiz M, Navarro-Marí JM, Salamanca-Rivera C, *et al.* West Nile virus outbreak in humans and epidemiological surveillance, west Andalusia, Spain, 2016. *Eurosurveillance.* 2018;23(14):17–00261.
98. European centre for disease prevention and control. Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe, 2018 En: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2018>. Acceso el 17, octubre, 2019.
99. Figuerola J, Soriguer R, Rojo G, Tejedor CG, Jimenez-Clavero MA. Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(12):1915–7.
100. Ciota AT. West Nile virus and its vectors. *Curr Opin Insect Sci.* 2017;22:28–36.

101. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *Lancet Infect Dis.* 2012;2(9):519–29.
102. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, *et al.* Transmission of West Nile Virus through Blood Transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med.* 2003;349(13):1236–45.
103. Nett RJ, Kuehnert MJ, Ison MG, Orłowski JP, Fischer M, Staples JE. Current practices and evaluation of screening solid organ donors for West Nile virus. *Transpl Infect Dis.* 2012;14(3):268–77.
104. Paisley JE, Hansman C, Boyd E, Hinckley AF, Rasmussen SA, Pape WJ, *et al.* West Nile Virus Infection Among Pregnant Women in a Northern Colorado Community, 2003 to 2004. *Pediatrics.* 2006;117(3):814–20.
105. Busch MP, Kleinman SH, Tobler LH, Kamel HT, Norris PJ, Walsh I, *et al.* Virus and Antibody Dynamics in Acute West Nile Virus Infection. *J Infect Dis.* 2008;198(7):984–93.
106. Nagy A, Bán E, Nagy O, Ferenczi E, Farkas Á, Bányai K, *et al.* Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period. *Arch Virol.* 2016;161(7):1797–806.
107. Lustig Y, Mannasse B, Koren R, Katz-likvornik S, Hindiyeh M, Mandelboim M, *et al.* Superiority of West Nile Virus RNA Detection in Whole Blood for. 2016;54(9):2294–7.
108. García-Bocanegra I, Belkhiria J, Napp S, Cano-Terriza D, Jiménez-Ruiz S, Martínez-López B. Epidemiology and spatio-temporal analysis of West Nile virus in horses in Spain between 2010 and 2016. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65(2):567–77.
109. Fernandez-Garcia MD, Bangert M, de Ory F, Potente A, Hernandez L, Lasala F, *et al.* Chikungunya virus infections among travellers returning to Spain, 2008 to 2014. *Eurosurveillance.* 2016;21(36):30336.
110. Díaz-Menéndez M, de la Calle-Prieto F, Montero D, Antolín E, Vazquez A, Arsuaga M, *et al.* Initial experience with imported Zika virus infection in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36(1):4–8.
111. Toro C, Trevisi P, López-Quintana B, Amor A, Iglesias N, Subirats M, *et al.* Imported Dengue Infection in a Spanish Hospital with a High Proportion of Travelers from Africa: A 9-Year Retrospective Study. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(3):701–7.
112. Collantes F, Delacour S, Alarcón-Elbal PM, Ruiz-Arrondo I, Delgado JA, Torrell-Sorio A, *et al.* Review of ten-years presence of *Aedes albopictus* in Spain 2004–2014: known distribution and public health concerns. *Parasit Vectors.* 2015;8(1):655.



HIPÓTESIS

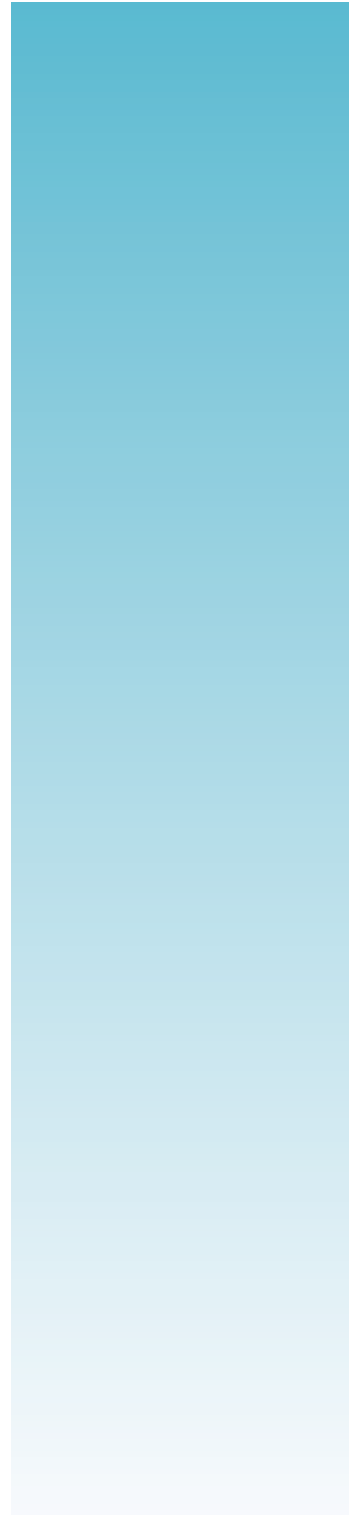


HIPÓTESIS

La hipótesis principal de este proyecto es que una evaluación rigurosa de los métodos diagnósticos disponibles, junto con el estudio de la cinética de los marcadores de la infección viral permitirá un mejor diagnóstico de las infecciones por arbovirus. Además, la revisión de los resultados obtenidos por los protocolos vigentes contribuirá a una mejor estimación del riesgo de introducción de arbovirosis en nuestro medio y en particular a determinar de forma más precisa el riesgo de infección y afectación fetal por Zika en embarazadas.



OBJETIVOS

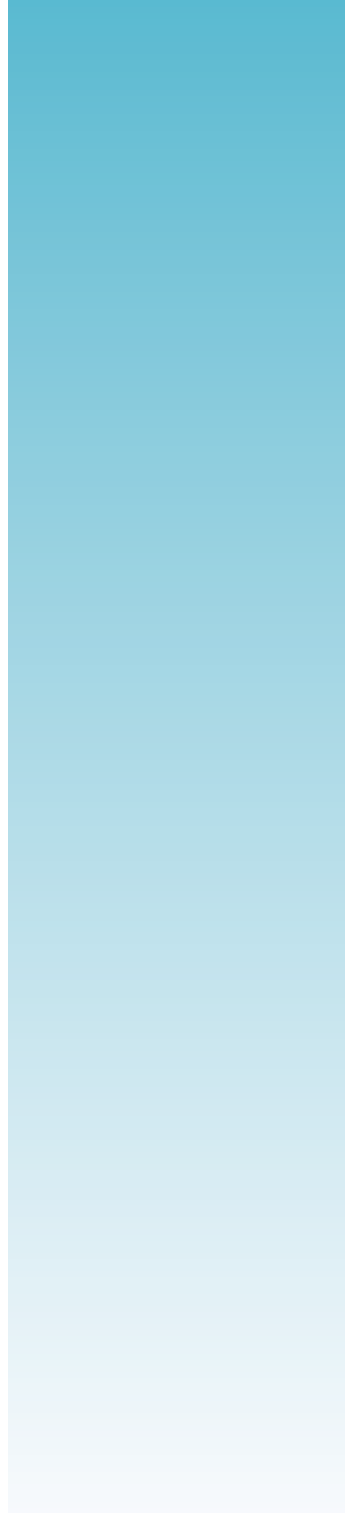


OBJETIVOS

1. Estudiar la cinética de la infección por virus Zika mediante detección molecular del virus en diferentes tipos de muestras.
2. Evaluar el cribado serológico y el impacto de la infección por virus Zika en embarazadas atendidas en Cataluña potencialmente expuestas al virus en áreas endémicas.
3. Evaluar la utilidad de los valores de leucocitos y plaquetas para el diagnóstico diferencial rápido del síndrome febril en viajeros provenientes de áreas endémicas para arbovirus.
4. Evaluar el rendimiento de un nuevo ensayo de inmuno-aglutinación magnética que detecta el antígeno viral NS1 para el diagnóstico de infecciones agudas por virus dengue.
5. Investigar la utilidad de otras técnicas serológicas para el diagnóstico de las infecciones por dengue, chikungunya y Zika.



MATERIAL Y MÉTODOS Y RESULTADOS



MATERIAL Y MÉTODOS Y RESULTADOS

A continuación se indican los resultados obtenidos en esta tesis doctoral para cada uno de los objetivos descritos anteriormente.

Objetivo 1: Estudiar la cinética de la infección por virus Zika mediante detección molecular del virus en diferentes tipos de muestras.

Resultados obtenidos:

- Artículo 2: Twenty-four cases of imported Zika virus infections diagnosed by molecular methods. (2016) Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases, 86 (2): 160-162.
- Artículo 3: Persistence of Zika virus in semen 93 days after the onset of symptoms. (2018) Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 36 (1): 21-23.

Objetivo 2: Evaluar el cribado serológico y el impacto de la infección por virus Zika en embarazadas atendidas en Cataluña potencialmente expuestas al virus en áreas endémicas.

Resultados obtenidos:

- Artículo 4: Screening for Zika virus infection in 1057 potentially exposed pregnant women, Catalonia (northeastern Spain). (2019) Travel Medicine and Infectious Disease, 29: 69-71.

Objetivo 3: Evaluar la utilidad de los valores de leucocitos y plaquetas para el diagnóstico diferencial rápido del síndrome febril en viajeros provenientes de áreas endémicas para arbovirus.

Resultados obtenidos:

- Artículo 5: Diagnostic value of platelet and leukocyte counts in the differential diagnosis of fever in the returning traveler. (2019) American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 100 (2): 470-475.

Objetivo 4: Evaluar el rendimiento de un nuevo ensayo de inmuno-aglutinación magnética que detecta el antígeno viral NS1 para el diagnóstico de infecciones agudas por virus dengue.

Resultados obtenidos:

- Artículo 6: Evaluation of a novel microfluidic immuno-magnetic agglutination assay method for detection of dengue virus NS1 antigen. (2020) PLOS Neglected Tropical Diseases, 14 (2).

Objetivo 5: Investigar la utilidad de otras técnicas serológicas para el diagnóstico de las infecciones por dengue, chikungunya y Zika.

Resultados obtenidos:

- Resultados adicionales 1: Evaluación de un test rápido para el diagnóstico de infección por virus dengue en viajeros
- Resultados adicionales 2: Evaluación de un nuevo método basado en inmunoblot para la detección simultánea de anticuerpos frente a virus dengue, virus Zika y virus chikungunya
- Resultados adicionales 3: Evaluación de un ELISA basado en el antígeno NS1 para la detección de anticuerpos contra el virus Zika

A continuación, se presenta un resumen explicativo de cada uno de los artículos publicados o resultados adicionales obtenidos seguido del trabajo completo.

OBJETIVO 1:

Estudiar la cinética de la infección por virus Zika mediante detección molecular del virus en diferentes tipos de muestras.

ARTÍCULO 2

Twenty-four cases of imported Zika virus infections diagnosed by molecular methods

Veinticuatro casos importados de infección por virus Zika diagnosticados mediante métodos moleculares

Autores:

Izaskun Alejo-Cancho, Nuria Torner, Inés Oliveira, Ana Martínez, José Muñoz, Mireia Jane, Joaquim Gascón, Ana Requena-Méndez, Anna Vilella, M^a Ángeles Marcos, María Jesús Pinazo, Verónica Gonzalo, Natalia Rodríguez, Miguel J Martínez

Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:

Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases, 86 (2): 160-162, Octubre 2016

Factor de impacto - Cuartil: 2,401 - Q3

Introducción:

El virus Zika (VZIK) es un arbovirus del género flavivirus que recientemente ha provocado varias epidemias en las que se ha comprobado su potencial para provocar cuadros graves como el síndrome de Guillain-Barré y malformaciones fetales.

La detección del virus en muestras clínicas empleando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) permite un diagnóstico de confirmación. Sin embargo, faltan estudios sobre el rendimiento diagnóstico de diferentes muestras clínicas (como suero, orina o saliva) para determinar qué muestras son más rentables y en qué periodos de tiempo tras la aparición de los síntomas deben analizarse.

Resultados y discusión:

Presentamos una serie de 24 viajeros diagnosticados de infección por VZIK mediante métodos moleculares utilizando muestras de suero y orina. El diagnóstico se realizó inicialmente mediante una RT-PCR en tiempo real (RealStar Zika Virus RT-PCR

Kit, Altona Diagnostics, Alemania) y todas las muestras positivas se confirmaron por una segunda técnica molecular: una RT-PCR genérica de flavivirus casera seguida de secuenciación u otra RT-PCR comercial (VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection kit, Certest Biotec). Se testaron muestras de suero y orina en paralelo en todos los casos en que ambas muestras fueron recogidas. En todas las muestras recogidas en los primeros 5 días tras el inicio de los síntomas se excluyó la infección por dengue y chikungunya mediante RT-PCR en tiempo real específicas.

Se testaron suero y orina en 12 casos, sólo suero en 11 y sólo orina en uno. De los 12 casos con ambas muestras, cuatro presentaron un resultado positivo en ambas, cuatro sólo en orina y cuatro sólo en suero. Estos resultados fueron analizados en relación con el tiempo desde el inicio de los síntomas y fueron comparados con el algoritmo diagnóstico sugerido por el European Centre for Disease prevention and Control (ECDC) en aquel momento.

Fueron positivas por RT-PCR en tiempo real el 76,9% (20/26) de las muestras recogidas en el periodo óptimo sugerido por el ECDC, el 84,7% (6/7) de las recogidas en el periodo subóptimo y el 66,7% (2/3) de las recogidas fuera de estos periodos. Un paciente presentó una RT-PCR positiva en suero 8 días tras el inicio de los síntomas, con un resultado negativo en orina. Otros resultados inesperados se encontraron en un paciente que obtuvo un resultado positivo en orina el día 1 y en otros dos pacientes con un resultado negativo en suero el día 3 tras el inicio de los síntomas.

Estos resultados sugieren que la cinética del VZIK aún no se conoce lo suficiente, y que el testado simultáneo de muestras de suero y orina mejoraría el rendimiento del diagnóstico molecular de la infección por VZIK.



Twenty-four cases of imported zika virus infections diagnosed by molecular methods



Izaskun Alejo-Cancho^a, Nuria Torner^b, Inés Oliveira^c, Ana Martínez^b, José Muñoz^c, Mireia Jane^b, Joaquim Gascón^c, Ana Requena-Méndez^c, Anna Vilella^{c,d}, M^a. Ángeles Marcos^{a,c}, María Jesús Pinazo^c, Verónica Gonzalo^a, Natalia Rodriguez^c, Miguel J. Martínez^{a,c,*}

^a Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^b Public Health Agency of Catalonia, Generalitat of Catalonia, Barcelona, Spain

^c ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^d Public Health Department, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2016

Received in revised form 13 July 2016

Accepted 14 July 2016

Available online 18 July 2016

ABSTRACT

Zika virus is an emerging flavivirus widely spreading through Latin America. Molecular diagnosis of the infection can be performed using serum, urine and saliva samples, although a well-defined diagnostic algorithm is not yet established. We describe a series of 24 cases of imported zika virus infection into Catalonia (northeastern Spain). Based on our findings, testing of paired serum and urine samples is recommended.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Background

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus from the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. It was first identified in 1947 after isolation from a rhesus monkey in Uganda (Wellcome and Unit, 1973). Sporadic cases of ZIKV infection in humans had been reported until the 2007 outbreak in Yap islands (Duffy et al., 2009). The French Polynesia epidemic in 2013 preceded the current expansion of the virus in Latin America (Cao-Lormeau, 2014). Most cases of ZIKV infection are considered to be either asymptomatic or inducing a mild disease presenting with symptoms such as fever, malaise, rash, arthralgia and conjunctivitis. However, the rapid dissemination of the virus and the possibility of severe complications such as Guillain-Barré syndrome or fetal abnormalities have placed ZIKV as the latest viral threat to public health systems (Cao-Lormeau et al., 2016; Rasmussen et al., 2016).

Since the clinical presentation is unspecific and may overlap with that of other arboviral diseases circulating in the same region, laboratory confirmation of suspected patients is essential for an accurate classification of cases. As for dengue and chikungunya, diagnosis of ZIKV infection is generally achieved by molecular detection of the viral genome and by detection of IgM and IgG ZIKV-induced antibodies. Serological diagnosis is challenging mainly due to cross reactivity with antibodies against other flaviviruses (Lanciotti et al., 2008) and may require performing laborious seroneutralization assays. In this sense, more specific serological assays are needed and recently a ZIKV ELISA

has shown promising results (Huzly et al., 2016). In general, molecular detection by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) would be preferable since it offers rapid and specific diagnosis, although its use is limited by the presence of the virus in clinical samples during the acute phase of the infection. Determining the type of samples and the duration of the virus in those biological fluids is important for an optimal molecular diagnosis. A short viremia (3–5 days) has been reported (Lanciotti et al., 2008), but the virus may be detectable for nearly 2 months in certain pregnant women with congenital infection (Levanov et al., 2016). The diagnostic utility of saliva and urine samples has also been reported. Saliva may increase the rate of detection but it does not seem to expand the period of detection compared to serum (Musso et al., 2015). The virus may be present in urine for prolonged periods up to 20 days after the onset of symptoms (Bingham et al., 2016; Gourinat et al., 2015). However, there is a lack of published series of ZIKV in travelers addressing the optimal time for testing each sample. An accurate description of the optimal samples and collection time would be useful for improved detection of ZIKV infections, given its implications on pregnancy and the possibility of autochthonous vector borne or sexual transmission in non endemic countries. Recently, provisional guidelines for testing have been provided by the ECDC suggesting optimal periods for testing of serum (0–4 days after onset of symptoms) and urine (3–8 days) samples (Ecdc, 2016).

2. Results and discussion

We report a series of 24 travelers with ZIKV infection diagnosed by molecular methods in serum and urine samples at our laboratory from

* Corresponding author. Tel.: +34-932275522.

E-mail address: myoldi@clinic.ub.es (M.J. Martínez).

January 2016 onwards. Cases detected were either attended at the Tropical Medicine Department of Hospital Clinic de Barcelona or detected through a regional arbovirus surveillance program (http://canalsalut.gencat.cat/web/content/home_canal_salut/professionals/temes_de_salut/vigilancia_epidemiologica/documents/arxiu/protocol_arbovirosis_cat.pdf).

A commercial ZIKV specific real time RT-PCR (RealStar® Zika Virus RT-PCR kit, Altona Diagnostics) was used as a first line test and all positive samples were confirmed by a second molecular test: an in house generic flavivirus RT-PCR (Moureau et al., 2007) followed by sequencing or another commercial real time RT-PCR (VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection kit, Certest Biotec). ZIKV-IgM and IgG antibodies were detected in serum diluted 1/10 by a commercial immunofluorescence test (Euroimmun, AG). When available, both urine and serum samples were analyzed. All serum samples collected within 5 days after the onset of symptoms tested negative for dengue and chikungunya by specific real time RT-PCR assays.

A total of 24 patients were diagnosed of ZIKV infection by real time RT-PCR. Seventeen patients (70.8%) were female and the median age was 38 years-old. All patients presented with symptoms. The main clinical and epidemiological characteristics of the patients and how the diagnosis of ZIKV infection was performed are summarized in Table 1. The type of sample and the time point of collection after the

onset of symptoms are also described. In 12 cases, serum and urine samples were analyzed whereas in 11 patients only serum samples were collected and in one patient only urine was tested. A total of 36 samples were tested (23 serum and 13 urine samples). Among the patients with both serum and urine samples tested, four of them had a positive result in both samples, four patients had positive results only in urine and four were only positive for ZIKV in serum. Significantly lower cycle threshold (Ct) values were observed in urine samples obtained 5 or 6 days after the onset of symptoms compared to serum samples, indicating higher viral loads in urine, as previously described (Gourinat et al., 2015).

Interestingly, 20/26 (76.9%) of the samples collected within the suggested optimal time for testing (Ecdc, 2016) were positive, 6/7 (85.7%) of the samples collected within the suboptimal time tested positive and 2/3 (66.7%) of the samples collected out of the optimal or suboptimal times tested positive. Patient 24 showed a positive RT-PCR in serum on day 8 after the onset of the symptoms, with a negative RT-PCR in urine. Both results are unexpected as at this time a positive PCR would be more likely in urine and a negative result in serum. Other unexpected findings include a positive RT-PCR in urine at day 1 (patient 1) or negative RT-PCR in serum at day 3 (patients 8 and 10). Although saliva samples are not considered to expand the ZIKV period of detection and were not collected in our series, systematic testing of these samples may yield surprising results, as has been recently

Table 1
Clinico-epidemiological characteristics and virological diagnosis of 24 cases of imported ZIKV infection.

Patient	Sex/age	Country visited	Symptoms	Days after onset of symptoms	RT-PCR in serum (Ct)	RT-PCR in urine (Ct)	Zika serology ¹	
							IgM	IgG
1	F/in her 40s	Bolivia	Rash, arthralgia, conjunctivitis	1	Positive (32.67)	Positive (34.56)	NI	Positive*
2	F/under 15	Honduras	Fever, chill, headache, rash, conjunctivitis	2	Positive (35.93)	NA	Negative	Negative
3	F/in her 40s	Puerto Rico	Rash, low fever	2	Positive (38.06)	NA	Negative	Negative
4	F/under 15	Honduras	Fever, chill, headache, rash, conjunctivitis	2	Positive (36.63)	NA	Positive**	Negative
5	F/in her 40s	Brazil	Arthralgia, rash	2	Positive (37.59)	NA	Negative	Negative
6	M/in his 30s	Honduras	Fever, chill, headache, rash, conjunctivitis	2	Positive (38.14)	NA	Negative	Positive*
7	F/in her 40s	Honduras	Low fever, arthralgia, rash, headache	2	Positive (34.27)	NA	Negative	NI
8	M/in his 20s	Bolivia	Arthralgia, rash, dysthermia	3	Negative	Positive (35.04)	Negative	Positive*
9	M/in his 30s	Venezuela	Myalgia, cehalea, fever, adenopathies, rash	3	Positive (24.78)	NA	Negative	Positive**
10	M/in his 40s	Colombia	Low fever, arthralgia, myalgia, rash, diarrhea	3	Negative	Positive (33.6)	Negative	Negative
11	F/in her 40s	Colombia	Rash, arthralgia, low fever	3	Positive (35.38)	NA	Negative	Positive*
12	F/in her 50s	Colombia	Dysthermia, rash, facial pruritus	3	Positive (26.76)	Negative	NA	NA
13	F/in her 30s	Dominican Republic	Fever, arthralgia, headache, rash, asthenia	3	Positive (36.24)	NA	Positive**	Negative
14	F/in her 20s	Dominican Republic	Fever, arthralgia, rash	3	Positive (35.45)	Negative	NA	NA
15	F/in her 30s	Dominican Republic	Low fever, rash	3	Positive (30.73)	Negative	Negative	Positive*
16	F/in her 40s	Bolivia	Rash, fever, arthralgia, conjunctivitis, headache, asthenia	4	NA	Positive (26.66)	NA	NA
17	F/in his 20s	Dominican Republic	Rash, arthralgia	4	Negative	Positive (33.95)	Negative	Negative
18	M/in his 30s	Venezuela	Arthralgia, rash, dysthermia	5	Positive (34.22)	Positive (31.32)	Negative	Negative
19	M/in his 30s	México and El Salvador	Arthralgia, rash, conjunctivitis, adenopathy	6	Positive (37.25)	Positive (24.14)	Positive*	Positive*
20	M/in his 40s	Venezuela	Fever, rash, arthralgia, conjunctivitis	6	Negative	Positive (34.74)	Positive**	Positive*
21	F/in his 30s	Dominican Republic	Arthralgia, fever, conjunctivitis, rash	6	Positive (31.57)	NA	Negative	Positive*
22	F/in her 20s	Martinique	Fever, cephalaea, rash, adenopathy	6	Positive (37.55)	Positive (33.16)	Positive**	Negative
23	F/in her 60s	Colombia	Asthenia, rthralgia, myalgia, rash, headache	8	Positive (37.87)	NA	Positive	Negative
24	F/in her 40s	Brazil	Rash, dysthermia, conjunctivitis	8	Positive (35.17)	Negative	Negative	Negative

NA: samples not available; NI: not interpretable due to homogeneous staining of both infected and non-infected cells of the immunofluorescence slide. Ct: cycle threshold values of the RealStar® Zika Virus RT-PCR kit (Altona Diagnostics).

* samples were also positive for antibodies against dengue;

** weakly positive;

shown in a case with prolonged viral shedding in saliva for 29 days (Barzon et al., 2016). Taken together, it seems that the kinetics of ZIKV is not yet fully understood. Our results support the testing of paired serum and urine samples for an improved ZIKV molecular diagnosis and may contribute to a better understanding of the diagnostic markers of ZIKV infection.

References

- Barzon L, Pacenti M, Berto A, Sinigaglia A, Franchin E, Lavezzo E, et al. Isolation of infectious zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Euro Surveill* 2016;21:1–5.
- Bingham AM, Cone M, Mock V, Heberlein-larson L, Stanek D. Comparison of test results for zika virus RNA in urine, serum, and saliva specimens from persons with travel-associated zika virus disease – Florida, 2016, 65; 2016. p. 475–8.
- Cao-Lormeau VM. RE: zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1960.
- Cao-Lormeau V, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia. *Lancet* 2016. [in press].
- Duffy M, Chen T, Hancock T, Powers A, Kool J, Lanciotti R, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 2009;360:2536–43.
- Ecdc. Interim guidance for healthcare providers and Zika virus laboratory diagnosis; 2016.
- Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of zika virus in urine. *Emerg Infect Dis* 2015;21:84–6.
- Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M. High specificity of a novel zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *Euro Surveill* 2016;21:30203.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of zika virus associated with an epidemic, yap state, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1232–9.
- Levanov L, Razak J, Iyengar P, Hennenfent A, Kennedy R, Lanciotti R, et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain Abnormalities_2016; 2016. p. 1–10.
- Moureaux G, Temmam S, Gonzalez JP, Charrel RN, Grard G, de Lamballerie X. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007;7:467–77.
- Musso D, Roche C, Nhan T-X, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Detection of zika virus in saliva. *J Clin Virol* 2015;68:53–5.
- Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika virus and birth defects – reviewing the evidence for causality; 2016. p. 1–7.
- Wellcome T, Unit P. *Transactions of the Royal Society of*, 67; 1973. p. 174–83.

ARTÍCULO 3

Persistence of Zika virus in semen 93 days after the onset of symptoms

Persistencia del virus Zika en semen 93 días tras el inicio de los síntomas

Autores:

Inés Oliveira Souto, Izaskun Alejo-Cancho, Joaquim Gascón Brustenga, Aida Peiró Mestres, Jose Muñoz Gutiérrez, Miguel J. Martínez Yoldi

Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 36 (1): 21-23, Enero 2018

Factor de impacto - Cuartil: 1,685 (Q3)

Caso clínico:

En enero de 2016 un hombre de unos 30 años acudió al Servicio de Medicina Tropical del Hospital Clinic tras regresar de Venezuela. Dos días antes había presentado malestar, fiebre, mialgias, artralgias y dolor retroorbital, seguido al día siguiente de rash pruriginoso y conjuntivitis. El paciente estaba vacunado frente a la fiebre amarilla y había pasado una infección por virus dengue (VDEN) en la infancia. En la analítica presentaba una ligera elevación de transaminasas y de proteína C reactiva, siendo el resto de parámetros normales. La fiebre y el rash desaparecieron en 3 días y el resto de síntomas en una semana.

Diagnóstico de laboratorio:

En una muestra de suero recogida tres días tras el inicio de los síntomas se detectó ARN de virus Zika (VZIK) mediante la técnica de reacción en cadena con transcriptasa inversa (RT-PCR) (RealStar Zika Virus RT-PCR Kit, Altona Diagnostics, Alemania). No se detectó ARN de virus dengue o chikungunya mediante RT-PCR en tiempo real específicas

para estos virus y se descartó malaria tras el estudio de gota gruesa y extensión. La presencia de VZIK se confirmó mediante la secuenciación de un fragmento del gen viral NS5. El paciente aportó muestras de seguimiento para evaluar la persistencia de VZIK en semen, suero y orina. Las muestras de orina (día 48 y 201) fueron negativas. La única muestra positiva de suero fue la obtenida el día 3, siendo las siguientes negativas (días 48 y 201). En el caso del semen, la RT-PCR fue positiva los días 30, 48 y 93 y negativa el día 201. No se consiguió aislar el virus en cultivo celular a partir de las muestras de semen.

En la primera muestra el paciente presentaba IgG positiva frente a VZIK y VDENV (probablemente por una reacción cruzada con los anticuerpos frente VDENV desarrollados en la infancia). El día 30 la IgM frente a ambos virus fue también positiva. El día 201 la IgM frente a VZIK había negativizado.

Discusión:

El VZIK es el único flavivirus descrito hasta la fecha que se transmite por vía sexual. Aún no se conoce con exactitud cuánto tiempo puede persistir el virus en semen. Se han reportado casos de persistencia durante 47, 62, 76 u 80 días, y recientemente hasta 6 meses. En nuestro estudio se detectó el virus en semen durante 3 meses, siendo el primer caso de estas características descrito en España. Lamentablemente, no disponemos de muestras entre el día 93 y 201 para saber exactamente cuándo dejó de ser detectable el virus. Las recomendaciones actuales para prevenir la infección por vía sexual indican un periodo de 6 meses de abstinencia o relaciones sexuales con protección para los casos sintomáticos y un periodo de 8 semanas para los casos asintomáticos, aunque no hay datos que avalen esta diferenciación. Son necesarios estudios más amplios para determinar los factores que influyen en la persistencia del virus en semen y por tanto mejorar nuestro conocimiento de la cinética de VZIK en el ser humano.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Brief report

Persistence of Zika virus in semen 93 days after the onset of symptoms



Inés Oliveira Souto^a, Izaskun Alejo-Cancho^b, Joaquim Gascón Brustenga^a, Aida Peiró Mestre^b, Jose Muñoz Gutiérrez^a, Miguel J. Martínez Yoldi^{a,b,*}

^a ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Tropical Medicine and International Health Department, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínic, c/ Villarroya 170, 08036 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2016

Accepted 16 October 2016

Available online 19 December 2016

Keywords:

Zika virus

Semen

Persistence

ABSTRACT

Introduction: Zika virus is mainly transmitted through the bites of infected *Aedes* mosquitoes, although mother-to-child and sexual transmission have also been described. The presence of Zika virus in semen after infection seems to be not uncommon, but the duration of viral persistence has not been well-determined.

Methods: Molecular, serological and cell culture methods were used for the diagnosis and follow up of a case of Zika virus infection imported from Venezuela. Serial samples of serum, urine and semen were analyzed to investigate the persistence of the Zika virus.

Results: Zika virus was detected in semen samples up to 93 days after the onset of symptoms.

Conclusions: Our results confirm the persistence of Zika virus in semen samples for long periods after infection.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Persistencia del virus Zika en semen 93 días tras el comienzo de los síntomas

RESUMEN

Introducción: El virus Zika se transmite fundamentalmente por la picadura de mosquitos *Aedes* infectados, aunque también es posible la transmisión de madre a hijo y la transmisión sexual. La presencia del virus Zika en semen tras la infección parece ser algo relativamente frecuente, pero la duración de la persistencia viral no es bien conocida.

Métodos: Mediante técnicas moleculares, serológicas y cultivo celular se diagnosticó un caso de Zika importado de Venezuela y se tomaron muestra seriadas de suero, orina y semen para investigar la persistencia del virus.

Resultados: El virus Zika fue detectado en muestras de semen recogidas 93 días después del inicio de los síntomas.

Conclusiones: Nuestros resultados confirman la persistencia del virus Zika en semen por períodos prolongados de tiempo después de la infección.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Palabras clave:

Virus Zika

Semen

Persistencia

Case report

In January 2016 a man in his 30s, previously diagnosed with prostatitis in December 2015 and in treatment with ciprofloxacin, presented to the Tropical Medicine Department at Hospital Clínic (Barcelona) two days after his return from a 15-day holiday trip to Venezuela. During his stay he reported self-limited hematospermia

* Corresponding author.

E-mail address: myoldi@clinic.ub.es (M.J. Martínez Yoldi).

Table 1
Laboratory results obtained at the time of diagnosis and in follow-up samples.

Laboratory tests	Days post onset of illness				
	3	30	48	93	201
<i>Real time RT-PCR</i>					
ZIKV (Serum)	Positive (28.7)		Negative		Negative
ZIKV (Urine)			Negative		Negative
ZIKV (Semen)		Positive (31.4)	Positive (32.58)	Negative Positive (29.99)	Negative
DENV (serum)	Negative				
CHIKV (serum)	Negative				
<i>Serology</i>					
IgM ZIKV	Negative	Positive			Negative
IgG ZIKV	Positive (*)	Positive			Positive
IgM DENV	Negative	Positive			
IgG DENV	Positive	Positive			
IgM CHIKV	Negative	Negative			
IgG CHIKV	Negative	Negative			

ZIKV: zika virus; DENV: dengue virus; CHIKV: chikungunya virus.

* IgG against ZIKV by ELISA were Negative. Cycle threshold of real time RT-PCR is shown in positive samples.

and ceftibuten was added by a local urologist to his previous ciprofloxacin regime. In the trip back to Europe he started with malaise, fever ($\geq 39^\circ\text{C}$), myalgias, arthralgias and retro-orbital pain. One day after, he developed a total itchy body macular rash, followed by conjunctivitis. He had not been vaccinated for this trip. He had received yellow fever vaccination in the past and referred dengue fever infection during his childhood. Medical examination revealed bilateral enlarged latero cervical lymph nodes, non purulent conjunctivitis and an intense itchy maculopapular rash diffused on the face, trunk, arms and legs. He had mild transaminitis (alanine aminotransferase 195 UI/L, aspartate aminotransferase 79 UI/L) and elevated C-reactive protein (1.69 mg/dl). A complete blood count, blood levels of electrolytes, as well as coagulation and renal-function tests were normal. Chest radiograph results were unremarkable. The fever and the cutaneous rash resolved in 3 days while malaise, weakness, and myalgia lasted for 1 week after presentation.

Laboratory investigations

Diagnosis of Zika virus (ZIKV) infection was established by real time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using a commercial kit (RealStar Zika Virus RT-PCR Kit 1.0, Altona Diagnostics, Hamburg, Germany) in a serum sample collected three days post onset of illness (dpi). Dengue and chikungunya RNA were not detected by specific real-time RT-PCR assays and malaria was ruled out by negative blood thick and thin smears. The presence of ZIKV was confirmed by Sanger sequencing analysis of a 270 bp amplicon (from a generic flavivirus RT-PCR assay¹) of the NS5 gene. The patient agreed to provide follow up samples to investigate the presence of ZIKV in semen, serum and urine samples. A summary of the samples collected and the results obtained is shown in Table 1. No ZIKV RNA was detected in follow up serum or urine samples. The first semen sample was obtained at 30 dpi and tested positive by ZIKV real time RT-PCR. Two more semen samples obtained at 51 and 93 dpi also contained detectable levels of ZIKV RNA. A fourth semen sample collected 201 dpi tested negative for ZIKV. For cell culture, semen samples were kept frozen until inoculated onto Vero cells and monitored for virus growth by visual inspection of the cytopathic effect and by RT-PCR of culture supernatants, but the virus could not be isolated. Serological tests were performed for dengue (Panbio ELISA, Alere, Australia), chikungunya and Zika (Immunofluorescence, Euroimmun, Germany). The patient tested positive for IgG against dengue upon first presentation at the Hospital, in agreement with the dengue virus infection he reported to have suffered during his childhood. This first sample tested

positive for IgG against Zika by immunofluorescence but was negative by Anti-Zika Virus ELISA (Euroimmun, Germany), in concordance with the higher specificity reported for the ELISA test.² IgM against Zika was positive one month after onset of symptoms and was undetectable 2 months later.

Discussion

ZIKV is, to date, the only flavivirus transmitted through sexual contact, and this mode of transmission might be more frequent than previously thought. So far, male to male,³ male to female^{4,5} and female to male sexual transmission⁶ have been documented and up to 11 countries have reported ZIKV sexual transmission. While most cases have been originated from men with previous history of ZIKV symptoms, the virus can also be spread through sexual contact before the symptoms develop and even from asymptomatic ZIKV infections.⁷ ZIKV sexual transmission is of public health concern, particularly for pregnant women given the possibility of ZIKV induced fetal abnormalities.⁸

The duration of ZIKV persistence in semen is yet poorly understood. Reports of travelers that acquired ZIKV during the present American epidemic showed viral persistence in semen for 47, 62, 76 and 80 days. Recently, a case of Zika Virus persistence for 6 months in semen has been described in a traveler returning from Haiti to Italy.⁹ In our case, ZIKV infection imported from Venezuela was confirmed during the viremic period 3 days after the onset of symptoms. Results of the follow up samples suggest that viral persistence was restricted to semen and longer shedding in urine was not demonstrated. Although it is possible to isolate ZIKV from semen, our attempts were not successful. Failure to isolate ZIKV from semen samples has been reported in other studies,⁹ with even higher viral loads (lower C_t) than in our case. The RT-PCR Cycle Threshold (C_t) values obtained in the three positive semen samples remained relatively stable until the last positive sample was tested as long as 93 days after the onset of symptoms. Our results confirm longer periods for ZIKV presence in semen and represent, to our knowledge, the first reported follow up of Zika virus in semen in Spain. Unfortunately, samples between the third and the sixth month after symptomatic illness were not available for testing. We can only suggest that somewhere between 93 and 201 dpi ZIKV RNA declined to undetectable levels. Current recommendations include a precautionary period of safer sex/abstinence for 6 months after onset of illness or for 8 weeks in asymptomatic patients who traveled to areas with active ZIKV transmission.^{10,11} This distinction between symptomatic and asymptomatic patients has, to our knowledge, no scientific basis to support that viral persistence in

semen of asymptomatic patients is shorter than in symptomatic ZIKV infections. Further studies are needed to better characterize the frequency and duration of ZIKV persistence in semen. For other emerging viruses such as Ebola, the duration of the virus in semen has been expanding as long as new studies and larger series of patients have been analyzed, moving from 91 days in the Kikwit outbreak¹² to 18 months in the West African epidemic.¹³ Likewise, factors influencing viral persistence in semen should be identified for a better understanding of ZIKV kinetics in humans.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Moureaux G, Temmam S, Gonzalez JP, Charrel RN, Grard G, de Lamballerie X. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;**7**:467–77.
- Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull.* 2016;**21**:30203.
- Deckard DT, Chung WM, Brooks JT, Smith JC, Woldai S, Hennessey M, et al. Male-to-male sexual transmission of Zika Virus – Texas, January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;**65**:372–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27078057>
- Frank C, Cadar D, Schlaphof A, Neddersen N, Günther S, Tappe D. Sexual transmission of Zika virus in Germany. *Euro Surveill.* 2016;**2016**:2–5.
- Hills SL, Russell K, Hennessey M, Williams C, Oster AM, Fischer M, et al. Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission – Continental United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;**65**:215–6.
- Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Morbidity and mortality weekly report suspected female-to-male sexual transmission of Zika virus – New York City, 2016. *Early Release.* 2016;**65**:716–7.
- Fréour T, Mirallié S, Hubert B, Splingart C, Barrière P, Maquart M, et al. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. *Euro Surveill.* 2016;**21**, pii 30254.
- Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects – Reviewing the Evidence for Causality. *New Engl J Med.* 2016:1–7.
- Nicastri E, Castilletti C, Liuzzi G, Iannetta M, Capobianchi MR, Ippolito G. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull.* 2016;**21**:1–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27541989>
- Oster AM, Russell K, Stryker JE, Friedman A, Kachur RE, Petersen EE, et al. Update: interim guidance for prevention of sexual transmission of Zika Virus – United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;**65**:323–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27032078>
- World Health Organization. Prevention of potential sexual transmission of Zika virus; 2016. p. 1–2.
- Rowe AK, Bertolli J, Khan AS, Mukunu R, Muyembe-Tamfum JJ, Bressler D, et al. Clinical, virologic, and immunologic follow-up of convalescent ebola hemorrhagic fever patients and their household contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *J Infect Dis.* 1999;**179**:S28–35. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/514318>
- Soka MJ, Choi MJ, Baller A, White S, Rogers E, Purpura LJ, et al. Prevention of sexual transmission of Ebola in Liberia through a national semen testing and counselling programme for survivors: an analysis of Ebola virus RNA results and behavioural data. *Lancet Glob Health.* 2016;**4**:e736–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27596037> [cited 03.10.16].

OBJETIVO 2:

Evaluar el cribado serológico y el impacto de la infección por virus Zika en embarazadas atendidas en Cataluña potencialmente expuestas al virus en áreas endémicas.

ARTÍCULO 4

Screening for Zika virus infection in 1057 potentially exposed pregnant women, Catalonia (northeastern Spain)

Cribado de la infección por virus Zika en 1.057 mujeres gestantes potencialmente expuestas, Cataluña (noreste de España)

Autores:

Elena Sulleiro, Ariadna Rando*, Izaskun Alejo*, Anna Suy, Anna Gonce, Carlota Rodó, Nuria Torner, Azucena Bardají, Victoria Fumadó, Antoni Soriano-Arandes, José Muñoz, Ana Martínez, Mireia Jané, Elena Marbán-Castro, M Paz Sánchez-Seco, Ana Vázquez, Fernando De Ory, Tomás Pumarola, Miguel J Martínez

*: contribuyeron por igual en este trabajo

Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:

Travel Medicine and Infectious Disease, 29: 69-71 Mayo-Junio 2019

Factor de impacto - Cuartil: 4,868 - Q1

Introducción y objetivos:

La infección en el embarazo por virus Zika (VZIK) puede producir defectos congénitos como microcefalia y abortos. Sin embargo, aún se desconoce el riesgo de infección en las embarazadas, el riesgo de infección fetal y de desarrollo de defectos congénitos entre otros. Este estudio describe los resultados observados en el programa de cribado de VZIK en embarazadas de Cataluña en el año 2016.

Material y métodos:

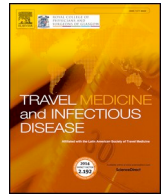
Se realizó el cribado de VZIK en embarazadas con historia de viaje a zona endémica durante el embarazo o en las 8 semanas previas a la concepción. En las pacientes sintomáticas se realizaron técnicas serológicas a partir del día 4 tras el inicio de los síntomas y técnicas moleculares durante la primera semana (en suero) y durante las dos primeras semanas (en orina). En las pacientes asintomáticas se realizó el cribado con

técnicas serológicas. Las técnicas empleadas fueron una RT-PCR en tiempo real comercial (Altona Diagnostics) y una inmunofluorescencia indirecta (Euroimmun). En caso de resultado serológico positivo para VZIK se determinó la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a VZIK mediante un ensayo de microneutralización.

Un caso confirmado de VZIK se definió como: i) una embarazada con RT-PCR positiva y/o ii) una embarazada con IgM positiva frente a VZIK y negativa frente a dengue con un título de anticuerpos neutralizantes (TAN) frente a VZIK $\geq 1/32$. Se consideraron probables los casos con una IgG positiva aislada frente a VZIK y un TAN $\geq 1/32$. Los casos sin ninguna evidencia de laboratorio de infección por VZIK o con IgG positiva aislada frente a VZIK con un TAN $< 1/32$ se consideraron casos negativos. El seguimiento obstétrico se llevó a cabo en dos servicios de referencia para la detección precoz de microcefalia u otras malformaciones.

Resultados y discusión:

Entre Enero y Diciembre de 2016 se realizó el cribado de 1.057 embarazadas potencialmente expuestas a VZIK. Se detectaron 14 casos confirmados (1,3%), 12 diagnosticados por RT-PCR y 2 por técnicas serológicas. La suma de los casos confirmados y probables alcanzó los 142 casos (13,4%). Se detectaron 3 desenlaces fatales adversos asociados a la infección por VZIK (3,1%): un recién nacido con microcefalia y dos abortos. En el primer caso se detectó RNA viral en líquido amniótico y en los otros dos en el tejido placentario (lográndose en uno de ellos el aislamiento del virus en cultivo celular). En los tres casos la madre presentó síntomas durante el primer trimestre del embarazo. El porcentaje de casos sintomáticos fue del 25% entre los casos los confirmados y probables, aumentando al 85,7% considerando sólo los casos confirmados. Nuestros resultados contribuyen a aumentar el conocimiento del impacto del VZIK en el embarazo y ayudan a estimar el riesgo de desenlaces adversos en gestantes que viven en Europa y han viajado a zonas endémicas durante el embarazo.



Screening for Zika virus infection in 1057 potentially exposed pregnant women, Catalonia (northeastern Spain)



ARTICLE INFO

Keywords:

Zika virus
Pregnant women
Serological screening
Microcephaly
Congenital syndrome

Dear editor:

A recent editorial in *Travel Medicine and Infectious Diseases* highlighted the lack of studies about Zika virus (ZIKV) in pregnancy and its implications in many countries [1]. Zika virus infection can induce congenital defects in the newborn such as microcephaly and miscarriage when mothers are infected during pregnancy [2]. However, relevant questions remain to be completely understood, such as the risk of infection for pregnant women and of subsequent congenital defects, and the ratio between symptomatic and asymptomatic ZIKV infections in the general population and in pregnant women. Here, we describe the results of a ZIKV screening of pregnant women in Catalonia, northeastern Spain. Testing for ZIKV was recommended for all pregnant women with history of travel to ZIKV endemic areas during pregnancy or in the 8 weeks before conception [3]. Symptomatic patients were screened by serological methods from day four after the onset of symptoms and by molecular methods within the first week (serum) and two weeks (urine) after illness. Asymptomatic patients were tested by serological methods. Seroneutralization assay for ZIKV was performed in samples positive for antibodies. Commercial diagnostic assays were used (RT-PCR, Altona Diagnostics and IIFT, Euroimmun). Neutralization titers $\geq 1/32$ were considered indicative of the presence of ZIKV neutralizing antibodies. Follow up at two designated reference obstetrical departments for early detection of microcephaly or other malformations was offered to pregnant women with laboratory evidence of ZIKV infection. When available, amniotic fluid and placental tissue samples were tested for ZIKV by RT-PCR in cases of microcephaly or miscarriage, respectively.

A ZIKV confirmed case was defined as i) a pregnant woman with a positive RT-PCR test for ZIKV in serum and/or urine samples and/or ii) a pregnant woman with a positive IgM against ZIKV, a negative IgM against dengue virus and a ZIKV neutralization titer $\geq 1/32$. A ZIKV probable case was defined as a pregnant woman with an isolated positive IgG test against ZIKV and a ZIKV neutralization titer $\geq 1/32$. All cases with no laboratory evidence of ZIKV infection and cases with an isolated positive IgG test and a ZIKV neutralization titer $< 1/32$ were considered negative cases.

A total of 1057 pregnant women with history of potential exposure to ZIKV were tested between January and December 2016. The results of the screening, clinical presentation and pregnancy outcomes are summarized in Fig. 1.

The median age of the pregnant women undergoing ZIKV screening was 31 years (range 15–49). The country most frequently visited was the Dominican Republic (113 women; 14.2%) followed by Bolivia (97, 12.2%), Ecuador (90; 11.3%) and Colombia (88; 11.0%). Information about the gestational age in which the women were potentially exposed to ZIKV was available in 683/1057 women (62.8%). Thirty-five (5.1%) stayed in ZIKV endemic areas within one month before conception, 482 (70.6%) during the first trimester, 117 (17.1%) during the second trimester and 49 (7.2%) during the third trimester. Clinical information was available in 946 patients (89.5%) and most of them (846; 89.4%) had not presented ZIKV compatible symptoms. Overall, ZIKV infection was confirmed in 14 out of the 1057 potentially exposed pregnant women (1.3%; 95%CI: 0.7–2.2%) and this figure rose to 142/1057 (13.4%; 95%CI: 11.4%–15.6%) considering women with any laboratory evidence of ZIKV infection (confirmed and probable cases). Of the 14 confirmed ZIKV cases, 12 were diagnosed by RT-PCR and two by serological methods.

We detected three adverse fetal outcomes associated with ZIKV infection: one newborn with microcephaly and two miscarriages. In the case with microcephaly, ZIKV RNA was detected in amniotic fluid [4]. In both cases of miscarriage, ZIKV RNA was detected in placental tissues and in one case ZIKV was, in addition, isolated from embryonic cells [5]. In forty-six probable cases, the information on the final pregnancy outcome was not available, but no fetal abnormalities were found at the time of screening. Our data show a prevalence of serious adverse effects (microcephaly or miscarriage) associated with ZIKV infection of 3/96 (3.1%; 95% CI: 0.6%–8.9%) among pregnant women with laboratory evidence of ZIKV infection. Importantly, in the three cases, ZIKV infection occurred in the first trimester of pregnancy. Moreover, the three cases were symptomatic and laboratory confirmed.

ZIKV infection in pregnancy, particularly during the first trimester in which the central nervous system of the fetus is being formed, is associated with adverse fetal outcomes such as miscarriage and

<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.03.006>

Received 17 November 2018; Received in revised form 8 March 2019; Accepted 11 March 2019

Available online 15 March 2019

1477-8939/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

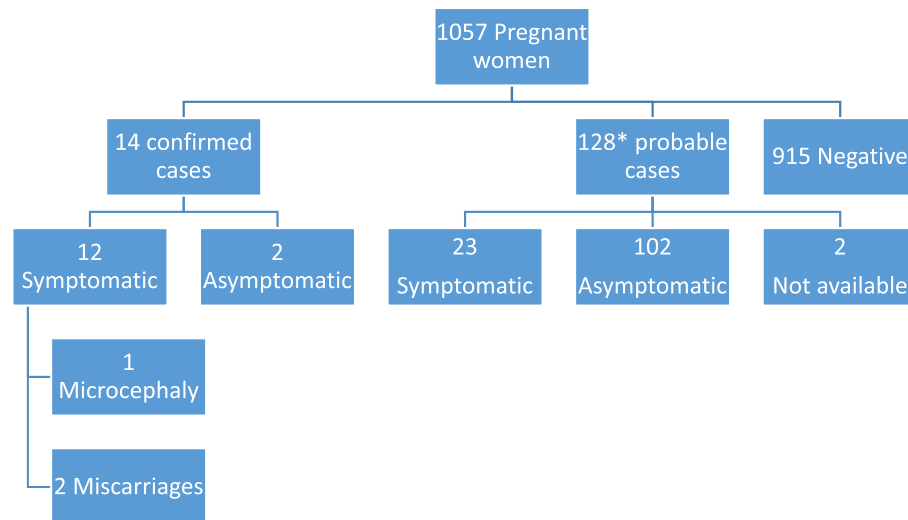


Figure 1. Screening results, clinical presentation and adverse pregnancy outcomes of 1057 pregnant women screened for ZIKV infection.
*Information on the final pregnancy outcomes was not available for 46 probable cases.

microcephaly among others [2]. There is a lack of published data from cohorts of pregnant women residing in Europe and who have been potentially exposed to ZIKV during pregnancy. A recent systematic review and metaanalysis based on series from the Americas estimated the prevalence of microcephaly of 2.3% [95%CI: 1.0%–5.3%] among babies born to ZIKV-infected mothers [6]. Our results from pregnant women with any laboratory evidence of ZIKV infection are in concordance with these figures. Among eight published studies, the proportion of asymptomatic ZIKV infections in pregnant women ranged from 17.2 to 56% [6]. Our study revealed that among women with any laboratory evidence of ZIKV infection only 25% presented symptoms. However, 85.7% (12 out of 14) laboratory confirmed ZIKV cases were symptomatic. These differences may be explained considering that ZIKV symptomatic patients may be more likely to seek medical attention and therefore might be more likely to be laboratory confirmed by RT-PCR in the acute phase of the illness. In contrast, asymptomatic cases are mainly detected by serology and therefore are more likely to be classified as probable cases.

Our study has several limitations. Firstly, the high cross reactivity between dengue and ZIKV induced antibodies and the absence of available neutralization tests against DENV in our setting hampered a more precise classification of the group of probable ZIKV infections. Secondly, other relevant risk factors such as precise duration of the trip or stay in the endemic areas, magnitude of the ZIKV circulation in each country at the time of visit and use of repellents or other measures against mosquito bites, were not systematically assessed. Despite these limitations, some of them being certainly difficult to address, we present the screening results from more than 1000 pregnant women who were screened for ZIKV infection. Our results contribute to better understand the impact of ZIKV infection in pregnancy and might be helpful to estimate the risk of poor pregnancy outcomes for pregnant women living in Europe who travel to ZIKV affected areas, as well as to evaluate the performance of screening and surveillance programs.

Conflicts of interest

All authors, no conflict.

Funding

This study was partially supported by grant 2017 SGR 794 from the Agència de gestió Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) - Departament d'Empresa i Coneixement. Generalitat de

Catalunya and by ISCIII, Projects RD12/0018/0006 and RD16CIII/0003/0003, “Red de Enfermedades Tropicales,” Subprogram RETICS Plan Estatal de I + D + I 2013–2016, and co-funded by FEDER “Una manera de hacer Europa.”

Acknowledgement

The authors thank David Rojas, Centre de Recerca en Epidemiologia Ambiental (CREAL), for his assistance in the study data management.

References

- [1] Alvarado-Arnez LE, Escalera-Antezana JP. Zika infection in pregnancy: follow up and outcomes, where are all the data? *Trav Med Infect Dis* 2018;25:1–2. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.06.014>.
- [2] Rice ME, Galand RR, Roth NM, Ellington SR, Moore CA, Prado MV, et al. Vital signs: zika-associated birth defects and neurodevelopmental abnormalities possibly associated with congenital zika virus infection — U.S. Territories and freely associated states, 2018. *Morb Mortal Wkly Rep* 2018;67:858–67. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6731e1>.
- [3] Protocol d'actuació davant de la infecció pel virus de Zika en l'àmbit obstètric i pediàtric de Catalunya Protocol d'actuació davant de la infecció pel virus de Zika en l'àmbit obstètric i pediàtric de Catalunya Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública Protocol d'actuació davant de la infecció pel virus de Zika en l'àmbit obstètric i pediàtric de Catalunya. 2017.
- [4] Suy A, Sulleiro E, Rodó C, É Vázquez, Bocanegra C, Molina I, et al. Prolonged zika virus viremia during pregnancy. *N Engl J Med* 2016;375:2611–3. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1607580>.
- [5] Goncé A, Martínez MJ, Marbán-Castro E, Saco A, Soler A, Alvarez-Mora MI, et al. Spontaneous abortion associated with zika virus infection and persistent viremia. *Emerg Infect Dis* 2018;24:933–5. <https://doi.org/10.3201/eid2405.171479>.
- [6] Campos Coelho AV, Crovella S. Microcephaly prevalence in infants born to zika virus-infected women: a systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci* 2017;18:1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms18081714>.

Elena Sulleiro
Department of Microbiology, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS
Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain

Ariadna Rando¹
Department of Microbiology, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS
Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain

Izaskun Alejo¹
Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Anna Suy
Maternal Fetal Medicine Unit, Department of Obstetrics, Hospital
Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona,
Spain

Anna Gonce

Department of Maternal-Fetal Medicine, BCNatal – Barcelona Center of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, Hospital Clínic and Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Carlota Rodó

Maternal Fetal Medicine Unit, Department of Obstetrics, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Nuria Torner

Public Health Agency of Catalonia, Generalitat of Catalonia, Barcelona, Spain

Departament de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

Azucena Bardají

ISGlobal, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Victoria Fumadó

Unitat de Malalties Infeccioses i Importades, Servei de Pediatria, Infectious and Imported Diseases, Pediatric Unit, Hospital Universitari Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

Antoni Soriano-Arandes

Paediatric Infectious Diseases and Immunodeficiencies Unit. Department of Pediatrics, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain

Jose Muñoz

ISGlobal, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
International Health Department, Hospital Clinic Barcelona, Barcelona, Spain

Ana Martínez

Public Health Agency of Catalonia, Generalitat of Catalonia, Barcelona, Spain

Mireia Jané

Public Health Agency of Catalonia, Generalitat of Catalonia, Barcelona, Spain

Elena Marbán-Castro

Departament de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

M. Paz Sanchez-Seco

National Center of Microbiology, Majadahonda, Spain

Ana Vazquez

CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain
National Center of Microbiology, Majadahonda, Spain

Fernando de Ory

CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain
National Center of Microbiology, Majadahonda, Spain

Tomás Pumarola

Department of Microbiology, Vall d'Hebron University Hospital. PROSICS
Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Miguel J. Martínez*

Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain
ISGlobal, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
E-mail address: myoldi@clinic.ub.es.

* Corresponding author. Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínic, Escalera 11, 5^a Planta, Hospital ClinicVillarroel 170. 08036, Barcelona, Spain.
¹ contributed equally to this work.

OBJETIVO 3:

Evaluar la utilidad de los valores de leucocitos y plaquetas para el diagnóstico diferencial rápido del síndrome febril en viajeros provenientes de áreas endémicas para arbovirus.

ARTÍCULO 5

Diagnostic value of platelet and leukocyte counts in the differential diagnosis of fever in the returning traveler

Valor diagnóstico del recuento de plaquetas y leucocitos en el diagnóstico diferencial de la fiebre en el viajero

Autores:

Elisa Rubio, Izaskun Alejo-Cancho, Cristian Aylagas, Daniel Camprubí, Roser Ferré, Ma Rosa Albarracín, Verónica Gonzalo, Josep Barrachina, Miriam José Álvarez-Martínez, María Eugenia Valls, Jordi Mas, Jordi Vila, Irene Losada, Miguel J. Martínez, Climent Casals-Pascual

Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 100 (2): 470-475, Febrero 2019

Factor de impacto - Cuartil:

2,315 - Q2

Introducción y objetivo:

La malaria, los arbovirus y la diarrea del viajero representan algunas de las etiologías más comunes de fiebre tras una estancia en los trópicos. Dado que los síntomas iniciales de estas enfermedades a menudo son similares, el diagnóstico diferencial supone un reto para la correcta clasificación y manejo de los pacientes. El objetivo de este estudio fue establecer la utilidad del recuento de plaquetas y leucocitos en el diagnóstico diferencial de la fiebre en el viajero.

Material y métodos:

Entre 2013 y 2016 se analizaron retrospectivamente aquellos episodios con sospecha clínica de malaria en los que se había realizado un estudio de gota gruesa. El diagnóstico microbiológico de cada episodio se estableció mediante la detección

molecular en el caso de los arbovirus, la identificación de enteropatógenos para los casos de diarrea u otros cuadros gastrointestinales y el examen de gota gruesa y extensión para el diagnóstico de malaria.

Resultados:

Se incluyeron un total de 1.218 episodios. La malaria, las infecciones por arbovirus y la diarrea u otros cuadros gastrointestinales causaron 102 (8,4%), 68 (5,6%) y 72 (5,9%) casos respectivamente. La media de plaquetas en los episodios de malaria fue de $89 \times 10^9/L$ y la trombocitopenia ($<150.000 \times 10^9$ plaquetas/L) presentó un valor predictivo negativo del 98% para el diagnóstico de malaria. La media de leucocitos en los episodios de arbovirus fue de $3,19 \times 10^9/L$ y la leucopenia ($<4 \times 10^9$ leucocitos/L) obtuvo un valor predictivo negativo del 98,1% para el diagnóstico de infecciones por arbovirus. Los recuentos de plaquetas y leucocitos no estuvieron significativamente alterados en los episodios de diarrea u otros cuadros gastrointestinales.

Discusión:

Los recuentos iniciales de plaquetas y leucocitos pueden ser útiles a la hora de realizar el diagnóstico diferencial de la fiebre en el viajero que vuelve de áreas tropicales o subtropicales. Aunque el rendimiento de estos parámetros no es suficiente para alcanzar un diagnóstico etiológico, deberían utilizarse en la valoración clínica inicial del paciente.

Diagnostic Value of Platelet and Leukocyte Counts in the Differential Diagnosis of Fever in the Returning Traveler

Elisa Rubio,^{1*} Izaskun Alejo-Cancho,¹ Cristian Aylagas,¹ Daniel Camprubí,^{2,3} Roser Ferré,¹ Ma Rosa Albarracín,¹ Verónica Gonzalo,¹ Josep Barrachina,¹ Míriam José Álvarez-Martínez,^{1,3} María Eugenia Valls,¹ Jordi Mas,¹ Jordi Vila,^{1,3} Irene Losada,^{2,3} Miguel J. Martínez,^{1,3} and Climent Casals-Pascual^{1,3}

¹Department of Clinical Microbiology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; ²Department of Tropical Medicine and International Health, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; ³ISGlobal Barcelona Institute for Global Health, Barcelona, Spain

Abstract. Malaria, arbovirus infection and travelers' diarrhea are among the most common etiologies of fever after a stay in the tropics. Because the initial symptoms of these diseases often overlap, the differential diagnosis remains a challenge. The aim of this study was to establish the effectiveness of platelet and leukocyte counts in the differential diagnosis of fever in the returning traveler. Between 2013 and 2016, patients with a clinical suspicion of malaria, who had thick blood smears performed were retrospectively included. The microbiological etiology of each episode was established based on molecular detection in the case of arbovirus infection, the detection of pathogens in stool samples for diarrhea and other gastrointestinal symptoms and the thick and thin blood smear results for malaria. A total of 1,218 episodes were included. Malaria, arbovirus infection, and diarrhea and other gastrointestinal symptoms caused 102 (8.4%), 68 (5.6%), and 72 (5.9%) episodes, respectively. The median platelet counts in malaria episodes were $89 \times 10^9/L$ and thrombocytopenia ($< 150,000 \times 10^9$ platelets/L) yielded a 98% negative predictive value to predict malaria. The median leukocyte counts in arbovirus infection episodes were $3.19 \times 10^9/L$ and leucopenia ($< 4 \times 10^9$ leukocytes/L) yielded a 97.9% negative predictive value to predict arbovirus infections. Platelet and leukocyte counts were not significantly altered in episodes caused by diarrhea and other gastrointestinal symptoms. Initial platelet and leukocyte counts might be useful for the clinical differential diagnosis of fever in the returning traveler. Although these results are insufficient to establish a diagnosis, they should be considered in the initial clinical assessment.

INTRODUCTION

Fever is one of the main reasons to attend emergency departments in travelers returning from tropical areas. Malaria, arbovirus infection, and travelers' diarrhea are among the most common etiologies of fever after a stay in the tropics.^{1–3} The initial clinical presentation for all these diseases is frequently unspecific and might include fever, arthralgia, headache, myalgia, and gastrointestinal symptoms. In consequence, the differential diagnosis based on clinical symptoms remains a challenge. Because of the increasing number of people travelling abroad and the difference in severity, outcome, and treatment of each condition, early diagnosis is crucial for the successful management of the patient, especially for life-threatening conditions such as malaria and severe dengue. Diagnostic predictors such as abnormalities in hematological parameters may be useful because they can suggest the etiology before the definitive microbiological diagnosis.

Acute malaria is often associated with mild or moderate thrombocytopenia in nonimmune adults and in children from malaria-endemic areas, and is a sensitive but nonspecific indicator of infection with malaria parasites. Profound thrombocytopenia is unusual. Malarial thrombocytopenia is rarely associated with hemorrhagic manifestations or disseminated intravascular coagulation either in nonimmune adults or children in endemic areas.^{4–6}

Arbovirus infections are commonly accompanied by thrombocytopenia and also by leucopenia. Potts and Rotham⁷ reviewed differences in laboratory indicators between patients with dengue and other febrile illnesses (measles, typhoid fever, leptospirosis, and severe acute respiratory syndrome)

in endemic areas and found that leukocyte and platelet counts were significantly lower among patients with dengue. Moreover, in endemic areas leukocyte parameters have been used for diagnostic models of dengue in combination with clinical symptoms.⁸ The same modifications in hematological parameters have been reported for Zika,⁹ chikungunya, and other arbovirus infections. These parameters are sensitive for arbovirus infection, but they lack specificity, as they vary among different arbovirus infections¹⁰ and they heighten in more severe cases.^{7,11}

Travelers' diarrhea and other gastrointestinal symptoms after a stay in a tropical or subtropical area can be caused by bacterial, viral, and parasitic pathogens. Laboratory indicators vary depending on the microbiological agent and its virulence. Few studies document abnormalities in hematological parameters as an indicator for travelers' diarrhea, except for enteric fever, which is commonly associated with thrombocytopenia and either leucopenia or leukocytosis.^{12–15}

The aim of this study was to establish the diagnostic effectiveness of leukocyte and platelet counts in the differential diagnosis of patients returning from tropical or subtropical areas with a clinical suspicion of malaria.

MATERIALS AND METHODS

Patients. The study was conducted at the Hospital Clinic i Provincial de Barcelona (an 800-bed teaching hospital in Barcelona, Spain). Following current clinical guidelines, screening for malaria in all febrile patients returning from tropical and subtropical areas is performed. This protocol includes fever measured using a thermometer and also a history of fever reported by the patient. Cases for this study were selected based on the thick and thin blood smear tests for malaria requested by the attending physician. All thick blood smears performed in the microbiology and parasitology

*Address correspondence to Elisa Rubio, Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel, 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: elrubio@clinic.cat

department between 2013 and 2016 were retrospectively analyzed. Thick blood smears performed as a control of the evolution in already diagnosed patients were excluded, and only the first thick blood smear of each episode was analyzed. Date of analysis, last visited country, identified *Plasmodium* species, and parasite density were collected for each episode and patient. In addition, the results from the different diagnostic methods to detect arbovirus infections and data on bacterial and parasitic intestinal pathogens were collected retrospectively. Finally, platelet and leukocyte counts at the beginning of each malaria-suspected episode (± 3 days difference from the date of performance of the first thick and thin blood smear) were collected retrospectively.

Diagnostic procedures. The diagnosis of malaria was defined by the presence of *Plasmodium* trophozoites in the thick and thin blood smears. In addition, a rapid diagnostic test (BinaxNOW Malaria, Alere, Ireland) was performed in some cases depending on the last visited country and the chemoprophylaxis taken by the patient. In cases where the *Plasmodium* species could not be established solely by microscopy, a commercial nested polymerase chain reaction (PCR) with specific primers for *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium ovale* was performed (BIOMALAR Gel Form Kit; BioTools, Madrid, Spain). PCR products were visualized in a 2% agarose gel.

Confirmed arbovirus infections were defined based on a positive specific real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for dengue, chikungunya, or Zika in serum or urine samples within the malaria suspected episode. An in-house multiplex real-time PCR was used for the molecular diagnosis of the four dengue serotypes using EXPRESS One-Step SuperScript qRT-PCR (Thermo Fisher, Madrid, Spain).¹⁶ For the molecular diagnosis of chikungunya and Zika, two different commercial real-time RT-PCR were performed: RealStar chikungunya RT-PCR (Altona Diagnostics, Hamburg, Germany) and RealStar Zika RT-PCR (Altona Diagnostics).

The diagnosis of travelers' diarrhea or presence of other intestinal pathogens was established with the detection of viral, bacterial, or parasitic pathogens in a stool sample collected during the same episode as the thick blood smear.

The routine methods for the detection of bacterial pathogens were cultures of the stool sample in Blood agar (Oxoid[®]; Thermo Fisher), MacConkey agar (Becton Dickinson[®], Heidelberg, Germany), CCDA agar (Becton Dickinson[®]) for *Campylobacter* isolation, Salmonella Shigella (SS) agar (Becton Dickinson[®]) for *Shigella* and *Salmonella* isolation, Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) agar (Becton Dickinson[®]) for *Yersinia* isolation, and Rappaport-Vassiliadis *Salmonella* Enrichment Broth (Becton Dickinson[®]) for the recovery of *Salmonella* and latter planting onto SS agar. The isolated bacteria were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (Bruker, Bremen, Germany), and the *Salmonella/Shigella* identified were serotyped by agglutination with commercial antisera (Bio-Rad[®], Marnes-la-Coquette, France). An in-house multiplex PCR^{15,17} was used for the detection of virulence genes of diarrheagenic *Escherichia coli* targeted to CVD432 probe of enteroaggregative *E. coli* and the *lt* and *st* genes of enterotoxigenic *E. coli*. PCR products were visualized in a 2% agarose gel.

Parasitic pathogens were detected by direct microscopic observation from fresh and concentrated stool samples with

the merthiolate formalin ether method and the modified Kinyoun acid-fast stain from the concentrated samples for the detection of *Cryptosporidium* and *Cyclospora cayetanensis*.

The detection of rotavirus and adenovirus was performed with a rapid immunochromatographic test (bioNexia[®]; Rota-Adeno, Marcy-l'Etoile, France) from stool samples.

The different diagnostic techniques were performed based on diagnostic suspicion and clinical criteria. We should emphasize that there was no clinical request for Norovirus detection in the group of patients included in the study.

Statistical analysis. Clinical, epidemiologic, and laboratory data were collected on standardized forms and entered in a password protected database. Univariate and multiple logistic regression models were fitted for all clinical variables available using etiology as dependent variables. Interaction of independent variables was checked using the likelihood ratio test.

The area under the receiver operating characteristic (ROC) curves was used to compare the sensitivity and specificity of selected markers. Cutoff values were chosen based on the highest sensitivity and specificity to predict outcome using the "roctab/detail" function (Stata 11.0; Stata Corporation, College Station, TX). When the diagnostic performance was assessed for more than one variable, the estimates were derived from a logistic regression model using the selected markers or clinical features as independent variables and the condition to diagnose as the dependent variable. These analyses were carried out using the "Iroc," "Istat," and "roctab/graph" functions in Stata. Data were analyzed with STATA 11.

RESULTS

Characteristics of the study population and geographic distribution. During the study period, 1,218 episodes belonging to 1,185 patients returning from tropical or subtropical areas with a clinical suspicion of malaria were included in the study, and 46.8% were female. The most commonly visited area was sub-Saharan Africa (47.5%), followed by Southern Asia/Pacific (31.3%), Latin America (19.5%), and North Africa/Middle East (1.6%).

Among patients diagnosed with malaria, 85.3% had returned from sub-Saharan Africa; the single country with most malaria cases was Equatorial Guinea. Sub-Saharan Africa was the origin of 93% of patients diagnosed with *P. falciparum* malaria and all patients diagnosed with *P. malariae* and *P. ovale* malaria. Patients diagnosed with *P. vivax* malaria had arrived from South Asia/Pacific (55.6%) and Latin America (44.4%). Patients with arbovirus infection were mostly diagnosed after a stay in Southern Asia/Pacific (52.9%) and Latin America (44.1%), with Thailand and Indonesia as the most frequently visited countries. The distribution of patients with travelers' diarrhea and parasitic intestinal pathogens was more heterogeneous, although the most frequently visited region was sub-Saharan Africa (41.7%), and the most frequent visited country was India. Figure 1 shows the geographical distribution of the cases diagnosed with malaria and arbovirus infection.

Confirmed etiologic diagnosis. A confirmed etiologic diagnosis of arbovirus infection, malaria, or travelers' diarrhea and other intestinal pathogens was found in 238 (19.5%) cases. Malaria was responsible for 102 episodes (8.4%), arbovirus infection for 68 episodes (5.6%), and traveler's

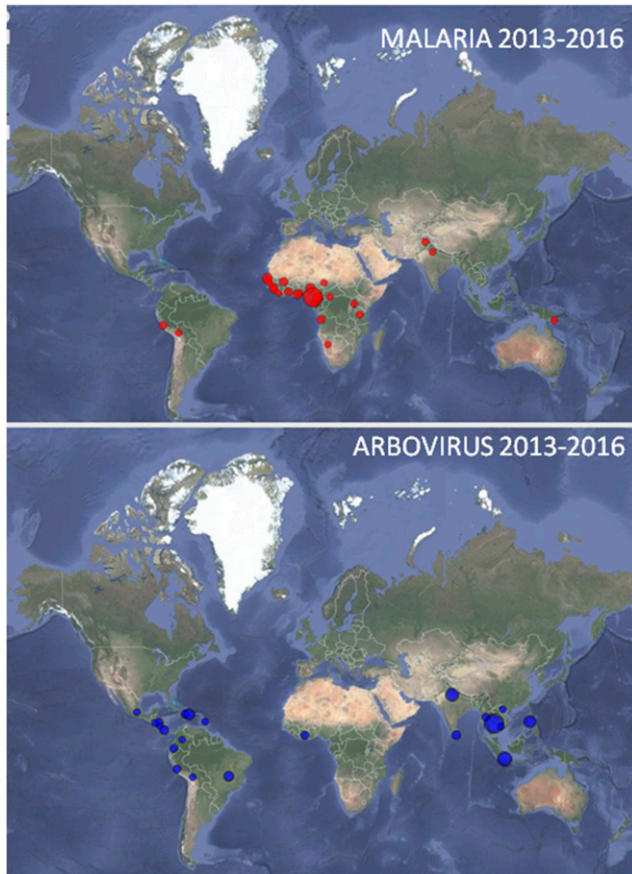


FIGURE 1. Geographic destination of travelers included in the study with malaria and confirmed arbovirus infection from 2013 to 2016. This figure appears in color at www.ajtmh.org.

diarrhea and other gastrointestinal symptoms for 72 episodes (5.9%) (Table 1). Four patients were diagnosed with more than one tropical infection: three cases of malaria and an intestinal pathogen and one case of arbovirus infection and an intestinal pathogen.

Among the malaria-confirmed cases, the most common species was *P. falciparum*, followed by *P. vivax*, *P. ovale*, and *P. malariae*. In one case, neither microscopic nor molecular methods could determine the *Plasmodium* species. The median parasitemia was 0.6% (IQR: 0.05–3.6). The most frequently found arbovirus was dengue, followed by chikungunya and Zika.

Regarding gastrointestinal symptoms, 40 cases were caused by a bacterial pathogen and 32 by a parasitic pathogen. However, we did not perform molecular or serological investigations to look for potential viruses associated with gastrointestinal (GI) symptoms. Diarrheagenic *E. coli* was the most commonly identified bacterial agent and *Giardia lamblia* and *Blastocystis hominis* were the most commonly identified parasitic agents. The latter probably not being the cause of infection. Table 1 shows the etiology of all intestinal pathogens identified.

Leukocyte and platelet counts may help establish fever etiology. Figure 2 shows a scatter plot with the distribution of platelets and leukocytes counts according to the different etiologies, and Table 2 shows the median leukocyte and platelet counts according to the malaria and arbovirus etiologies. The four episodes with more than one etiology were

TABLE 1

Etiology of infection in travelers presenting with acute febrile illness with a suspected diagnosis of malaria

Aetiology	Number (%)	N	%
Unknown	979 (80.4)*		
Arbovirus	68 (5.6)*		
Dengue		50	73.5
Chikungunya		12	17.7
Zika		6	8.8
Malaria	102 (8.4)*		
<i>Plasmodium falciparum</i>		86	84.3
<i>Plasmodium vivax</i>		9	8.8
<i>Plasmodium ovale</i>		4	3.9
<i>Plasmodium malariae</i>		2	2.0
<i>Plasmodium</i> spp.		1	1.0
Traveller's diarrhea	40 (3.3)*		
EAEC		21	52.5
ETEC		10	25.0
ETEC + <i>Shigella flexneri</i>		1	2.5
<i>Campylobacter jejuni</i>		3	7.5
<i>Salmonella typhimurium</i>		2	5.0
<i>Salmonella</i> spp.		1	2.5
<i>Vibrio</i> spp.		1	2.5
<i>Shigella sonnei</i>		1	2.5
Intestinal parasites	32 (2.6)*		
<i>Blastocystis hominis</i>		10	31.3
<i>Cyclospora cayatanensis</i>		1	3.1
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>		3	9.4
<i>E. histolytica/dispar</i> + <i>Iodamoeba butschlii</i>		1	3.1
<i>E. histolytica/dispar</i> + <i>Chilomastix mesnili</i>		1	3.1
<i>E. histolytica/dispar</i> + <i>Giardia lamblia</i>		1	3.1
<i>G. lamblia</i>		11	34.4
<i>G. lamblia</i> + <i>C. mesnili</i>		1	3.1
<i>G. lamblia</i> + <i>C. mesnili</i> + <i>Cryptosporidium</i> sp.		1	3.1
<i>Hymenolepis nana</i>		1	3.1
<i>Schistosoma intercalatum</i> + <i>Trichuris trichiura</i>		1	3.1

EAEC = enteroaggregative *Escherichia coli*; ETEC = enterotoxigenic *E. coli*.

* Percentages may not total 100 because patients may have more than one diagnosis.

classified in the malaria and arbovirus infection group because it is known that these diseases cause more abnormalities in platelet and leukocyte counts. Although some overlap was found, malaria presented a major trend toward thrombocytopenia without affecting leukocyte counts. In the cases of arbovirus, both leucopenia and thrombocytopenia were observed.

Malaria. Figure 3A shows the platelet distribution among patients with and without malaria. Platelet counts were significantly lower ($P < 0.001$) in patients with malaria compared with patients without malaria. The ROC curve analysis for platelet count and malaria yielded an area under the curve of 0.89 (95% CI: 0.86–0.93, $P < 0.05$) (Figure 4B). Applying a cutoff value of $150,000 \times 10^9/L$ (thrombocytopenia), the sensitivity, specificity, negative and positive predictive values were 82.4%, 82.9%, 98.1%, and 30.6%, respectively. There was a higher tendency toward thrombocytopenia in episodes caused by *P. falciparum* than for the other *Plasmodium* species, but these differences were not statistically significant. A weak but significant inverse correlation between parasitemia levels and platelet counts was observed ($r = -0.31$, $P < 0.01$). Eighteen patients diagnosed with malaria did not have thrombocytopenia. In 16 cases, it was caused by *P. falciparum* in patients returning from sub-Saharan Africa, one case was caused by *P. vivax* in a patient returning from Pakistan, and one case was caused by *P. ovale* in a patient returning from

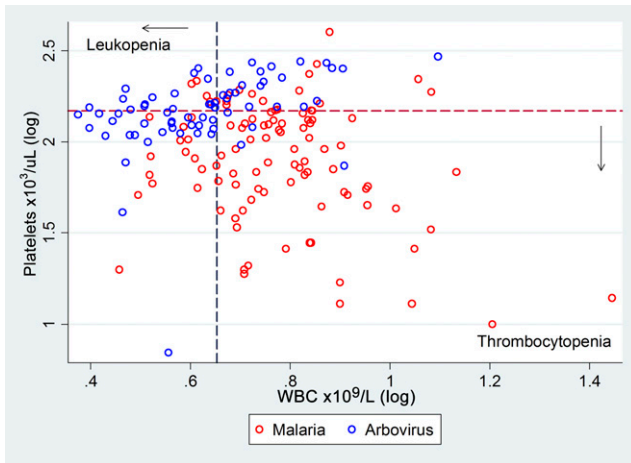


FIGURE 2. Distribution of white blood cell and platelet counts on admission in travelers with malaria and arbovirus infection. This figure appears in color at www.ajtmh.org.

Cameroon. Among the *P. falciparum* cases, three patients were travelers of sub-Saharan Africa origin living in a nonendemic area and visiting family or relatives in their country of origin, five patients had undergone previous episodes of malaria in previous travels to endemic areas, one patient was already under treatment when the platelet count was performed, and one patient was splenectomized.

Arbovirus infection. Both platelet and leukocyte counts in patients with arbovirus infection were significantly lower ($P < 0.001$) compared with patients without arbovirus infection (Table 2, Figure 4A). The ROC curve analysis for platelet and leukocyte counts and arbovirus infection yielded an area under the curve of 0.71 for platelet counts and 0.88 for leukocyte counts (Figure 4B). Applying a cutoff value of 4.00×10^9 leukocytes/L (leucopenia), the sensitivity, specificity, negative and positive predictive values were 72.1%, 87.3%, 98.1%, and 25.1%, respectively. The median platelet counts for patients with dengue, chikungunya, and Zika were 143, 223, and 155 ($\times 10^9/L$), respectively. The median leukocyte counts for patients with dengue, chikungunya, and Zika were 2.68, 3.24, and 3.55 ($\times 10^9/L$), respectively. The platelet and leukocyte levels were significantly lower in episodes caused by dengue ($P = 0.002$ and $P = 0.004$, respectively) compared with episodes caused by chikungunya.

The ROC curve for leukocyte counts, including only arbovirus infection and malaria cases, yielded an area under the curve of 0.78, and leucopenia had sensitivity, specificity, negative and positive predictive values of 72.1%, 59.8%, 78.4%, and 67.7%, respectively, to differentiate arbovirus infection from malaria.

TABLE 2

Platelet and leukocyte counts according to the etiology of fever in the returning traveler

Etiology (N)	Platelet counts ($10^9/L$)		Leukocyte counts ($10^9/L$)	
	Median	IQR	Median	IQR
Malaria (102)	89	52–135	4.75	3.73–6.00
Arbovirus infection (68)	154	120–1953	3.19	2.24–4.18
Travelers' diarrhea bacteria (40)	257	204–308	7.28	5.39–8.63
Intestinal parasites (32)	209	146–264	6.37	4.89–9.31
Unknown (979)	215	175–257	6.77	5.12–9.21

Travelers' diarrhea and other intestinal pathogens. No hematological parameter was significantly altered for patients, where a parasitic intestinal pathogen was identified. Platelet levels among patients with diarrhea of bacterial etiology were significantly higher ($P < 0.001$) compared with patients without this etiology. However, none showed a platelet count greater than $450,000 \times 10^9/L$ (thrombocytopenia¹⁸). Leukocyte levels were not significantly altered in patients with travelers' diarrhea of bacterial etiology.

DISCUSSION

In this study, we have shown that an initial laboratory screening using hematological parameters such as platelet and leukocyte counts might assist the clinical differential diagnosis in returning travelers. Indeed, we show that in the case of malaria, platelet counts under $150,000 \times 10^9/L$ (thrombocytopenia) have sensitivity and specificity values of 82.4%, and 82.9%, respectively, and a negative predictive value of 98.1%. Although this diagnostic performance is not sufficient to establish a diagnosis, the clinician can use its high negative predictive value to consider diagnoses other than malaria in an initial assessment. Moreover, we show an inverse correlation between parasitemia levels and platelet count, indicating that levels of thrombocytopenia can be used as a predictive factor of severity in malaria. Few publications directly correlate parasitemia with lower platelet counts, and this correlation has mainly been presented in *P. vivax* malaria.^{19–21} Thrombocytopenia in the absence of significant bleeding is not considered a clinical manifestation for severe malaria.²² However, some studies correlate the levels of thrombocytopenia with malaria severity.^{23–25} Our results show a tendency for *P. falciparum* malaria to have lower platelet counts compared with other malaria species. These results agree with previous studies,^{25,26} although other publications²⁷ show that *P. vivax* infection presents higher rates of thrombocytopenia. Our study does not have enough cases of *non-falciparum* malaria to verify if thrombocytopenia is a discriminating feature for a particular type of malaria.

Among patients diagnosed with *P. falciparum* malaria without thrombocytopenia, we show a high rate of patients with previous episodes of malaria (8/16). It is known that the repeated exposure to malaria parasites is associated with semi-immunity against malaria and a reduced risk of severe malaria.²⁸ Some studies have shown that malaria severity is lower in patients of sub-Saharan Africa origin living in non-endemic areas and visiting family or relatives in their country of origin.^{29,30} In addition, different hematological patterns have been observed in semi-immune patients compared with nonimmune patients, including a lower rate of severe thrombocytopenia.^{23,30} These findings could explain the lack of thrombocytopenia in patients previously exposed to malaria.

We have shown that low platelet counts are not specific to malaria because they are also associated with arbovirus infections. However, in arbovirus infections, we usually find concomitant leucopenia.⁷ In this study, we observed statistically lower leukocyte and platelet levels associated with dengue, chikungunya, and Zika. In our sample, leukocyte levels show a better diagnostic performance than platelets because leukocyte levels are more specifically altered in arbovirus infections.

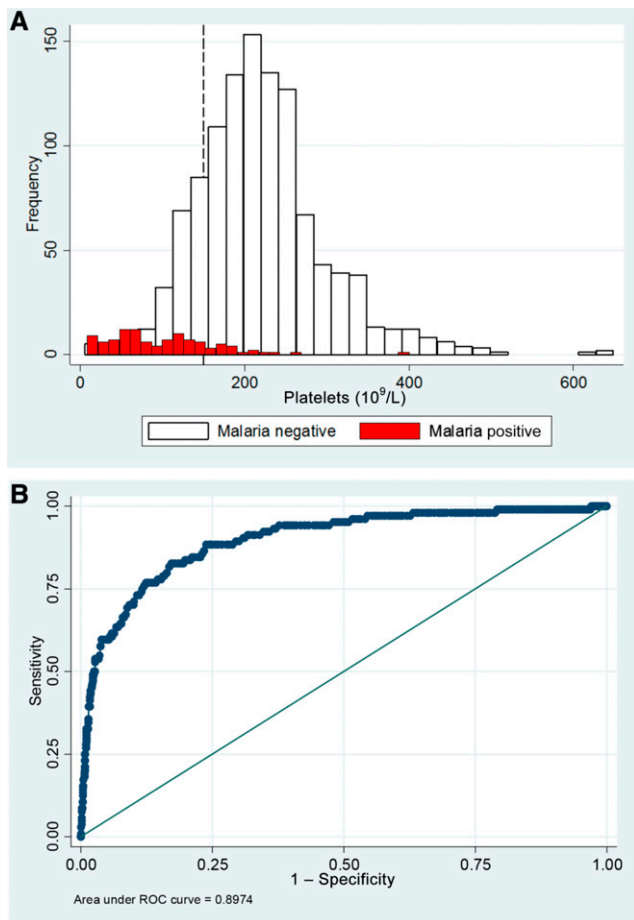


FIGURE 3. Platelet distribution in malaria and non-malaria cases (A) and diagnostic performance (area under the receiver operating characteristic [ROC] curve) for platelet counts to discriminate malaria and non-malaria cases (B). Dotted line indicates the cutoff value for thrombocytopenia. This figure appears in color at www.ajtmh.org.

Leukocyte counts of 4.00×10^9 leukocytes/L or less (leucopenia) have sensitivity and specificity values of 72.1% and 87.3%, respectively, and a negative predictive value of 98.1% for the detection of arbovirus infection. In addition, leucopenia showed a negative predictive value of 78.4% to differentiate malaria from arbovirus infection.

In agreement with previous studies,¹⁰ our results show that leucopenia and specially thrombocytopenia are more severe in dengue compared with chikungunya cases. No statistical significance in hematological parameters is shown for episodes caused by Zika due to the low number of included cases, since we only started testing for Zika virus in 2016, after the large 2015 Brazil outbreak.³¹ However, in agreement with previously reported cases, Zika cases in our study presented mild leucopenia.^{32,33}

No hematological parameter was significantly altered in episodes of travelers' diarrhea or where parasitic intestinal pathogens were identified, probably because of the lack of invasiveness of parasitic and bacterial agents causing gastrointestinal symptoms. *Blastocystis hominis* or *Hymenolepis nana* were identified in some episodes. Probably, in these cases the focus of fever was other than gastrointestinal but a parasitic study was additionally demanded by the clinician because of gastrointestinal symptoms or other epidemiological characteristics.

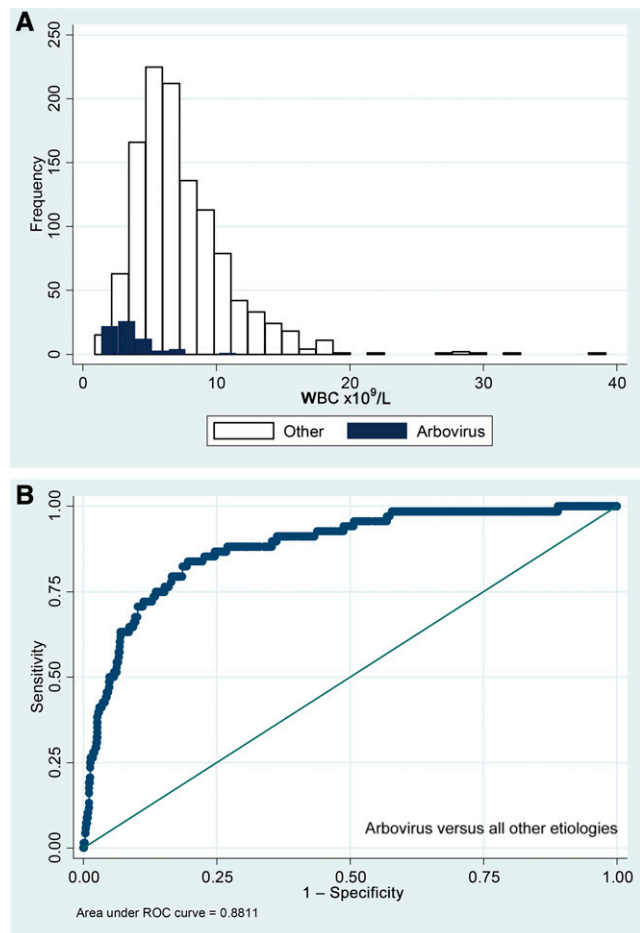


FIGURE 4. Leukocyte distribution in arbovirus and non-arbovirus cases (A) and diagnostic performance (area under the receiver operating characteristic [ROC] curve) for leukocyte counts to discriminate arbovirus and non-arbovirus infection cases (B). This figure appears in color at www.ajtmh.org.

In the cases included in our study, the country visited did not provide a major insight into the etiology. Most cases of *P. falciparum* malaria came from sub-Saharan Africa, particularly from Equatorial Guinea. However, because Equatorial Guinea is a former Spanish colony, and therefore a preferred destination, we do not consider it to reflect the severity of malaria in this country. Most cases of arbovirus infection arrived from Southern Asia/Pacific and Latin America. Our results show that the distribution of travelers' diarrhea and other gastrointestinal symptoms is more heterogeneous among tropical areas. These findings are in agreement with previously reported epidemiological information.³⁴

This study has several limitations. First, underlying conditions that could potentially alter leukocyte or platelet counts were not systematically investigated. Second, some of the selected cases may not correspond to acute febrile illness but rather to reported fevers. Finally, diagnoses other than malaria and arbovirus infection were not analyzed. These limitations would explain the large number of episodes of unknown etiology included in the study, although previous studies show a 25% rate of undiagnosed episodes of fever after travelling to the tropics.^{3,35} However, platelet and leukocyte counts were able to set apart malaria and arbovirus infections from other conditions. These indicators are inexpensive, easily available,

and can provide useful information in the differential diagnosis of returning travelers presenting with fever.

In conclusion, this study provides quantitative evidence for the potential role of platelet and leukocyte counts as diagnostic predictors of malaria and arbovirus infection, two of the most common causes of fever in the returning traveler and which may rapidly evolve into severe diseases. These parameters can be used as an initial guidance to accelerate the definitive diagnosis and administer the appropriate treatment.

Received September 6, 2018. Accepted for publication October 15, 2018.

Published online December 10, 2018.

Authors' addresses: Elisa Rubio, Izaskun Alejo-Cancho, Cristian Aylagas, Roser Ferré, Ma Rosa Albarracín, Verónica Gonzalo, Josep Barrachina, Miriam José Álvarez-Martínez, María Eugenia Valls, Jordi Mas, Jordi Vila, Miguel J. Martínez, and Climent Casals-Pascual, Department of Clinical Microbiology, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain, E-mails: elrubio@clinic.cat, alejo@clinic.cat, aylagas@clinic.cat, mrferré@clinic.cat, ralbarra@clinic.cat, vgonzal1@clinic.cat, barrachina@clinic.cat, malvarez@clinic.cat, mevals@clinic.cat, jmas@clinic.cat, jvila@clinic.cat, myoldi@clinic.cat, and ccasals@clinic.cat. Daniel Camprubí and Irene Losada, Department of Tropical Medicine and International Health, Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain, E-mails: dcamprub@clinic.cat and ilosada@clinic.cat.

REFERENCES

- Bottieau E, Clerinx J, Van Den Enden E, Van Esbroeck M, Colebunders R, Van Gompel A, Van Den Ende J, 2007. Fever after a stay in the tropics: diagnostic predictors of the leading tropical conditions. *Medicine (Baltimore)* 86: 18–25.
- Freedman DO, Weild LH, Kozarsky PE, Fisk T, Robins R, von Sonnenburg F, Keystone JS, Pandey P, Cetron MS; Geo-Sentinel Surveillance Network, 2006. Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travellers. *N Engl J Med* 354: 119–130.
- Kutsuna S, Hayakawa K, Kato Y, Fujiya Y, Mawatari M, Takeshita N, Kanagawa S, Ohmagari N, 2015. Comparison of clinical characteristics and laboratory findings of malaria, dengue, and enteric fever in returning travelers: 8-year experience at a referral center in Tokyo, Japan. *J Infect Chemother* 21: 272–276.
- Wickramasinghe SN, Abdalla SH, 2000. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13: 277–299.
- Ladhani S, Lowe B, Cole AO, Kowuondo K, Newton CR, 2002. Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. *Br J Haematol* 119: 839–847.
- Kelton JG, Keystone J, Moore J, Denomme G, Tozman E, Glynn M, Neame PB, Gaudie J, Jensen J, 1983. Immune-mediated thrombocytopenia of malaria. *J Clin Invest* 71: 832–836.
- Potts JA, Rothman AL, 2009. Clinical and laboratory features that distinguish dengue from other febrile illnesses in endemic populations. *Trop Med Int Health* 13: 1328–1340.
- Daumas RP, Passos SR, Oliveira RV, Nogueira RM, Georg I, Marzochi KB, Brasil P, 2013. Clinical and laboratory features that discriminate dengue from other febrile illnesses: a diagnostic accuracy study in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis* 13: 77.
- Musso D, Gubler DJ, 2016. Zika virus. *Nature* 11: 10–20.
- Lee VJ, Chow A, Zheng X, Carrasco LR, Cook AR, Lye DC, Ng LC, Leo YS, 2012. Simple clinical and laboratory predictors of chikungunya versus dengue infections in adults. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1786.
- Chraïbi S, Najjoulah F, Bourdin C, Pegliasco J, Deligny C, Résière D, Meniane JC, 2016. Two cases of thrombocytopenic purpura at onset of Zika virus infection. *J Clin Virol* 83: 61–62.
- Steffen R, Hill DR, DuPont HL, 2015. Traveler's diarrhea: a clinical review. *JAMA* 313: 71.
- Okhuysen PC, 2013. Traveler's diarrhea due to intestinal protozoa. *Clin Infect Dis* 33: 110–114.
- Azmatullah A, Qamar FN, Thaver D, Zaidi AK, Buhatta ZA, 2015. Systematic review of the global epidemiology, clinical and laboratory profile of enteric fever. *J Glob Health* 5: 020407.
- Zboromyrska Y, Hurtado JC, Salvador P, Alvarez-Martínez MJ, Valls ME, Mas J, Marcos MA, Gascón J, Vila J, 2014. Aetiology of traveller's diarrhoea: evaluation of a multiplex PCR tool to detect different enteropathogens. *Clin Microbiol Infect* 20: 0753–0759.
- Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS, 2005. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* 43: 4977–4983.
- Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC, 2004. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol* 42: 5849–5853.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW, 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127: 2391–2406.
- Thachil J, 2017. Platelets and infections in the resource-limited countries with a focus on malaria and viral haemorrhagic fevers. *Br J Haematol* 177: 960–970.
- Grynberg P, Fernandes Fontes CJ, Braga EM, 2007. Association between particular polymorphic residues on apical membrane antigen 1 (AMA-1) and platelet levels in patients with vivax malaria. *Clin Microbiol Infect* 13: 1089–1094.
- Leal-Santos FA, Silva SB, Crepaldi NP, Nery AF, Martin TO, Alves-Junior ER, Fontes CJ, 2013. Altered platelet indices as potential markers of severe and complicated malaria caused by *Plasmodium vivax*: a cross-sectional descriptive study. *Malar J* 12: 462.
- Gachot B, Ringwald P, 1998. Severe malaria [article in French]. *Rev Prat* 48: 273–278.
- Berens-Riha N et al., 2014. Evidence for significant influence of host immunity on changes in differential blood count during malaria. *Malar J* 13: 155.
- Lacerda MV, Mourão MP, Coelho HC, Santos JB, 2011. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 (Suppl 1): 52–63.
- Lampah DA et al., 2015. Severe malarial thrombocytopenia: a risk factor for mortality in Papua, Indonesia. *J Infect Dis* 211: 623–634.
- Khan SJ, Abbas Y, Marwat MA, 2012. Thrombocytopenia as an indicator of malaria in adult population. *Malar Res Treat* 2012: 405981.
- Kochar DK et al., 2010. Thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and mixed infection malaria: a study from Bikaner (northwestern India). *Platelets* 21: 623–627.
- Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Simon I, 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434: 214–217.
- Jelinek T et al., 2002. Imported falciparum malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases. *Clin Infect Dis* 34: 572–576.
- Pistone T, Diallo A, Mechain M, Receveur MC, Malvy D, 2014. Epidemiology of imported malaria give support to the hypothesis of “long-term” semi-immunity to malaria in sub-Saharan African migrants living in France. *Travel Med Infect Dis* 12: 48–53.
- Possas C, 2016. Zika: what we do and do not know based on the experiences of Brazil. *Epidemiol Health* 38: e2016023.
- Duijster JW et al.; Dutch ZIKV Study Team, 2016. Zika virus infection in 18 travellers returning from Surinam and the Dominican Republic, The Netherlands, November 2015–March 2016. *Infection* 44: 797–802.
- Meltzer E, Leshem E, Lustig Y, Gottesman G, Schwartz E, 2016. The clinical spectrum of Zika virus in returning travelers. *Am J Med* 129: 1126–1130.
- Leder K et al.; GeoSentinel Surveillance Network, 2013. GeoSentinel surveillance of illness in returned travelers, 2007–2011. *Ann Intern Med* 158: 456–468.
- Harvey K, Esposito DH, Han P, Kozarsky P, Freedman DO, Plier DA, Sotir MJ; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013. Surveillance for travel-related disease—GeoSentinel Surveillance System, United States, 1997–2011. *MMWR Surveill Summ* 62: 1–23.

OBJETIVO 4:

Evaluar el rendimiento de un nuevo ensayo de inmunoglutinación magnética que detecta el antígeno viral NS1 para el diagnóstico de infecciones agudas por virus dengue.

ARTÍCULO 6

Evaluation of a novel microfluidic immuno-magnetic agglutination assay method for the detection of dengue virus NS1 antigen

Evaluación de un nuevo ensayo microfluídico de aglutinación inmuno-magnética para la detección de antígeno NS1 de virus dengue

Autores:

Izaskun Alejo-Cancho, Jessica Navero-Castillejos, Aida Peiró-Mestres, Rosa Albarracín, Josep Barrachina, Alexander Navarro, Verónica Gonzalo, Víctor Pastor, José Muñoz, Miguel J Martínez

Revista, volumen (número): páginas, fecha de publicación:

PLOS Neglected Tropical Diseases, 14 (2), Febrero 2020

Factor de impacto - Cuartil: 4,487 - Q1

Introducción y objetivo:

El virus dengue (VDEN) es el arbovirus más importante y la enfermedad transmitida por vectores con mayor crecimiento a nivel mundial, causando millones de infecciones en países endémicos y en viajeros que regresan de dichos países. Son necesarios métodos de diagnóstico rápido para mejorar el manejo clínico de los pacientes y para prevenir la transmisión local en zonas no endémicas. La detección de la proteína no-estructural 1 (NS1) de VDEN es una herramienta útil para el diagnóstico, pero los métodos disponibles en la actualidad son lentos o carecen de la sensibilidad suficiente.

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar un nuevo test diagnóstico rápido de detección de NS1 de VDEN: un ensayo de aglutinación inmuno-magnética (IMA) microfluidico y semicuantitativo basado en la agregación de nanopartículas magnéticas y

su detección mediante un lector electrónico (Virotrack Dengue Acute y Blubox, Blusense diagnostics).

Material y métodos:

Se empleó un panel de 135 muestras de viajeros que habían regresado de países endémicos de dengue (74 muestras positivas para dengue incluyendo los cuatro serotipos del virus, 26 muestras positivas para Zika, 25 muestras positivas para chikungunya, 5 muestras positivas para malaria y 5 muestras negativas). Las muestras se testaron mediante tres métodos de detección de antígeno diferentes: SD Dengue NS1 Ag ELISA (técnica ELISA, el método más sensible para la detección de NS1 actualmente), SD BIOLINE Dengue Duo (técnica inmunocromatográfica (ICT), empleada para el diagnóstico rápido de la enfermedad) y ViroTrack Dengue Acute (técnica IMA).

Resultados:

La sensibilidad observada para SD Dengue Elisa NS1, ViroTrack Dengue Acute y SD BIOLINE Dengue Duo fue 97,2%, 91,1% y 68,1% respectivamente. Todos los métodos mostraron una alta especificidad (98,4% en el caso de ViroTrack Dengue Acute y 100% para los otros dos métodos). Los métodos basados en ELISA e IMA sólo fallaron al detectar muestras de pacientes infectados con el serotipo 2 de VDEN. Los métodos ICT e IMA obtuvieron los resultados en 15 minutos, frente a las 2,5 horas del método ELISA. Los métodos ELISA e IMA realizan una lectura de resultados cuantificada, mientras que la lectura de la ICT es subjetiva y puede mostrar variaciones entre observadores.

Discusión:

ViroTrack Dengue Acute es un ensayo sensible y específico para la detección de NS1 de VDEN. Aporta resultados de manera más rápida que el método ELISA y sus resultados son mejores que los obtenidos por el otro método rápido (ICT). Por lo tanto, representa una herramienta útil para el diagnóstico rápido de dengue en viajeros que regresan de países endémicos.

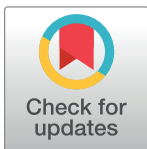
RESEARCH ARTICLE

Evaluation of a novel microfluidic immuno-magnetic agglutination assay method for detection of dengue virus NS1 antigen

Izaskun Alejo-Cancho¹, Jessica Navero-Castillejos², Aida Peiró-Mestres², Rosa Albarracín¹, Josep Barrachina¹, Alexander Navarro¹, Verónica Gonzalo¹, Víctor Pastor¹, José Muñoz^{2,3}, Miguel J. Martínez^{1,2*}

1 Department of Clinical Microbiology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain, **2** ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Department of Tropical Medicine, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

* myoldi@clinic.cat



Abstract

Background

Dengue virus (DENV) is the most important arbovirus worldwide, causing infections in endemic countries and returning travellers from these areas. Rapid diagnostic tests are needed to improve patient management and monitor local transmission. The detection of DENV non-structural protein 1 (NS1) is a useful tool for the diagnosis, but the currently available methods can be time consuming or lack sensitivity. The objective of our study was to evaluate a new rapid and semi-quantitative microfluidic DENV NS1 immuno-magnetic agglutination assay based on aggregation of magnetic nanoparticles detected by an electronic reader (Virotrack Dengue Acute and Blubox, Blusense diagnostics, Copenhagen, Denmark).

Methodology/Principal findings

A panel of 135 serum samples from travelers returning from dengue endemic countries was analyzed (74 DENV positive samples including the four DENV serotypes, 26 Zika virus positive samples, 25 chikungunya virus positive samples, 5 malaria positive samples and 5 negative samples). Samples were tested by three different antigen detection methods: SD Dengue NS1 Ag ELISA, SD BIOLINE Dengue Duo and ViroTrack Dengue Acute. The sensitivity observed for SD Dengue NS1 Ag ELISA, ViroTrack Dengue Acute and SD BIOLINE Dengue Duo was 97.2%, 91.1% and 68.1%, respectively. All methods showed high specificity (98.4% for ViroTrack Dengue Acute and 100% for both SD Dengue NS1 Ag ELISA and SD BIOLINE Dengue Duo). SD Dengue NS1 Ag ELISA and ViroTrack Dengue Acute only failed to detect samples positive for DENV-2.

Conclusions/Significance

ViroTrack Dengue Acute is a sensitive and specific assay for DENV NS1 detection. It provides faster results than the ELISA method and a better performance than the rapid

OPEN ACCESS

Citation: Alejo-Cancho I, Navero-Castillejos J, Peiró-Mestres A, Albarracín R, Barrachina J, Navarro A, et al. (2020) Evaluation of a novel microfluidic immuno-magnetic agglutination assay method for detection of dengue virus NS1 antigen. *PLoS Negl Trop Dis* 14(2): e0008082. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008082>

Editor: Brett M. Forshey, DoD - AFHSB, UNITED STATES

Received: May 15, 2019

Accepted: January 23, 2020

Published: February 18, 2020

Copyright: © 2020 Alejo-Cancho et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files

Funding: This study was partially supported by grant 2017 SGR 794 to MJM from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) - Departament d'Empresa i Coneixement, Generalitat de Catalunya (<http://agaur.gencat.cat>). The funders had no role in study design, data collection and

analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

immuno-chromatographic tests. ViroTrack Dengue Acute could represent a valuable tool for rapid diagnosis of DENV infections in returning travellers from endemic countries.

Author summary

Dengue virus is a human pathogen that causes millions of infections each year. It can be found in nearly all tropical areas, and people living in those regions and travelers who visit them are at risk of disease. The symptoms may vary from a mild flu-like disease to severe hemorrhagic symptoms. Accurate diagnosis of dengue is important for a better management of the disease and for epidemiological surveillance. Detection of DENV antigen is a useful tool to diagnose DENV infections. However, currently available techniques are not rapid (ELISA assays) or not accurate enough (immuno-chromatographic tests). Here, we evaluate a new antigen detection technique based on aggregation of magnetic nanoparticles. The method combines a short time to results (12 minutes) with a high diagnostic performance. We therefore conclude that this new technique could be a useful tool for the diagnosis of dengue.

Introduction

Dengue virus (DENV) (genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*) is mainly transmitted by the bites of infected *Aedes* mosquitoes, and there are four different serotypes of the virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4). Infection by one of the DENV serotypes does not induce protection against other serotypes, and secondary infections are associated with a higher risk of severe clinical disease [1] [2]. DENV infection has a large spectrum of clinical manifestations; from asymptomatic infections to a febrile illness (dengue fever) and in a minority of cases a severe life-threatening disease [3]. DENV is considered the most important arthropod borne virus (arbovirus) and the fastest growing vector borne disease worldwide [3]. It is estimated that 390 millions of infections by DENV may occur annually, being 96 millions of them symptomatic [4]. Most of the cases of DENV infection occur in endemic countries. The number of travelers returning from endemic countries is also increasing, and therefore DENV infection has become a common diagnosis among travelers presenting fever at their return [5]. In a surveillance study in returning travelers from 2007 to 2011, DENV infection accounted for 15% of the etiologies of febrile illness [6].

Laboratory diagnosis of DENV infection can be achieved by direct and indirect methods. Direct methods include detection of the viral genome by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), virus isolation or detection of viral antigens. Indirect diagnosis is based on detection of immunoglobulin (Ig) M and IgG antibodies, and the confirmation by indirect methods is achieved by the observation of seroconversion in paired acute and convalescent serum samples [3]. The detection of non-structural protein 1 (NS1) of DENV, a glycoprotein secreted from infected cells, is a useful tool for the diagnosis of acute DENV infection. NS1 antigen can be detected by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) or immuno-chromatographic assays (ICT). Enzyme-linked immunosorbent assays have proven to be a useful tool for NS1 antigen detection, with sensitivity values between 57.7%-95.1% according to different studies [7] [8] [9] [10] [11]. However, the ELISA time to results (around 2-3h) and the need for certain laboratory expertise to perform them make them not the best choice for rapid diagnosis. Immuno-chromatographic tests, on the contrary, are easy to use and provide

results in minutes. However, they offer a lower diagnostic performance, with sensitivities ranging from 40% to 79.1% among different reports [9][11]. The specificity observed for both techniques is very high (95%-100%)[7][8][10][11], and therefore a positive NS1 detection represents a laboratory confirmed case of DENV infection (<https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-and-disease-data/eu-case-definitions>).

Immuno-magnetic agglutination (IMA) assays are newly developed methods that use magnetic particles coated with capture molecules (e.g. antibodies, ligands, nucleotides) that bind specifically to the target biomarker, forming clusters that enable the detection. Different assays have been developed for the detection of pathogens, small molecules and proteins[12]. These methods are easy to use and can improve the sensitivity and time to the results of classic methods such as ELISAs [13]. An assay to detect DENV NS1 antigen has been developed based on IMA technology[14].

A rapid and reliable diagnostic test for acute DENV infections would contribute to a better patient management and would be helpful for surveillance programs in order to monitor local virus transmission in non-endemic areas where the vectors are present. The objective of our study was to evaluate a new rapid and semi-quantitative microfluidic DENV NS1 immuno-magnetic agglutination (IMA) assay based on aggregation of magnetic nanoparticles detected by an electronic reader (Virotrack Dengue Acute and Blubox, Blusense diagnostics). The performance of the test was evaluated in samples from acute cases of DENV, chikungunya virus (CHIKV), Zika virus (ZIKV) and *Plasmodium* infections and was compared against established methods for detection of DENV NS1 antigen.

Materials and methods

Samples

A panel of 135 serum samples from travelers returning from dengue endemic countries was analyzed in this study. The panel included 74 DENV positive samples by real time RT-PCR including all DENV serotypes (26 DENV-1, 24 DENV-2, 15 DENV-3, 7 DENV-4, 2 non typed DENV), 26 ZIKV positive samples by real time RT-PCR, 25 CHIKV positive samples by real time RT-PCR, 5 malaria positive samples by thick and thin blood smear and 5 negative samples from patients with fever returning from endemic countries in which an arboviral infection was ruled out. A summary of the samples included in the study, according to days after the onset of symptoms and the geographical area visited by the travelers is shown in Fig 1. The median age of travelers was 35 years old (range 6–74) and 51% were female.

Laboratory diagnosis

Acute DENV infections in travelers were diagnosed by detection of DENV RNA in serum samples. The following methods were used for detection and/or serotyping of DENV: a commercial real-time RT-PCR (LightMix Modular Dengue, TIB Molbiol, Berlin, Germany, performed on LightCycler 480 II thermal cycler, Roche), an in-house real-time RT-PCR (performed on Stratagene Mx3000P thermal cycler, Thermo Fisher Scientific)[15] or an in-house generic flavivirus RT-PCR [16]. RT-PCR products obtained with the later method were then visualized in a 2% agarose gel followed by sequencing. The different methods used reflect the availability of diagnostic assays in different periods in our laboratory: the in-house real time RT-PCR was substituted in 2017 by the commercial assay and the generic flavivirus RT-PCR was used for serotyping three samples. Dengue cases were classified as secondary infections when pre-existing immunoglobulin (Ig) G against DENV (measured by PanBio ELISA (Alere, Brisbane, Australia)) were present in the sample positive for DENV RNA [3]. The diagnosis of acute CHIKV and ZIKV infections was achieved by specific real-time

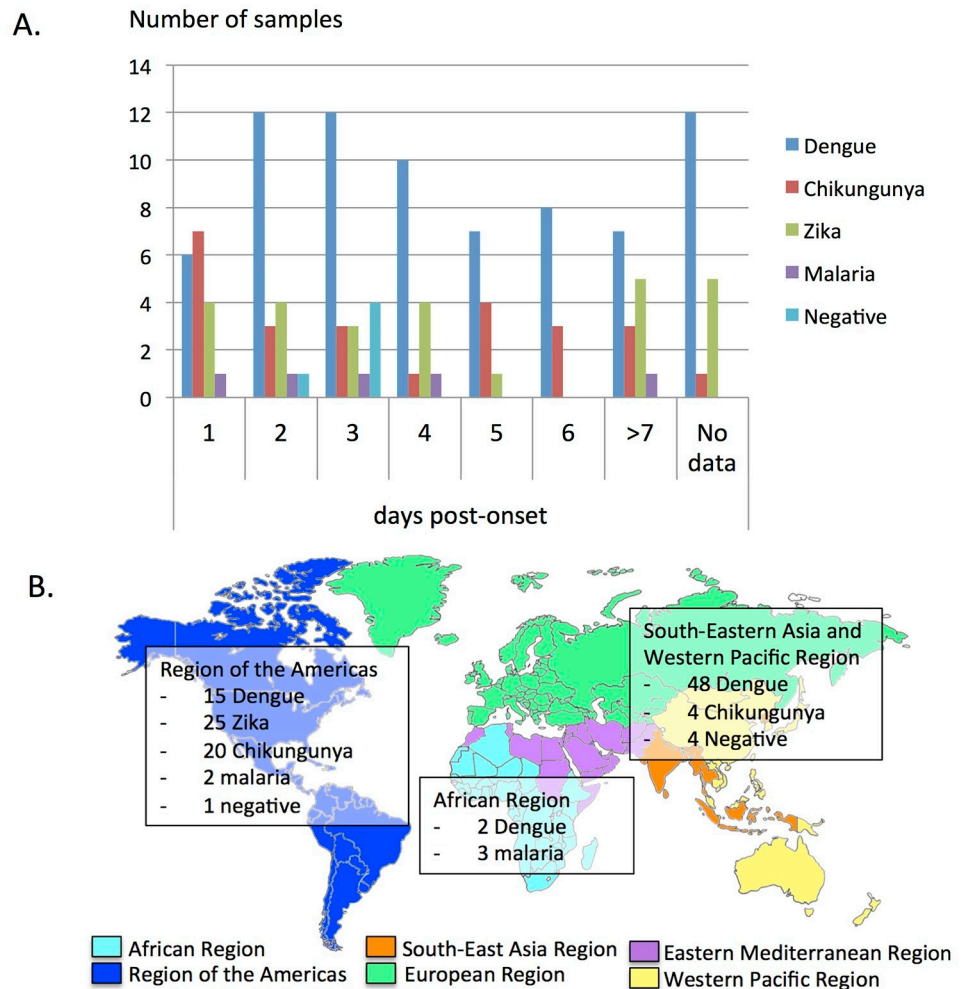


Fig 1. A. Distribution of samples by day post-onset of symptoms and final diagnosis. B. Distribution of samples by visited region, according to the WHO regions. In 11 samples (9 positive DENV samples, one positive ZIKV sample and one positive CHIKV sample) the country visited was not recorded.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008082.g001>

RT-PCR (RealStar Chikungunya Virus RT-PCR kit and RealStar Zika Virus RT-PCR kit, Altona Diagnostics GmbH, Hamburg, Germany). Malaria cases were diagnosed by thick and thin blood smears. All samples were stored frozen at -80°C until the DENV NS1 assays were performed.

Tests for DENV NS1 antigen detection

The samples were tested by three different methods for detection of DENV NS1 antigen: SD Dengue NS1 Ag ELISA (Standard Diagnostic Inc, Kyongii-Do, Korea), SD BIOLINE Dengue Duo (Standard Diagnostic Inc, Kyongii-Do, Korea) and ViroTrack Dengue Acute (BluSense Diagnostics, Copenhagen, Denmark). All assays were performed according to the manufacturer's instructions.

SD Dengue NS1 Ag ELISA (hereinafter also referred to as ELISA) is an enzyme-linked immunosorbent assay for the qualitative detection of NS1 antigen in human serum. SD BIOLINE Dengue Duo kit is a rapid immunochromatographic test (hereinafter also referred to as immunochromatographic test or ICT) that detects both DENV NS1 antigen and antibodies

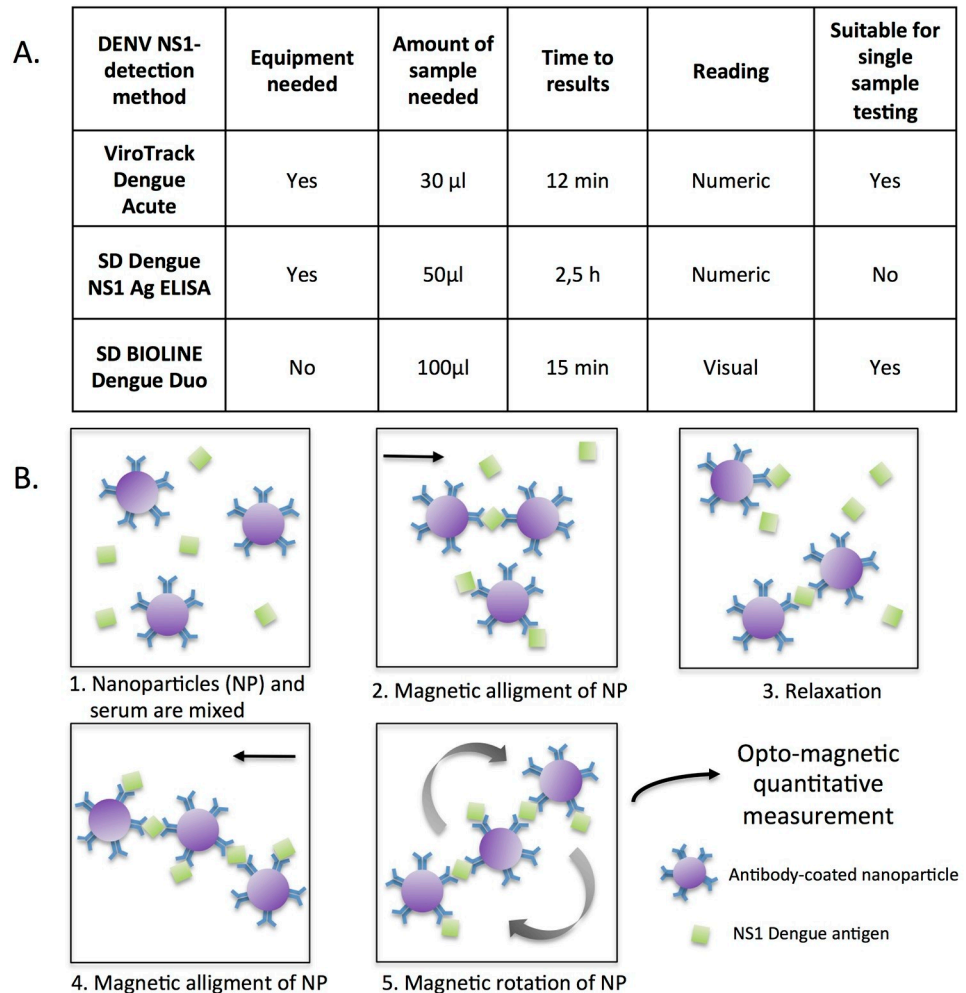


Fig 2. A. Overview of the three DENV NS1 detection methods. B. Schematic principle of the IMA technology. Magnetic nanoparticles coated with monoclonal antibodies against DENV NS1 protein are incubated with the serum sample. Incubation in a strong magnetic field induces NS1-mediated nanoparticle aggregation. The concentration of NS1 in the sample is quantified by measuring the modulation of a transmitted laser light upon magnetic rotation of nanoparticles.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008082.g002>

against DENV (IgM/IgG) in human serum, plasma or whole blood. ViroTrack Dengue Acute (hereinafter also referred to as immuno-magnetic agglutination assay or IMA) is a rapid and semi-quantitative microfluidic DENV NS1 detection method based on IMA technology[14]. The IMA test uses magnetic nanoparticles coated with a mix of monoclonal antibodies capable of detecting NS1 from all four DENV serotypes. The test cannot differentiate between the serotypes and returns a positive, negative, or equivocal value relative to the total amount of DENV NS1 antigen (of one or multiple serotypes) present in the sample. The kit consists on a cartridge in which 30 μ l of serum, plasma, whole blood or capillary blood are introduced. This cartridge is then inserted on the reader (Blubox; BluSense Diagnostics, Copenhagen, Denmark), in which all the self-contained sample preparation, mixing and reading steps take place. The reading is automatic and quantitative, and the results are obtained on the screen in 12 minutes after loading the cartridge. An overview of the main characteristics of the NS1 detection assays and the principle of the IMA technology is shown in Fig 2.

Statistical analysis

Sensitivity, specificity, likelihood ratios and agreement values were calculated for all methods having molecular techniques as the gold standard. Sensitivity was calculated as: true positives/(true positives + false negatives) and specificity as: true negatives/(true negatives + false positives). Confidence interval for sensitivity and specificity were calculated using the efficient-score method described by Newcomb based on the procedure described by Wilson [17]. Likelihood ratios indicate the increase or decrease of probability for a disease for the given test results, and were calculated as follows: positive likelihood ratio (LR+) = sensitivity/(1-specificity); negative likelihood ratio (LR-) = (1-sensitivity)/specificity and interpreted based on Hayden et al [18]. Kappa coefficient, a measurement of nonrandom agreement between measurements, was also calculated and interpreted following Landis and Koch criteria [19].

Ethics statement

This study was approved by the Ethical Comitee of Hospital Clinic (File HCB/2018/0931). Leftovers of routine diagnostic serum samples were anonymized and stored frozen until testing.

Results

All 135 serum samples were tested by ViroTrack Dengue Acute, 133 samples by SD Dengue NS1 Ag ELISA and 130 samples by SD BIOLINE Dengue Duo kit (some samples could not be tested by all methods due to insufficient sample volume).

The sensitivity, specificity, positive and negative likelihood ratios and kappa statistic values obtained are summarized in Table 1. The results obtained for each method by type of pathogen are shown in Table 2. Sensitivity values were higher with the ELISA (97.2%), followed by the IMA assay (91.9%) and the ICT (68.1%). Specificity was 100% for ELISA and ICT and 98.4% for the IMA test. One ZIKV positive sample tested positive in IMA assay. This sample was obtained two days after the onset of the symptoms and tested positive for ZIKV and negative for DENV and CHIKV by real-time RT-PCR. This apparent cross-reactivity was not observed in the other 25 ZIKV positive samples tested.

For all three methods positive likelihood ratios >10 were obtained, which means that a positive result has large effect on post-test probability. For negative likelihood ratio, a ratio <0.1 was obtained both for IMA and ELISA test, which implies a large effect on post-test probability, and a ratio of 0.3 for ICT, which means a small effect on post-test probability.

Both ELISA and IMA methods showed an almost perfect agreement with the real-time RT-PCR gold standard according to the kappa statistic values and Landis and Koch criteria, whereas the ICT showed a substantial agreement.

Table 1. Sensitivity, specificity, likelihood ratios and Kappa statistic results for each test with a 95% confidence interval. The gold standard used for the final diagnosis was the DENV RT-PCR result.

	Sensitivity (% , 95% CI)	Specificity (% , 95% CI)	Positive Likelihood ratio	Negative likelihood ratio	Kappa (value, 95% CI)
ViroTrack Dengue Acute	91.9 (82.6–96.7)	98.4 (90–99.9)	>10	0.08 (0.04–0.2)	0.9 (0.8–1)
SD Dengue Ag NS1 ELISA ¹	97.2 (89.4–99.5)	100 (92.6–100)	>10	0.03 (0.007–0.11)	1 (0.9–1)
SD BIOLINE Dengue Duo ¹	68.1 (55.7–78.5)	100 (90.6–100)	>10	0.36 (0.25–0.52)	0.7 (0.6–0.8)

¹ Due to insufficient sample volume in DENV positive samples 2 SD Dengue NS1 Ag ELISA and 5 SD BIOLINE Dengue Duo could not be performed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008082.t001>

Table 2. Positive results from the total of positive samples tested.

Panel	Number of samples	Positive by ViroTrack Dengue Acute		Positive by SD Dengue NS1 Ag ELISA		Positive by SD BIOLINE Dengue Duo	
		N	%	N	%	N	%
DENV	74	68	91.9	70 ¹	97.2	47 ²	68.1
Serotype-1	26	26	100	26	100	20 ²	83.3
Serotype-2	24	19	79.2	21 ¹	95.5	14 ²	66.7
Serotype-3	15	15	100	15	100	11	73.3
Serotype-4	7	7	100	7	100	1	1.4
Non-typed	2	1	50	1	50	1	50
ZIKV	26	1	3.8	0	0	0	0
CHIKV	25	0	0	0	0	0	0
Malaria	5	0	0	0	0	0	0
Negative	5	0	0	0	0	0	0

¹ Due to insufficient sample volume SD Dengue NS1 Ag ELISA could not be performed in 2 DENV-2 samples.

² Due to insufficient sample volume in 2 DENV-1 samples and 3 DENV-2 samples SD BIOLINE Dengue Duo could not be performed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008082.t002>

The ELISA and the IMA assay detected all DENV-1, DENV-3 and DENV-4 positive samples included in the study. Detection rates for DENV-2 positive samples for the ELISA and IMA assays were 95.5% and 79.2%. The tested panel included eight samples from secondary DENV infections: seven were detected by the ELISA, six by the IMA assay and four by the ICT.

Detection rates by days post-onset are shown on Supplementary material (S1 Table), as well as true positive (TP), true negative (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values for each test (S2 Table).

Discussion

DENV infection is a frequent diagnosis in travelers returning from endemic countries[5][6]. The clinical presentation of the infection can range from asymptomatic or mild disease to a severe syndrome. A rapid diagnostic test for dengue could contribute to better patient management and facilitate screening of patients for arboviral surveillance programs in non-endemic areas [20]. In the last years, local transmission of DENV and CHIKV has been documented in several European countries, including the first autochthonous cases in Spain in 2018 [21].

Detection of DENV NS1 protein in serum of infected patients represents the principal antigen-detection diagnostic method for DENV infections. A variety of both ELISAs and ICTs are commercially available. Previous studies have observed sensitivity values of 57.7%-95.1% for ELISA assays[7][8][9][10][11] and 40%-79.1% for immunochromatographic tests[9][11]. While the diagnostic performance of ELISA-based methods is clearly superior to that of immunochromatography-based rapid tests, ELISA methods are more time-consuming requiring 2-3h until the results are obtained. In addition, unlike rapid tests, ELISA-based assays are not as suitable as rapid tests for screening of individual samples, given that they usually require the use of multiple controls in each run. Thus, ELISA-based tests are not optimal for urgent testing of individual samples and the rapid tests, which are suitable for individual sample testing, do not perform sufficiently well.

Immuno-magnetic agglutination assays have been recently developed for the detection of various biomarkers [12][22]. Their simplicity of use and rapid time to results are interesting features for rapid diagnosis of infectious diseases. In this study, we have evaluated a novel IMA

assay for detection of DENV NS1 antigen. We compared the IMA assay with an ELISA and with an ICT method, considering the RT-PCR results as the gold standard. On the one hand, it was important to compare the IMA with the ELISA, which represents the reference method for NS1 antigen detection. On the other hand, it was specifically relevant to compare the IMA to the ICT, as both assays represent rapid diagnostic testing and therefore would be used in the same clinical situations.

We show that the sensitivity of the IMA (91.9%) is notably higher than the ICT (68.1%) and only slightly lower than the ELISA (97.2%). The IMA requires the lowest amount of sample, is very simple to perform, provides results in less than 15 minutes and offers a semi-quantitative reading. These features make the IMA a promising candidate for rapid DENV NS1 diagnostic testing.

The IMA technology seems to be not exempt from some limitations that have been described for NS1 detection assays, such as the lower sensitivity for DENV-2 and for secondary dengue infections. DENV-2 was the least detected serotype by all three methods. IMA technology failed to detect the NS1 protein in 6 cases of confirmed DENV infection by RT-PCR, being 5 of them DENV-2 and one non-typed DENV. Limitations in detecting DENV-2 NS1 antigen have already been addressed in other studies[7][8], obtaining a sensitivity of 63% for DENV-2 against a 84% of sensitivity of the other three serotypes pooled[23]. A decrease in sensitivity of NS1 detection kits has also been observed during DENV-2 outbreaks[24]. This phenomenon could be related to lower NS1 protein levels in serum in DENV-2 infections[25]. Both ELISA and IMA assays detected all DENV-4 samples, but the ICT only detected one out of seven samples with this serotype. Low sensitivity for the detection of DENV-4 has been previously described for other NS1 assays, including the ICT that was used in our study [11].

Detection of NS1 antigen in secondary DENV infections is challenging because of lower sensitivity, probably due to the formation of immune complexes between NS1 and pre-existing antibodies from the previous DENV infection [25][26]. Other studies have shown a great decrease in sensitivity when comparing primary infections to secondary infections, from 47–71% sensitivity in primary dengue cases to 21–55% in secondary cases with ICT assays[9]. Similar results have been reported for ELISA kits, with sensitivity values dropping from 96.1% to 67.3%[10] in secondary infections. Our study did not include a high number of secondary dengue cases, since the majority of our patients are travelers and DENV infections in travelers are much more likely to be primary infections. Despite the low number of secondary dengue cases analyzed in this study, the IMA technology seems to have better sensitivity than ICT for the diagnosis of secondary infections. A larger study on the diagnostic performance of the IMA technology in endemic areas would be needed to assess the usefulness of the IMA for global dengue diagnostics.

Along with the new test, we also evaluated SD Dengue NS1 Ag ELISA and SD BIOLINE Dengue Duo in our study. The ELISA assay had a very good performance, with results similar to the best results obtained in other studies (sensitivity of 85–95%)[11]. Lower sensitivity values have been observed for ELISA in other studies (60–76%)[9][8]. This difference could be explained by the number of secondary dengue infections, as well as the number of DENV-2 infections included in the studies, two factors that can severely affect the performance of the different kits. Regarding SD BIOLINE Dengue Duo, the sensitivity observed in our study was similar to that observed in other reports (52–66%) [9].

In this study, a sample from a patient with ZIKV infection gave a positive result for ViroTrack Dengue Acute. The rest of the positive ZIKV samples did not give any false positive result by ViroTrack Dengue Acute. This phenomenon of cross reactivity has been previously described in a single sample for other rapid diagnostic tests [27]. Although it is not clear the reasons for this cross reactivity, it seems to be a rare finding.

The IMA test performs automatic reading of the results and quantification, providing a robust assessment of the presence of NS1 antigen in the sample. Although some studies have shown low inter-observer variation in the interpretation of NS1 rapid tests, differences have also been reported and weak positive samples are more prone to be misclassified in ICTs. In conclusion, we evaluated the utility of an IMA technology (ViroTrack Dengue Acute) for the NS1 detection of suspected cases of DENV infection in travelers. The assay compiles several advantages of rapid tests (short time to results, suitability for individual sample testing) and the better performance of ELISA methods. Thus, it could represent a valuable tool for the diagnosis of acute DENV infections.

Supporting information

S1 Checklist. STARD checklist for the reporting of studies of diagnostic accuracy.
(DOCX)

S1 Diagram. STARD Flow Diagram.
(DOCX)

S1 Table. Detection rates by days post-onset of symptoms in dengue positive samples.
(DOCX)

S2 Table. True positives, true negatives, false positives and false negatives for each test.
(DOCX)

Acknowledgments

The authors thank Marco Donolato and the BluSense team for providing the kits used in this study.

Author Contributions

Data curation: Izaskun Alejo-Cancho.

Formal analysis: Izaskun Alejo-Cancho.

Investigation: Izaskun Alejo-Cancho.

Methodology: Izaskun Alejo-Cancho, Jessica Navero-Castillejos, Aida Peiró-Mestres, Rosa Albarracín, Josep Barrachina, Alexander Navarro, Verónica Gonzalo, Víctor Pastor, José Muñoz.

Resources: Miguel J. Martínez.

Supervision: Miguel J. Martínez.

Writing – original draft: Izaskun Alejo-Cancho.

Writing – review & editing: Izaskun Alejo-Cancho, Miguel J. Martínez.

References

1. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Prim*. Macmillan Publishers Limited; 2016; 2: 1–26. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55> PMID: 27534439
2. Soo KM, Khalid B, Ching SM, Chee HY. Meta-analysis of dengue severity during infection by different dengue virus serotypes in primary and secondary infections. *PLoS One*. 2016; 11: 4–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154760> PMID: 27213782
3. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Spec Program Res Train Trop Dis*. 2009; x, 147. doi: WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1

4. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. Nature Publishing Group; 2013; 496: 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060> PMID: 23563266
5. Schlagenhauf P, Weld L, Goorhuis A, Gautret P, Weber R, Sonnenburg F Von, et al. Travel-associated infection presenting in Europe (2008–12): an analysis of EuroTravNet longitudinal, surveillance data, and evaluation of the effect of the pre-travel consultation. 2013; 55–64. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)71000-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)71000-X)
6. Leder K, Torresi J, Libman MD, Cramer JP, Castelli F, Schlagenhauf P, et al. GeoSentinel surveillance of illness in returned travelers, 2007–2011. *Ann Intern Med*. 2013; 158: 456–468. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-6-201303190-00005> PMID: 23552375
7. Duong V, Ly S, Try P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeueng N, et al. Clinical and virological factors influencing the performance of a ns1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001244> PMID: 21811645
8. Wang SM, Sekaran SD. Evaluation of a commercial SD dengue virus NS1 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay kit for early diagnosis of dengue virus infection. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 2793–2797. <https://doi.org/10.1128/JCM.02142-09> PMID: 20573879
9. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of Commercially Available Diagnostic Tests for the Detection of Dengue Virus NS1 Antigen and Anti-Dengue Virus IgM Antibody. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003171> PMID: 25330157
10. Hermann LL, Thaisomboonsuk B, Poolpanichupatam Y, Jarman RG, Kalayanarooj S, Nisalak A, et al. Evaluation of a Dengue NS1 Antigen Detection Assay Sensitivity and Specificity for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003193> PMID: 25275493
11. Pal S, Dauner AL, Mitra I, Forshey BM, Garcia P, Morrison AC, et al. Evaluation of dengue ns1 antigen rapid tests and elisa kits using clinical samples. *PLoS One*. 2014; 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113411> PMID: 25412170
12. Uddin R, Burger R, Donolato M, Fock J, Creagh M, Hansen MF, et al. Lab-on-a-disc agglutination assay for protein detection by optomagnetic readout and optical imaging using nano- and micro-sized magnetic beads. *Biosens Bioelectron*. Elsevier; 2016; 85: 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.023> PMID: 27183287
13. Park H, Hwang MP, Lee KH. Immunomagnetic nanoparticle-based assays for detection of biomarkers. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 4543–4552. <https://doi.org/10.2147/IJN.S51893> PMID: 24285924
14. Antunes P, Watterson D, Parmvi M, Burger R, Boisen A, Young P, et al. Quantification of NS1 dengue biomarker in serum via optomagnetic nanocluster detection. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2015; 5: 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep16145> PMID: 26536916
15. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 4977–4983. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005> PMID: 16207951
16. Moureau G, Temmam S, Gonzalez JP, Charrel RN, Grard G, de Lamballerie X. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007; 7: 467–477. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0206> PMID: 18020965
17. Newcombe RG. IMPROVED CONFIDENCE INTERVALS FOR THE DIFFERENCE BETWEEN BINOMIAL PROPORTIONS BASED ON PAIRED DATA. 1998;2650.
18. Hayden SR, Brown MD. Likelihood ratio: A powerful tool for incorporating the results of a diagnostic test into clinical decisionmaking. *Ann Emerg Med*. 1999; 33: 575–580. [https://doi.org/10.1016/s0196-0644\(99\)70346-x](https://doi.org/10.1016/s0196-0644(99)70346-x) PMID: 10216335
19. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data Published by: International Biometric Society Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2529310>. *Society*. 2008;33: 159–174. <https://doi.org/10.2307/2529310>
20. Tomasello D, Schlagenhauf P. Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007–2012. *Travel Med Infect Dis*. Elsevier Ltd; 2013; 11: 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2013.07.006> PMID: 23962447
21. European centre for disease prevention and control. Local transmission of dengue fever in France and Spain—2018.
22. Mezger A, Fock J, Antunes P, Østerberg FW, Boisen A, Nilsson M, et al. Scalable DNA-Based Magnetic Nanoparticle Agglutination Assay for Bacterial Detection in Patient Samples. *ACS Nano*. 2015; 9: 7374–7382. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b02379> PMID: 26166357

23. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Thi V, Hang T, Sekaran SD, et al. Multi-Country Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Two Commercially-Available NS1 ELISA Assays for Dengue Diagnosis. 2010; 4: 2–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000811> PMID: 20824173
24. Felix AC, Centrone CDC, Villas-boas L, Maria C, Martelli T. Low Sensitivity of NS1 Protein Tests Evidenced during a Dengue Type 2 Virus Outbreak in Santos, Brazil, in 2010. 2012; 19: 1972–1976. <https://doi.org/10.1128/CVI.00535-12> PMID: 23100478
25. Duyen HTL, Ngoc T V, Ha DT, Hang VTT, Kieu NTT, Young PR, et al. Kinetics of Plasma Viremia and Soluble Nonstructural Protein 1 Concentrations in Dengue: Differential Effects According to Serotype and Immune Status. 2011; 203. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir014> PMID: 21335562
26. Koraka P, Burghoorn-maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, Groen J, et al. Detection of Immune-Complex-Dissociated Nonstructural-1 Antigen in Patients with Acute Dengue Virus Infections. 2003; 41: 4154–4159. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4154-4159.2003> PMID: 12958240
27. Gyurech D, Schilling J, Schmidt-Chanasit J, Cassinotti P, Kaeppeli F, Dobec M. False positive dengue NS1 antigen test in a traveller with an acute Zika virus infection imported into Switzerland. *Swiss Med Wkly*. 2016; 146: w14296. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14296> PMID: 26859285

OBJETIVO 5:

Investigar la utilidad de otras técnicas serológicas para el diagnóstico de las infecciones por dengue, chikungunya y Zika.

RESULTADOS ADICIONALES 1

Evaluación de un test rápido para el diagnóstico de infección por virus dengue en viajeros

Una versión preliminar de este estudio fue presentada en formato poster en el 24^º Congreso de la Sociedad Europea de Microbiología y Enfermedades Infecciosas (ECCMID, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases):

Evaluation of a rapid test for dengue virus infection in travelers; Alejo Cancho I, Vilavella D, Campos I, Ferre R, Monte R, Cañas A, Martínez D, Gascón J, Martínez MJ

Autores:

Izaskun Alejo-Cancho, Daniel Vilavella, Irene Campos, Roser Ferré, Rosa Monte, A. Cañas, Diego Martínez, Aída Peiró-Mestres, Joaquim Gascón, Miguel Julián Martínez

Introducción y objetivos:

El virus dengue (VDEN) es un flavivirus transmitido por artrópodos que causa unos 300 millones de infecciones anuales. Su cuadro clínico es variable, pudiendo ocasionar desde infecciones asintomáticas o leves hasta graves cuadros hemorrágicos.

Su diagnóstico se basa en métodos serológicos y en la detección del virus. También existen técnicas rápidas de detección de antígeno NS1, que han sido principalmente evaluadas en zonas endémicas. El objetivo de nuestro estudio es evaluar un test de diagnóstico rápido en viajeros que regresan de zonas endémicas con sospecha de infección por VDEN.

Material y métodos:

Se evaluó un panel de 68 muestras de pacientes que regresaban de zonas endémicas con un cuadro sugestivo de VDEN. En 64 muestras se comparó el resultado de IgM e IgG obtenidos por el método de diagnóstico rápido (SD Bioline Dengue Duo) con los

obtenidos por el método de rutina (ELISA IgM e IgG, Dengue Panbio). En 19 muestras se comparó el resultado de detección de antígeno NS1 de VDEN con los resultados de una RT-PCR en tiempo real casera específica para VDEN.

Resultados:

El test rápido presentó una sensibilidad del 89,3% (70,6-97,2%) para la IgM y del 54,5% (36,6-71,5%) para la IgG. Para ambos la especificidad fue del 100%. El índice kappa mostró una correlación con el método de referencia casi perfecta en el caso de la IgM y moderada para la IgG. El antígeno NS1 fue positivo en 13 de las 14 muestras positivas por RT-PCR. Cinco muestras de malaria incluidas en el panel presentaron resultados negativos para los tres marcadores de infección por VDEN mediante el método de diagnóstico rápido.

Discusión:

Los resultados obtenidos con el test de diagnóstico rápido fueron comparables a los métodos de rutina para la detección de IgM. SD Bioline Dengue Duo podría ser una herramienta útil para el diagnóstico de infección aguda por VDEN en viajeros, ya que además parece detectar bien el antígeno NS1. La detección de IgG mostró un rendimiento inferior al de la técnica de referencia. Los resultados obtenidos son notablemente mejores que otros reportados en la literatura con este test. Esto es así probablemente porque el rendimiento diagnóstico de la prueba es superior en infecciones primarias (que ocurren más frecuentemente en viajeros) que en zonas endémicas donde la frecuencia de infecciones secundarias es superior.

1 **EVALUACIÓN DE UN TEST RÁPIDO PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN**
2 **POR VIRUS DENGUE EN VIAJEROS**

3

4

5 I. Alejo-Cancho^{1*}, D. Vilavella¹, I. Campos¹, R. Ferré¹, R. Monte¹, A. Cañas¹, D.
6 Martínez¹, A. Peiró-Mestres¹, J. Gascón^{2,3}, M.J. Martínez^{1,3,4}

7

8

9

10 ¹ Servicio de Microbiología, Hospital Clinic, Barcelona

11 ² Servicio de Medicina Tropical, Hospital Clinic, Barcelona

12 ³ ISGlobal, Centro de Investigación de Salud Internacional de Barcelona (CRESIB),

13 Hospital Clinic

14 ⁴ Universitat de Barcelona, Barcelona

15

16

17

18

19

20

21 ***Correspondencia:**

22 Izaskun Alejo-Cancho

23 Servicio de Microbiología, Hospital Clinic, Barcelona

24 alejo@clinic.cat

25

26 **RESUMEN**

27 **Introducción y objetivos**

28 El virus dengue (VDEN) es un flavivirus transmitido por artrópodos que causa unos
29 300 millones de infecciones anuales. Su cuadro clínico es variable, pudiendo ocasionar
30 desde infecciones asintomáticas o leves hasta graves cuadros hemorrágicos.

31 Su diagnóstico se basa en métodos serológicos y en la detección del virus. También
32 existen técnicas rápidas de detección de antígeno NS1, que han sido principalmente
33 evaluadas en zonas endémicas. El objetivo de nuestro estudio es evaluar un test de
34 diagnóstico rápido en viajeros que regresan de zonas endémicas con sospecha de infección
35 por VDEN.

36

37 **Material y métodos**

38 Se evaluó un panel de 68 muestras de pacientes que regresaban de zonas endémicas
39 con un cuadro sugestivo de VDEN. En 64 muestras se comparó el resultado de IgM e IgG
40 obtenidos por el método de diagnóstico rápido (SD Bioline Dengue Duo) con los obtenidos
41 por el método de rutina (ELISA IgM e IgG, Dengue Panbio). En 19 muestras se comparó el
42 resultado de detección de antígeno NS1 de VDEN con los resultados de una RT-PCR en
43 tiempo real casera específica para VDEN.

44

45 **Resultados**

46 El test rápido presentó una sensibilidad del 89,3% (70,6-97,2%) para la IgM y del
47 54,5% (36,6-71,5%) para la IgG. Para ambos la especificidad fue del 100%. El índice kappa
48 mostró una correlación con el método de referencia casi perfecta en el caso de la IgM y
49 moderada para la IgG. El antígeno NS1 fue positivo en 13 de las 14 muestras positivas por
50 RT-PCR. Cinco muestras de malaria incluidas en el panel presentaron resultados negativos
51 para los tres marcadores de infección por VDEN mediante el método de diagnóstico
52 rápido.

53 **Discusión**

54 Los resultados obtenidos con el test de diagnóstico rápido fueron comparables a los
55 métodos de rutina para la detección de IgM. SD Bioline Dengue Duo podría ser una
56 herramienta útil para el diagnóstico de infección aguda por VDEN en viajeros, ya que
57 además parece detectar bien el antígeno NS1. La detección de IgG mostró un rendimiento
58 inferior al de la técnica de referencia. Los resultados obtenidos son notablemente mejores
59 que otros reportados en la literatura con este test. Esto es así probablemente porque el
60 rendimiento diagnóstico de la prueba es superior en infecciones primarias (que ocurren
61 más frecuentemente en viajeros) que en zonas endémicas donde la frecuencia de
62 infecciones secundarias es superior.

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80 **INTRODUCCIÓN**

81 El virus dengue (VDEN) es un virus del género flavivirus transmitido por
82 artrópodos. Es la enfermedad transmitida por vectores con mayor crecimiento a nivel
83 mundial: se estima que ocurren 390 millones de infecciones anuales por este virus que
84 está presente en más de 125 países(1). El diagnóstico de VDEN en los viajeros contribuye
85 a definir mejor su presencia en los países visitados, ya que en algunos casos en dichos
86 países carecen de las infraestructuras necesarias para diagnosticar los casos.

87 El rango de manifestaciones clínicas observadas en las infecciones por VDEN es muy
88 amplio, desde casos asintomáticos o leves hasta cuadros hemorrágicos severos(2). El
89 diagnóstico microbiológico de VDEN se realiza habitualmente mediante métodos
90 serológicos, detección de ARN viral o aislamiento viral. Otra aproximación diagnóstica es
91 la detección del antígeno NS1, que es una glicoproteína secretada de las células infectadas
92 por el virus y que circula en la sangre de los pacientes durante la fase aguda de la
93 enfermedad. En las infecciones primarias por VDEN el genoma puede ser detectado
94 durante la primera semana tras el inicio de los síntomas. El antígeno NS1 puede ser
95 detectado durante el mismo periodo e incluso unos días después de la fase virémica (3).
96 Los anticuerpos IgM aparecen habitualmente el día 5 tras el inicio de los síntomas, y
97 posteriormente aparecen los anticuerpos IgG(3).

98

99 En la actualidad se han desarrollado diferentes test de diagnóstico rápido que
100 detectan sólo el antígeno NS1 o el antígeno y los anticuerpos IgM e IgG. Estos métodos
101 permiten un diagnóstico sencillo y rápido de las infecciones por VDEN. El papel de estos
102 test ha sido evaluado en múltiples estudios, la mayoría de ellos en zonas endémicas
103 (4)(5)(6)(7). Los resultados obtenidos sugieren que la exposición previa a otros serotipos
104 de VDEN y a otros flavivirus puede afectar al resultado del antígeno en estos test, ya que
105 los anticuerpos pre-existentes podrían ligarse al antígeno impidiendo su detección (3). No
106 hay mucha información respecto a la utilidad de estos test de diagnóstico rápido en

107 viajeros que regresan de zonas endémicas. Nuestra hipótesis es que estos test podrían
108 obtener un mayor rendimiento en los viajeros, ya que los casos de dengue secundario y la
109 presencia de anticuerpos frente a diferentes flavivirus es menos frecuente en este grupo
110 de pacientes. Un diagnóstico rápido en viajeros que regresan de zonas endémicas
111 permitiría optimizar el manejo clínico y epidemiológico de estos pacientes.

112

113 El objetivo de este estudio es evaluar un test de diagnóstico rápido que detecta
114 antígeno NS1 de VDEN y anticuerpos IgM e IgG frente a VDEN (SD Dengue Duo, Standard
115 Diagnostics, Kyongii-Do, Corea) en muestras de viajeros que regresan de zonas tropicales
116 o subtropicales.

117

118

119 **MATERIAL Y MÉTODOS**

120 Muestras

121 Se evaluó el test con un panel de 68 muestras de suero de pacientes que acudieron a
122 nuestro hospital con fiebre tras estancia en zona endémica. En 64 muestras se realizó un
123 estudio serológico de rutina, obteniendo diferentes patrones serológicos de infección por
124 VDEN: 19 muestras eran positivas para IgM e IgG frente a VDEN, 9 muestras sólo
125 presentaban IgM positiva, 14 sólo IgG positiva y 22 presentaban ambos marcadores
126 negativos.

127 Se realizó la RT-PCR a tiempo real en un total de 19 muestras, 15 con estudio
128 serológico concomitante y 4 sin datos serológicos. Del total de 19 muestras en las que se
129 realizó la RT-PCR a tiempo real, se obtuvieron 14 resultados positivos (7 VDEN-1, 3 VDEN-
130 2, 1 VDEN-3, 2 VDEN-4 y una muestra no tipable).

131 Del total de muestras, cinco correspondían a casos de malaria (cuatro casos por
132 *Plasmodium falciparum* y uno por *Plasmodium vivax*).

133

134 Métodos diagnósticos de rutina

135 El método de rutina empleado en nuestro laboratorio para la detección de IgM e IgG
136 frente a VDEN es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-linked
137 ImmunoSorbent Assay, ELISA) comercial (PanBio ELISA, Alere, Australia), que se realiza
138 de manera automatizada en la plataforma Freedom EVOlyzer (Tecan, Suiza). Todas las
139 muestras se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las
140 muestras de suero diluidas se incuban durante 60 minutos a 37°C con un trazador de
141 anticuerpos monoclonales y con el antígeno. Tras la incubación se realiza un lavado y
142 posteriormente se lleva a cabo una nueva incubación de una hora. Tras un segundo lavado
143 se añade el sustrato, con el que se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente.
144 Tras añadir solución de parada se mide la absorbancia.

145 La detección de RNA viral se realizó mediante una RT-PCR a tiempo real casera que
146 detecta de forma simultánea los 4 serotipos de VDEN (8).

147 El diagnóstico de malaria de los casos sospechosos se alcanzó mediante la
148 observación de la gota gruesa y la extensión sanguínea, realizando la identificación de
149 especie y el cálculo del índice de parasitemia.

150

151 SD Bioline Dengue Duo

152 El método a evaluar en este estudio fue SD Bioline Dengue Duo, un ensayo basado en
153 inmunocromatografía (ICT) que detecta de manera simultánea anticuerpos IgM e IgG
154 frente a VDEN en una tira de nitrocelulosa, y la presencia de antígeno NS1 en otra tira
155 diferente. Se puede realizar el estudio en sangre total, plasma o suero. En nuestro estudio
156 la muestra empleada fue el suero.

157 Las muestras se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante. El
158 procedimiento es el siguiente: en la parte del casete correspondiente a la detección de
159 antígeno NS1 se añaden 3 gotas (aproximadamente 100µl) de suero y se lee el resultado
160 pasados 15-20 minutos; la detección de anticuerpos se realiza en la otra parte del casete,

161 donde hay que añadir 10 µl de muestra y 4 gotas de diluyente, y realizar la lectura también
162 a los 15-20 minutos.

163 La interpretación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: en presencia
164 de una banda de control, una banda de test positiva indica un resultado positivo de
165 antígeno NS1; en presencia de la banda de control, la presencia de una banda marcada
166 como M indica un resultado positivo para IgM y una banda en G, un resultado positivo
167 para IgG. La no aparición de la banda de control invalida los resultados de dicha tira.

168

169 Análisis estadístico

170 Se compararon los resultados serológicos obtenidos por el test rápido (ICT) con los
171 resultados de rutina por el método ELISA, tomando este último como método de
172 referencia. En el caso del antígeno NS1, los resultados se compararon con los obtenidos
173 por la RT-PCR. Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos
174 positivo y negativo, así como el índice kappa del nuevo método.

175 Los intervalos de confianza para los valores de sensibilidad y especificidad se
176 calcularon empleando el método descrito por Newcomb basado en el trabajo de
177 Wilson(9). El índice Kappa se interpretó siguiendo los criterios de Landis y Koch(10).

178

179

180 **RESULTADOS**

181 Se compararon los resultados obtenidos por SD Bioline Dengue Duo tomando como
182 referencia el método ELISA empleado de rutina en nuestro laboratorio. Sesenta y cuatro
183 muestras fueron evaluadas para los resultados serológicos. Los resultados de sensibilidad,
184 especificidad, valores predictivos e índice kappa se muestran en la Tabla 1.

185

186

187

	Sensibilidad (% (IC 95%))	Especificidad (% (IC 95%))	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo	Índice kappa
IgM	89,3 (70,6- 97,2)	100 (88,0 - 100)	100 (83,4-100)	92,3 (78,0- 98,0)	0,90 (0,80- 1,01)
IgG	54,5 (36,6- 71,5)	100 (86,3-100)	100 (78,1-100)	67,4 (51,9 - 80,0)	0,54 (0,33- 0,74)

188 Tabla 1. Valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos e índice kappa de SD Bioline
189 Dengue Duo para IgM e IgG frente a VDEN. IC: Intervalo de confianza.

190

191 Los valores de índice kappa mostraron una concordancia casi perfecta para la IgM
192 (0,9) y moderada para la IgG (0,54) según los criterios de Landis y Koch.

193

194 Los resultados de antígeno NS1 se compararon con los resultados obtenidos por RT-
195 PCR. Se detectó antígeno en 13 de las 14 muestras con resultado positivo por RT-PCR. La
196 única RT-PCR positiva que obtuvo un resultado negativo para antígeno NS1 fue una
197 muestra de VDEN-4.

198 Respecto a las 5 muestras de malaria incluidas en el estudio, ninguna obtuvo
199 resultados positivos para antígeno o anticuerpos mediante ICT. Con los métodos de rutina
200 se detectó una IgM frente a VDEN en una muestra e IgG positiva frente a VDEN en otras
201 tres muestras.

202

203

204

205

206 **DISCUSIÓN**

207 Los test rápidos para diagnóstico de VDEN son una nueva herramienta para el
208 diagnóstico de esta infección. Estos test se han evaluado principalmente en zonas
209 endémicas, donde se han reportado sensibilidades del 44,4-87,5% y especificidades del
210 94,64-100% para el antígeno NS1, del 60,51-77,8% y 76,19-94,06% para la IgM y del
211 48,59-90,06% y 76,19-92,48% para la IgG, respectivamente (4)(5)(7)(6).

212 En nuestro estudio hemos observado que la detección de anticuerpos IgM por el
213 método rápido presenta una alta sensibilidad (89,3% (70,6-97,2%)) y muy buena
214 especificidad (100% (88,0 – 100%)), superiores a las observadas en los estudios previos y
215 con resultados comparables a los obtenidos mediante los métodos de rutina. En el caso de
216 la IgG la sensibilidad es más baja (54,5% (36,6-71,5%)), similar a la observada en otros
217 estudios.

218 En el caso del antígeno NS1, el test rápido detectó todas las muestras positivas por
219 RT-PCR menos una. La muestra no detectada era un VDEN-4 y otros estudios han
220 reportado menor sensibilidad para este serotipo(11). Sin embargo, el número de muestras
221 evaluadas por RT-PCR y antígeno NS1 es bajo, con lo que no se pueden extraer
222 conclusiones sólidas. Es necesaria por tanto una evaluación más amplia de esta
223 herramienta diagnóstica.

224 Algunos estudios hablan de la posible aparición de reacciones cruzadas en los test
225 rápidos de VDEN en pacientes con malaria, especialmente en el caso de la IgM(4). Nuestro
226 estudio incluía cinco muestras de pacientes diagnosticados de malaria (4 *P. falciparum* y 1
227 *P. vivax*) en los que no se observó ninguna reactividad cruzada en el test rápido. Las
228 técnicas de rutina detectaron una IgM en uno de los casos e IgG en tres. La presencia de
229 IgG aislada indicaría una infección por VDEN pasada y la discordancia en las IgG entre los
230 métodos de rutina y el test rápido podría explicarse por la baja sensibilidad del nuevo test.
231 La falta de muestras posteriores del caso con IgM positiva impide realizar una correcta
232 valoración de dicho resultado aislado. No obstante, el número de muestras de malaria

233 incluidas en el estudio es bajo, por lo que habría que realizar un estudio más amplio para
234 descartar la aparición de reactividad cruzada.

235

236 Los resultados obtenidos para la IgG en este estudio no permiten recomendar su
237 detección por ICT de forma rutinaria, ya que la sensibilidad es muy inferior a la de los
238 métodos de rutina. Sin embargo, la detección de IgG no es un método diagnóstico de
239 infección aguda, ya que este tipo de anticuerpos aparecen habitualmente una semana
240 después del inicio del cuadro y pueden persistir positivos de por vida. Los resultados
241 obtenidos en este estudio sugieren que el test de diagnóstico rápido podría ser una
242 herramienta útil para el diagnóstico rápido de infecciones agudas por VDEN en viajeros.
243 Diagnosticar un caso agudo con rapidez permite un mejor manejo del paciente, así como
244 una rápida aplicación de medidas de control para tratar de evitar la transmisión autóctona
245 del virus.

246

247

248

249

250 **REFERENCIAS**

- 251 1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global
252 distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504–7.
- 253 2. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment,
254 prevention, and control. Special Programme for Research and Training in Tropical
255 Diseases. 2009.
- 256 3. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of
257 diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Dec;8(12supp):S30–7.
- 258 4. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al.
259 Evaluation of Commercially Available Diagnostic Tests for the Detection of Dengue

260 Virus NS1 Antigen and Anti-Dengue Virus IgM Antibody. *PLoS Negl Trop Dis.*
261 2014;8(10).

262 5. Naz A, Zahid D, Murky SN, Nadeem M, Sil BK, Shamsi TS. Evaluation of efficacy of
263 various immunochromatographic rapid tests for dengue diagnosis. *Pakistan J Med*
264 *Sci.* 2014;30(1):166–71.

265 6. Sánchez-Vargas LA, Sánchez-Marce EE, Vivanco-Cid H. Evaluation of the SD
266 BIOLINE dengue duo rapid test in the course of acute and convalescent dengue
267 infections in a Mexican endemic region. *Diagn Microbiol Infect Dis.*
268 2014;78(4):368–72.

269 7. Andries AC, Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, Sroin KK, et al. Field Evaluation and
270 Impact on Clinical Management of a Rapid Diagnostic Kit That Detects Dengue NS1,
271 IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(12).

272 8. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses
273 in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005
274 Oct;43(10):4977–83.

275 9. Newcombe RG. Improved confidence intervals for the difference between binomial
276 proportions based on paired data. 1998;2650(May 1995).

277 10. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data
278 Published by : International Biometric Society Stable URL :
279 <http://www.jstor.org/stable/2529310>. *Society.* 2008;33(1):159–74.

280 11. Pal S, Dauner AL, Mitra I, Forshey BM, Garcia P, Morrison AC, et al. Evaluation of
281 dengue ns1 antigen rapid tests and elisa kits using clinical samples. *PLoS One.*
282 2014;9(11).

283 12. Reynes JM, Ong S, Mey C, Ngan C, Hoyer S, Sall AA. Improved molecular detection of
284 dengue virus serotype 1 variants. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3864–7.

285

RESULTADOS ADICIONALES 2

Evaluación de un nuevo método basado en inmunoblot para la detección simultánea de anticuerpos frente a virus dengue, virus Zika y virus chikungunya

Autores:

Izaskun Alejo-Cancho, Aida Peiró-Mestres, Jessica Navero-Castillejos, Verónica Gonzalo, Josep Barrachina, Alexander Navarro, Rosa Albarracin, Miguel J Martínez Yoldi

Introducción y objetivo:

Los virus dengue (VDEN), chikungunya (VCHIK) y Zika (VZIK) presentan actualmente una amplia distribución mundial, dando lugar a un gran número de casos en zonas endémicas y en viajeros que regresan de las mismas. La clínica que presentan es muy similar, lo que hace que el diagnóstico microbiológico sea imprescindible para establecer la etiología del cuadro. Las pruebas de detección de anticuerpos son un pilar fundamental del diagnóstico, pero su principal limitación son las reacciones cruzadas, lo cual hace que llegar a un diagnóstico de confirmación sea difícil. El objetivo de este estudio es evaluar un nuevo método diagnóstico basado en serología que detecta de forma simultánea anticuerpos frente a los tres virus.

Material y métodos:

Se empleó un panel de 59 muestras para evaluar el ensayo: 7 muestras de casos confirmados de VCHIK, 20 de casos confirmados de VDEN, 8 de casos confirmados de VZIK, 18 muestras de casos probables de VZIK y 6 muestras de gestantes asintomáticas con microneutralización frente a VZIK negativa. Las muestras se habían analizado con los métodos de rutina empleados habitualmente en nuestro laboratorio y posteriormente se analizaron con el nuevo método a estudio.

Los resultados del nuevo método pueden leerse de manera visual o de manera

automática empleando un software. En ambos casos se compara la intensidad de las bandas de los diferentes antígenos con unas bandas de control para valorar si hay presencia de anticuerpos específicos frente a dichos antígenos y en función del patrón de bandas obtenida la muestra se clasificará como presencia de anticuerpos frente a VDEN, VZIK, VCHIK, de forma genérica como presencia de anticuerpos frente flavivirus o sin presencia de anticuerpos frente a dichos arbovirus, siguiendo las instrucciones del fabricante .

Resultados:

El nuevo método mostró una baja sensibilidad en la detección de IgM frente a los diferentes virus (VCHIK 0%, VDEN 38,1% y VZIK 39,1%) y mayor frente a la IgG (VCHIK 90,9%, VDEN 70,4% y VZIK 79,5%). Los valores de especificidad fueron mayores en todos los casos (VCHIK IgM 94,2%, VCHIK IgG 100%, VDEN IgM 97,4%, VDEN IgG 100%, VZIK IgM 100% y VZIK IgG 86,7%).

Respecto a la interpretación, 18 (51,4%) de las 35 muestras con diagnóstico confirmado fueron correctamente clasificadas mediante el método automático y 21 (60%) mediante el método visual.

Discusión:

La baja sensibilidad del nuevo método evaluado no permite recomendar su uso como técnica habitual de diagnóstico serológico de arbovirosis. No obstante, y a pesar de la limitación que supone el reducido número de muestras incluidas, el método podría tener cierta utilidad potencial a la hora de discriminar entre infecciones por VDEN y VZIK, en las que las reacciones cruzadas serológicas son frecuentes.

1 **EVALUACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO DE INMUNOBLOT PARA LA DETECCIÓN**
2 **SIMULTÁNEA DE ANTICUERPOS FRENTE A VIRUS DENGUE, VIRUS ZIKA Y**
3 **VIRUS CHIKUNGUNYA**

4

5

6

7

8

9 Izaskun Alejo-Cancho¹, Aida Peiró-Mestres², Jessica Navero-Castillejos², Verónica
10 Gonzalo¹, Josep Barrachina¹, Alexander Navarro¹, Rosa Albarracin¹, Miguel J
11 Martínez Yoldi^{1,2,3}

12

13

14

15 ¹ Servicio de Microbiología, Hospital Clinic, Barcelona

16 ² ISGlobal, Centro de Investigación de Salud Internacional de Barcelona (CRESIB),
17 Hospital Clinic

18 ³ Universitat de Barcelona, Barcelona

19

20

21

22 ***Correspondencia:**

23 Izaskun Alejo-Cancho

24 Servicio de Microbiología, Hospital Clinic, Barcelona

25 alejo@clinic.cat

26 **RESUMEN**

27 **Introducción y objetivos**

28 Los virus dengue (VDEN), chikungunya (VCHIK) y Zika (VZIK) presentan
29 actualmente una amplia distribución mundial, dando lugar a un gran número de casos en
30 zonas endémicas y en viajeros que regresan de las mismas. La clínica que presentan es
31 muy similar, lo que hace que el diagnóstico microbiológico sea imprescindible para
32 establecer la etiología del cuadro. Las pruebas de detección de anticuerpos son un pilar
33 fundamental del diagnóstico, pero su principal limitación son las reacciones cruzadas, lo
34 cual hace que llegar a un diagnóstico de confirmación sea difícil. El objetivo de este estudio
35 es evaluar un nuevo método diagnóstico basado en serología que detecta de forma
36 simultánea anticuerpos frente a los tres virus.

37

38 **Material y métodos**

39 Se empleó un panel de 59 muestras para evaluar el ensayo: 7 muestras de casos
40 confirmados de VCHIK, 20 de casos confirmados de VDEN, 8 de casos confirmados de
41 VZIK, 18 muestras de casos probables de VZIK y 6 muestras de gestantes asintomáticas
42 con microneutralización frente a VZIK negativa. Las muestras se habían analizado con los
43 métodos de rutina empleados habitualmente en nuestro laboratorio y posteriormente se
44 analizaron con el nuevo método a estudio.

45 Los resultados del nuevo método pueden leerse de manera visual o de manera
46 automática empleando un software. En ambos casos se compara la intensidad de las
47 bandas de los diferentes antígenos con unas bandas de control para valorar si hay
48 presencia de anticuerpos específicos frente a dichos antígenos y en función del patrón de
49 bandas obtenida la muestra se clasificará como presencia de anticuerpos frente a VDEN,
50 VZIK, VCHIK, de forma genérica como presencia de anticuerpos frente flavivirus o sin
51 presencia de anticuerpos frente a dichos arbovirus, siguiendo las instrucciones del
52 fabricante .

53

54 **Resultados**

55 El nuevo método mostró una baja sensibilidad en la detección de IgM frente a los
56 diferentes virus (VCHIK 0%, VDEN 38,1% y VZIK 39,1%) y mayor frente a la IgG (VCHIK
57 90,9%, VDEN 70,4% y VZIK 79,5%). Los valores de especificidad fueron mayores en todos
58 los casos (VCHIK IgM 94,2%, VCHIK IgG 100%, VDEN IgM 97,4%, VDEN IgG 100%, VZIK
59 IgM 100% y VZIK IgG 86,7%).

60 Respecto a la interpretación, 18 (51,4%) de las 35 muestras con diagnóstico
61 confirmado fueron correctamente clasificadas mediante el método automático y 21 (60%)
62 mediante el método visual.

63

64 **Discusión**

65 La baja sensibilidad del nuevo método evaluado no permite recomendar su uso
66 como técnica habitual de diagnóstico serológico de arbovirosis. No obstante, y a pesar de
67 la limitación que supone el reducido número de muestras incluidas, el método podría
68 tener cierta utilidad potencial a la hora de discriminar entre infecciones por VDEN y VZIK,
69 en las que las reacciones cruzadas serológicas son frecuentes.

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79 **INTRODUCCIÓN**

80 Las infecciones por arbovirus suponen un riesgo creciente para los viajeros que
81 visitan áreas endémicas. La irrupción hace unos años del virus chikungunya (VCHIK) en
82 las Américas (1), seguido de la expansión del virus Zika (VZIK) (2) ha supuesto que en
83 gran parte de las regiones tropicales circulen de forma simultánea estos dos virus junto al
84 virus dengue (VDEN). Estos virus causan millones de infecciones anuales en pacientes que
85 viven en dichas regiones o en viajeros que viajan a las mismas (3)(4)(5).

86

87 La clínica de las diferentes infecciones por arbovirus puede ser muy similar, con
88 síntomas inespecíficos como fiebre, cefalea y rash (5). Algunos síntomas son más
89 sugestivos de una etiología concreta, pero no siempre están presentes y ninguno de ellos
90 es patognomónico. En la situación actual, en la que los diferentes virus circulan por las
91 mismas regiones, comparten vectores y causan cuadros clínicos similares, el diagnóstico
92 etiológico requiere la realización de pruebas microbiológicas que permitan diferenciar el
93 virus causante del cuadro.

94

95 El diagnóstico de laboratorio de las infecciones por arbovirus puede realizarse
96 mediante métodos directos o indirectos (6). Los métodos directos son aquellos que se
97 basan en la detección del virus o sus componentes: cultivo viral, detección de ácidos
98 nucleicos o detección de antígenos. Estos métodos proporcionan un diagnóstico de
99 confirmación, pero presentan una limitación temporal, dado que sólo son útiles durante el
100 periodo en el que el virus es detectable en muestras como la sangre, aproximadamente
101 una semana tras el inicio de los síntomas. Los métodos indirectos se basan en detectar la
102 respuesta del huésped frente al virus. Los anticuerpos pueden comenzar a detectarse unos
103 días tras el inicio de los síntomas y en el caso de las inmunoglobulinas tipo G (IgG) pueden
104 persistir positivos incluso de por vida. Esto permite aumentar la ventana diagnóstica, pero
105 obtener un diagnóstico de confirmación con estos métodos es más complicado, ya que es

106 necesario observar una seroconversión o un aumento de cuatro veces el título de
107 anticuerpos IgG específicos para que el diagnóstico sea confirmatorio. Además, las técnicas
108 serológicas presentan en ocasiones reactividad cruzada frente a virus del mismo género o
109 antigénicamente relacionados, como ocurre en el caso de VZIK y VDEN, ambos del género
110 flavivirus.

111 Por todo ello, el diagnóstico de las arbovirosis requiere habitualmente la realización
112 de múltiples pruebas diagnósticas para tratar de filiar la etiología del cuadro, por lo que el
113 desarrollo de técnicas que de forma simultánea permitan diagnosticar los diferentes virus
114 agilizaría sustancialmente el diagnóstico de estas infecciones.

115

116 El objetivo de este estudio es evaluar un nuevo prototipo de técnica de diagnóstico
117 serológico basado en inmunoblot (recomLine Tropical Fever, Mikrogen diagnostik,
118 Alemania) que detecta de forma simultánea anticuerpos frente a VDEN, VZIK y VCHIK.

119

120

121 **MATERIAL Y MÉTODOS**

122 **Muestras**

123 Se empleó un panel de 59 muestras para evaluar el nuevo método diagnóstico.
124 Cincuenta y tres de estas muestras pertenecían a viajeros que habían regresado de países
125 endémicos para estas arbovirosis y en los que se había obtenido un diagnóstico
126 confirmado o probable de arbovirosis: 7 muestras de casos confirmados de VCHIK, 20 de
127 casos confirmados de VDEN, 8 de casos confirmados de VZIK y 18 muestras de casos
128 probables de VZIK. Las 6 muestras restantes eran de gestantes asintomáticas a las que se
129 les realizó el cribado de infección por VZIK y en las que la microneutralización para este
130 virus resultó negativa. Las características de las muestras empleadas en el estudio se
131 resumen en la Tabla 1.

132

Diagnóstico	N	Días tras el inicio de síntomas (media (rango))	Chikungunya		Dengue		Zika	
			IgM +	IgG +	IgM +	IgG +	IgM +	IgG +
Chikungunya confirmado	7	34,8 (15-66)	7	6	0	2	1	1
Dengue confirmado	20	17,8 (2-62)*	0	0	18	15	7	12
Zika confirmado	8	26,9 (12-42)	0	0	2	5	7	8
Zika probable (IgM positiva)	8	30,1 (8-48)	0	0	0	5	8	7
Zika probable (microneutralización positiva)	10	NA**	0	4	1	10	0	10
Negativos	6	NA	0	1	0	6	0	6

133 Tabla 1. Resumen de las muestras empleadas en el estudio. NA: no aplicable.

134 * Se excluyen del cálculo de los días post-síntomas dos pacientes que tuvieron infección por VDEN
135 confirmada un año antes, que corresponden a las muestras con IgM frente a VDEN negativa.

136 **Sólo un caso presentó síntomas (muestra tomada el día 41 tras el inicio), el resto eran
137 asintomáticos.

138

139 **Definición de casos**

140 Los casos se consideraron confirmados si se había obtenido un resultado positivo
141 por métodos de amplificación de ácidos nucleicos frente a alguno de los virus en una

142 muestra previa o si se había objetivado seroconversión para alguno de los virus. En el caso
143 de VZIK también se consideraron casos confirmados aquellos que presentaban una
144 inmunoglobulina tipo M (IgM) y un título de anticuerpos neutralizantes superior a 1/32
145 frente a VZIK, con IgM frente a VDEN negativa. Se consideraron casos probables aquellos
146 en los que se observó presencia de IgM frente a alguno de los virus, sin haber podido
147 confirmar la seroconversión por falta de muestras posteriores o por una IgG ya positiva en
148 la primera muestra. Además, en el caso de VZIK, se consideraron casos probables aquellos
149 que presentaron anticuerpos neutralizantes en título 1/32 o superior en ausencia de
150 anticuerpos IgM. Las muestras con una IgG positiva frente a alguno de los virus pero sin
151 ningún otro dato de infección actual se clasificaron como infecciones pasadas.

152

153 **Métodos diagnósticos de rutina**

154 El diagnóstico de confirmación se alcanzó en la mayoría de los casos mediante
155 técnicas moleculares. Para el diagnóstico de VDEN se empleó una RT-PCR casera a tiempo
156 real(7), mientras que para el diagnóstico de VCHIK y VZIK se emplearon RT-PCR
157 comerciales a tiempo real (RealStar® Chikungunya Virus RT-PCR kit y RealStar® Zika
158 Virus RT-PCR kit, Altona Diagnostics GmbH, Alemania).

159 La detección de anticuerpos se llevó a cabo mediante una técnica ELISA para la
160 detección de IgM e IgG frente a VDEN (PanBio dengue ELISA, Alere, Australia) y una
161 técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de IgM e IgG frente a VZIK y
162 VCHIK (Arboviral fever Mosaic, Euroimmun, Alemania). En todos los casos los métodos se
163 llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Para simplificar el análisis,
164 los resultados positivos débiles obtenidos por los métodos de rutina se consideraron
165 positivos y los resultados dudosos se consideraron negativos.

166 En las muestras de embarazadas con anticuerpos frente a VZIK se llevó a cabo la
167 determinación de anticuerpos neutralizantes frente al mismo mediante la técnica de
168 microneutralización. Esta técnica se llevó a cabo en el laboratorio nacional de referencia

169 (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda), donde un título $<1/32$ se interpretó como un
170 resultado negativo y un título $>1/512$ como resultado positivo. Los resultados entre
171 ambos títulos se clasificaron como indeterminados. Para simplificar el análisis, en nuestro
172 estudio se consideraron indicativos de la presencia de anticuerpos neutralizantes todos
173 aquellos títulos $>1/32$.

174

175 **recomLine Tropical Fever**

176 El método a estudio es una técnica de inmunoblot que detecta de forma simultánea
177 anticuerpos frente a VDEN, VZIK y VCHIK (recomLine Tropical Fever, Mikrogen
178 diagnostik, Alemania). El test consta de dos tiras de nitrocelulosa, una para la detección de
179 IgM y otra para IgG. Cada tira contiene una banda frente a VCHIK (antígeno E1), dos
180 bandas frente a VDEN (antígeno NS1 y antígeno E), dos bandas frente a VZIK (antígeno
181 NS1 y antígeno E), una banda de control de la reacción, una banda de control de la
182 conjugación (diferentes para IgG e IgM) y una banda de control de punto de corte. Las tiras
183 se incuban con suero diluido durante una hora y posteriormente se realiza un lavado. Tras
184 una segunda incubación de 45 minutos con anticuerpos anti-IgG o IgM humanas
185 conjugados, se realiza un lavado y se añade una solución con un sustrato que revela las
186 bandas en los lugares de la tira en los que se han fijado los anticuerpos.

187

188 La lectura de los resultados puede realizarse de forma visual (siendo el evaluador
189 quien analiza las bandas que aparecen en las tiras) o de forma automática empleando el
190 software recomScan, que tras un escaneo de las tiras realiza una interpretación. Ambos
191 métodos fueron evaluados en este estudio.

192

193 Las bandas de control deben ser positivas para que el test se considere válido.
194 Siguiendo las instrucciones del fabricante la interpretación se realiza de la siguiente
195 manera:

196

197 - Chikungunya: sólo hay un antígeno presente en el ensayo, por lo que una muestra
198 será considerada positiva si la banda del antígeno es al menos tan intensa como la
199 banda del punto de corte. Si tiene una intensidad menor o la banda no es visible, se
200 considerará negativo.

201 - Flavivirus: la interpretación se basa en el antígeno NS1, siendo la proteína E sólo
202 una ayuda en el diagnóstico. Así, si la banda del antígeno NS1 de VDEN es tan
203 fuerte como la banda del punto de corte y visiblemente más intensa que la banda
204 de NS1 de VZIK, la muestra se considerará positiva para anticuerpos contra VDEN
205 y no contra VZIK. En el caso de que la banda de VZIK NS1 sea más intensa que la
206 banda de VDEN NS1, la muestra se considerará positiva para anticuerpos frente a
207 VZIK. Cuando ambas bandas tienen un resultado de intensidad similar se emitirá
208 un resultado de “positivo para anticuerpos frente a flavivirus”, siendo imposible
209 distinguir si se trata de anticuerpos contra VDEN o contra VZIK. En caso de que
210 tanto NS1 como E sean positivas para un flavivirus, la intensidad de ambas debe
211 ser superior a las del otro virus para que la interpretación vaya a favor de una
212 infección por dicho virus. Es decir, si VDEN NS1 es más intensa que VZIK NS1 pero
213 las bandas E de ambos virus son de la misma intensidad, se considerará “positivo
214 para anticuerpos frente a flavivirus.

215

216 Para evaluar el nuevo método diagnóstico se analizó por un lado su capacidad de
217 detectar anticuerpos frente a alguno de los virus y por otro lado la interpretación que
218 realiza de los resultados obtenidos. La presencia o no de bandas frente a los diferentes
219 antígenos (considerándose positiva cualquier banda superior o igual a la banda de punto
220 de corte) se comparó con los resultados obtenidos por los métodos serológicos de rutina.

221 Por otro lado, la interpretación obtenida tanto de forma visual como de forma
222 automática se comparó con el resultado de las muestras con un diagnóstico de

223 confirmación. Se valoró de forma conjunta el resultado obtenido para IgM e IgG en cada
224 una de las muestras y el resultado final se comparó con el diagnóstico confirmado en cada
225 caso.

226

227

228 **Análisis estadístico**

229 Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, razones de verosimilitud e
230 índice kappa para el nuevo método evaluado, teniendo como referencia los métodos de
231 rutina. Los intervalos de confianza se calcularon empleando el método descrito por
232 Newcomb basado en el trabajo de Wilson(8). La interpretación de las razones de
233 verosimilitud se realizaron según el trabajo de Hayden et al (9)y el índice Kappa se
234 interpretó siguiendo los criterios de Landis y Koch(10).

235

236

237

238 **RESULTADOS**

239 Todas las muestras se analizaron con el método a estudio basado en inmunoblot. Se
240 calcularon los valores de sensibilidad, especificidad y razones de verosimilitud obtenidos
241 por el nuevo test diagnóstico, obteniendo los resultados recogidos en la Tabla 2.

242

243

244

245

246

247

248

249

		Sensibilidad % (IC 95%)	Especificidad % (IC 95%)	Razón de verosimilitud positiva (IC 95%)	Razón de verosimilitud negativa (IC 95%)	Kappa (IC 95%)
Chikungunya	IgM	0 (0-0,4)	94,2 (83,1- 98,5)	0	1,06 (1,05- 1,06)	-0,1 (- 0,7 - 0,5)
	IgG	90,9 (57,1- 99,5)	100 (90,8-100)	>10	0,09 (0,01- 0,59)	0,9 (0,8- 1,1)
Dengue	IgM	38,1 (19-61,3)	97,4 (84,6- 99,9)	>10	0,64 (0,45- 0,89)	0,4 (0,1- 0,7)
	IgG	74,4 (58,5-86)	100 (75,9-100)	>10	0,26 (0,15- 0,43)	0,6 (0,4- 0,8)
Zika	IgM	39,1 (20,5- 61,2)	100 (88-100)	>10	0,61 (0,44- 0,84)	0,4 (0,2- 0,7)
	IgG	79,5 (64,2- 89,7)	86,7 (58,4- 97,7)	5,97 (1,63- 21,87)	0,24 (0,13- 0,43)	0,5 (0,3- 0,8)

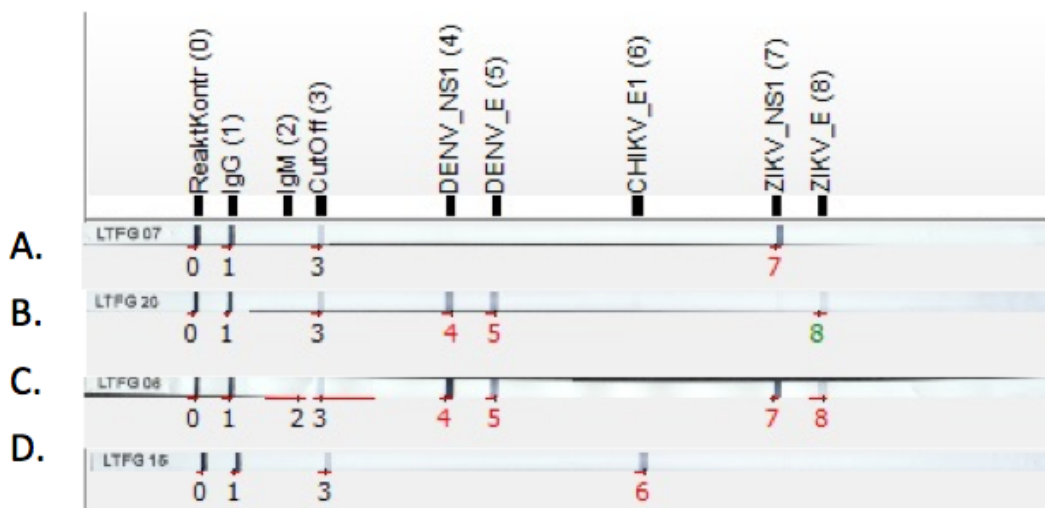
250 Tabla 2. Valores de sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud positiva, razón de
251 verosimilitud negativa e índice Kappa obtenidas por el método basado en inmunoblot, con
252 intervalos de confianza (IC) al 95%.

253

254 La sensibilidad de la nueva técnica fue baja, en especial para las IgM y de forma más
 255 marcada en los casos de VCHIK, donde el nuevo método no detectó ninguna IgM frente a
 256 VCHIK. También falló al detectar 13 de las 21 IgM de VDEN y 14 de las 23 IgM frente a
 257 virus VZIK. La detección de IgG obtuvo mayor sensibilidad que la de IgM, aunque también
 258 falló al detectar casos que habían sido positivos por los métodos de rutina.

259 En el caso de las razones de verosimilitud positivas, las IgG frente a los tres virus
 260 obtuvieron resultados >10, lo que indica que un resultado positivo tiene un gran efecto en
 261 la probabilidad post-test. En la IgM de VDEN también fue >10, mientras que la IgM frente a
 262 VZIK presentó una razón de 5,97, que indica que un resultado positivo tiene un efecto
 263 moderado en la probabilidad post-test. En el caso de VCHIK no pudo analizarse ya que no
 264 se obtuvo ningún resultado positivo para IgM mediante el método a estudio.

265 Al analizar las razones de verosimilitud negativas, sólo la IgG frente a VCHIK
 266 presentaba un gran efecto en la probabilidad post-test, mientras que las IgG frente a VDEN
 267 y VZIK presentaban un efecto pequeño en dicha probabilidad. Los resultados negativos de
 268 IgM frente a cualquiera de los virus no presentaban cambios en las probabilidades post-
 269 test.



270
 271 Figura 1. Ejemplo de interpretación de resultados de IgG. En la parte superior de la imagen aparece
 272 una banda de referencia con las bandas de control de reacción (0), de IgG (1), de IgM (2), de punto
 273 de corte (3), de antígeno NS1 de VDEN (4), de antígeno E de VDEN (5), de antígeno E de VCHIK (6),

274 de antígeno NS1 de VZIK (7) y de antígeno E de VZIK (8). La banda A es positiva en IgG frente a
275 VZIK, la banda B frente a VDEN, la banda C frente a flavivirus sin poder diferenciar entre VZIK y
276 VDEN y la banda D frente a VCHIK.

277

278 La falta de sensibilidad repercutió también en los valores del índice kappa. En el
279 caso de IgM frente a VCHIK se obtuvo un valor <0 , lo que indica una pobre concordancia
280 según los criterios de Landis y Koch. En el caso de IgM frente a VDEN y VZIK se obtuvieron
281 valores superiores, que muestran una concordancia moderada. En el caso de las IgG, se
282 obtuvo una concordancia casi perfecta en el caso de VCHIK, y una concordancia moderada
283 en el caso de VDEN y VZIK.

284

285 La interpretación que aporta el nuevo prototipo de kit diagnóstico se evaluó
286 comparando la interpretación obtenida por medios visuales o automáticos para el
287 conjunto de la muestra (interpretación combinada de IgG e IgM) con el diagnóstico
288 definitivo de los pacientes. En este análisis sólo se evaluaron las 35 muestras de las que se
289 tenía un diagnóstico confirmado. En la Tabla 3 se resumen los datos de interpretación
290 obtenidos.

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

Diagnóstico definitivo	N	Interpretación automática correcta N / % (IC 95%)	Interpretación visual correcta N / % (IC 95%)	Clasificación como flavivirus automática N / % (IC 95%)	Clasificación como flavivirus visual N / % (IC 95%)
Chikungunya confirmados	7	3 / 42,9% (15,8-75%)	5 / 71,4% (35,9-91,8%)	NA	NA
Dengue confirmados	20	8 / 40% (21,9-61,3%)	9 / 45% (25,8-65,8%)	4 / 20% (8,1-41,6%)	2 / 10% (2,8-30%)
Zika confirmados	8	7 / 87,5% (52,9-97,8%)	7 / 87,5% (52,9-97,8%)	1 / 12,5% (2,2-47,1%)	0
Total de diagnósticos	35	18 / 51,4% (36,6-67,0%)	21 / 60,0% (43,6-74,5%)	5 / 17,9% (7,9-35,6%)*	2 / 7,1% (2-22,7%)*

301 Tabla 3. Número de casos y porcentaje con intervalos de confianza (IC) al 95% de casos
302 correctamente identificados por el método basado en inmunoblot.

303 * En el cálculo de flavivirus no se tienen en cuenta los casos confirmados de chikungunya, obviando
304 las infecciones pasadas que éstos pudieran presentar.

305

306 En el caso de VCHIK la interpretación se basó únicamente en el resultado de la IgG,
307 ya que este método no detectó ninguna IgM frente a VCHIK. Hubo dos casos de VCHIK que
308 presentaron anticuerpos frente a uno o más flavivirus, por lo que, en ausencia de
309 detección de ningún anticuerpos frente a VCHIK, fueron incorrectamente clasificados
310 como “infección por dengue” o “infección por flavivirus”).

311 Hubo un caso de infección por VZIK que se clasificó como VDEN por el método
312 visual, siendo el único en el que se cometió un error de clasificación, además de los ya

313 comentados de VCHIK. El resto de resultados discrepantes se deben a resultados negativos
314 obtenidos por el inmunoblot.

315

316

317 Estas comparaciones se realizaron con el diagnóstico definitivo de las muestras, ya
318 que para el estudio se emplearon muestras bien caracterizadas en las que se había
319 obtenido un resultado positivo previamente mediante RT-PCR o tras la observación de
320 seroconversión. En el caso de los flavivirus los métodos de rutina presentan con
321 frecuencia reacciones cruzadas, por lo que también se analizó cuál hubiese sido la
322 interpretación diagnóstica basada únicamente en la información aportada por dichos
323 métodos empleando únicamente la muestra incluida en el estudio (sin poder valorar
324 seroconversión y sin tener datos sobre RT-PCR).

325 En el caso de VCHIK los métodos de rutina hubiesen aclarado el diagnóstico en al
326 menos 6 de los casos, al presentar IgM frente a dicho virus y no frente a VZIK o VDEN (5 de
327 las muestras también presentaba IgG positiva en dicho momento). En el caso restante los
328 métodos de rutina detectaron IgM frente a VZIK, por lo que únicamente con los datos
329 disponibles de serología no se podría haber esclarecido la etiología.

330 De los 20 casos confirmados de VDEN 18 presentaban IgM positiva por métodos de
331 rutina, 7 de las cuales presentaban también IgM frente a VZIK (y 3 de ellas IgG frente a
332 ambos flavivirus), por lo que sólo 11 se habrían podido clasificar como VDEN probable. En
333 los dos casos de VDEN pasado se detectó IgG frente a VDEN y no frente a VZIK, por lo que
334 su clasificación hubiese sido correcta. Así, el total de casos de VDEN correctamente
335 clasificados por los métodos de rutina habrían sido 13 / 65% (43,3-81,9%).

336 De los 8 casos confirmados de VZIK, dos presentaban IgM frente a VDEN, en uno de
337 ellos sin detectarse IgM frente a VZIK, por lo que 6 casos se hubiesen clasificado
338 correctamente, 1 como posible flavivirus y el caso restante erróneamente como infección
339 por VDEN.

340

341 Aunque excluidos de este primer análisis, también se analizó la interpretación de las
342 muestras de infección VZIK probable, cuya clasificación está basada en los resultados
343 serológicos de rutina. Seis de los 8 casos de VZIK probables con IgM positiva fueron
344 clasificados como VZIK con la interpretación automática, y 7 con la visual. Un caso fue
345 clasificado como flavivirus por ambos métodos, y uno como VDEN por el método
346 automático. En el caso de las 10 muestras con neutralización positiva frente a VZIK, el
347 método automático clasificó como flavivirus las 10 y el visual 8, siendo las dos restantes
348 clasificadas como VDEN.

349 Finalmente, de las 6 muestras de cribado de VZIK con microneutralización negativa
350 la interpretación automática clasificó 4 de ellas como VDEN y 2 como flavivirus. La
351 interpretación visual clasificó 5 como VDEN y 1 como flavivirus.

352

353

354 **DISCUSIÓN**

355 El diagnóstico serológico de las arbovirosis es complejo, especialmente en el
356 panorama actual donde varios arbovirus de la misma familia circulan de forma simultánea
357 en amplias regiones causando cuadros clínicos muy similares.

358 Por ello, el método evaluado en este estudio propone un abordaje interesante,
359 permitiendo la detección simultánea de anticuerpos frente a los arbovirus VDEN, VZIK y
360 VCHIK. Esto reduciría el número de técnicas a realizar al abordar un diagnóstico de estas
361 características, permitiendo una interpretación global de los resultados y reduciendo el
362 tiempo de obtención de los mismos.

363

364 Diferentes estudios realizados para evaluar los métodos diagnósticos empleados de
365 rutina en nuestro laboratorio reportaron sensibilidades de >95% tanto en el caso del
366 ELISA de VDEN como en el caso de la IFI frente a VCHIK y VZIK (11)(12)(13). Los valores

367 de sensibilidad obtenidos para el método basado en inmunoblot en esta evaluación,
368 especialmente en el caso de la IgM, son notablemente inferiores, desaconsejando el
369 empleo de esta técnica como sustituto de las empleadas hasta el momento.

370

371 Una de las principales ventajas que presenta este método es la detección simultánea
372 de anticuerpos frente a diferentes antígenos de los dos flavivirus incluidos, lo que podría
373 en algunos casos podría evitar la realización de técnicas de neutralización, que son mucho
374 más laboriosas y lentas que sólo se realizan en laboratorios especializados y retrasan
375 considerablemente el diagnóstico.

376 El nuevo método catalogó correctamente sólo el 40-45% de las infecciones por
377 VDENV, pero el 87,5% de las infecciones por VZIK. El nuevo método también mostró buena
378 concordancia en los casos de VZIK probables con IgM positiva, mientras que en el caso de
379 las muestras con microneutralización positiva la mayoría de muestras fueron clasificadas
380 como infecciones por flavivirus.

381 Esto sugiere un potencial para este tipo de ensayos basados en inmunoblot en
382 cuanto a la discriminación entre infecciones por VDENV y VZIK.

383 Este estudio presenta algunas limitaciones, como son un número limitado de
384 muestras, en especial muestras de VZIK confirmado. Además, la técnica de neutralización
385 se ha realizado exclusivamente frente a VZIK, y no de forma paralela frente a otros
386 flavivirus, por lo que algunas de las muestras testadas podrían estar erróneamente
387 clasificadas. Un estudio con muestras procesadas en paralelo para varios flavivirus
388 mediante técnicas de neutralización sería de utilidad para comparar la utilidad de este
389 método diagnóstico a la hora de diferenciar infecciones por diferentes flavivirus.

390 Como conclusión, el nuevo método no estaría indicado con su rendimiento actual
391 como técnica serológica de rutina para el diagnóstico de arbovirosis debido a su baja
392 sensibilidad. Versiones mejoradas de este prototipo podrían ser útiles para diferenciar
393 entre infecciones por VDENV y VZIK.

394 **REFERENCIAS**

395

396 1. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic
397 spread. *Antiviral Res.* 2015;120:32–9.

398 2. Wikan N, Smith DR. Review Zika virus: history of a newly emerging arbovirus.
399 *Lancet Infect Dis.* 2016;16:e119–26.

400 3. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global
401 distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504–7.

402 4. Neumayr A, Muñoz J, Schunk M, Bottieau E, Cramer J, Calleri G, et al. Sentinel
403 surveillance of imported dengue via travellers to Europe 2012 to 2014 : TropNet
404 data from the DengueTools Research Initiative. 2014;1–9.

405 5. Eckerle I, Briciu VT, Ergönül, Lupşe M, Papa A, Radulescu A, et al. Emerging
406 souvenirs—clinical presentation of the returning traveller with imported arbovirus
407 infections in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(3):240–5.

408 6. Pan American Health Organization. Tool for the Diagnosis and Care of patients with
409 suspected arboviral diaseases. 2017.

410 7. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses
411 in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005
412 Oct;43(10):4977–83.

413 8. Newcombe RG. Improved confidence intervals for the difference between binomial
414 proportions based on paired data. 1998;2650(May 1995).

415 9. Hayden SR, Brown MD. Likelihood ratio: A powerful tool for incorporating the
416 results of a diagnostic test into clinical decisionmaking. *Ann Emerg Med.*
417 1999;33(5):575–80.

418 10. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data
419 Published by : International Biometric Society Stable URL :
420 <http://www.jstor.org/stable/2529310>. *Society.* 2008;33(1):159–74.

- 421 11. Vazquez S, Hafner G, Ruiz D, Calzada N, Guzman MG. Evaluation of immunoglobulin
422 M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic
423 dengue infections. *J Clin Virol.* 2007;39(3):194-8.
- 424 12. Litzba N, Schuffenecker I, Zeller H, Drosten C, Emmerich P, Charrel R, et al.
425 Evaluation of the first commercial chikungunya virus indirect immunofluorescence
426 test. *J Virol Methods.* 2008;149(1):175-9.
- 427 13. De Ory F, Sánchez-Seco MP, Vázquez A, Montero MD, Sulleiro E, Martínez MJ, et al.
428 Comparative evaluation of indirect immunofluorescence and NS-1-based ELISA to
429 determine zika virus-specific IgM. *Viruses.* 2018;10(7):1-9.
- 430

RESULTADOS ADICIONALES 3

Evaluación de un ELISA basado en el antígeno NS1 para la detección de anticuerpos frente al virus Zika

Este estudio es una ampliación de una evaluación inicial de la técnica ELISA presentada como comunicación en formato poster en el 30º congreso nacional de la asociación española de técnicos de laboratorio (AETEL):

Evaluación de un ELISA basado en el antígeno NS1 para la detección de anticuerpos contra el virus Zika. Barrachina J, Alejo I, Albarracín R, Gonzalo V, Martínez Yoldi MJ.

Autores:

Izaskun Alejo-Cancho, Josep Barrachina, Rosa Albarracín, Verónica Gonzalo, Miguel J Martínez Yoldi

Introducción y objetivo:

El virus Zika (VZIK) es un arbovirus que puede causar alteraciones en el desarrollo fetal y síndrome de Guillain-Barré como complicaciones más severas de la infección. Su diagnóstico mediante técnicas serológicas es complejo debido a las frecuentes reacciones cruzadas que se observan frente a otros flavivirus, como es el caso del virus dengue (VDEN). El objetivo de este estudio es evaluar un nuevo ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) basado en el antígeno NS1 de VZIK (Euroimmun Zika IgM e IgG, Euroimmun, Alemania).

Material y métodos:

Se empleó un panel de 161 muestras de pacientes con sospecha clínica de infección por VZIK. En 27 muestras se determinaron anticuerpos IgM e IgG, en 42 sólo IgM y en 92 sólo IgG. En 96 muestras se realizó el estudio de microneutralización frente a VZIK.

Los resultados obtenidos por los métodos de rutina (detección de IgM e IgG por

inmunofluorescencia indirecta (IFI) y técnica de microneutralización) se compararon con los obtenidos por el método a estudio (Anti-Zika Virus ELISA IgM e IgG, Euroimmun).

Resultados:

En el grupo de las muestras testadas para IgM había 12 muestras de casos confirmados de infección por VZIK. El nuevo método detectó la IgM en 6 (50% (21,1-78,9%)), mientras que el método basado en IFI detectó 9 (75% (42,8-94,5%)). Sumando a estos casos confirmados los casos probables, la técnica IFI detectó la IgM en 20 de los 23 casos (86,96% (66,4-97,2%)) y la técnica ELISA 10 (43,48% (23,1-65,5%)).

La sensibilidad y especificidad de la IgG se calculó tomando como referencia el resultado de la técnica de microneutralización. El nuevo método presentó una sensibilidad del 92,9% (79,4-98,1%) y especificidad del 87,0% (74,5-94,2%).

Discusión:

Los resultados obtenidos para la IgM parecen mostrar una menor sensibilidad del nuevo método serológico, por lo que se requiere un estudio con mayor número de muestras para evaluar mejor su utilidad. En cambio, los resultados obtenidos por el nuevo método para la IgG son muy prometedores, con una concordancia elevada con los resultados obtenidos por microneutralización. Esto permitiría dar una respuesta mucho más rápida evitando en muchas ocasiones la realización de un ensayo de neutralización.

1 **EVALUACIÓN DE UN ELISA BASADO EN EL ANTÍGENO NS1 PARA LA**
2 **DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE AL VIRUS ZIKA**

3

4

5

6 Izaskun Alejo-Cancho¹, Josep Barrachina¹, Rosa Albarracin¹, Verónica Gonzalo¹,

7 Miguel J Martínez Yoldi^{1,2,3}

8

9

10

11

12 ¹ Servicio de Microbiología, Hospital Clinic, Barcelona

13 ² ISGlobal, Centro de Investigación de Salud Internacional de Barcelona (CRESIB),

14 Hospital Clinic

15 ³ Universitat de Barcelona, Barcelona

16

17

18

19

20

21

22 ***Correspondencia:**

23 Izaskun Alejo-Cancho

24 Servicio de Microbiología, Hospital Clinic, Barcelona

25 alejo@clinic.cat

26 **RESUMEN**

27 **Introducción**

28 El virus Zika (VZIK) es un arbovirus que puede causar alteraciones en el desarrollo
29 fetal y síndrome de Guillain-Barré como complicaciones más severas de la infección. Su
30 diagnóstico mediante técnicas serológicas es complejo debido a las frecuentes reacciones
31 cruzadas que se observan frente a otros flavivirus, como es el caso del virus dengue
32 (VDEN). El objetivo de este estudio es evaluar un nuevo ensayo de inmunoabsorción
33 ligado a enzimas (ELISA) basado en el antígeno NS1 de VZIK (Euroimmun Zika IgM e IgG,
34 Euroimmun, Alemania).

35

36 **Material y métodos**

37 Se empleó un panel de 161 muestras de pacientes con sospecha clínica de infección
38 por VZIK. En 27 muestras se determinaron anticuerpos IgM e IgG, en 42 sólo IgM y en 92
39 sólo IgG. En 96 muestras se realizó el estudio de microneutralización frente a VZIK.

40 Los resultados obtenidos por los métodos de rutina (detección de IgM e IgG por
41 inmunofluorescencia indirecta (IFI) y técnica de microneutralización) se compararon con
42 los obtenidos por el método a estudio (Anti-Zika Virus ELISA IgM e IgG, Euroimmun).

43

44 **Resultados**

45 En el grupo de las muestras testadas para IgM había 12 muestras de casos
46 confirmados de infección por VZIK. El nuevo método detectó la IgM en 6 (50% (21,1-
47 78,9%)), mientras que el método basado en IFI detectó 9 (75% (42,8-94,5%)). Sumando a
48 estos casos confirmados los casos probables, la técnica IFI detectó la IgM en 20 de los 23
49 casos (86,96% (66,4-97,2%)) y la técnica ELISA 10 (43,48% (23,1-65,5%)).

50 La sensibilidad y especificidad de la IgG se calculó tomando como referencia el
51 resultado de la técnica de microneutralización. El nuevo método presentó una sensibilidad
52 del 92,9% (79,4-98,1%) y especificidad del 87,0% (74,5-94,2%).

53

54 **Discusión**

55 Los resultados obtenidos para la IgM parecen mostrar una menor sensibilidad del
56 nuevo método serológico, por lo que se requiere un estudio con mayor número de
57 muestras para evaluar mejor su utilidad. En cambio, los resultados obtenidos por el nuevo
58 método para la IgG son muy prometedores, con una concordancia elevada con los
59 resultados obtenidos por microneutralización. Esto permitiría dar una respuesta mucho
60 más rápida evitando en muchas ocasiones la realización de un ensayo de neutralización.

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79 **INTRODUCCIÓN**

80 El virus Zika (VZIK) es un virus transmitido por artrópodos (arbovirus) emergente
81 que ha sido declarado emergencia de salud pública por la Organización Mundial de la
82 Salud (OMS). Antes de las epidemias actuales se creía que el virus causaba un cuadro
83 clínico leve, en muchos casos asintomático. En las recientes epidemias se ha observado
84 que VZIK puede causar afectación fetal cuando infecta a las mujeres embarazadas
85 pudiendo causar, entre otras alteraciones, microcefalia. Otra complicación que también se
86 ha visto asociada a la infección por VZIK es el síndrome de Guillain-Barré(1).

87 El diagnóstico de VZIK se basa en la detección del genoma viral por RT-PCR y/o en la
88 detección de anticuerpos frente al virus. Las pruebas serológicas presentan una
89 importante limitación: las reacciones cruzadas frente a otros virus genéticamente
90 relacionados como por ejemplo el virus dengue (VDEN), también del género flavivirus. Por
91 este motivo, el diagnóstico serológico es complejo y en ocasiones requiere la realización
92 de pruebas de neutralización, que son pruebas laboriosas y que se llevan a cabo
93 únicamente en laboratorios especializados. Estas técnicas no siempre permiten obtener
94 un diagnóstico confirmado y además alargan el tiempo hasta los resultados de forma
95 ostensible (2).

96 Tras el comienzo de la epidemia de VZIK las primeras pruebas serológicas
97 disponibles comercialmente y las más empleadas eran aquellas basadas en
98 inmunofluorescencia indirecta (IFI). Estas pruebas emplean como antígeno un cultivo
99 viral infectado por el virus, motivo por el cual son capaces de detectar anticuerpos contra
100 cualquier antígeno viral expresado durante la infección. Se ha documentado que, si bien la
101 sensibilidad es buena, presentan una especificidad menor, con un alto porcentaje de
102 reacciones cruzadas frente a otros flavivirus. Posteriormente se han ido desarrollando
103 nuevos métodos basados en diferentes antígenos virales aislados para tratar de encontrar
104 aquellos que permitan una mejor discriminación entre diferentes flavivirus. La técnica
105 anti-Zika Virus ELISA IgM e IgG (Euroimmun, Alemania) se trata de un ensayo de

106 inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) basado
107 en el antígeno NS1 de VZIK. Este ensayo, por tanto, detecta anticuerpos sintetizados
108 exclusivamente contra la proteína NS1 del virus.

109

110 El objetivo de este trabajo es evaluar la utilidad de este método ELISA para la
111 detección de anticuerpos IgM e IgG frente a VZIK, en comparación a la técnica basada en
112 inmunofluorescencia indirecta y las técnicas de neutralización.

113

114 **MATERIAL Y MÉTODOS**

115 Muestras

116 Se empleó un panel de 161 muestras de pacientes con sospecha de infección por
117 VZIK, incluyendo muestras del cribado de embarazadas. Veintisiete de estas muestras se
118 testaron con los métodos serológicos de rutina (IFI) tanto la IgM como la IgG, en 42
119 muestras sólo la IgM y en 92 sólo la IgG.

120 Un total de 96 muestras correspondían a mujeres gestantes en las que el cribado
121 inicial (IgG mediante IFI) fue positivo, por lo que se procedió a realizar la prueba de
122 microneutralización frente a VZIK.

123

124 Métodos diagnósticos

125 El método serológico empleado de rutina en nuestro laboratorio para la detección
126 de anticuerpos frente a VZIK fue Euroimmun Arbovirus Fever Mosaic 2 (Euroimmun,
127 Alemania). Se trata un método basado en inmunofluorescencia indirecta (IFI) que cuenta
128 con seis pocillos por campo: uno con células infectadas por VZIK, otro por virus
129 chikungunya (VCHIK) y otros cuatro por los diferentes serotipos de VDEN (VDEN-1,
130 VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4). El método se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del
131 fabricante.

132 En el caso de las pacientes embarazadas, todas las muestras con un resultado de IgG
133 positivo en el cribado mediante IFI se enviaron al Instituto de Salud Carlos III, donde se
134 llevó a cabo la detección de anticuerpos neutralizantes frente a VZIK mediante la técnica
135 de microneutralización en placa. La interpretación de los resultados fue la siguiente:
136 títulos inferiores a 1/32 se reportaron como negativos (54 muestras), entre 1/32 y 1/512
137 como indeterminados (32 muestras) y los superiores a 1/512 como positivos (10
138 muestras). Para simplificar el análisis, en este estudio se consideraron los títulos >1/32
139 (positivos e indeterminados) como indicativos de la presencia de anticuerpos
140 neutralizantes.

141 En algunos casos se realizó el diagnóstico de VZIK mediante RT-PCR, bien en la
142 muestra empleada en este estudio o en muestras tomadas con anterioridad. Para ello se
143 empleó una RT-PCR en tiempo real comercial (RealStar® Zika Virus RT-PCR kit, Altona
144 Diagnostics GmbH, Alemania).

145

146 En algunos casos se realizó de forma paralela el estudio de infección por VDEN. La
147 detección de anticuerpos IgM e IgG frente a VDEN se realizó mediante una técnica ELISA
148 (PanBio ELISA (Alere, Australia)) y la RT-PCR empleada para la detección de VDEN fue una
149 RT-PCR casera en tiempo real(3).

150

151 El método evaluado en este estudio fue Euroimmun anti-Zika virus IgM e IgG
152 (Euroimmun, Alemania). Es un método ELISA que emplea como antígeno la proteína NS1
153 de VZIK. La técnica se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

154

155 Análisis estadístico

156 Se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos serológicos y se
157 compararon con el diagnóstico definitivo de los casos, en aquellos que se alcanzó un
158 diagnóstico confirmado o probable. Se calculó la sensibilidad y especificidad del ELISA de

159 IgG frente a VZIK tomando como prueba de referencia la microneutralización. Se calculó el
 160 índice Kappa, que se interpretó siguiendo los criterios de Landis y Koch(4). Los intervalos
 161 de confianza para los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y
 162 negativo se calcularon empleando el método descrito por Newcomb basado en el trabajo
 163 de Wilson(5).

164

165 **RESULTADOS**

166 Los resultados obtenidos por ambos métodos para IgM e IgG se muestran en las
 167 tablas 1 y 2 respectivamente.

168

IgM		Euroimmun Arbovirus Fever	
		Mosaic 2 (VZIK)	
		Positivo	Negativo
Euroimmun anti-Zika virus IgM	Positivo	22	1
	Negativo	23	23

169 Tabla 1. Resultados obtenidos para la IgM frente a VZIK por los métodos evaluados en el estudio:
 170 Euroimmun Arbovirus Fever Mosaic 2 y Euroimmun anti-Zika virus IgM.

171

172 El grupo de muestras testadas para la IgM incluía 12 muestras con un diagnóstico
 173 confirmado de VZIK y 4 muestras de VDEN confirmado (con un resultado de RT-PCR
 174 positivo para el virus respectivo en la misma muestra o en una muestra previa). De las 12
 175 muestras con diagnóstico de confirmación, la IgM frente a VZIK fue positiva en 9 con el
 176 método de IFI (75% (42,8-94,5%)) y en 6 con el método ELISA (50% (21,1-78,9%)). Las
 177 cuatro muestras de VDEN confirmado presentaban IgM positiva frente a VDEN; dos de
 178 ellas obtuvieron un resultado positivo de IgM frente a VZIK mediante IFI (falsos positivos
 179 por reacción cruzada), mientras que todas fueron negativas mediante ELISA.

180 En este grupo de muestras testadas para la IgM también se incluían 11 muestras de
 181 pacientes diagnosticados como VZIK probable (IgM frente a VZIK positiva, con
 182 antecedente de viaje a zona epidémica y cuadro compatible). Todas estas muestras
 183 presentaban una IgM frente a VZIK positiva por IFI e IgM negativas frente a VDEN
 184 (excepto un caso obtuvo que obtuvo un resultado dudoso de IgM frente a VDEN). El
 185 método ELISA fue positivo para la IgM frente a VZIK en cuatro de estas muestras. Además,
 186 dos casos clasificados como VDEN probable (IgM frente a VDEN positiva) tuvieron un
 187 resultado negativo de IgM frente a VZIK por ambos métodos, IFI y ELISA.

188 Así, teniendo en cuenta el total de casos probables y confirmados de VZIK (23
 189 casos), la técnica de IFI detectó la IgM en 20 casos (86,96% (66,4-97,2%)), frente a los 10
 190 (43,48% (23,1-65,5%)) detectados mediante ELISA.

191 En la Tabla 2 se muestran los resultados globales obtenidos para la IgG por los
 192 métodos de IFI y ELISA. Debido al bajo número de muestras negativas por el método de
 193 rutina incluido, que limitaría el valor estadístico de los datos evaluados, se decidió analizar
 194 únicamente los datos de aquellas en las que se realizó el estudio de microneutralización.

195

IgG		Euroimmun Arbovirus Fever	
		Mosaic 2 (VZIK)	
		Positivo	Negativo
Euroimmun anti-Zika virus IgG	Positivo	57	1
	Negativo	58	3

196 Tabla 2. Resultados obtenidos para la IgG frente a VZIK por los métodos evaluados en el estudio:
 197 Euroimmun Arbovirus Fever Mosaic 2 y Euroimmun anti-Zika virus IgG.

198

199 Del total de muestras testadas para IgG, en 96 se realizó neutralización frente a
 200 VZIK. Tomando esta técnica como método de referencia, el ELISA mostró una sensibilidad

201 del 92,9% (79,4-98,1%) y una especificidad del 87,0% (74,5-94,2%). El valor predictivo
 202 positivo fue del 84,8% (70,5-93,2%) y el valor predictivo negativo del 94% (82,5-98,4%).
 203 El índice kappa, que indica la concordancia entre ambos métodos, fue 0,79 (0,67-0,91), lo
 204 cual indica una buena concordancia entre ambos.

205 En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos por el método ELISA en
 206 comparación con la técnica de microneutralización.

207

		Microneutralización	
		>1/32	<1/32 (negativo)
Euroimmun anti-Zika virus IgG	Positivo	39	7
	Negativo	3	47

208 Tabla 3. Comparación de los resultados obtenidos para la IgG con Euroimmun anti-Zika virus IgG
 209 frente a los resultados del estudio de microneutralización frente a VZIK.

210

211 El ELISA detectó como positivas 7 muestras que finalmente obtuvieron un resultado
 212 de neutralización negativo. Fueron considerados falsos positivos al tomar como prueba de
 213 referencia la neutralización, aunque también se ha de considerar que la neutralización no
 214 es la prueba más sensible, como ocurre con otros flavivirus. En el caso de las tres muestras
 215 con ELISA negativo y presencia de anticuerpos neutralizantes, se trataba de tres casos con
 216 títulos comprendidos entre el 1/32 y 1/512.

217 De las 96 muestras que habían sido positivas por IFI sólo 42 de ellas obtuvieron un
 218 resultado positivo mediante neutralización. En 34 de ellas se testó la IgG frente a VDENV,
 219 resultando positivas todas las muestras. Entre las 54 muestras positivas por IFI pero con
 220 neutralización negativa se determinó la IgG frente a VDENV en 40, siendo positiva en 39 de
 221 ellas.

222 **DISCUSION**

223 El diagnóstico serológico del VZIK es complejo, debido principalmente a las
224 reacciones cruzadas que se observan con otros flavivirus como VDEN. En este estudio se
225 ha evaluado un nuevo método ELISA basado en el antígeno NS1 de VZIK, comparándolo
226 con el método habitual de IFI basado en células infectadas. La principal limitación del
227 estudio es la falta de un método gold-estándar con el que poder comparar todos los
228 resultados.

229 Teniendo esto en cuenta, los datos obtenidos para la IgM en este estudio muestran
230 bastante discrepancia entre ambos métodos (ELISA e IFI), con un elevado número de
231 muestras con resultado negativo por ELISA y positivo por IFI. Esto podría deberse a una
232 mayor reactividad cruzada del método IFI o a una menor sensibilidad de la técnica ELISA.
233 Teniendo en cuenta las muestras bien caracterizadas de VZIK, la técnica IFI parecía
234 presentar una mayor sensibilidad, ya que detectó 9 de las 12, frente a las 6 detectadas con
235 ELISA. Este análisis presenta dos limitaciones principales: por un lado, no se dispuso de
236 una prueba de referencia para la IgM como sí ocurrió para el análisis de las IgG (en el que
237 se pudo comparar con la neutralización); y por otra parte, no se tuvo disponibilidad de
238 muestras seriadas para comprobar la sensibilidad del método en relación a la síntesis de
239 IgM frente a VZIK a diferentes tiempos desde el inicio de los síntomas.

240 El número de casos de VDEN incluidos es bajo, por lo que, aunque los resultados del
241 ELISA parecen mostrar menor reactividad cruzada con este virus (ninguno de los cuatro
242 casos confirmados de VDEN tuvo una IgM para VZIK positiva mediante ELISA, mientras
243 que 2 fueron positivas por IFI), no puede descartarse que esto se deba a su menor
244 sensibilidad global. Los datos obtenidos están en concordancia con estudios similares
245 donde también se han evaluado estos métodos, y en los que se observó una mayor
246 sensibilidad de la técnica IFI y una mayor especificidad de la técnica ELISA(6). Otros
247 estudios también apoyan estos datos, mostrando una menor sensibilidad del ELISA IgM
248 frente a otros ensayos (7)(8)(9).

249 Por el contrario, la evaluación de la IgG muestra unos resultados prometedores para
250 el nuevo método diagnóstico. Tomando como referencia el método de
251 microneutralización, el nuevo método muestra una elevada sensibilidad y especificidad.
252 Esto permitiría obtener los resultados de manera mucho más rápida, ya que la técnica de
253 referencia requiere semanas hasta la obtención de un resultado. La aplicación del ELISA
254 basado en NS1 evitaría enviar un número importante de muestras para el estudio de
255 neutralización.

256 Otra limitación de nuestro estudio es que la técnica de microneutralización se llevó a
257 cabo únicamente en pacientes embarazadas, como parte del programa cribado. Este es un
258 grupo de pacientes especial, en el que hay un alto porcentaje de pacientes asintomáticas y
259 de pacientes que han residido en zonas endémicas y han estado expuestas previamente a
260 otros flavivirus. Por ese motivo, los resultados obtenidos en este subgrupo pueden no ser
261 aplicables a la población general.

262 Teniendo en cuenta los datos globales de IgG, no sólo aquellos en los que se realizó
263 estudio de microneutralización, 58 muestras que habían sido positivas por el método IFI
264 resultaron ser negativas por ELISA. Probablemente correspondan a falsos positivos de la
265 técnica ELISA debidos a reacciones cruzadas frente a otros flavivirus (en 40 de las 58
266 muestras se determinó la IgG frente a VDENV, siendo positiva en 39 de ellas).

267 Diferentes estudios también han descrito una buena sensibilidad y especificidad
268 para las IgG mediante técnica ELISA(10). El nuevo método diagnóstico presenta una serie
269 de ventajas, entre ellas su posibilidad de automatización y una interpretación cuantitativa
270 (al contrario de la lectura de la IFI, que depende en gran parte de la experiencia del
271 observador). Los datos obtenidos sugieren que el cribado de IgG en embarazadas podría
272 llevarse a cabo mediante esta técnica diagnóstica, ya que su correlación con la técnica de
273 microneutralización es buena.

274 En conclusión, el nuevo método podría ser útil para el cribado de la IgG en
275 embarazadas. Su empleo reduciría de forma considerable el tiempo hasta los resultados.

276 En el caso de la IgM habría que realizar un estudio con mayor número de muestras bien
277 caracterizadas, incluyendo casos de VZIK y VDEN, que permitiese evaluar mejor la
278 sensibilidad y especificidad del nuevo método.

279

280 **REFERENCIAS**

- 281 1. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Jul 30;29(3):487–524.
- 282 2. Rabe IB, Staples JE, Villanueva J, Hummel KB, Johnson JA, Rose L, et al. Interim
283 guidance for interpretation of Zika virus antibody test results. *Morb Mortal Wkly*
284 *Rep.* 2016 Jun 3;65(21):543–6.
- 285 3. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses
286 in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005
287 Oct;43(10):4977–83.
- 288 4. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data
289 Published by: International Biometric Society Stable URL :
290 <http://www.jstor.org/stable/2529310>. *Society.* 2008;33(1):159–74.
- 291 5. Newcombe RG. Improved confidence intervals for the difference between binomial
292 proportions based on paired data. 1998;2650(May 1995).
- 293 6. De Ory F, Sánchez-Seco MP, Vázquez A, Montero MD, Sulleiro E, Martínez MJ, et al.
294 Comparative evaluation of indirect immunofluorescence and NS-1-based ELISA to
295 determine zika virus-specific IgM. *Viruses.* 2018;10(7):1–9.
- 296 7. L’Huillier AG, Hamid-Allie A, Kristjanson E, Papageorgiou L, Hung S, Wong CF, et al.
297 Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus. *J Clin*
298 *Microbiol.* 2017;55(8):2462–71.
- 299 8. Matheus S, Talla C, Labeau B, De Laval F, Briolant S, Berthelot L, et al. Performance
300 of 2 commercial serologic tests for diagnosing zika virus infection. *Emerg Infect Dis.*
301 2019;25(6):1153–60.
- 302 9. Basile AJ, Goodman C, Horiuchi K, Sloan A, Johnson BW, Kosoy O, et al. Multi-

303 laboratory comparison of three commercially available Zika IgM enzyme-linked
304 immunosorbent assays. *J Virol Methods*. 2018;260(March):26–33.

305 10. Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van Esbroeck
306 M, et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA
307 devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of
308 assay performance, 2015 to 2016. *Euro Surveill*. 2016;21(50):30426.

309



DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Para poder hacer frente a la aparición o re-emergencia de un virus, como ocurrió con el VZIK recientemente, es necesario conocer su distribución en líquidos biológicos y la cinética de sus marcadores diagnósticos durante la infección. Esto permite optimizar las pruebas diagnósticas y emplear las muestras idóneas en cada momento. Los datos disponibles sobre el VZIK al inicio de la epidemia eran escasos, ya que antes de la epidemia que tuvo lugar en la isla de Yap (2007) los casos descritos del mismo apenas llegaban a la veintena (155). Debido a ello las primeras recomendaciones para el diagnóstico de laboratorio del VZIK se basaron en datos obtenidos de pequeñas cohortes de pacientes y en el conocimiento previo de otros flavivirus como el VDENV, presuponiendo que ambos virus presentan una cinética similar.

El documento de la OMS publicado el 23 de Marzo de 2016 recomendaba el testado mediante RT-PCR durante los primeros siete días de síntomas, empleando como muestras la sangre total, el suero y/o la orina (156). El 1 de Abril de 2016 el Centro Europeo para la prevención y Control de Enfermedades (European Centre for Disease prevention and Control, ECDC) publicó las recomendaciones de testado para VZIK (157), según las cuales el periodo óptimo para la realización de RT-PCR en suero son los cuatro primeros días desde el inicio de la sintomatología, considerándose un periodo subóptimo hasta el séptimo día. La saliva presenta el mismo periodo óptimo, aumentando el periodo subóptimo hasta el octavo día. En el caso de la orina el periodo óptimo de cribado engloba el periodo desde el tercer día desde el inicio de los síntomas al octavo, siendo subóptimo hasta el décimo día. Este documento recomienda el testado de semen a partir del día 15 y hasta los dos meses tras el inicio de los síntomas. Por su parte, en la primavera de 2016 los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) recomendaban la realización de RT-PCR en suero los primeros siete días y en orina los primeros catorce días (158).

Tras el inicio de la epidemia de VZIK en las Américas el número de pacientes que acudían a nuestro centro con clínica sugestiva de infección por VZIK aumentó, por lo que se pusieron a punto una serie de técnicas diagnósticas basadas en RT-PCR y serología. A falta de un algoritmo diagnóstico claramente establecido, en los primeros casos sospechosos se tomaron, siempre que fue posible, muestras de suero y orina simultáneamente. Los resultados obtenidos en el **Artículo 2** de la sección de resultados muestran que, tomando como referencia las recomendaciones de tiempos de testado emitidas por el ECDC, nosotros encontramos muestras positivas fuera de los periodos considerados óptimos y subóptimos para el testado, así como muestras negativas en dichos periodos. Se encontraron pacientes en los que el ARN viral sólo era detectable en una de las dos muestras (suero u orina) en períodos teóricamente no esperables. Estos hallazgos apoyan la utilidad del testado simultáneo de ambas muestras siempre que estén disponibles, ya que este abordaje aumenta el número de casos diagnosticados por técnicas moleculares, ofreciendo por tanto un diagnóstico de confirmación de la infección.

Posteriormente se han ido publicando diferentes estudios que han permitido conocer mejor la cinética del virus en los diferentes fluidos corporales. Uno de los principales es el realizado por el equipo de Paz-Bailey, en el cuál se evaluó la presencia de ARN viral en diferentes muestras de 295 pacientes a lo largo de seis meses. Los resultados mostraron que en la mitad de los pacientes el ARN viral seguía siendo detectable en suero durante dos semanas, en orina durante una semana y en semen durante más de mes y medio. En 222 pacientes en los que se disponía de muestras de suero y orina, se observó que en un 41% el ARN viral era detectable en suero pero no en orina, mientras que en un 12% solamente era detectable en orina. Este estudio también confirmó la presencia de viremia prolongada en algunas gestantes, hallazgo que ya había sido descrito en otros estudios (114)(159)(160).

Otro estudio prospectivo observacional describió el seguimiento realizado a 15 pacientes varones de los que se recogieron muestras de sangre, orina y semen en diferentes momentos a lo largo de 120 días tras el inicio de los síntomas. A los 30 días el ARN viral seguía detectándose en el suero de cuatro pacientes y en la orina de dos pacientes. Además, en 11 de los 15 pacientes se detectó ARN de VZIK en semen en algún momento, persistiendo positivo a los dos meses en un 30% de los casos (119). En este estudio también se observó una mayor rentabilidad diagnóstica de la sangre total frente al suero, una muestra que en otros estudios ya había mostrado ser más sensible y permitir el diagnóstico en un periodo más prolongado que el suero (161)(162).

Aunque los principales estudios de cinética de VZIK se han llevado a cabo en población de zonas con transmisión activa, aquellos como los nuestros realizados en viajeros muestran también resultados similares. Por ejemplo, el equipo de Barzón realizó el seguimiento de 30 pacientes con VZIK importado, encontrando una media de 11,5 días hasta el aclaramiento del ARN en plasma, siendo el ARN detectable durante un mayor tiempo en sangre total. En el caso de la orina, el 75% de los pacientes presentaban una RT-PCR positiva en la segunda semana tras el inicio de los síntomas (124).

En conclusión, los datos obtenidos en nuestro estudio son concordantes con otros estudios publicados y sugieren que algunas recomendaciones iniciales podrían ser demasiado conservadoras y que una ampliación de los tiempos de testado aumenta el número de casos con diagnóstico confirmado. La estrategia de testar suero y orina de forma simultánea es una aproximación diagnóstica apropiada para este virus, ya que parece aumentar el número de casos detectados. Diferentes estudios sugieren también que el empleo de sangre total en lugar de suero aumentaría la sensibilidad diagnóstica. En nuestra experiencia, hoy en día la mayoría de laboratorios especializados testan ambas

muestras (suero y orina). El empleo de sangre total para RT-PCR no se ha extendido totalmente, aunque muestra un potencial diagnóstico de gran interés.

Una característica del VZIK que no presentan otros arbovirus es su capacidad de transmitirse por vía sexual (esta vía sólo se ha descrito de manera anecdótica en el caso del VDEN (43)(44)). Esta forma de transmisión se sugirió por primera vez en 2008 (163) y ha quedado probada en las epidemias más recientes. La transmisión ocurre con mayor frecuencia de hombre a mujer (164), aunque también se han descrito casos de mujer a hombre (165) y entre hombres (166). La transmisión puede ocurrir tanto en casos sintomáticos como a partir de pacientes asintomáticos (167). Además, el virus también es capaz de transmitirse verticalmente y causar graves afectaciones fetales (107). Esto dejó patente la necesidad de conocer la cinética del VZIK en muestras no empleadas habitualmente para el diagnóstico, como por ejemplo muestras vaginales y semen. La duración de la persistencia del VZIK en semen no estaba establecida y se convirtió pronto en una cuestión relevante a investigar. Teniendo esto en cuenta, en Enero de 2016 comenzamos el seguimiento de un paciente con infección por VZIK en el que se detectó la presencia del virus en semen. Muestras posteriores permitieron la detección de ARN viral en semen hasta 93 días tras el inicio de los síntomas. Cuando trabajamos en este estudio los periodos más largos en los que se había detectado VZIK en semen eran de 62 y 76 días (168)(169). Justo antes de obtener los resultados definitivos de nuestro caso (**Artículo 3** de la sección de resultados) un grupo italiano describió la presencia de RNA viral durante 6 meses (170).

Son múltiples los estudios de cinética viral de VZIK en semen realizados, en los cuales el ARN viral se ha detectado durante meses (114)(116)(119), siendo el periodo más largo en el que se ha detectado superior a 900 días (171). Otra característica observada en esta muestra es la detección intermitente: tras una detección negativa el ARN viral vuelve

a detectarse en una muestra posterior, lo que nos impide descartar la eliminación del virus en semen con un único resultado negativo. Es importante recordar que la detección por RT-PCR no indica presencia de virus viable infeccioso. El mayor periodo en el cual ha logrado aislarse el virus a partir de esta muestra es de 69 días, aunque la mayoría de estudios no ha encontrado virus viable más allá de los 30 días tras el inicio de los síntomas (172)(114). En la cohorte más amplia de pacientes en los que se investigó la persistencia del virus en semen se detectó ARN viral en la mitad de los casos (48/117) (114). La media hasta la pérdida de detección fue de 42 días y en el 95% de los casos no se detectó ARN viral en semen pasados 4 meses del inicio de los síntomas. Los datos obtenidos del caso que estudiamos nosotros concuerdan con estos hallazgos. También se han realizado estudios para evaluar la presencia del virus en el tracto genital femenino. La detección de virus en estas muestras es menos frecuente que en semen y el periodo que persisten positivas también es inferior, cercano a la semana o dos semanas (114)(162), aunque se han descrito casos donde el ARN viral se ha detectado en periodos superiores al mes (173)(174).

Cuando se descubrió la posibilidad de transmisión por vía sexual las diferentes organizaciones sanitarias emitieron recomendaciones para evitar la transmisión por esta vía. En áreas con transmisión activa se procedió a informar del riesgo y de las medidas a tomar para reducirlo, especialmente durante el embarazo. Las recomendaciones para personas que regresaban de zonas con transmisión activa se basaban en la abstinencia sexual o en el uso de métodos barrera tras el regreso, así como en evitar la gestación durante la estancia o inmediatamente tras el regreso de dichas zonas. La mejor comprensión de la cinética viral ha permitido ir actualizando estas recomendaciones conforme se obtenían nuevos conocimientos.

Las primeras recomendaciones que emitieron los CDC sólo contemplaban la transmisión de hombre a mujer y recomendaban 6 meses de abstinencia o medidas de

barrera en el caso de hombres sintomáticos, u ocho semanas tras el regreso en el caso de asintomáticos (175). En la siguiente actualización se incorporó la posibilidad de la transmisión de mujer a hombre, recomendando periodos de abstinencia de 8 semanas tanto para mujeres sintomáticas como para asintomáticas (176). La siguiente actualización en Septiembre de 2016, eliminó la discrepancia de tiempos entre pacientes sintomáticos y asintomáticos, dejando los tiempos en 6 meses para los hombres y 8 semanas para las mujeres (177). En la última actualización realizada hasta la fecha, publicada en Agosto de 2018, se rebajó a 3 meses el tiempo de abstinencia recomendado en hombres, ya que a pesar de la detección del virus en periodos extensos, el virus no parece ser viable a partir del mes en la mayoría de casos (128). En todas las actualizaciones los CDC recomiendan abstinencia o métodos barrera durante toda la gestación a las parejas de mujeres gestantes.

La necesidad de realizar un cribado a las embarazadas resultó evidente tras confirmarse la causalidad entre infección por VZIK durante el embarazo y la aparición de alteraciones en el desarrollo fetal (107). Ante la falta de evidencia sobre cuál sería el abordaje más adecuado, las diferentes organizaciones fueron publicando diferentes algoritmos diagnósticos, que fueron modificándose conforme se iba ampliando el conocimiento sobre la cinética de los marcadores diagnósticos del VZIK. Tampoco estaba claro cuál era el porcentaje de mujeres embarazadas con afectación fetal, cuáles eran los principales factores de riesgo o qué proporción de pacientes sufría una infección asintomática.

En Cataluña el cribado de las gestantes se inició en 2016 con la elaboración del “Protocolo de actuación frente a la infección por virus Zika en el ámbito obstétrico y pediátrico de Cataluña” (“Protocol d’actuació davant de la infecció pel virus de Zika en l’àmbit obstètric i pediàtric de Catalunya”) (http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/A-Z/Z/zika/documents/ProtocolObstetric_prov.def.pdf). En la primera versión del mismo se

indicaba la necesidad de testar a las mujeres embarazadas que habían estado expuestas al VZIK durante el embarazo o en las 8 semanas previas al mismo, bien por haber viajado a lugares con transmisión activa o bien tras viaje de su pareja. Los hospitales de referencia encargados del testado fueron el Hospital Vall d'Hebron y el Hospital Clinic de Barcelona. El cribado se realizaba utilizando técnicas de RT-PCR y de detección de anticuerpos en función de si las gestantes presentaban síntomas o no, la duración de los mismos y el tiempo transcurrido entre la probable exposición y la toma de la muestra. Las muestras con anticuerpos positivos eran enviadas al laboratorio nacional de referencia (Instituto Carlos III, Majadahonda), donde se realizaba la técnica de microneutralización para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes frente al VZIK. Era de interés en salud pública determinar el impacto del VZIK en las gestantes atendidas en Cataluña, para conocer el grado de afectación reproductiva y el rendimiento del programa de cribado establecido. El **Artículo 4** de la sección de resultados muestra que durante el primer año de aplicación del protocolo (2016, el año en el que más casos se detectaron), hasta el 13,4% de las pacientes cribadas mostró alguna evidencia de laboratorio de infección por VZIK (casos confirmados y probables). Se observó un 3,1% de desenlaces adversos (aborto o microcefalia) entre el total de mujeres con alguna evidencia de infección por VZIK.

La comparación de los datos sobre afectación fetal obtenidos en diferentes estudios se ve complicada por los diferentes tipos de pacientes incluidos en el mismo (en algunos casos sólo se consideran casos confirmados y en otros se incluyen casos confirmados y probables) y por las diferentes clasificaciones empleadas para describir los desenlaces del embarazo y las alteraciones fetales. Datos iniciales de Brasil indicaban una tasa de desenlaces adversos extremadamente alta, superando el 40% (107)(178). Una revisión sistemática posterior de ocho estudios situaba la prevalencia de microcefalia en un 2,3% en bebés nacidos de mujeres infectadas por VZIK(179), cifra con la que concuerdan nuestros hallazgos. El estudio de Bruno Hoen et al incluyó sólo gestantes sintomáticas diagnosticadas por RT-PCR y encontró un 7% de alteraciones oculares o neurológicas y un

3,1% de síndromes congénitos por VZIK (180). En el denominado síndrome congénito por VZIK se incluyen otros tipos de alteraciones neurológicas además de la microcefalia y también alteraciones oculares o musculo-articulares (112). La descripción más detallada de otras alteraciones o defectos al nacimiento y durante el seguimiento de los niños nacidos de madres infectadas ha hecho que actualmente el porcentaje de efectos adversos de la infección por VZIK se considere superior. A pesar de que la frecuencia de afectación todavía no está completamente determinada, la OMS estima que un 5-15% de los lactantes hijos de mujeres infectadas durante el embarazo podrían presentar complicaciones relacionadas con el virus (181). Es posible, además, que el seguimiento médico de los niños revele nuevas alteraciones asociadas a la infección por VZIK durante el embarazo. Los diferentes estudios muestran también una tasa de pacientes asintomáticas muy variable, desde un 17,2% a un 56% (179). En general se considera aceptado que las infecciones asintomáticas por VZIK son muy frecuentes, como en nuestro estudio. Probablemente el tipo de diagnóstico (confirmado vs probable) y el acceso a atención sanitaria y pruebas específicas de laboratorio, junto con el hecho de que los síntomas son por general de carácter leve y pueden no recordarse, contribuyan a la variación del porcentaje de infecciones asintomáticas reportada en las series.

Hay, sorprendentemente, una notable falta de artículos que evalúen los programas de cribado establecidos para las embarazadas en Europa. Los diferentes protocolos han ido ajustándose en base al conocimiento de la cinética viral, la evaluación de los diferentes métodos diagnósticos y el estudio de los diferentes cuadros clínicos, y han sufrido cambios sustanciales a lo largo del tiempo: desde incluir a pacientes asintomáticas a cambios en las recomendaciones de las pruebas a realizar y en los tiempos de realización de las mismas. La falta de una evaluación sistemática de los programas de cribado implementados y la falta de un marcador diagnóstico ideal en estos casos impiden establecer cuál es el abordaje más sensible y efectivo en el cribado de mujeres gestantes. A día de hoy, con la baja tasa de circulación de VZIK a nivel mundial, los CDC no recomiendan el cribado de las

gestantes asintomáticas de forma rutinaria y en el caso de las mujeres sintomáticas recomienda el testado en paralelo de VDEN y VZIK (132). En Cataluña la última versión del protocolo de actuación frente a fiebre por VZIK en el ámbito obstétrico y pediátrico se publicó en Marzo de 2019 y sigue recomendando el testado de aquellas pacientes que han podido estar expuestas (182). En esta actualización se ha eliminado el testado de IgG frente al virus, que sí estaba presente en el protocolo inicial a diferencia de otros países. Esto tiene sentido de manera general para pacientes provenientes de zonas endémicas, donde la presencia de IgG hoy en día puede reflejar una infección previa al embarazo. Sin embargo, la determinación de IgG puede ser de gran utilidad en gestantes que no han tenido exposición previa a otros flavivirus como el VDEN.

Si bien el diagnóstico molecular es confirmatorio y suele ofrecer pocas dudas, las dificultades del diagnóstico serológico de la infección por VZIK son evidentes. Esto es debido en parte a la reacción cruzada con anticuerpos frente a otros flavivirus antigénicamente relacionados y a las limitaciones del rendimiento diagnóstico de los kits comerciales. Esto hace que en una gran parte de casos diagnosticados por serología no se alcance un diagnóstico de confirmación. En los **Resultados adicionales 2 y 3** de esta tesis doctoral intentamos evaluar métodos que contribuyeran a una mejora del diagnóstico serológico de la infección por VZIK. El método basado en inmunoblot es un abordaje innovador que realiza una interpretación global de los resultados obtenidos para los VZIK, VDEN y VCHIK y trata de disminuir el impacto de las reacciones cruzadas que presentan los flavivirus empleando dos antígenos diferentes de VDEN y VZIK (antígeno NS1 y proteína E). La baja sensibilidad de la técnica, especialmente en el caso de la IgM, fue la principal limitación que presentó la técnica estudiada. Este método diagnóstico evaluado se trataba de una versión preliminar de un producto del que no se han publicado otros estudios de evaluación hasta el momento. En esta versión se empleaba el antígeno E1 para la detección de anticuerpos frente a VCHIK, mientras que una versión posterior del

producto indica que el antígeno ha cambiado a pseudo-partículas virales (virus-like particles o VLP). En el caso de VDEN y VZIK, en la versión posterior del método, se ha cambiado la proteína E por variantes de la proteína E (Equad, proteínas con mutaciones concretas) que presumiblemente mejoran la especificidad del método. Una evaluación de esta versión definitiva permitiría conocer la utilidad de estos cambios y la nueva sensibilidad del método, lo que sería necesario para valorar su utilidad diagnóstica.

Otro método diagnóstico que también detecta anticuerpos frente a los tres virus de manera simultánea es Euroimmun Arbovirus Mosaic II (Euroimmun, Alemania), una técnica basada en inmunofluorescencia indirecta (IFI) que emplea células infectadas como antígeno, a diferencia de la técnica basada en inmunoblot que detecta anticuerpos frente a los antígenos concretos mencionados previamente. Hasta la fecha ningún estudio ha evaluado la utilidad de esta IFI a la hora de realizar un diagnóstico diferencial de manera simultánea, aunque algunos estudios han evaluado su sensibilidad y especificidad para cada uno de los virus. El empleo de células infectadas probablemente hace que la sensibilidad de estas técnicas sea elevada, mientras que la especificidad se puede ver afectada por la aparición de reacciones cruzadas, ya que al estar presentes todos los antígenos virales, los anticuerpos pueden unirse a antígenos que presentan una gran similitud estructural entre diferentes virus. Precisamente el grave problema diagnóstico que supone la presencia de reacciones cruzadas entre VDEN y VZIK (131)(183)(184) ha impulsado el estudio de la estructura de los diferentes antígenos de ambos virus para tratar de buscar aquellos con menor similitud y así desarrollar nuevos métodos diagnósticos más específicos basados en los mismos.

Los test basados en IFI empleando células infectadas fueron los primeros en estar disponibles para realizar el diagnóstico serológico de VZIK. Posteriormente se desarrollaron técnicas ELISA basadas en el antígeno NS1 de VZIK. En los **Resultados adicionales 3** evaluamos ambos métodos, observando en el caso de la IgM una aparente mayor sensibilidad de la técnica basada en IFI. Estos datos van en concordancia con lo

observado en otros estudios que encuentran resultados similares (185)(186)(187). Los resultados de la IgG obtenidos por ELISA mostraron una buena concordancia con los resultados de la microneutralización. El uso de este ELISA permitiría discriminar mejor entre infecciones por VDEN y VZIK, evitando la realización de pruebas de neutralización en muchas ocasiones. El antígeno NS1 de VZIK es la diana de muchas de las pruebas serológicas disponibles actualmente y presenta una analogía del 51-53% con los antígenos NS1 de los cuatro serotipos de VDEN (115). El antígeno E de VZIK también comparte el 55-58% de las proteínas con el antígeno E de VDEN. Se ha estudiado qué epítomos concretos de estos antígenos generan una respuesta específica frente a VZIK, tratando así de minimizar las reacciones cruzadas. El empleo del antígeno de dominio III de la proteína de envoltura (EIII) mostró buenos resultados en fase convaleciente, mientras que en las infecciones agudas la reactividad cruzada seguía siendo elevada (188)(189).

Por lo tanto, las reacciones cruzadas serológicas siguen siendo un problema en la actualidad y son necesarios nuevos métodos. La evaluación de estas nuevas técnicas ha de ir acompañada de la reevaluación de las técnicas empleadas clásicamente en la situación epidemiológica actual. Las técnicas serológicas para el diagnóstico de VDEN, por ejemplo, se han empleado durante años mientras éste era el único flavivirus que circulaba de manera extensa por un gran número de países. Tras la irrupción de VZIK se ha observado una alta reactividad cruzada entre estos dos virus, lo cual cuestiona no sólo los métodos desarrollados para detectar anticuerpos contra VZIK sino también la validez de los ensayos ya establecidos para el VDEN. Un estudio reevaluando las técnicas serológicas de VDEN en viajeros con diagnóstico de VZIK mostró una elevada tasa de reacción cruzada tanto para la IgM (31%) como para la IgG (54%) (190).

Las infecciones por VDEN, VCHIK y VZIK presentan una clínica inespecífica con síntomas que pueden estar presentes en las tres infecciones. Los tres virus presentan además una distribución mundial solapada y coincidente con la de otras patologías

importadas como la malaria, por lo que realizar un diagnóstico basado únicamente en la clínica es difícil. Un cuadro clínico relativamente frecuente en los Servicios de Urgencias es la fiebre en el viajero (191). En estos casos la anamnesis es fundamental para conocer los lugares visitados y los patógenos a los que se ha podido estar expuesto. El primer cuadro a descartar en un viajero con fiebre siempre ha de ser la infección por *Plasmodium spp*, ya que se trata de una infección tratable potencialmente mortal. Los arbovirus suelen cursar con cuadros autolimitados y carecen de un tratamiento específico. No obstante, es importante diagnosticarlos correctamente ya que el manejo de los pacientes será diferente en cada uno de los casos. Por ejemplo, ante una infección por VDEN habrá que prestar atención a la aparición de signos de alarma (31); en el caso de VCHIK valorar la evolución de las artralgias y en el caso de VZIK gestionar las implicaciones de la infección en las gestantes. En todos los casos es importante identificar a los pacientes que hayan pasado parte del periodo virémico tras su regreso para tomar medidas de control con el fin de disminuir el riesgo de transmisión autóctona en áreas donde se han establecido vectores competentes.

Las primeras herramientas diagnósticas con las que cuenta el clínico son la historia clínica y los parámetros analíticos de rutina. Estos últimos, además de ayudar a evaluar la gravedad del cuadro, también pueden ayudar a dirigir el diagnóstico. Diversos estudios han descrito las diferentes alteraciones analíticas que acompañan a los diferentes cuadros que pueden causar fiebre en el viajero. Así, por ejemplo, la malaria cursa habitualmente con elevación de reactantes de fase aguda y plaquetopenia, la fiebre tifoidea con aumento de reactantes de fase aguda y leucocitosis, y el VDEN se acompaña con frecuencia de leucopenia y plaquetopenia (130)(192)(193). Teniendo en cuenta estos datos, realizamos un estudio para investigar puntos de corte en los valores de plaquetas y leucocitos que pudiesen ser de ayuda en el diagnóstico diferencial de la fiebre en el viajero (**Artículo 5**). La plaquetopenia y la leucopenia obtuvieron un alto valor predictivo negativo para el diagnóstico de malaria y arbovirosis, respectivamente. Aunque estos parámetros no son

suficientes para establecer un diagnóstico, pueden ser de utilidad en la orientación del paciente con fiebre tras regreso del trópico en los Servicios de Urgencias. El empleo de datos clínicos, epidemiológicos y analíticos ha mostrado ser de utilidad a la hora de realizar un diagnóstico diferencial entre diferentes causas de fiebre. Un estudio llevado a cabo en Rio de Janeiro describió un modelo que incluía datos clínicos (enrojecimiento conjuntival) y analíticos (leucopenia) que presentaba una sensibilidad del 81% para el diagnóstico de VDEN frente a otras causas de fiebre (194). Estudios similares se han llevado a cabo también en viajeros, como un estudio realizado en Japón en el que concluyeron que una proteína C reactiva inferior a 10 mg/L (reactante de fase aguda) era sugestivo de VDEN, ayudando este parámetro a descartar otras causas frecuentes de fiebre en el viajero (195).

Realizar el diagnóstico diferencial entre diferentes arbovirus basándonos en datos clínicos y analíticos es más difícil, aunque las infecciones por VCHIK parecen cursar con recuentos de leucocitos y plaquetas más elevados a los observados en infecciones por VDEN (196), dato que también se observó en nuestro estudio a pesar del bajo número de pacientes con VCHIK incluidos. Comparando las tres arbovirosis tratadas en esta tesis, la leucopenia es más frecuente en VDEN, menos frecuente en VCHIK y poco frecuente en VZIK. Además estos dos últimos cursan en ocasiones con elevación de la proteína C reactiva, mientras que este hallazgo no se observa en los casos de VDEN (17)(69)(129).

Tras la aproximación inicial basada en la clínica y en los parámetros analíticos, el diagnóstico definitivo de las arbovirosis se basa en las técnicas microbiológicas. En el caso de VDEN contamos con técnicas rápidas que permiten obtener un diagnóstico en minutos, gracias a la detección de antígeno NS1 o anticuerpos IgM e IgG. Estos test se basan mayoritariamente en técnicas de inmunocromatografía (ICT), cuya principal desventaja es una baja sensibilidad en comparación con las técnicas basadas en ELISA. Los test de diagnóstico rápido basados en ICT disponibles hasta el momento han sido ampliamente

evaluados en regiones endémicas y apenas evaluados en viajeros. El rendimiento de las técnicas podría ser diferente ya que los viajeros sufren con más frecuencia de dengues primarios (primeros episodios de dengue), mientras que en las zonas endémicas las infecciones secundarias (personas que sufren un segundo o tercer episodio de dengue) son más habituales. Se ha comprobado que la sensibilidad de los test de antígenos NS1 en casos de dengue secundario es inferior, probablemente porque la formación de inmunocomplejos entre anticuerpos pre-existentes y el antígeno circulante dificulta su detección. La detección de NS1 en viajeros mediante ELISA presenta un buen rendimiento (197)(198), por lo que las técnicas rápidas podrían ser de gran valor en el manejo inicial de estos pacientes. En una evaluación preliminar de la ICT, el antígeno se detectó en la mayoría de muestras positivas, si bien el número de muestras testado era demasiado bajo (14), además de mostrar unos valores prometedores para la detección de IgM (**Resultados adicionales 1**). Estos datos sugerían que los test rápidos podrían ser una herramienta diagnóstica útil en el caso de sospecha de VDEN en los viajeros, y que por tanto merecían investigarse más profundamente.

La detección de antígeno NS1 para el diagnóstico de infecciones agudas por VDEN se ha establecido en los últimos años como una alternativa relevante a la detección molecular por RT-PCR. En respuesta a la utilidad clínica de la detección de NS1, el desarrollo de técnicas basadas en ELISA y de pruebas rápidas basadas en ICT ha hecho que la detección de NS1 sea accesible a muchos laboratorios de diagnóstico microbiológico. Sin embargo, las limitaciones de estas técnicas han hecho que la innovación en nuevos métodos de detección del antígeno NS1 sea un campo en expansión. Varios grupos han propuesto tecnologías basadas en biosensores utilizando, por ejemplo, nanopartículas fluorescentes, resonancia de plasmones superficiales o detección electroquímica (199)(200)(201)(202). El método evaluado en este trabajo de tesis, basado en técnicas microfluídicas de aglutinación inmunomagnética (IMA por sus siglas en inglés, immuno-magnetic

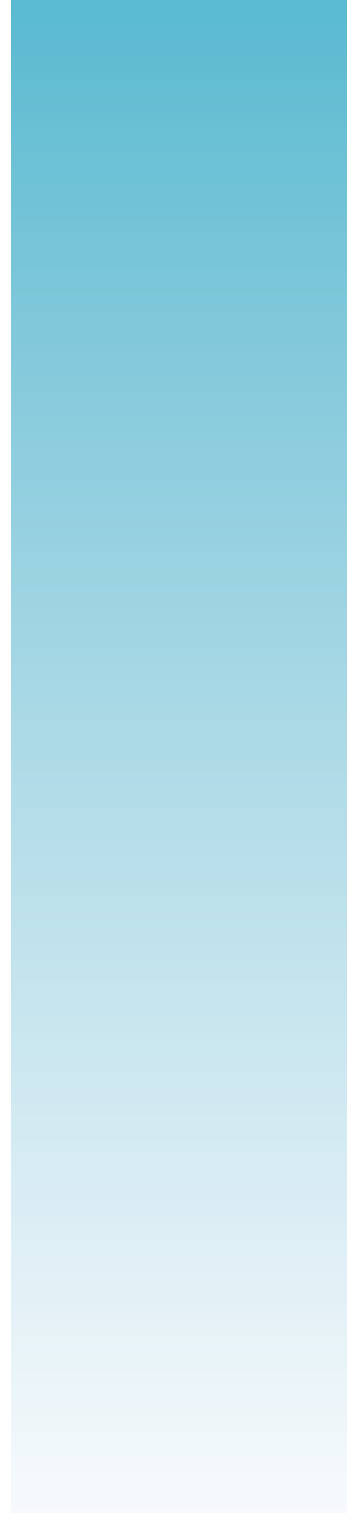
agglutination) representa otro avance dentro de las técnicas novedosas de detección de NS1 para el diagnóstico del dengue agudo. En el **Artículo 6** evaluamos un nuevo método de detección de antígeno NS1 de VDEN basado en IMA cuyas principales ventajas son su rapidez y su facilidad de uso. El nuevo método diagnóstico presentó una mayor sensibilidad que la ICT y alcanzó valores similares a los del ELISA, presentando frente a este último la ventaja de un menor tiempo de procesamiento hasta obtener los resultados. En este trabajo la ICT fue evaluada en un número de muestras mucho mayor que en nuestra evaluación preliminar, observándose una sensibilidad moderada (68,1% para la detección de NS1), en concordancia con la observada en otros estudios publicados (40-79,1%) (203)(204). El método IMA, para el que se está desarrollando la detección combinada de NS1 y anticuerpos IgG e IgM, puede representar una mejora significativa en el diagnóstico rápido de dengue. Sin embargo, deberá validarse de forma extensa también en áreas endémicas donde la circulación del virus y frecuencia de infecciones secundarias es más elevada. En nuestro trabajo observamos una menor sensibilidad de los tres métodos (IMA, ICT y ELISA) en las infecciones por VDEN-2, hallazgo ya descrito en estudios previos (205)(206) y que podría deberse a que las infecciones causadas por este serotipo presentan menor cantidad de NS1 circulante. La aplicación rutinaria del diagnóstico rápido del dengue podría impactar de forma directa en el manejo de los pacientes. A pesar de haber pocos estudios que evalúen su utilidad clínica, algunos ya han descrito una disminución en la tasa de hospitalización y el uso de antibióticos en estos pacientes gracias al uso de los test rápidos (207).

En conclusión, hoy en día son varios los arbovirus que circulan por las mismas regiones compartiendo vectores y sintomatología. A éstos se suman un número indeterminado de arbovirus que actualmente se encuentran limitados geográficamente pero que presentan potencial para emerger en el futuro. Por ello es de vital importancia

contar con programas de control y vigilancia de las arbovirosis que permitan hacer frente con celeridad a posibles emergencias o re-emergencias. Para llevar esto a cabo es necesario conocer la cinética de los marcadores virales y realizar una correcta evaluación de las diferentes técnicas diagnósticas disponibles con especial atención al diagnóstico rápido de estas infecciones. Esta evaluación ha de llevarse a cabo tanto en regiones endémicas como en viajeros, para poder conocer las diferencias entre aquellas poblaciones expuestas previamente a otros arbovirus y aquellas que no lo han estado. Todo ello nos ayudará a estar preparados frente a posibles amenazas virales.



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

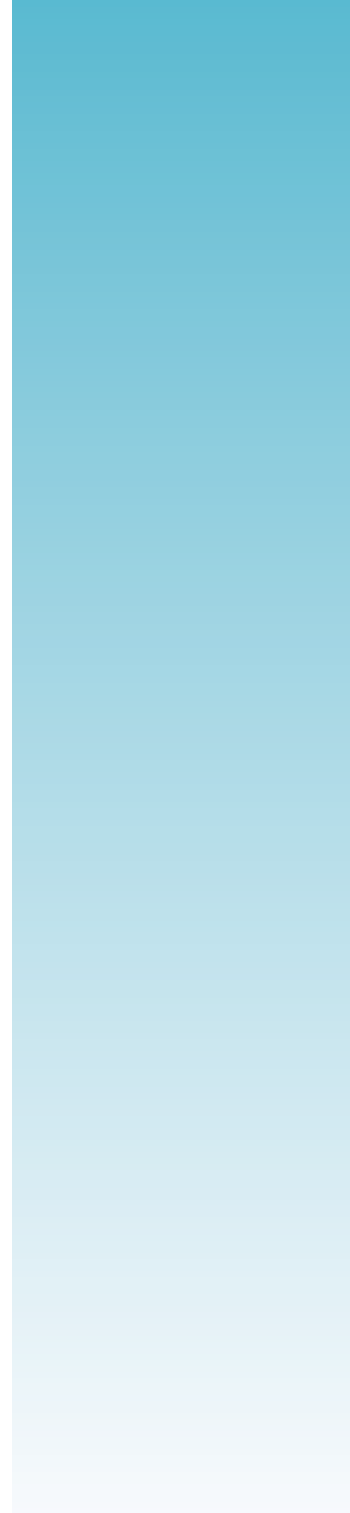
1. El ARN de VZIK puede ser detectado en suero y orina durante periodos de tiempo más amplios que los estimados al inicio de la epidemia, por lo que el testado simultáneo de ambas muestras aumenta el número de diagnósticos confirmados de esta infección.
2. El ARN de VZIK puede detectarse en semen durante periodos prolongados desde el inicio de los síntomas, aunque el virus no sea aislado en cultivo celular.
3. Un porcentaje importante de gestantes incluidas en el cribado de VZIK en Cataluña en 2016 mostraron alguna evidencia de laboratorio de infección por ZIKV. El porcentaje de casos confirmados fue notablemente inferior.
4. La mayor parte de las gestantes con alguna evidencia de laboratorio de infección por VZIK fueron asintomáticas mientras que la mayoría de pacientes con infección por VZIK confirmada presentaron síntomas.
5. La proporción de las gestantes con datos sugestivos de infección por ZIKV que presentaron un desenlace adverso del embarazo (aborto o microcefalia) fue similar al descrito series de en zonas endémicas en el momento de la realización del estudio.
6. Todos los desenlaces adversos detectados en gestantes infectadas por VZIK tuvieron lugar en pacientes sintomáticas y que habían adquirido la infección durante el primer trimestre del embarazo.
7. La leucopenia y la trombocitopenia son marcadores con alto valor predictivo negativo para arbovirosis y malaria, respectivamente, y son de utilidad en el despistaje clínico inicial de pacientes que regresan de un área tropical con síndrome febril.
8. El ensayo evaluado basado en técnicas microfluídicas de aglutinación inmunomagnética (IMA) es un método eficaz para el diagnóstico rápido de

infección aguda por VDENV, con una sensibilidad similar al ELISA y un tiempo hasta el resultado similar a la inmunocromatografía.

9. Las técnicas de detección de antígeno NS1 de VDENV presentan limitaciones para el diagnóstico de infección por VDENV-2 y para las infecciones secundarias.
10. La técnica evaluada para la detección de anticuerpos frente a VCHIK, VDENV y VZIK basada en inmunoblot presenta una baja sensibilidad para la detección de anticuerpos IgM, por lo que no es útil para el diagnóstico de infecciones recientes.
11. La técnica de ELISA para detectar anticuerpos IgG contra la proteína NS1 de VZIK mejora el diagnóstico serológico de las infecciones por VZIK.
12. Son necesarias nuevas herramientas serológicas para mejorar el diagnóstico serológico de las infecciones por flavivirus y en especial para discriminar los anticuerpos contra VDENV y VZIK.



REFERENCIAS



REFERENCIAS

1. Gubler DJ, Vasilakis N. The Arboviruses: Quo Vadis? In: Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control. Caister Academic Press; 2016. p. 1–6.
2. Arrigo NC, Weaver SC, Calisher CH. The Taxonomy of Arboviruses. In: Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control. Caister Academic Press; 2016. p. 9–30.
3. Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. Insect-specific virus discovery: Significance for the arbovirus community. Vol. 7, Viruses. 2015. p. 4911–28.
4. Go YY, Balasuriya UBR, Lee C. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. Clin Exp Vaccine Res. 2014;3(1):58.
5. Hall RA, Hall-Mendelin S, Hobson-Peters J, Prow NA, Mackenzie JS. Ecological and Epidemiological Factors Influencing Arbovirus Diversity, Evolution and Spread. In: Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control. Caister Academic Press; 2016. p. 135–66.
6. Reed W, Carroll J. Yellow Fever : 100 Years of Discovery The Etiology of Yellow Fever : An Additional Note. JAMA Class. 2008;36(8):1–3.
7. Vasilakis N, Tesh RB, Popov VL, Widen SG, Wood TG, Forrester NL, et al. Exploiting the Legacy of the Arbovirus Hunters. Viruses. 2019;11(5):1–38.
8. Gubler DJ. Human Arbovirus Infections Worldwide. Ann N Y Acad Sci. 2006;951(1):13–24.
9. Kilpatrick AM, Randolph SE. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. Lancet. 2012 Dec 1;380(9857):1946–55.
10. Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. Aedes albopictus, an arbovirus vector: From the darkness to the light. Microbes Infect. 2009;11(14–15):1177–85.
11. Tomasello D, Schlagenhauf P. Chikungunya and dengue autochthonous cases in

- Europe, 2007-2012. *Travel Med Infect Dis.* 2013;11(5):274–84.
12. Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect.* 2015;4(3):1–5.
 13. Weaver SC, Reisen WK. Present and Future Arboviral Threats. Vol. 85, *Antiviral Research.* 2010. 1–36 p.
 14. Moudy RM, Meola MA, Morin LLL, Ebel GD, Kramer LD. A newly emergent genotype of West Nile virus is transmitted earlier and more efficiently by *Culex* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(2):365–70.
 15. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007;3(12):1895–906.
 16. Tsetsarkin KA, Weaver SC. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by chikungunya virus and its epidemic emergence. *PLoS Pathog.* 2011 Dec 8;7(12):e1002412.
 17. Eckerle I, Briciu VT, Ergönül Ö, Lupşe M, Papa A, Radulescu A, et al. Emerging souvenirs—clinical presentation of the returning traveller with imported arbovirus infections in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(3):240–5.
 18. Charlier C, Beaudoin MC, Couderc T, Lortholary O, Lecuit M. Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. *Lancet Child Adolesc Heal.* 2017;1(2):134–46.
 19. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2:1–26.
 20. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med journal, Armed Forces India.* 2015 Jan;71(1):67–70.
 21. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015;385(9966):453–65.

22. Islam R, Salahuddin M, Ayubi MS, Hossain T, Majumder A, Taylor-Robinson AW, et al. Dengue epidemiology and pathogenesis: images of the future viewed through a mirror of the past. *Virol Sin.* 2015;30(5):326–43.
23. Rothman AL. Immunity to dengue virus: A tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):532–43.
24. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett ADT, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *J Virol.* 2000;74(7):3227–34.
25. Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: Prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(7):532–41.
26. Mayer S V., Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop.* 2017;166:155–63.
27. Halstead SB. The XXth century dengue pandemic: Need for surveillance and research. Vol. 45, *World Health Statistics Quarterly.* 1992. p. 292–8.
28. Kuno G. A Re-Examination of the History of Etiologic Confusion between Dengue and Chikungunya. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(11):1–11.
29. Carey DE. Chikungunya and dengue: A case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci.* 1971 Jul 1;26(3):243–62.
30. Halstead SB. Reappearance of chikungunya, formerly called Dengue, in the Americas. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(4):557–61.
31. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 2009.
32. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504–7.

33. Ryan SJ, Carlson CJ, Mordecai EA, Johnson LR. Global expansion and redistribution of Aedes-borne virus transmission risk with climate change. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;13(3):1–20.
34. Danis-Lozano R, Díaz-González EE, Malo-García IR, Rodríguez MH, Ramos-Castañeda J, Juárez-Palma L, et al. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and its role in the epidemiological persistence of dengue in Central and Southern Mexico. *Trop Med Int Heal*. 2019 Sep 4;24(11):1311–9.
35. Ferreira-De-Lima VH, Lima-Camara TN. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: A systematic review. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–8.
36. Grunnill M, Boots M. How important is vertical transmission of dengue viruses by mosquitoes (Diptera: Culicidae)? *J Med Entomol*. 2016;53(1):1–19.
37. Rosen L, Rozeboom LE, Sweet BH, Sabin AB. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. *Am J Trop Med Hyg*. 1954;3(5):878–82.
38. Savage HM, Fritz CL, Rutstein D, Yolwa A, Vorndam V, Gubler DJ. Epidemic of dengue-4 virus in Yap State, Federated States of Micronesia, and implication of *Aedes hensilli* as an epidemic vector. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58(4):519–24.
39. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. 2015 Jun 30;4.
40. Chen LH, Wilson ME. Update on non-vector transmission of dengue: relevant studies with Zika and other flaviviruses. *Trop Dis Travel Med Vaccines*. 2016;2(1):2–7.
41. Basurko C, Carles G, Youssef M, Guindi WEL. Maternal and foetal consequences of dengue fever during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;147(1):29–32.
42. Barthel A, Gourinat AC, Cazorla C, Joubert C, Dupont-Rouzeyrol M, Descloux E.

- Breast milk as a possible route of vertical transmission of dengue virus? *Clin Infect Dis*. 2013;57(3):415–7.
43. Lee C, Lee H. Probable female to male sexual transmission of dengue virus infection. *Infect Dis (Auckl)*. 2019;51(2):150–2.
 44. Liew CH. The first case of sexual transmission of dengue in Spain. *J Travel Med*. 2020;27(1):23744235.
 45. Waggoner JJ, Balmaseda A, Gresh L, Sahoo MK, Montoya M, Wang C, et al. Homotypic Dengue Virus Reinfections in Nicaraguan Children. *J Infect Dis*. 2016 Oct 1;214(7):986–93.
 46. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*. 2013;158(7):1445–59.
 47. Soo KM, Khalid B, Ching SM, Chee HY. Meta-analysis of dengue severity during infection by different dengue virus serotypes in primary and secondary infections. *PLoS One*. 2016;11(5):4–14.
 48. Guzmán MG, Kourí G, Valdés L, Bravo J, Vázquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: Death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal*. 2002;11(4):223–7.
 49. Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: An update. Vol. 10, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2012. p. 895–907.
 50. Peeling RW, Artsob H, Pelegriño JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Dec;8(12supp):S30–7.
 51. Muller DA, Depelseñaire ACI, Young PR. Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. *J Infect Dis*. 2017;215(Suppl 2):S89–95.
 52. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2005 Oct;43(10):4977–83.

53. Reynes JM, Ong S, Mey C, Ngan C, Hoyer S, Sall AA. Improved molecular detection of dengue virus serotype 1 variants. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3864–7.
54. Lopez-Jimena B, Bekaert M, Bakheit M, Frischmann S, Patel P, Simon-Loriere E, et al. Development and validation of four one-step real-time RT-LAMP assays for specific detection of each dengue virus serotype. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(5):1–22.
55. Duyen HTL, Ngoc T V, Ha DT, Hang VTT, Kieu NTT, Young PR, et al. Kinetics of Plasma Viremia and Soluble Nonstructural Protein 1 Concentrations in Dengue : Differential Effects According to Serotype and Immune Status. 2011;203.
56. Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet J.* 2013;195(1):33–40.
57. Teles FRR, Prazeres DMF, Lima-Filho JL. Trends in dengue diagnosis. *Rev Med Virol.* 2005;15(5):287–302.
58. European Union. On the communicable diseases and related special health issues to be covered by epidemiological surveillance as well as relevant case definitions [Internet]. Official Journal of the European Union. [cited 2019 Apr 7]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0945&from=EN#page=10>
59. Pan American Health Organization, World Health Organization. Zika virus (ZIKV) Surveillance in the Americas: Laboratory detection and diagnosis. Algorithm for detecting Zika virus (ZIKV) [Internet]. [cited 2019 Feb 5]. Available from: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2015-cha-algorithm-detecting-zikv.pdf>
60. World Health Organization. Dengue vaccine: WHO position paper, July 2016 – recommendations. Vol. 35, Vaccine. Elsevier Ltd; 2017. p. 1200–1.
61. World Health Organization. Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 – Recommendations. Vol. 37, Vaccine. Elsevier Ltd; 2019. p. 4848–9.
62. Javelle E, Al Balushi A, Jespersen S, Al Abri S, Gautret P, Petersen E. Should travellers

- be offered vaccination against the dengue virus? Vol. 27, *Travel Medicine and Infectious Disease*. Elsevier USA; 2019. p. 2–4.
63. Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. Vol. 7, *Lancet Infectious Diseases*. Elsevier; 2007. p. 319–27.
 64. Silva LA, Dermody TS. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest*. 2017;127(3):737–49.
 65. Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol*. 2000;81(2):471–9.
 66. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res*. 2015;120:32–9.
 67. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):491–500.
 68. Ganesan VK, Duan B, Reid SP. Chikungunya virus: Pathophysiology, mechanism, and modeling. *Viruses*. 2017;9(12):1–14.
 69. Silva JVJ, Ludwig-Begall LF, Oliveira-Filho EF d., Oliveira RAS, Durães-Carvalho R, Lopes TRR, et al. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta Trop*. 2018;188(July):213–24.
 70. Ross RW. The Newala Epidemic. *J Hyg*. 1956;54(2):177–91.
 71. Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli A, Panning M, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. 2007;370(9602):1840–6.
 72. Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge JM, Souarès Y, Failloux AB, et al. Chikungunya virus, Southeastern France. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):910–3.
 73. Delisle E, Rousseau C, Broche B, Leparç-Goffart I, L'ambert G, Cochet A, et al.

- Chikungunya outbreak in Montpellier, France, september to october 2014. *Eurosurveillance*. 2015 Apr 30;20(17):21108.
74. Lindh E, Argentini C, Remoli ME, Fortuna C, Faggioni G, Benedetti E, et al. The Italian 2017 outbreak chikungunya virus belongs to an emerging aedes albopictus-adapted virus cluster introduced from the Indian subcontinent. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(1).
 75. Sam IC, Kümmerer BM, Chan Y-F, Roques P, Drosten C, AbuBakar S. Updates on Chikungunya Epidemiology, Clinical Disease, and Diagnostics. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2015;15(4):223–30.
 76. Valentine MJ, Murdock CC, Kelly PJ. Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. Vol. 12, *Parasites and Vectors*. 2019. p. 1–18.
 77. Higgs S, Vanlandingham D. Chikungunya Virus and Its Mosquito Vectors. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2015;15(4):231–40.
 78. Weaver SC, Chen R, Diallo M. Chikungunya Virus: Role of Vectors in Emergence from Enzootic Cycles. *Annu Rev Entomol*. 2020;65(1).
 79. Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PLoS Med*. 2008;5(3):0413–23.
 80. Shah K V, Baron S. Laboratory infection with chikungunya virus: a case report. *Indian J Med Res*. 1965 Jul;53(7):610–3.
 81. Natrajan MS, Rojas A, Waggoner JJ. Beyond Fever and Pain: Diagnostic Methods for Chikungunya Virus. *J Clin Microbiol*. 2019;(May):1–14.
 82. Bustos Carrillo F, Collado D, Sanchez N, Ojeda S, Lopez Mercado B, Burger-Calderon R, et al. Epidemiological Evidence for Lineage-Specific Differences in the Risk of Inapparent Chikungunya Virus Infection. *J Virol*. 2018;93(4):1–27.
 83. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: A re-emerging virus. *Lancet*. 2012;379(9816):662–71.

84. Paixão ES, Rodrigues LC, Costa M da CN, Itaparica M, Barreto F, Gérardin P, et al. Chikungunya chronic disease: A systematic review and meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2018;112(7):301–16.
85. Lopez-Jimena B, Wehner S, Harold G, Bakheit M, Frischmann S, Bekaert M, et al. Development of a single-tube one-step RT-LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(5):1–14.
86. Okabayashi T, Sasaki T, Masrinoul P, Chantawat N, Yoksan S, Nitatpattana N, et al. Detection of chikungunya virus antigen by a novel rapid immunochromatographic test. *J Clin Microbiol.* 2015;53(2):382–8.
87. Huits R, Okabayashi T, Cnops L, Barbé B, Van Den Berg R, Bartholomeeusen K, et al. Diagnostic accuracy of a rapid E1-antigen test for chikungunya virus infection in a reference setting. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(1):78–81.
88. Jain J, Okabayashi T, Kaur N, Nakayama E, Shioda T, Gaind R, et al. Evaluation of an immunochromatography rapid diagnosis kit for detection of chikungunya virus antigen in India, a dengue-endemic country. *Virol J.* 2018;15(1):1–6.
89. Powers AM. Vaccine and therapeutic options to control chikungunya virus. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(1):1–29.
90. Wang A, Thurmond S, Islas L, Hui K, Hai R. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(3):1–6.
91. Beaver JT, Lelutiu N, Habib R, Skountzou I. Evolution of two major Zika virus lineages: Implications for pathology, immune response, and vaccine development. Vol. 9, *Frontiers in Immunology.* 2018. p. 1.
92. Gubler DJ, Vasilakis N, Musso D. History and Emergence of Zika Virus. *J Infect Dis.* 2017;216(Suppl 10):S860–7.
93. Hu T, Li J, Carr MJ, Duchêne S, Shi W. The Asian Lineage of Zika Virus: Transmission and Evolution in Asia and the Americas. *Virol Sin.* 2019;34(1):1–8.
94. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Jul 30;29(3):487–524.

95. Langerak T, Mumtaz N, Tolk VI, van Gorp ECM, Martina BE, Rockx B, et al. The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2019;15(4):e1007640.
96. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009 Jun 11;360(24):2536–43.
97. Musso D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(10):1887–9.
98. Wikan N, Smith DR. Review Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:e119–26.
99. Monteiro Rodrigues J, Lourenço J, Rodrigues Faria N, Tomás T, Monteiro M, Pybus O. Epidemiology of the Zika Virus Outbreak in the Cabo Verde Islands, West Africa. *PLoS Curr.* 2018;1–7.
100. Ho ZJM, Hapuarachchi HC, Barkham T, Chow A, Ng LC, Lee JMV, et al. Outbreak of Zika virus infection in Singapore: an epidemiological, entomological, virological, and clinical analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(8):813–21.
101. Hill SC, Vasconcelos J, Neto Z, Jandondo D, Zé-Zé L, Aguiar RS, et al. Emergence of the Asian lineage of Zika virus in Angola: an outbreak investigation. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(10):1138–47.
102. Saxena SK, Kumar S, Sharma R, Maurya VK, Dandu HR, Bhatt MLB. Zika virus disease in India - Update October 2018. *Travel Med Infect Dis.* 2019;27(October 2018):121–2.
103. Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Huang JH, Leal G, Yun R, et al. Variation in aedes aegypti mosquito competence for zika virus transmission. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(4):625–32.
104. Boyer S, Calvez E, Chouin-Carneiro T, Diallo D, Failloux AB. An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes Infect.* 2018;20(11–12):646–60.

105. Ledermann JP, Guillaumot L, Yug L, Saweyog SC, Tided M. *Aedes hensilli* as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10):3188.
106. Moreira J, Peixoto TM, Siqueira AM, Lamas CC. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. Vol. 23, *Clinical Microbiology and Infection*. 2017. p. 296–305.
107. Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016 Dec;375(24):2321–34.
108. Musso D, Ko AI, Baud D. Zika Virus Infection — After the Pandemic. *N Engl J Med*. 2019;381(15):1444–57.
109. Mann TZ, Haddad LB, Williams TR, Hills SL, Read JS, Dee DL, et al. Breast milk transmission of flaviviruses in the context of Zika virus: A systematic review. Vol. 32, *Paediatric and Perinatal Epidemiology*. 2018. p. 358–68.
110. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance*. 2014 Apr 10;19(14):20761.
111. Salvador E. Zika Virus and the Guillain – Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. 2019;23–6.
112. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura C V., Da Fonseca EB, et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians. Vol. 171, *JAMA Pediatrics*. American Medical Association; 2017. p. 288–95.
113. Landry ML, St George K. Laboratory diagnosis of zika virus infection. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(1):60–7.
114. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. *N Engl J Med*. 2018 Sep

- 27;379(13):1234–43.
115. Theel ES, Jane Hata D. Diagnostic testing for Zika virus: A postoutbreak update. *J Clin Microbiol.* 2018;56(4):1–12.
 116. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Lavezzo E, Trevisan M, Sgarabotto D, et al. Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. *Eurosurveillance.* 2016 Aug 11;21(32):30316.
 117. García-Bujalance S, Gutiérrez-Arroyo A, De la Calle F, Díaz-Menéndez M, Arribas JR, García-Rodríguez J, et al. Persistence and infectivity of Zika virus in semen after returning from endemic areas: Report of 5 cases. *J Clin Virol.* 2017 Nov;96:110–5.
 118. Arsuaga M, García Bujalance S, Díaz-Menéndez M, Vázquez A, Arribas JR. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:1107.
 119. Joguet G, Mansuy JM, Matusali G, Hamdi S, Walschaerts M, Pavili L, et al. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(11):1200–8.
 120. Chotiwan N, Brewster CD, Magalhaes T, Weger-Lucarelli J, Duggal NK, Rückert C, et al. Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. *Sci Transl Med.* 2017 May 3;9(388).
 121. Estrela PFN, Mendes G de M, de Oliveira KG, Bailão AM, Soares CM de A, Assunção NA, et al. Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. *J Virol Methods.* 2019;271(June):113675.
 122. Afsahi S, Lerner MB, Goldstein JM, Lee J, Tang X, Bagarozzi DA, et al. Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection. *Biosens Bioelectron.* 2018;100(August 2017):85–8.
 123. Lum FM, Lin C, Susova OY, Teo TH, Fong SW, Mak TM, et al. A sensitive method for detecting Zika virus antigen in patients' whole-blood specimens as an alternative

- diagnostic approach. *J Infect Dis.* 2017;216(2):182–90.
124. Barzon L, Percivalle E, Pacenti M, Rovida F, Zavattoni M, Del Bravo P, et al. Virus and Antibody Dynamics in Travelers with Acute Zika Virus Infection. *Clin Infect Dis.* 2018 Apr 3;66(8):1173–80.
 125. Lustig Y, Cotar AI, Ceianu CS, Castilletti C, Zelena H, Burdino E, et al. Lack of Zika virus antibody response in confirmed patients in non-endemic countries. *J Clin Virol.* 2018 Feb;99–100:31–4.
 126. Rabe IB, Staples JE, Villanueva J, Hummel KB, Johnson JA, Rose L, et al. Interim guidance for interpretation of Zika virus antibody test results. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016 Jun 3;65(21):543–6.
 127. World Health Organization. Prevention of sexual transmission of Zika virus Interim guidance update [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 1]. Available from: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2015_terminology_guidel
 128. Polen KD, Gilboa SM, Hills S, Oduyebo T, Kohl KS, Brooks JT, et al. Update: Interim Guidance for Preconception Counseling and Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus for Men with Possible Zika Virus Exposure — United States, August 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2018 Aug 7;67(31).
 129. Pan American Health Organization (PAHO). Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases. Pan American Health Organization. PAHO; 2017. 102 p.
 130. Cooper EC, Ratnam I, Mohebbi M, Leder K. Laboratory features of common causes of fever in returned travelers. *J Travel Med.* 2014;21(4):235–9.
 131. Charrel RN. Diagnosis of arboviral infections - A quagmire of cross reactions and complexities. Vol. 14, *Travel Medicine and Infectious Disease.* 2016. p. 11–2.
 132. Sharp TM, Fischer M, Muñoz-Jordán JL, Paz-Bailey G, Staples JE, Gregory CJ, et al. Dengue and Zika Virus Diagnostic Testing for Patients with a Clinically Compatible Illness and Risk for Infection with Both Viruses. *MMWR Morb Mortal Wkly report.*

- 2019;68(1):1–10.
133. Schaffner F, Mathis A. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: Past, present, and scenarios for the future. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(12):1271–80.
 134. Adhami J, Reiter P. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc.* 1998 Sep;14(3):340–3.
 135. Collantes F, Delacour S, Alarcón-Elbal PM, Ruiz-Arrondo I, Delgado JA, Torrell-Sorio A, et al. Review of ten-years presence of *Aedes albopictus* in Spain 2004–2014: known distribution and public health concerns. *Parasit Vectors.* 2015;8(1):655.
 136. Aranda C, Eritja R, Roiz D. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Med Vet Entomol.* 2006;20(1):150–2.
 137. Breve N, Delacour S, Félix Barandika J, Luisa García-Pérez A, Collantes F, Ruiz-Arrondo I, et al. Detección temprana de mosquito tigre, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), en el País Vasco (España). *An Biol.* 2015;37:25–30.
 138. Bravo-Barriga D, Gouveia Almeida AP, Parreira R, Jiménez-Vidal D, Pérez-Martín JE, Martín-Cuervo M, et al. First detections of *Aedes albopictus* (tiger mosquito) in the region of Extremadura, west of Spain. Vol. 33, *Gaceta Sanitaria.* 2019. p. 299–300.
 139. La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, september 2010. *Eurosurveillance.* 2010;15(39):1–5.
 140. Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobučar A, Pem-Novosel I, et al. Autochthonous dengue fever in Croatia, August- September 2010. *Eurosurveillance.* 2011;16(9):1–4.
 141. Auerswald H, De Jesus A, Seixas G, Nazareth T, In S, Mao S, et al. First dengue virus seroprevalence study on Madeira Island after the 2012 outbreak indicates unreported dengue circulation. *Parasites and Vectors.* 2019;12(1):1–11.
 142. Marchand E, Prat C, Jeannin C, Lafont E, Bergmann T, Flusin O, et al. Autochthonous

- case of dengue in France, October 2013. *Eurosurveillance*. 2013;18(50).
143. Succo T, Leparc-Goffart I, Ferré J, Roiz D, Broche B, Maquart M, et al. Autochthonous dengue outbreak in Nîmes, South of France, July to September 2015. *Eurosurveillance*. 2016;21(21):1–7.
 144. European centre for disease prevention and control. Local transmission of dengue fever in France and Spain - 2018 [Internet]. [cited 2019 Feb 1]. Available from: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/08-10-2018-RRA-Dengue-France.pdf>
 145. European centre for disease prevention and control. Autochthonous cases of dengue in Spain and France, 1 October 2019 [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 7]. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-dengue-in-Spain-France_10Oct2019.pdf
 146. Venturi G, Di Luca M, Fortuna C, Elena Remoli M, Riccardo F, Severini F, et al. Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy. *Eurosurveillance*. 2017;22(39):1–4.
 147. Riccardo F, Venturi G, Di Luca M, Del Manso M, Severini F, Andrianou X, et al. Secondary Autochthonous Outbreak of Chikungunya, Southern Italy, 2017. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(11):2093–6.
 148. Calba C, Guerbois-Galla M, Franke F, Jeannin C, Auzet-Caillaud M, Grard G, et al. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Eurosurveillance*. 2017;22(39):5–10.
 149. Fréour T, Mirallié S, Hubert B, Splingart C, Barrière P, Maquart M, et al. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. *Eurosurveillance*. 2016 Jun 9;21(23):30254.
 150. Grossi PA, Percivalle E, Campanini G, Sarasini A, Premoli M, Zavattoni M, et al. An autochthonous sexually transmitted Zika virus infection in Italy 2016. *New Microbiol*. 2018;41(1):80–2.

151. Frank C, Cadar D, Schlaphof A, Neddersen N, Günther S, Tappe D. Sexual transmission of Zika virus in Germany , April 2016. 2016;(April):2–5.
152. Valle Borrego B, Kosanic C, de Ory F, Merino Fernández FJ, Gómez Rodríguez B. Primer caso documentado de Zika en España . Transmisión por vía sexual. Emergencias. 2017;290–1.
153. Perez S, Tato R, Cabrera JJ, Lopez A, Robles O, Paz E, et al. Confirmed case of Zika virus congenital infection, Spain, March 2016. Eurosurveillance. 2016;21(24):1–4.
154. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid Risk Assessment - Zika virus disease in Var department, France [Internet]. 2019. p. 8. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-Zika-France-16-Oct-2019-corrected.pdf>
155. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. Lancet. 2017;390:2099–109.
156. World Health Organization. Laboratory testing for Zika virus infection. World Health Organ. 2016;(March):1.
157. European centre for disease prevention and control. Interim guidance for healthcare providers and Zika virus laboratory diagnosis [Internet]. 2016 [cited 2016 May 20]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/zika-virus-guidance-healthcare-providers-and-laboratory-diagnosis.pdf>
158. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidance for Zika virus testing of urine — United States, 2016. Morb Mortal Wkly Rep. 2016;65(18):474.
159. Driggers RW, Ho C-Y, Korhonen EM, Kuivanen S, Jääskeläinen AJ, Smura T, et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. N Engl J Med. 2016 Jun 2;374(22):2142–51.
160. Meaney-Delman D, Oduyebo T, Polen KND, White JL, Bingham AM, Slavinski SA, et al. Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Pregnant Women. Obstet Gynecol.

- 2016 Oct 1;128(4):724–30.
161. Mansuy JM, Mengelle C, Pasquier C, Chapuy-Regaud S, Delobel P, Martin-Blondel G, et al. Zika virus infection and prolonged viremia in whole-blood specimens. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(5):863–5.
 162. Murray KO, Gorchakov R, Carlson AR, Berry R, Lai L, Natrajan M, et al. Prolonged detection of zika virus in vaginal secretions and whole blood. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(1):99–101.
 163. Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, da Rosa AT, Haddow AD, et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):880–2.
 164. Russell K, Hills SL, Oster AM, Porse CC, Danyluk G, Cone M, et al. Male-to-female sexual transmission of zika virus-United States, January-April 2016. *Clin Infect Dis.* 2017;64(2):211–3.
 165. Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected female-to-male sexual transmission of zika virus — New York city, 2016. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016 Jul 22;65(28):716–7.
 166. Trew Deckard D, Chung WM, Brooks JT, Smith JC, Woldai S, Hennessey M, et al. Male-to-male sexual transmission of Zika virus — Texas, January 2016. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016 Apr 15;65(14):372–4.
 167. Brooks RB, Carlos MP, Myers RA, White MG, Bobo-Lenoci T, Aplan D, et al. Likely Sexual Transmission of Zika Virus from a Man with No Symptoms of Infection — Maryland, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016 Sep 2;65(34):915–6.
 168. Atkinson B, Hearn P, Afrough B, Lumley S, Carter D, Aarons EJ, et al. Detection of zika virus in semen. Vol. 22, *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2016. p. 940.
 169. Harrower J, Kiedrzyński T, Baker S, Upton A, Rahnama F, Sherwood J, et al. Sexual Transmission of Zika Virus and Persistence in Semen, New Zealand, 2016. *Emerg*

- Infect Dis. 2016 Oct;22(10).
170. Nicastrri E, Castilletti C, Liuzzi G, Iannetta M, Capobianchi MR, Ippolito G. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Eurosurveillance*. 2016;21(32).
 171. Petridou C, Bonsall D, Ahmed A, Roberts M, Bell C, de Cesare M, et al. Prolonged Zika virus RNA detection in semen of immunosuppressed patient. Vol. 25, *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2019. p. 1598–600.
 172. Mead PS, Duggal NK, Hook SA, Delorey M, Fischer M, Olzenak McGuire D, et al. Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *N Engl J Med*. 2018 Apr 12;378(15):1377–85.
 173. Reyes Y, Bowman NM, Becker-Dreps S, Centeno E, Collins MH, Liou GJA, et al. Prolonged shedding of zika virus RNA in vaginal secretions, nicaragua. *Emerg Infect Dis*. 2019 Apr 1;25(4):808–10.
 174. Sánchez-Montalvá A, Pou D, Sulleiro E, Salvador F, Bocanegra C, Treviño B, et al. Zika virus dynamics in body fluids and risk of sexual transmission in a non-endemic area. *Trop Med Int Heal*. 2018;23(1):92–100.
 175. Oster AM, Russell K, Stryker JE, Friedman A, Kachur RE, Petersen EE, et al. Update: Interim Guidance for Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus — United States, 2016. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Mar 25;65(12).
 176. Brooks JT, Friedman A, Kachur RE, Laflam M, Peters PJ, Jamieson DJ. Update: Interim guidance for prevention of sexual transmission of zika virus — United States, July 2016. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(29):745–7.
 177. Petersen EE, Meaney-Delman D, Neblett-Fanfair R, Havers F, Oduyebo T, Hills SL, et al. Update: Interim Guidance for Preconception Counseling and Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus for Persons with Possible Zika Virus Exposure —

- United States, September 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016 Oct 7;65(39):1077–81.
178. Pomar L, Vouga M, Lambert V, Pomar C, Hcini N, Jolivet A, et al. Maternal-fetal transmission and adverse perinatal outcomes in pregnant women infected with Zika virus: Prospective cohort study in French Guiana. *BMJ.* 2018 Oct 31;363:4431.
179. Campos Coelho AV, Crovella S. Microcephaly prevalence in infants born to zika virus-infected women: A systematic review and meta-analysis. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences.* 2017. p. 1–10.
180. Hoen B, Schaub B, Funk AL, Ardillon V, Boullard M, Cabié A, et al. Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. *N Engl J Med.* 2018 Mar 15;378(11):985–94.
181. OMS. Enfermedad por el virus de Zika [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2016 [cited 2020 Nov 3]. p. 1–5. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
182. Generalitat de Catalunya. Departament de Salut. Protocol d'actuació davant de casos de febre vírica de Zika en l'àmbit obstètric i pediàtric de Catalunya Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública. 2019.
183. Kerkhof K, Falconi-Agapito F, Van Esbroeck M, Talledo M, Ariën KK. Reliable Serological Diagnostic Tests for Arboviruses: Feasible or Utopia? Vol. 28, *Trends in Microbiology.* Elsevier Ltd; 2020. p. 276–92.
184. Charrel RN, Leparç-Goffart I, Pas S, De Lamballerie X, Koopmans M, Reusken C. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. *Bull World Heal Organ.* 2016;
185. De Ory F, Sánchez-Seco MP, Vázquez A, Montero MD, Sulleiro E, Martínez MJ, et al. Comparative evaluation of indirect immunofluorescence and NS-1-based ELISA to determine zika virus-specific IgM. *Viruses.* 2018;10(7):1–9.
186. L'Huillier AG, Hamid-Allie A, Kristjanson E, Papageorgiou L, Hung S, Wong CF, et al.

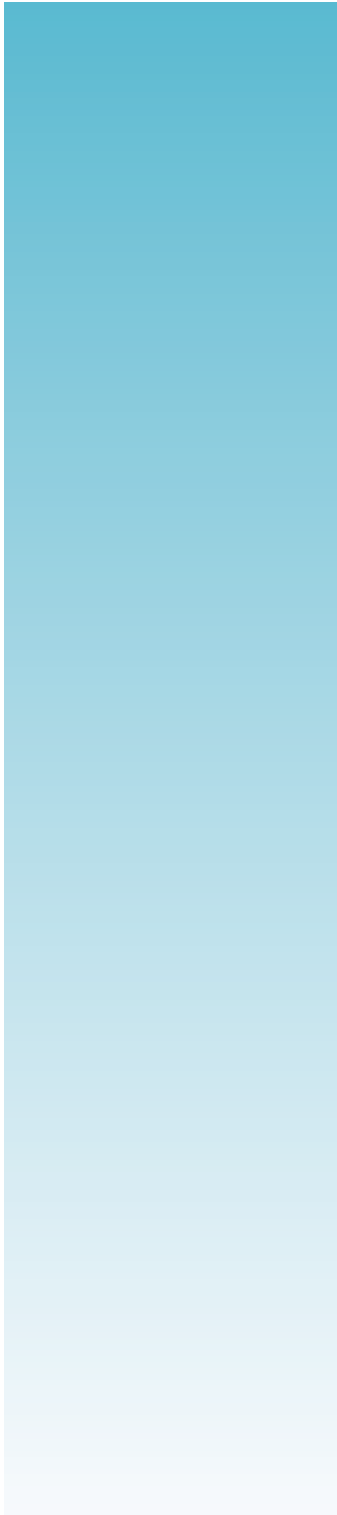
- Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus. *J Clin Microbiol.* 2017;55(8):2462–71.
187. Matheus S, Talla C, Labeau B, De Laval F, Briolant S, Berthelot L, et al. Performance of 2 commercial serologic tests for diagnosing zika virus infection. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(6):1153–60.
188. Premkumar L, Collins M, Graham S, Alice Liou G-J, Lopez CA, Jadi R, et al. Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection. *J Clin Microbiol.* 2018;56:1504–21.
189. Denis J, Attoumani S, Gravier P, Tenebray B, Garnier A, Briolant S, et al. High specificity and sensitivity of Zika EDIIIbased ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(9).
190. van Meer MPA, Mögling R, Klaasse J, Chandler FD, Pas SD, van der Eijk AA, et al. Re-evaluation of routine dengue virus serology in travelers in the era of Zika virus emergence. *J Clin Virol.* 2017 Jul 1;92:25–31.
191. Leder K, Torresi J, Libman MD, Cramer JP, Castelli F, Schlagenhauf P, et al. GeoSentinel surveillance of illness in returned travelers, 2007-2011. *Ann Intern Med.* 2013;158(6):456–68.
192. Bottieau E, Clerinx J, Van Den Enden E, Van Esbroeck M, Colebunders R, Van Gompel A, et al. Fever after a stay in the tropics: Diagnostic predictors of the leading tropical conditions. *Medicine (Baltimore).* 2007 Jan;86(1):18–25.
193. Potts JA, Rothman AL. Clinical and laboratory features that distinguish dengue from other febrile illnesses in endemic populations. Vol. 13, *Tropical Medicine and International Health. Trop Med Int Health;* 2008. p. 1328–40.
194. Daumas RP, Passos SRL, Oliveira RVC, Nogueira RMR, Georg I, Marzochi KBF, et al. Clinical and laboratory features that discriminate dengue from other febrile illnesses: A diagnostic accuracy study in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis.*

- 2013;13(1).
195. Kutsuna S, Hayakawa K, Kato Y, Fujiya Y, Mawatari M, Takeshita N, et al. Comparison of clinical characteristics and laboratory findings of malaria, dengue, and enteric fever in returning travelers: 8-year experience at a referral center in Tokyo, Japan. *J Infect Chemother*. 2015 Apr 1;21(4):272–6.
 196. Lee VJ, Chow A, Zheng X, Carrasco LR, Cook AR, Lye DC, et al. Simple Clinical and Laboratory Predictors of Chikungunya versus Dengue Infections in Adults. Powers AM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Sep 27;6(9):e1786.
 197. Moi ML, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Kotaki A, Ikeda M, et al. Detection of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) by using ELISA as a useful laboratory diagnostic method for dengue virus infection of international travelers. *J Travel Med*. 2013 May;20(3):185–93.
 198. Fuchs I, Bin H, Schlezinger S, Schwartz E. NS1 antigen testing for the diagnosis of dengue in returned Israeli travelers. *J Med Virol*. 2014 Dec 1;86(12):2005–10.
 199. Antunes P, Watterson D, Parmvi M, Burger R, Boisen A, Young P, et al. Quantification of NS1 dengue biomarker in serum via optomagnetic nanocluster detection. *Sci Rep*. 2015;5(July):1–10.
 200. Hu D, Fry SR, Huang JX, Ding X, Qiu L, Pan Y, et al. Comparison of surface plasmon resonance, resonant waveguide grating biosensing and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the evaluation of a dengue virus immunoassay. *Biosensors*. 2013;3(3):297–311.
 201. Linares EM, Pannuti CS, Kubota LT, Thalhammer S. Immunospot assay based on fluorescent nanoparticles for Dengue fever detection. *Biosens Bioelectron*. 2013 Mar 15;41(1):180–5.
 202. Silva MMS, Dias ACMS, Silva BVM, Gomes-Filho SLR, Kubota LT, Goulart MOF, et al. Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode. *J Chem Technol*

- Biotechnol. 2015 Jan 1;90(1):194–200.
203. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of Commercially Available Diagnostic Tests for the Detection of Dengue Virus NS1 Antigen and Anti-Dengue Virus IgM Antibody. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(10).
 204. Pal S, Dauner AL, Mitra I, Forshey BM, Garcia P, Morrison AC, et al. Evaluation of dengue ns1 antigen rapid tests and elisa kits using clinical samples. *PLoS One.* 2014;9(11).
 205. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Thi V, Hang T, Sekaran SD, et al. Multi-Country Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Two Commercially-Available NS1 ELISA Assays for Dengue Diagnosis. 2010;4(8):2–11.
 206. Felix AC, Centrone CDC, Villas-boas L, Maria C, Martelli T. Low Sensitivity of NS1 Protein Tests Evidenced during a Dengue Type 2 Virus Outbreak in Santos , Brazil , in 2010. 2012;19(12):1972–6.
 207. Huits R, Soentjens P, Maniewski-Kelner U, Theunissen C, Van Den Broucke S, Florence E, et al. Clinical Utility of the NS1 Antigen Rapid Diagnostic Test in the Management of Dengue in Returning Travelers with Fever. *Open Forum Infect Dis.* 2017;ofw273.



ANEXO



ANEXO 1

Imported Zika virus in a European city: How to prevent local transmission?

Zika importado en una ciudad europea: ¿cómo prevenir la transmisión local?

Autores:

Joan-Pau Millet, Tomás Montalvo, Rubén Bueno-Marí, Arancha Romero-Tamarit, Albert Prats-Uribe, Lidia Fernández, Esteve Camprubí, Lucía del Baño, Victor Peracho, Jordi Figuerola, Elena Sulleiro, Miguel J Martínez, Joan A Caylà, Zika Working Group in Barcelona

Revista, volumen, fecha de publicación:

Frontiers in Microbiology, 8, Julio 2017

Factor de impacto – Cuartil: 4,019 – Q2

Introducción y objetivos:

El 1 de Febrero de 2016 la OMS declaró la infección por virus Zika (VZIK) emergencia de salud pública mundial debido a su rápida expansión y severas complicaciones, como el síndrome de Guillain-Barré y microcefalia en los recién nacidos. El gran número de personas que viajan a zonas endémicas y la presencia de *Aedes albopictus* en Barcelona aumenta el riesgo de transmisión autóctona. El objetivo de este estudio es describir los primeros casos de VZIK diagnosticados en nuestra ciudad y analizar la vigilancia, prevención y medidas de control implementadas para evitar la transmisión autóctona.

Material y métodos:

Se realizó un estudio observacional transversal de base poblacional en Barcelona,

España. Se llevó a cabo un análisis de los datos socio-demográficos, epidemiológicos, características clínicas y actividades de control de mosquito de los casos de VZIK detectados entre Enero y Diciembre de 2016 empleando una encuesta epidemiológica específica para VZIK de la Agencia de Salud Pública de Barcelona.

Resultados:

Se recibieron un total de 118 notificaciones de posibles infecciones por VZIK y 44 correspondieron a casos confirmados en residentes en Barcelona. Entre estos, la media de edad era de 35 años y un 57% eran mujeres. Todos los casos eran importados, el 48% de pacientes nacidos en España y el 52% de pacientes nacidos en el extranjero. República Dominicana fue el país más visitado entre estos últimos, y Nicaragua el más visitado entre los nacidos en España. Los síntomas más frecuentes eran exantema, fiebre y artralgia. Entre las 24 mujeres diagnosticadas, 6 (25%) estaban embarazadas. Hubo un caso de microcefalia fuera de la ciudad de Barcelona. Las inspecciones entomológicas se llevaron a cabo en los hogares de 19 personas (43,2% del total) y en 34 (77,3%) espacios públicos. Se encontró actividad vectorial en uno de los 44 casos y se llevaron a cabo 134 vigilancias y controles de vectores asociados a casos de VZIK importados. En todos los casos se recomendaron medidas preventivas para evitar las picaduras de los mosquitos a los pacientes infectados.

Discusión:

La vigilancia epidemiológica y entomológica son esenciales para la prevención de transmisión autóctona de arbovirosis que pueden tener un gran impacto en la Salud Pública. La buena coordinación entre epidemiólogos, entomólogos, microbiólogos y clínicos es una prioridad en una ciudad turística con una intensa relación con países endémicos para minimizar el riesgo de transmisión local por vectores competentes.



Imported Zika Virus in a European City: How to Prevent Local Transmission?

Joan-Pau Millet^{1,2*}, Tomàs Montalvo^{2,3}, Ruben Bueno-Mari⁴, Arancha Romero-Tamarit¹, Albert Prats-Urbe^{1,5}, Lidia Fernández³, Esteve Camprubí¹, Lucía del Baño¹, Victor Peracho³, Jordi Figuerola^{2,6}, Elena Sulleiro⁷, Miguel J. Martínez^{8,9}, Joan A. Caylà^{1,2} and Zika Working Group in Barcelona

¹ Servicio de Epidemiología, Agència de Salut Pública de Barcelona, Barcelona, Spain, ² CIBER de Epidemiología y Salud Pública, Barcelona, Spain, ³ Servicio de Vigilancia y Control de Plagas Urbanas, Agencia de Salud Pública de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁴ Laboratorios Lokímica, Departamento de Investigación y Desarrollo (I+D), Valencia, Spain, ⁵ Unitat Docent de Medicina Preventiva i Salut Pública Parc Salut Mar-Universitat Pompeu Fabra-Agència de Salut Pública de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁶ Estación Biológica de Doñana, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla, Spain, ⁷ Microbiology Department, Hospital Vall d' Hebron, PROSICS Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁸ Department of Microbiology, Hospital Clinic of Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁹ ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clinic of Barcelona, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Oscar Daniel Salomón,
National Institute of Tropical Medicine,
Argentina

Reviewed by:

Lorenzo Zammarchi,
University of Florence, Italy
Amer Hayat Khan,
Universiti Sains Malaysia, Malaysia

*Correspondence:

Joan-Pau Millet
jmillet@aspb.cat;
juampablomillet@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 13 January 2017

Accepted: 29 June 2017

Published: 18 July 2017

Citation:

Millet J-P, Montalvo T, Bueno-Mari R, Romero-Tamarit A, Prats-Urbe A, Fernández L, Camprubí E, del Baño L, Peracho V, Figuerola J, Sulleiro E, Martínez MJ, Caylà JA and Zika Working Group in Barcelona (2017) Imported Zika Virus in a European City: How to Prevent Local Transmission? *Front. Microbiol.* 8:1319. doi: 10.3389/fmicb.2017.01319

Background: On February 1st 2016 the WHO declared the Zika Virus (ZIKV) infection a worldwide public health emergency because of its rapid expansion and severe complications, such as Guillain-Barré Syndrome or microcephaly in newborn. The huge amount of people traveling to endemic areas and the presence of *Aedes albopictus* in Barcelona increase the risk of autochthonous transmission. The objective of this study was to describe the first ZIKV cases diagnosed in our city and to analyze the surveillance, prevention, and control measures implemented to avoid autochthonous transmission.

Methods: An observational cross-sectional population-based study in Barcelona, Spain was performed. An analysis of the socio-demographic, epidemiological, clinical characteristics, and mosquito control activities of the ZIKV cases detected between January 1st and December 2016 was carried out using a specific ZIKV epidemiological survey of the Barcelona Public Health Agency.

Results: A total of 118 notifications of possible ZIKV infections were received, and 44 corresponded to confirmed cases in Barcelona residents. Amongst these, the median age was 35 years and 57% were women. All cases were imported, 48% were Spanish-born and 52% foreign-born. Dominican Republic was the most visited country amongst foreign-born patients and Nicaragua amongst Spanish-born. The most frequent symptoms were exanthema, fever, and arthralgia. Among the 24 diagnosed women, 6 (25%) were pregnant. There was one case of microcephaly outside Barcelona city. Entomological inspections were done at the homes of 19 cases (43.2% of the total) and in 34 (77.3%) public spaces. Vector activity was found in one case of the 44 confirmed cases, and 134 surveillance and vector control were carried out associated to imported ZIKV cases. In all cases prevention measures were recommended to avoid mosquito bites on infected cases.

Conclusion: Epidemiological and entomological surveillance are essential for the prevention of autochthonous transmission of arbovirolosis that may have a great impact on Public Health. The good coordination between epidemiologists, entomologists, microbiologists, and clinicians is a priority in a touristic city with an intense relationship with endemic countries to minimize the risk of local transmission by competent vectors.

Keywords: arbovirus, epidemiology, global health, Guillain-Barré syndrome, microcephaly, public health, mosquito, Zika virus

INTRODUCTION

Arboviruses are a group of viruses transmitted through arthropods and many of them are capable of producing infection in humans. West Nile virus (WNV), Chikungunya (CHIKV), dengue (DENV), or Zika virus (ZIKV) are emerging arboviruses with a high potential of generating epidemic outbreaks (White et al., 2016). ZIKV was discovered in 1947 in Uganda by scientists that were performing a surveillance of the yellow fever virus in a forest called Zika (Hayes, 2009; Bulletin of the World Health Organization, 2016). This virus is transmitted by mosquitoes and *Aedes aegypti* is the main known vector (Ayres, 2016; Chouin-Carneiro et al., 2016). Recent infectivity studies in laboratory conditions revealed that *Aedes albopictus* is also susceptible to ZIKV virus infection, since the virus is replicated, disseminated and can reach to salivary glands. However, the efficiency of this infective process is lower in comparison with *A. aegypti*, which clearly shows the highest ZIKV vector competence among mosquitoes (Chouin-Carneiro et al., 2016; Di Luca et al., 2016; Jupille et al., 2016). Moreover, it is important to note that *A. albopictus* has been found infected also in wild populations in endemic areas as Gabon, in Central Africa (Grard et al., 2014).

The first cases of infection by ZIKV in humans were diagnosed in Uganda and Nigeria in 1952 (Macnamara, 1954). Throughout the second half of 20th century, the ZIKV had expanded to countries in Africa and Asia; India, Egypt, Malaysia, Mozambique, Nigeria, the Philippines, and Vietnam. Until 2007, only 16 cases in humans had been reported. It is at this time, when the ZIKV expands to the Yap Island, in the Pacific (Federal State of Micronesia), where the first great outbreak was reported (Duffy et al., 2009). Other large outbreaks were reported in the French Polynesia (2013–2014) and in Brazil in 2015, where the first ZIKV autochthonous case in Latin America was reported. This outbreak has been the origin of the Public Health crisis initiated in 2016. By the starts of February 2016, local transmission of ZIKV had been reported from more than 20 countries and territories in the Americas (Bulletin of the World Health Organization, 2016).

On February 1st 2016 the World Health Organization (WHO) declared the ZIKV epidemic a worldwide health emergency. This took place after the appearance of three epidemiological alerts

related to outbreaks of congenital microcephaly and Guillain-Barré Syndrome (GBS) cases due to ZIKV in countries such as Brazil, France, USA, and El Salvador (U. S. Department of Health and Human Services, et al., 2016). Although a decline in ZIKV infections has been reported in some countries, or in some regions of countries, surveillance needs to remain high (WHO, 2016a).

Within Europe, Spain is one of the countries with high risk of autochthonous cases of ZIKV infection (WHO, 2016b), due to the presence of *A. albopictus* (Grard et al., 2014; Bueno, 2016) (commonly named “tiger mosquito”) in various regions and due to the great cultural, commercial, touristic, and migratory relationship with Latin America (Díaz-Menéndez et al., 2016). Consequently in April 2016 a National Plan of preparedness and response against DENV, CHIKV, and ZIKV was established. Its objective was to reduce the impact and the risk of establishment of these emerging diseases in Spain (MSSSI, 2016).

In Spain, the first imported case of ZIKV was detected in December 2015–January 2016 (Bachiller-Luque et al., 2016). In Barcelona, both imported ZIKV cases and *A. albopictus* (a competent vector for ZIKV) overlap in space and time. With the objective of controlling the imported ZIKV cases and prevent autochthonous cases, the public health services of the city were reorganized. This rearrangement was included within a more global Surveillance and Control of Arbovirolosis Program that was already in place since 2014 that includes other emerging viruses transmitted by *A. albopictus* such as DENV, WNV, and CHIKV (Agència de Salut Pública de Catalunya, 2015; González et al., 2017).

The objectives of this paper were to describe the epidemiological and entomological surveillance for ZIKV cases in Barcelona (Spain) and to describe the improvements in the procedures to control ZIKV and other emerging arbovirolosis to reduce the risk of an autochthonous outbreak.

METHODS

Design

A descriptive observational cross sectional population-based study was performed in the city of Barcelona.

Study Period and Population

The notified and confirmed ZIKV cases among residents in Barcelona city from January 1st to December 31st 2016 were studied. All cases were detected and followed by the Epidemiology Service of the Public Health Agency of Barcelona

Abbreviations: CHIKV, Chikungunya; DENV, Dengue; GBS, Guillain-Barré Syndrome; PHAB, Public Health Agency of Barcelona; STD, Sexual Transmitted Disease; SUPCS, Surveillance and Urban Plague Control Service; WHO, World Health Organization; ZIKV, Zika Virus.

(PHAB) through the notifiable disease register. Entomological surveillance period starts on March and finishes on November because the low temperatures prevent vector activity. The cases that did not reside in Barcelona and those that were not confirmed by the laboratory were excluded from the analyses.

ZIKV, CHIKV, and DENV are diseases of mandatory notification in Spain. In Barcelona an active epidemiological surveillance system is carried out based on a close communication among doctors, laboratories and the public health nurses from the Epidemiology Service. The circuit and procedures followed from the notification of a possible case until entomological inspections are listed in **Figure 1**.

Definitions and Case Classification

The case definition used at the PHAB is described in the “National Plan for preparation and response against vector transmitted diseases” and in the “Protocol for surveillance and Control of mosquito transmitted arbovirolosis in Catalonia” updated on 14 June 2016. The cases were classified according to clinical, epidemiological and laboratory criteria in four categories

(Díaz-Menéndez et al., 2016; González et al., 2017).

1. *Probable case*: person that complies with the clinical criteria with or without epidemiological criteria and that complies with the laboratory criteria of probable case.
2. *Confirmed case*: person that complies with the clinical criteria with or without epidemiological criteria and that complies with the laboratory criteria of confirmed case.
3. *Imported case*: when the beginning of the symptoms occur until 15 days after abandoning a ZIKV epidemic area.
4. *Autochthonous case*: if there is no record/history of trip to endemic area within the last 15 days previous to the beginning of symptoms (Agència de Salut Pública de Catalunya, 2015).

The days of viremic phase in Barcelona since the arrival date were calculated for each patient. The viremic period was estimated from the natural history of the infection reported in the literature. For the viremic period, we assumed 7 days starting from the day of symptoms onset. However, we also simulate how many people would be viremic in Barcelona with different theoretic values: 8 and 9 days of viremic period.

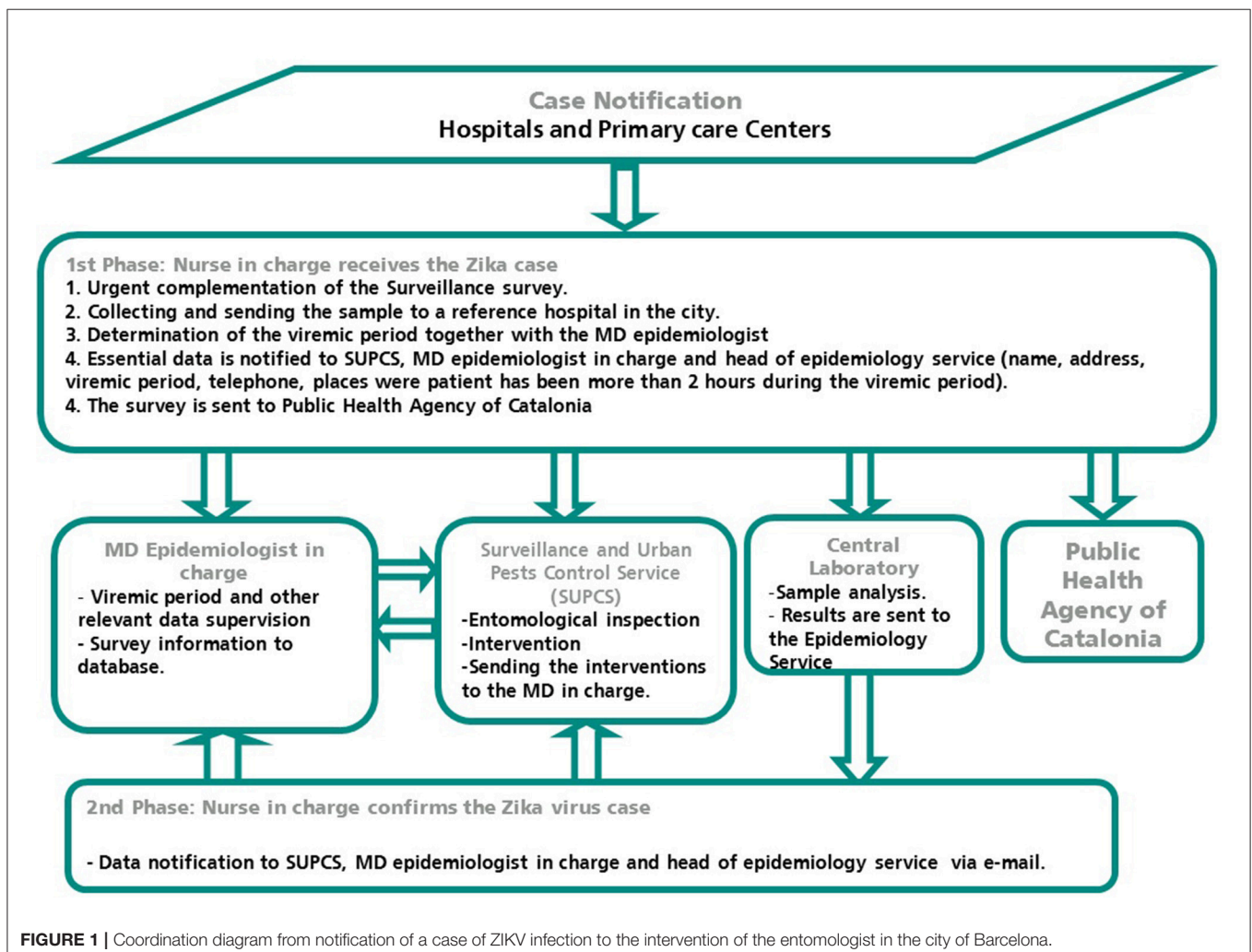


FIGURE 1 | Coordination diagram from notification of a case of ZIKV infection to the intervention of the entomologist in the city of Barcelona.

Variables and Source of Information

The different epidemiological variables were collected from the epidemiological survey of Catalunya specific to ZIKV infection. Socio-demographic variables (age, sex, country of origin, neighborhood/district of residence), clinical variables (date of beginning of symptoms, viremic period, fever, asthenia, arthralgia, arthritis, conjunctival hyperemia, cephalgia, non-purulent conjunctivitis, exanthema, myalgia, complications, hospitalization), diagnostic variables [date of diagnosis, laboratory results (IgG, IgM, PCR)], and epidemiological variables (way of transmission, pregnancy, and gestation week if affirmative, country or countries visited, dates of departure, and arrival to Barcelona, cause of trip, number of bites, place in which bites were received, mobility of the cases and if activities of prevention, confinement, or personal protection were given) were collected. The median time elapsed (in days) between the symptoms onset of patients and the first medical consultation, the notification and the laboratory confirmation, and the implementation of vector control activities were calculated.

The Surveillance and Urban Plague Control Service (SUPCS) at PHAB recorded different information during their entomological inspections related to the cases: places visited during the viremic period, vector activity at case residency, capture of adult vectors with BG traps, detection of mosquito breeding sites, and presence of virus in the vector.

Surveillance Procedures and Vector Control

In order to minimize the risk of ZIKV transmission through local mosquito bites during the viremic period, prevention measures were recommended by the Epidemiology Service. These measures included personal protection measures against mosquito bites (type of clothing, use of mosquito repellent, etc.), and house confinement during the viremic period and recommendations regarding safe sex.

Based on the collected information in the epidemiological survey, the SUPCS carried out an entomological inspection in at least two places: the public space around the case's place of residence and in the patient's own home. All the risk areas for the proliferation of mosquitoes were included in a Geographical Information System (GIS) to speed up the inspections. Gutters, fences, ornamental fountains and small artificial containers, within a buffer of 150 m in relation to the case's place of residence (habitual flying ratio of *A. albopictus* in the urban setting) were included in the GIS.

In our study, informative notes with recommendations to prevent the proliferation of larvae breeding sites in the home were distributed during the inspections of more vulnerable residential areas close to the imported case. The entomological inspections in private homes were analogous to the already described procedures for public areas. The areas were inspected for detecting larvae breeding spot sites and adult mosquitoes. It's worth mentioning that these activities are essential in the reduction of the risk of disease expansion because the contact between vectors and the infected host is likely to occur at home. The need to obtain an authorization from the patient to be able

to carry out the inspection was an important limiting factor in comparison with the interventions in public spaces.

The collected entomological material was examined and identified and females were analyzed in pools for the detection of virus presence by RT-PCR. All the necessary steps for the evaluation of transmission risk were considered in the protocol, including vector activity (inside and around the patient's place of residence), and the efficacy of the control activities. The program monitoring the cases of imported arbovirolosis is integrated within a general procedure that monitors and treats monthly the areas with recurrent proliferation of tiger mosquitoes (Bonney et al., 2008; Montalvo et al., 2016).

Statistical Analysis

A descriptive study of qualitative and quantitative variables to characterize the study population was carried out. We computed the frequency distributions of the qualitative variables, and compared proportions using the χ^2 -test, or the two-tailed Fisher test when expected values were <5 . Absolute frequencies were calculated for categorical variables. Social, demographic, epidemiologic and clinical variables were compared according to the country of origin of the infected person (Spanish born or foreign-born). The median and interquartile range (IQR) for continuous variables was calculated and Spanish born and foreign born were compared using the U-Mann Whitney-test. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Ethical Considerations

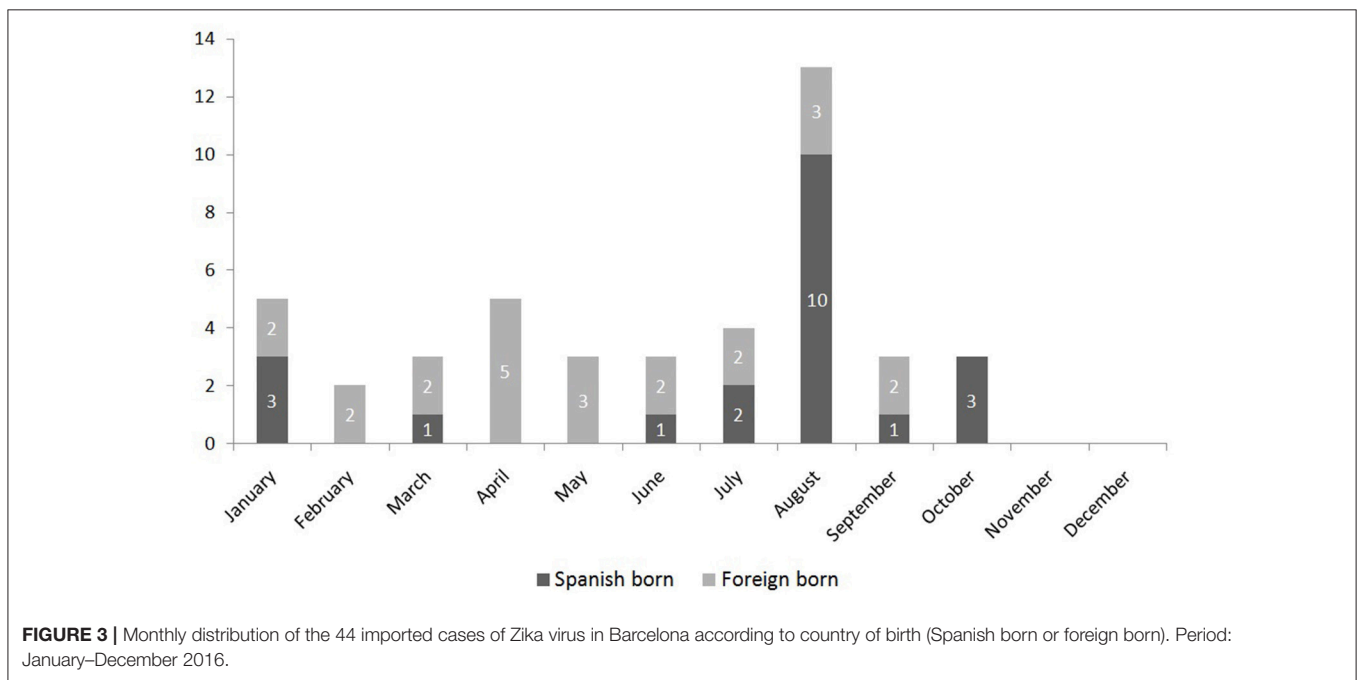
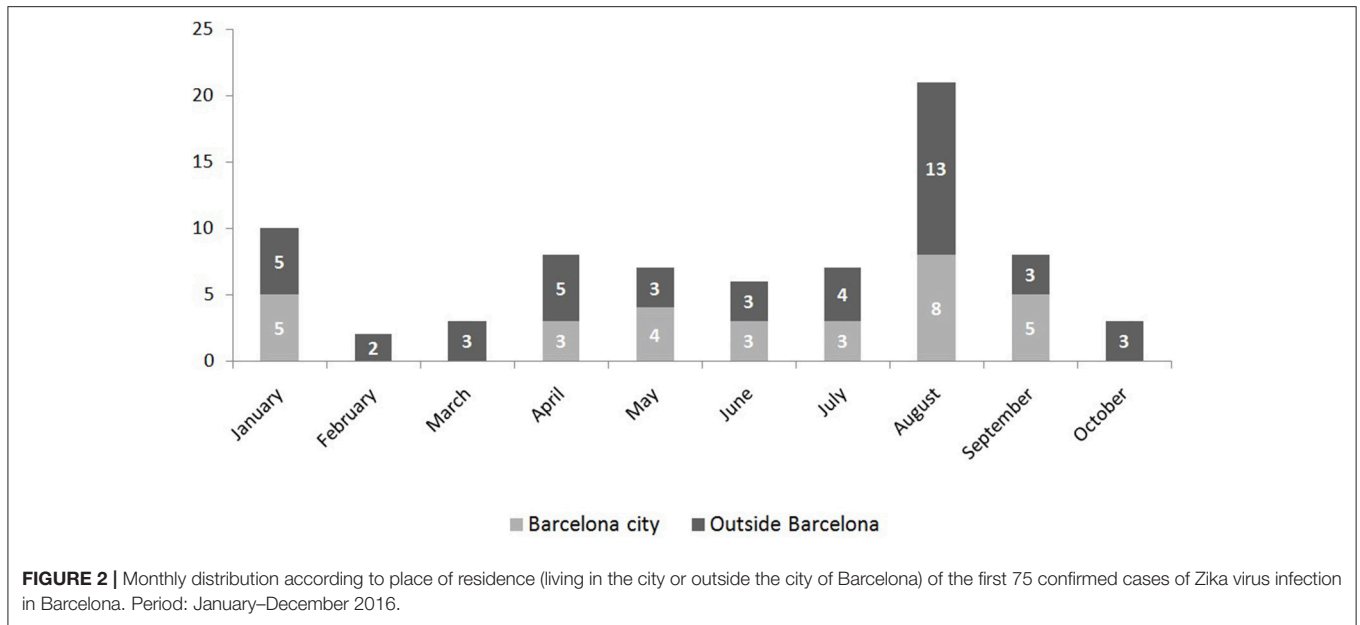
This study was approved by the Clinical Research Ethical Committee of Parc Salut Mar (IMAS). In order to guarantee data and registry confidentiality the regulation established by the Organic Law of Personal Data Protection of Spain 15/1999 and Royal Decree 994/1999 about security of computerized files that contain personal data was followed. All ethical principles for investigation in humans defined in the Declaration of Helsinki of 1964 revised and updated by the Worldwide Medical Association (Fortaleza, Brazil 2013) were followed.

RESULTS

Epidemiological Surveillance

During the study period 118 cases were notified, 75 of which (63.6%) were laboratory confirmed. **Figure 2** shows the monthly distribution according to the place of residency (those who lived in the city or outside the city but diagnosed in Barcelona) of these 75 confirmed cases. Forty-four confirmed cases correspond to residents in the city, with an incidence of 2.74 cases per 100,000 inhabitants. The median age was 35 (standard deviation 11.8), 25 (57%) were women, and 19 (43%) men. They were all imported cases, 21 (48%) among Spanish-born population and 23 (52%) among immigrant population. No differences regarding age and sex were observed ($p = 0.2$ and 0.57 , respectively). The number of cases peaked in August, when most of the infections occurred among Spanish-born individuals (**Figure 3**).

When comparing the characteristics of the 44 confirmed cases between Spanish-born and foreign-born, it stands



out that the most frequently visited countries where the Dominican Republic and Venezuela amongst the foreign-born and Nicaragua, Colombia, Mexico, and Vietnam amongst the Spanish-born. Fifty-two percent of the cases didn't report being bitten by mosquitoes after arrival to Barcelona. The most frequent clinical symptoms were rash (86%), fever (61%), and arthralgia (59%). No significant differences were found between Spanish-born and foreign-born in relation to the clinical symptoms, visited country or detected bites (**Table 1**).

A total of 31 cases (70.5%) were arrived in Barcelona during the viremic period and 13 (30%) arrived during the incubation phase and became viremic in the city (**Figure 4**). The proportion of viremic immigrants for 8–9 days in Barcelona was higher than for the Spanish born (**Table 1**) (61% vs. 29%), $p = 0.034$.

The median time, for Spanish born, elapsed between the symptoms onset and: (a) the first medical consultation date was 4 days (IQR 2–5); (b) the notification date was 8 days (IQR 7–14); (c) the laboratory confirmation date was 9 days (IQR 6–12), and

TABLE 1 | Comparison of the descriptive characteristics between Spanish born and foreign born for the 44 confirmed cases of Zika virus infection in the city of Barcelona. January–November 2016.

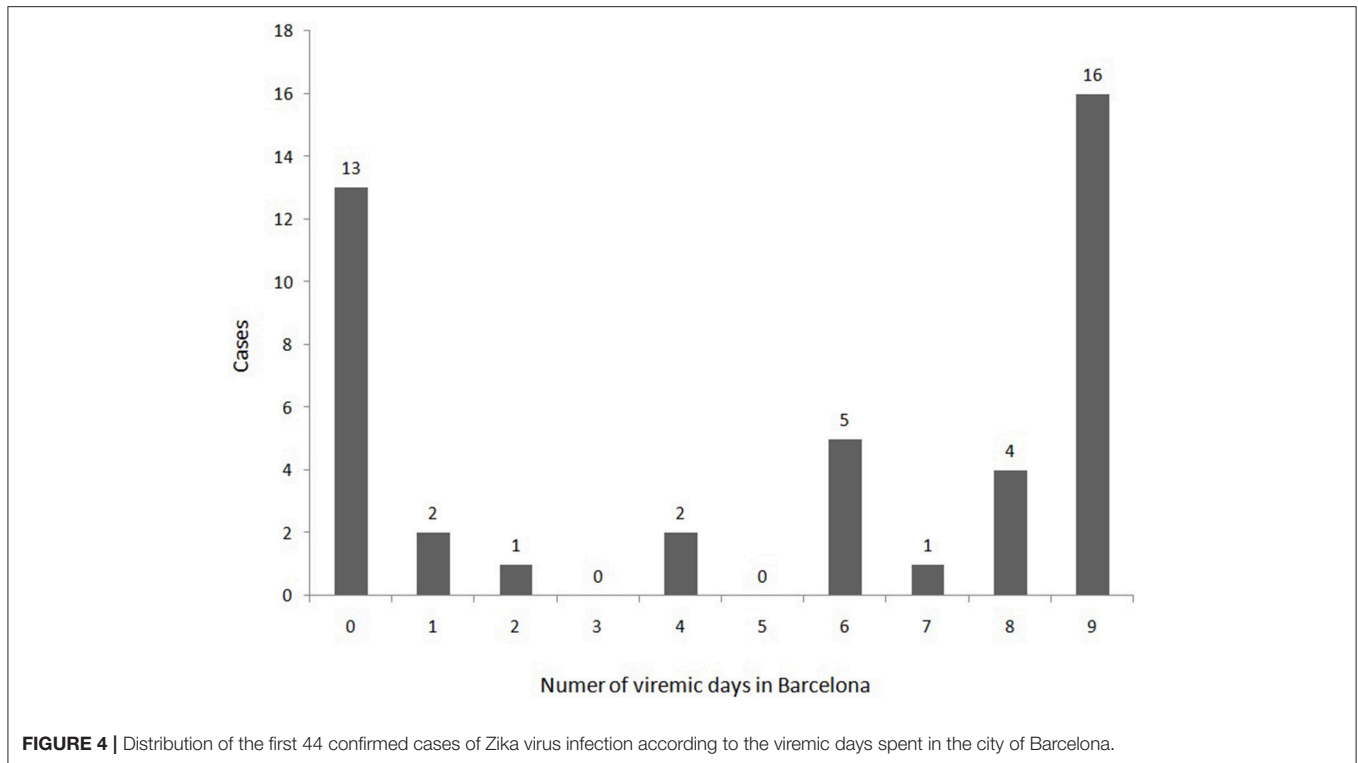
	Spanish-born N (%)		Foreign-born N (%)		Total N (%)	
	21	48%	23	52%	44	
AGE (MEDIAN, SD)	33.5	10.7	36.5	12.7	35	11.8
SEX						
Male	10	48%	9	39%	19	43%
Female	11	52%	14	61%	25	57%
HOSPITALIZATION						
Yes	0	0%	0	0%	0	0%
No	21	100%	23	100%	44	100%
CLINICAL SYMPTOMS						
Fever	14	67%	13	57%	27	61%
Arthralgia	11	52%	15	65%	26	59%
Rash	17	81%	21	91%	38	86%
Myalgia	6	29%	7	30%	13	30%
Cephalaea	9	43%	9	39%	18	41%
Any other symptom	15	71%	12	52%	27	61%
COMPLICATIONS						
	0	0%	0	0%	0	0%
VISITED COUNTRY						
Dominican Republic	2	10%	6	26%	8	18%
Nicaragua	6	29%	2	9%	8	18%
Colombia	3	14%	2	9%	5	11%
Mexico	3	14%	1	4%	4	9%
Venezuela	0	0%	4	17%	4	9%
Vietnam	3	14%	0	0%	3	7%
Honduras	1	5%	1	4%	2	5%
Bolivia	0	0%	2	9%	2	5%
Others	3	14%	5	22%	8	18%
DETECTED BITES						
Yes	10	48%	11	48%	21	48%
No	11	52%	12	52%	23	52%
PREGNANCY						
	2	10%	2	14%	4	16%
DAYS OF RISK IN BARCELONA (VIREMIC PERIOD)						
0 days	10	48%	3	13%	13	30%
1–7 days	5	24%	6	26%	11	25%
From 8 to 9 days	6	29%	14	61%	20	45%
PREVENTIVE RECOMMENDATIONS						
Yes	21	100%	23	100%	44	100%
No	0	0%	0	0%	0	0%

(d) the implementation date of vector control activities was 9 days (IQR 7–14). The median time in days for foreign born was 4 (IQR 2–11), 11 (IQR 8–27), 20 (IQR 13–25), and 13 (IQR 11–28), respectively. No statistically significant differences were observed in these elapsed times between Spanish-born and foreign-born patients except for the lab confirmation days ($p = 0.04$).

Regarding the consequences of the ZIKV infection, no mortality was observed. Regarding morbidity, no GBS was detected. Among the 24 diagnosed women, 6 (25%) were pregnant. There was one case of microcephaly notified to PHAB but the pregnant woman lived outside Barcelona city.

Vector Control

According to the Surveillance protocol of arbovirology in Catalonia, 34 entomological inspections related to ZIKV were done between 1st April and 15th November. Nine of the 34 cases had high mobility during the viremic period visiting different areas of the city, increasing their exposure to tiger mosquito bites. Only 19 (43.2%) homes could be inspected, since the persons could not be contacted or refused the inspection in the other 15 cases. The activity of *A. albopictus* was low, and was only detected in the public neighborhood of one of the cases (Figure 5).



There was a seasonal overlap between vector activity, and the arrival of imported ZIKV cases with viremia (**Figure 6**). April, August, and September, are amongst the months of higher overlap and consequently higher risk of local transmission of ZIKV.

To minimize the risk of transmission as much as possible, 122 vector control interventions took place in public spaces and 12 in places of residence of ZIKV cases. Most of the interventions were larvicide treatments in gutters and modifications of elements with risk of hosting mosquito larvae, in most cases in private property. In those cases in which tiger mosquito activity was detected or its presence was suspected, we used BG Sentinel traps for capturing mosquito females. Twelve traps were set, four in public spaces, and eight in private property. Only one pool of mosquitoes was finally analyzed for ZIKV detection and the result of the molecular analysis was negative.

DISCUSSION

The first year of epidemiological surveillance for ZIKV in the city of Barcelona has allowed us to know very well the profile of ZIKV imported cases. The wide presence of a vector that can transmit the virus (*A. albopictus*) and the population movements increases the risk of introduction of emerging arbovirus like ZIKV. This fact requires surveillance of the imported cases and tasks for vector control. This makes a good coordination between all the different actors, like epidemiologists, clinicians, entomologists, and microbiologists essential in order to avoid ZIKV from becoming a public

health problem that would also affect the tourism in the city.

The imported ZIKV cases profile was that of a traveler that after visiting endemic areas for ZIKV in Latin America, presents clinical symptoms such as fever, rash and arthralgia. No differences in sex, age, clinical symptoms, detected bites, or visited country were observed among Spanish and foreign-born patients. Regarding the visited country, the predominant group was originally from the Dominican Republic, Venezuela, and Nicaragua or Colombia. Other cities in Spain have also reported a high number of cases from Latin American countries. This is due to the mobility of people between Latin America and Spain that takes place for different reasons such as business, cooperation, tourism or visits to friends and relatives. It also responds to the high number of immigrants living in Spain especially since year 2000, and that occasionally travel to their countries of origin (López De Lera, 1995; Díaz-Menéndez et al., 2016). In many of these countries ZIKV is endemic and its expansion is favored by the wide presence and abundance of *A. aegypti*, main vector for ZIKV and other arbovirolosis.

Viremia

Over 70% of the diagnosed ZIKV cases in our city where viremic (PCR positive on serum) when they sought medical attention and over 36% (16/44) arrived in the city during incubation phase and spend all the viremic phase in our city. Usually tourists spend less time at their destinations than foreign born which also explains that Spanish-born patients more often present viremic phase after arriving. For the foreign-born, the reason for traveling is to visit friends and relatives and therefore normally they stay with their

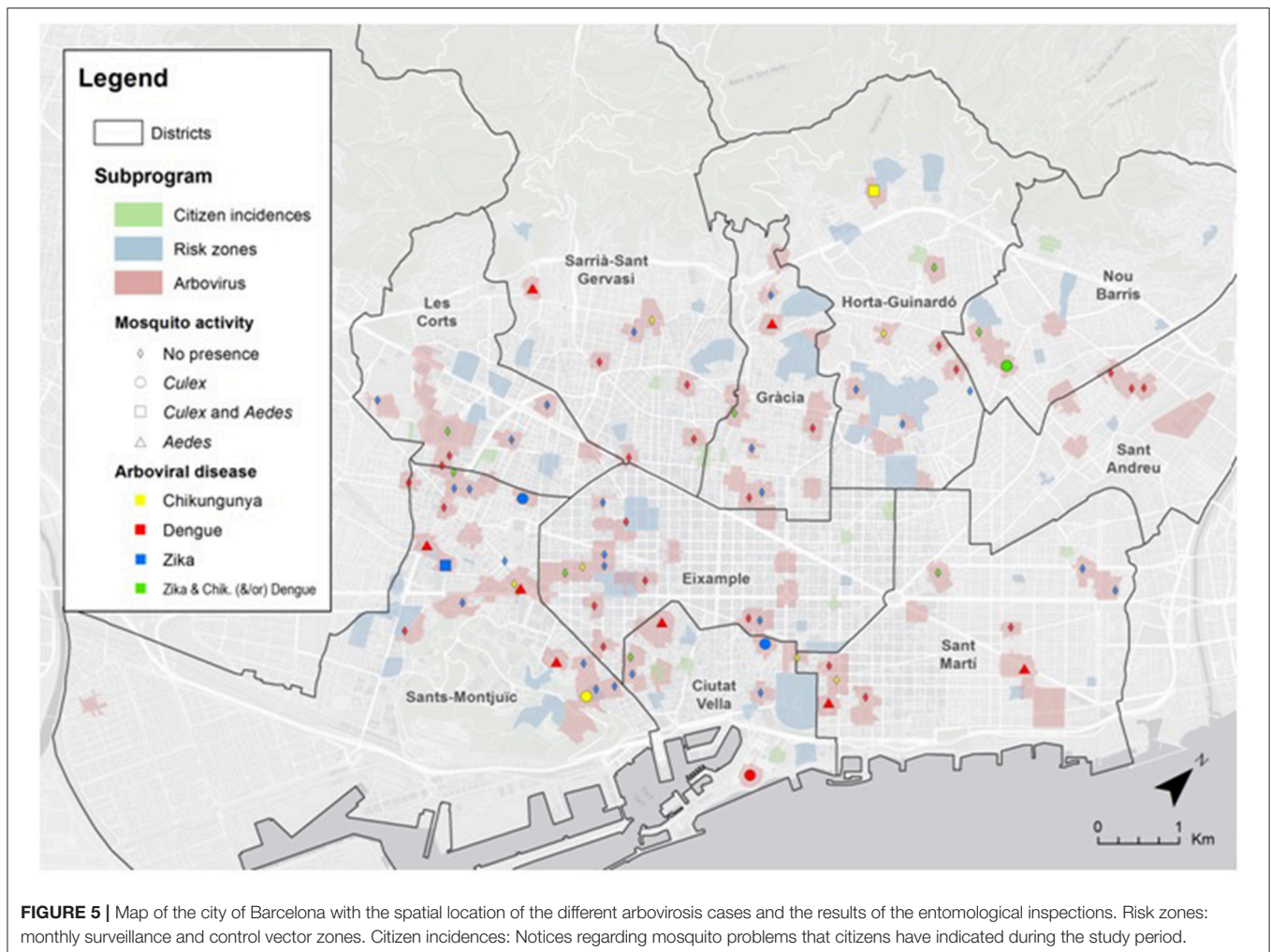


FIGURE 5 | Map of the city of Barcelona with the spatial location of the different arbovirolosis cases and the results of the entomological inspections. Risk zones: monthly surveillance and control vector zones. Citizen incidences: Notices regarding mosquito problems that citizens have indicated during the study period.

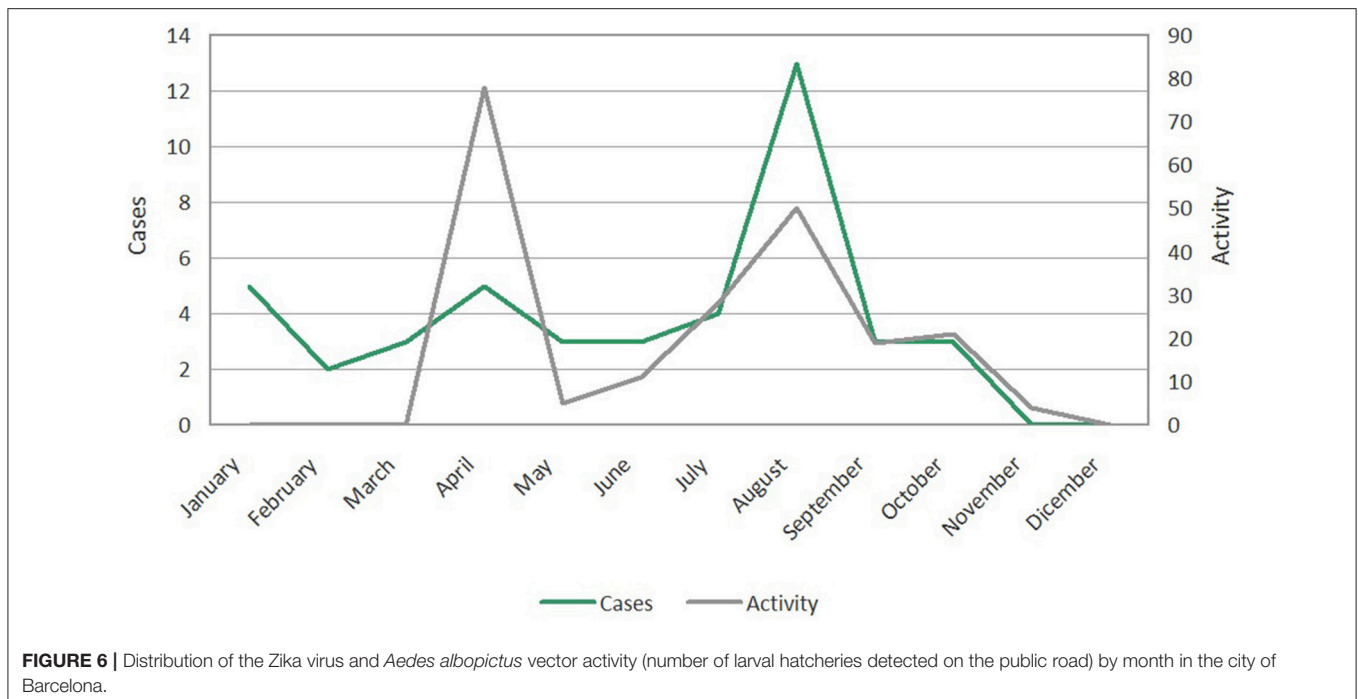
family and stay for a longer period of time. The cases that started viremic phase after arriving to Spain represented the highest risk for local transmission because of the longest duration of exposure to local vectors while still viremic. Additionally, an important percentage of patients reported mosquito bites after arrival, in many cases overlapping with the viremic period.

The incubation period can vary between 2 and 14 days after infection and the viremic period can be 3–5 days long or longer (Falcao et al., 2016). Nevertheless, the viremic period for ZIKV has not been clearly established, especially in some vulnerable populations such as pregnant women (Suy et al., 2016). The viremic period in our city is estimated from the natural history of the infection, 7 days starting from the day of symptoms onset, not performing a repeated blood test to check the presence of the virus. Recently the CDC stated that the ZIKV viremic period should be extended to 7 days, information that is of great relevance in vector control and autochthonous transmission (Agència de Salut Pública de Catalunya, 2015). According to **Figure 4** it can be deduced that if the viremic phase was considered to be only 5 days, the total days for all cases in viremic period would be 116 days. However, if the viremic

phase is considered to be 9 days, the total days of viremic period are 252 days, almost twice. Therefore, we believe that while the accurate length of the viremic phase is not yet established, the best option to maximize effects of epidemiological surveillance and entomological precautions is to consider a viremic phase of 9 days (Alejo-Cancho et al., 2016).

The duration of the viremic period has also important implications for the establishment of prevention measures. Entomologic inspections and tasks should occur as soon as a suspected case seeks medical advice, in order to reduce the risk of transmission during the viremic phase. Delays in the flow of information between medical and entomological staff may dramatically reduce the effectiveness in control, making them ineffective if the information reaches the entomological staff when the viraemic period has finished.

It is important to highlight that 9 of 34 confirmed cases, in spite of the recommendations given by public health services or the clinic, experienced great mobility during the viremic period. The fact that the clinical symptoms are frequently mild probably had an influence on this. These aspects together with the fact that most of the imported cases overlapped with periods of vector



activity increased the risk of possible transmission. It is therefore very important to recommend to patients a reduction in their mobility during this period (Marrama-Rakotoarivony and Zeller, 2012).

Zika Virus Consequences

To this date, nor deaths nor cases of SGB related to ZIKV have been reported in Barcelona. However, in a retrospective case-control study that took place after the ZIKV outbreak in French Polynesia (2013–2014), 42 cases of SGB were identified which were also positive for DENV virus and ZIKV. Recently there has been an increase in the SGB incidence in countries like Brazil, Colombia, El Salvador, and Suriname, but the exact cause is still unknown.

Unfortunately, we found one microcephaly case out of 6 babies born from ZIKV infected mothers. We had a high portion of pregnant woman due to the active screening of pregnant woman that is being performed in Catalonia. Not only the doctors but also pregnant woman that travel to a ZIKV endemic area are aware about the risks of microcephaly in newborn and look for medical advice and follow up when they are back home. This ongoing protocol in Catalonia perform not only a screening and follow up of all pregnant woman exposed to the risk of ZIKV but also a long term follow-up of all newborn in order to monitor the development of neurological abnormalities (Bocanegra et al., 2016). A prospective study in Brazil amongst pregnant women infected by ZIKV showed that 29% of the fetus suffered some type of abnormality during pregnancy, including microcephaly and intrauterine restricted development. Fetal abnormalities were detected by Doppler ultrasonography in 12 of the 42 (29%) ZIKV positive women (Brasil et al., 2016; Mysorekar and Diamond, 2016; Reynolds et al., 2017). In light

of this scenario, we need to rapidly evaluate the risk to child development by this emerging disease that is spreading quickly in many territories.

In the context of epidemiological surveillance it is important not to forget that ZIKV could be a sexual transmitted disease (STD). In the latest WHO update, 12 countries have reported STD of ZIKV, not only from man to woman, but also from woman to man, man to man (Deckard et al., 2016) and also could be transmitted by oral sex (World Health Organization, 2016). The exact duration of ZIKV in semen still remains unknown. In a recent study, ZIKV RNA was detected in semen 62 days after the initiation of the symptoms (D'Ortenzo et al., 2016), even though the longest period in which ZIKV has been detected in semen is 188 days (Althaus and Low, 2016; Paz-Bailey et al., 2017). Other routes of transmission include transmission through blood (Barjas-Castro et al., 2016).

Reorganization of the Public Health Services

After the diagnosis of the first imported cases of arbovirolosis in our city, it was necessary to face up to the risk the presence of *A. albopictus* represented to public health. For these reason, an epidemiologist and an entomologist were incorporated in the team for surveillance and control of arbovirolosis.

As a result, a protocol for the surveillance and control of mosquito-borne arboviruses was established in Catalonia in 2014. It was written by an inter-institutional commission comprised of different experts (clinicians, microbiologists, entomologists, epidemiologists, etc., Agència de Salut Pública de Catalunya, 2015). The importance of surveillance and early detection was key therefore an interdisciplinary group formed by members of the Epidemiology Service and the Vector

Control Service of the PHAB was created. Public health nurses were trained to fully know the arboviruses and to adequately complete the case reporting surveys. The structure (**Figure 1**) was also organized in coordination with the doctors of the hospitals specialized in Travel Medicine. This changes improved communication systems, and accelerated the responses to risk situations that occurred with the arrival of viremic patients. A fundamental aspect was the communication and knowledge of the protocol by all the involved agents. For this reason, PHAB organized training sessions for physicians were held in the main hospitals. The aim was to increase awareness of the importance of each agent involved in the process (Bonney et al., 2008; Bueno, 2016). The information was disseminated through the commission of arbovirology of Catalonia and through TV programs and news reports and at a round table that was organized at the 6th Emerging Diseases Congress in Barcelona (Camprubí, 2016).

In this first year of experience in ZIKV surveillance and control, the delays observed among time elapsed between the symptoms onset and first medical consultation, public health notification, laboratory confirmation, and implementation of vector control activities, were remarkable. The first problem was that the diagnostic delay in the first medical consultation and therefore the notification delay to the public health system. Therefore, the vector control activities were also initiated later, when patient was no longer viremic. So, from public health it is essential to educate patients to consult soon and also that doctors notify all suspected cases of ZIKV quickly.

Vector Control

To this date no autochthonous ZIKV case has been detected in Barcelona. However, they could have been occurred since some cases may go undetected as happened in Croatia for DENV infection (Kurot et al., 2013). There is a clear overlap of the peaks of imported cases and the vector's activity (**Figure 6**). The analysis of the phenology in the vector appearance using a weighting of the risk factors, allows us to identify the months of April, August, and September (in general the months with highest temperatures) as the most favorable for the mosquito species (**Figure 3**). In any case, the phenology of *A. albopictus* matches the predictive models and the observations that have been carried out recently in different Mediterranean cities (Tran et al., 2013; Bueno, 2016).

Local transmission of ZIKV has been observed recently in temperate zones of USA such as Texas and Florida. Among the 1,325 reported cases in 2016, 262 were due to local transmission, and 224 were in pregnant woman (16.9%). After governmental efforts on vector control activities, no new ZIKV cases have been detected by local transmission in Florida. The example of Florida together with Barcelona, underlines the importance of surveillance and vector control activities and close monitoring to prevent ZIKV circulation (Department of Health Daily Zika Update, 2017).

In light of this situation, efforts to intensify traveler's advice, preventive measures and individual protection measures must be maximized. We believe in paying special attention in providing resources to reduce mobility of the cases that are in viremic

period. This would help reduce contact with the vector and decrease possible risk of transmission. A possible solution would be to make home confinement obligatory. We are aware that adherence to this recommendation could be low. In the case of people that are working, an obligatory medical leave could be provided in order to reduce mobility. Another area in which improvement could be made is in the inspection of private properties. These are confined areas where there is a great overlap between vector and viremic patient. In our case only 19 out of 34 homes could be inspected, leaving a significant part of the risk assessment without completion.

In Barcelona, when vector activity was detected, either in larval phase or in adult phase, larvicide or adulticide control actions took place within the framework of the basic criteria of Plague Integrated Control (Bonney et al., 2008). Adulticide spraying can pose several environmental problems especially in urban environments, since they are of large spectrum interventions that can affect non-target organisms. However, although the effect of adulticide treatments is well known to be short-lived, in certain epidemiological contexts a well technified adulticide application is needed to reduce the mosquito population rapidly (Caputo et al., 2016). Consequently, it is a particularly interesting strategy in the framework of imported cases of arbovirus in a concrete place where the vectors are present in high densities. In any case, it is well known that a long temporal lapse between outbreak initiation and the start of control tasks reduces effectiveness of adulticides applications significantly in terms of cost-benefits (Burattini et al., 2008). Therefore, the best approach is to supply reactive adulticides by preventive larvicides as a basis of the control programme, since the treatment of potential breeding sites with larvicides has a proven role in the reduction of adult population at local scale in urban environments (Sochacki et al., 2016).

The activity of vectors detected in the entomological inspections of the ZIKV viremic cases in homes was low. However, additional inspections related to DENV cases detected high activity for five cases during 2016. This fact highlights the need for coordination in the protocols for surveillance and control of any arbovirology in order to reduce the risk of transmission (Lucientes-Curdi et al., 2014). Similar protocols have been implemented in other countries such as France or Italy (Zammarchi et al., 2015; Maria et al., 2016) and recently have also been approved at a national level in Spain (MSSSI, 2016). It is important that these programs for surveillance and control integrate epidemiological issues (with an appropriate identification and follow up of cases and adequate prevention measures) as well as vector issues (vector presence and quantification) (Bonney et al., 2008; Bueno, 2016).

The use of new technology can help improve the systems and knowledge of the territory (mosquito proliferation areas and detection of new competent vectors for transmission of diseases). Applications such as *Mosquito Alert* (<http://www.mosquitoalert.com>) can help improve the early detection system and are of great help in managing this public health problem (Center for Ecological Research and Forestry Applications. Oltra

et al., 2016). *Mosquito Alert* collaborated in locating unidentified breeding sites in private property near confirmed cases of ZIKV.

A. albopictus may not be the only competent vector of ZIKV in Barcelona. Different studies have suggested the possible role of *Culex* sp. as a ZIKV vector due to the occasional detection of the virus in wild populations (Huang et al., 2016). However, viral infection experiments in the laboratory have not confirmed *Culex* as a competent vector (Amraoui et al., 2016; Boccolini et al., 2016; Huang et al., 2016).

Risk of Local Transmission and Preventive Measures

Autochthonous transmission of ZIKV can potentially occur in the Mediterranean countries since imported cases and competent vectors are present. Therefore, it is essential to establish active case surveillance and prevention protocols to avoid local transmission. As previously stated, the most effective prevention measure to avoid local transmission is vector control. Additionally, it is important that healthcare professionals are informed of the potential risk of ZIKV cases, since this will improve early case detection, surveillance procedures and transmission control (Leona, 2016; Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2016). Nevertheless, since a low percent of ZIKV are symptomatic, the majority of viremic travelers returning from endemic zones could be unidentified, and therefore possible source of autochthonous outbreak. In this sense, reducing mosquito populations in the city may significantly reduce the risk of autochthonous outbreak because limiting vector control activities to the neighborhood of symptomatic cases, may have limited impact if a significant fraction of ZIKV infections are asymptomatic during the viraemic phase.

In relation to the preventive measures, at an individual level, the imperative recommendation is that all people that travel to endemic areas should take precautions against mosquito bites (use of repellents, mosquito nets, long sleeve clothes) and on arrival should visit a medical center if any symptom develops (Agència de Salut Pública de Catalunya, 2015; Leona, 2016; MSSSI, 2016). At a community level, taking into consideration that in the last few years migratory mobility and the increase of individual's mobility has produced the introduction of emerging diseases such as many arbovirose, the recommendations would be based on reducing the areas suitable for the reproduction of *Aedes* mosquitoes in around human inhabited areas. These measures would be based on the elimination or protection of small containers that can accumulate water, and the application of measures of control in those water containers that cannot be protected or eliminated. A frequent inspection of these spaces to avoid any mosquito breeding site would be necessary. Individual protection measures should be taken in order to avoid bites, such as the use of long sleeves and long pants, and the use of repellents.

Pregnant women are a priority. The early detection of the cases and effects on fetus and newborns is essential. In pregnant women, the diagnosis has to be confirmed and there

has to be a follow up of the pregnancy and the fetus. Men arriving from areas with local ZIKV transmission should have safe sex during a minimum period of 6 months. Women arrived from endemic areas should have safe sex during 8 weeks (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2016). The pregnant women who have traveled to areas with local ZIKV transmission or that have presented symptoms after the trip should communicate this information during pre-natal visits. The time that a woman has to wait to get pregnant after arriving from an affected area is 8 weeks from the time of arrival or since the time of diagnosis (CDC, 2016; WHO, 2016c).

All these preventive measures together with a good management of imported ZIKV cases and coordination among epidemiologists, clinicians, entomologists, and microbiologists are essential to prevent local transmission and therefore to limit the extension of this emerging disease. The arbovirus surveillance program in Barcelona is an example of the need of a multidisciplinary approach in order to reduce the risk of introduction of the different arbovirose, amongst them, ZIKV. The coordination between public health and pest control agencies has contributed to the reduction of the risk of autochthonous transmission.

ZIKA WORKING GROUP IN BARCELONA

Dolores Álamo-Junquera, Anna de Andrés, Ingrid Avellanés, Roser González, Pilar Gorrindo, Alexis Sentís, Pere Simón, Servicio de Epidemiología. Agencia de Salud Pública de Barcelona; Frederic Bartumeus, ICREA Movement Ecology Laboratory (CEAB-CSIC), Girona, Spain and CREA (Center for Ecological Research and Forestry Applications); Núria Busquets, IRTA, Centre de Recerca en Sanitat Animal, CReSA, IRTA-UAB, Barcelona, Spain; Izaskun Alejo, Joaquim Gascón, José Muñoz, Inés Oliveira, M^a Jesús Pinazo, Natalia Rodríguez, ISGlobal, Barcelona Ctr. Int. Health Res. (CRESIB), Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; Cristina Bocanegra, Mateu Espasa, Israel Molina, Diana Pou, Fernando Salvador, Adrián Sánchez-Montalvá, Tomàs Pumarola, Ariadna Rando, Nuria Serre, Antonio Soriano-Arandes, Begoña Treviño, Hospital Vall-d'Hebron-Drassanes, PROSICS, Barcelona, Spain; *Mosquito Alert* Community, Citizen scientists collaborating in the platform *Mosquito Alert*.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JM, TM, RB, EC, and JC conceived and designed the work, write the first draft, revised critically and approved the final version. AR, AP analyzed and participated in the interpretation of the data, revised critically and approved the final version. AR, AP, LF, LD, VP, MM, ES, and JF participated in the acquisition and interpretation of the data, revised critically and approved the final version. Zika Working Group in Barcelona participated in the acquisition and interpretation of the data, revised critically and approved the final draft. All authors agree to be accountable for all aspects of the work.

ACKNOWLEDGMENTS

Our special gratitude to the Health Department in Catalonia, the Public Health Agency of Catalonia and all the doctors, nurses and admin personnel in different hospitals and at primary care for the good job performed together to fight against emerging arbovirolosis. Special thanks to Silvia Bruguera for her great help with the translation. MJ, JG, NR, and JM receives funds from 2014 SGR 26 grant from the Department d'Universitats,

Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (AGAUR) and from RD12/0018/0010 grant, ISCIII RETIC (MICINN, Spain). PROSICS authors are supported by the 6th National Plan (PN) of Research + Development + Innovation (I + D + I) 2008–2011, ISCIII-General Division Networks and Cooperative Research Centres + FEDER funds + Collaborative Research Network on Tropical Diseases (RICET): RD12/0018/0020.

REFERENCES

- Agència de Salut Pública de Catalunya. (2015). *Protocol per a la Vigilància i el Control de les Arbovirolosis Transmeses per Mosquits a Catalunya*. General Catalunya, 1–69. Available online at: http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home_canal_salut/professionals/temes_de_salut/vigilancia_epidemiologica/documents/arxiu/protocol_arbovirolosis_cat.pdf
- Alejo-Cancho, I., Torner, N., Oliveira, I., Martínez, A., Mu-oz, J., Jane, M., et al. (2016). Twenty-four cases of imported Zika virus infections diagnosed by molecular methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 86, 160–162. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.016
- Althaus, C. L., and Low, N. (2016). How Relevant Is Sexual Transmission of Zika Virus? *PLoS Med.* 13:e1002157. doi: 10.1371/journal.pmed.1002157
- Amraoui, F., Atyame-Nten, C., Vega-Rúa, A., Lourenço-de-Oliveira, R., Vazeille, M., and Failloux, A. B. (2016). Culex mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Euro Surveill.* 21:30333. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.35.30333
- Ayres, C. F. (2016). Identification of Zika virus vectors and implications for control. *Lancet Infect. Dis.* 16, 278–279. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00073-6
- Bachiller-Luque, P., Domínguez-Gil González, M., Álvarez-Manzanares, J., Vázquez, A., De Ory, F., and Sánchez-Seco Fari-as, M. P. (2016). First case of imported Zika virus infection in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 34, 243–246. doi: 10.1016/j.eimc.2016.02.012
- Barjas-Castro, M. L., Angerami, R. N., Cunha, M. S., Suzuki, A., Nogueira, J. S., and Rocco, I. M. (2016). Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion* 56, 1684–1688. doi: 10.1111/trf.13681
- Bocanegra, C., Sulleiro, E., Soriano-Arandes, A., Pou, D., Suy, A., Llorba, E., et al. (2016). Zika virus infection in pregnantwomen in Barcelona, Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 648–650. doi: 10.1016/j.cmi.2016.03.025
- Boccolini, D., Toma, L., Di Luca, M., Severini, F., Romi, R., Remoli, M. E., et al. (2016). Experimental investigation of the susceptibility of Italian Culex pipiens mosquitoes to Zika virus infection. *Euro Surveill.* 21:pii30328. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.35.30328
- Bonnefoy, X., Kampen, H., and Sweeney, K. (2008). *Public Health Significance of UrbanPests*. Copenhagen: World Health Organization.
- Brasil, P., Pereira, J. P. Jr., Moreira, M. E., Ribeiro Nogueira, R. M., Damasceno, L., Wakimoto, M., et al. (2016). Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* 375, 2321–2334. doi: 10.1056/NEJMoa1602412
- Bueno, R. (2016). Vigilancia y control vectorial. *Enf. Emerg.* 15, 113–114.
- Bulletin of the World Health Organization. (2016). Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull. World Health Organ.* 94, 675C–686C. doi: 10.2471/BLT.16.171082
- Burattini, M. N., Chen, M., Chow, A., Coutinho, F. A., Goh, K. T., Lopez, L. F., et al. (2008). Modelling the control strategies against dengue in Singapore. *Epidemiol. Infect.* 136, 309–319. doi: 10.1017/S0950268807008667
- Camprubí, E. (2016). Zika: vigilancia en humanos. *Enf. Emerg.* 15, 111–112.
- Caputo, B., Manica, M., D'Alessandro, A., Bottà, G., Filipponi, F., Protano, C. et al. (2016). Assessment of the effectiveness of a seasonal-long insecticide-based control strategy against *Aedes albopictus* Nuisance in an Urban Area. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004463. doi: 10.1371/journal.pntd.0004463
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2016). *Guidelines for US Citizens and Residents Living in Areas with Ongoing Zika virus Transmission*. Available online at: <https://www.cdc.gov/travel/page/us-citizens-living-in-areas-with-zika>
- Center for Ecological Research and Forestry Applications. Oltra, et al. (2016). *European Handbook of Crowdsourced Geographic Information*. CREA 295–308. doi: 10.5334/bax
- Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., et al. (2016). Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3:e0004543. doi: 10.1371/journal.pntd.0004543
- D'Ortenzo, E., Metheron, S., and Yazdanpanah, Y. (2016). Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* 374, 2195–2198. doi: 10.1056/NEJMc1604449
- Deckard, D. T., Chung, W. M., Brooks, J. T., Smith, J. C., Woldai, S., Hennessey, M., et al. (2016). Male-to-male sexual transmission of Zika virus - Texas. *MMWR Morb Mortal Wkly. Rep.* 65, 372–374. doi: 10.15585/mmwr.mm6514a3
- Department of Health Daily Zika Update (2017). Available online at: <http://www.floridahealth.gov/newsroom/2017/01/012717-zika-update.html> (Accessed May 8th, 2017).
- Di Luca, M., Severini, F., Toma, L., Boccolini, D., Romi, R., Remoli, M. E., et al. (2016). Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Euro Surveill.* 21:30223. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.18.30223
- Díaz-Menéndez, M., de la Calle-Prieto, F., Montero, D., Antolín, E., Vázquez, A., Arsuaga, M., et al. (2016). Initial experience with imported Zika virus infection in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* doi: 10.1016/j.eimc.2016.08.003. [Epub ahead of print].
- Duffy, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., et al. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 11, 2536–2543. doi: 10.1056/NEJMoa0805715
- Falcao, M. B., Cimerman, S., Luz, K. G., Chebabo, A., Brigido, H. A., Lobo, I. M., et al. (2016). Management of infection by the Zika virus. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 57, 1–15. doi: 10.1186/s12941-016-0172-y
- González, R., Montalvo, T., Camprubí, E., Fernández, L., Millet, J. P., Peracho, V., et al. (2017). Experiencia en la vigilancia y control de las arbovirolosis emergentes en Barcelona. *Rev. Esp. Salud Pub.* pii: e201701027.
- Grard, G., Caron, M., Mombo, I. M., Nkoghe, D., Mboui Ondo, S., Jiolle, D., et al. (2014). Zika virus in Gabon (Central Africa)–2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2681. doi: 10.1371/journal.pntd.0002681
- Hayes, E. B. (2009). Zika virus outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1347–1350. doi: 10.3201/eid1509.090442
- Huang, Y. J. S., Ayers, V. B., Lyons, A. C., Unlu, I., Alto, B. W., Cohnstaedt, L. W., et al. (2016). Vector-borne and zoonotic diseases. *Culex Species Mosquitoes Zika Virus* 16, 673–676. doi: 10.1089/vbz.2016.2058
- Jupille, H., Seixas, G., Mousson, L., Sousa, C. A., and Failloux, A. B. (2016). Zika virus, a new threat for europe? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004901. doi: 10.1371/journal.pntd.0004901
- Kuroit, I. C., Betica-Radić, L., Daković-Rode, O., Franco, L., Zelená, H., Tenorio, A., et al. (2013). Molecular characterization of dengue virus 1 from autochthonous dengue fever cases in Croatia. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, E163–E165. doi: 10.1111/1469-0691.12104
- Leona, S. (2016). Evaluación Rápida del Riesgo de transmisión de enfermedad por el virus Zika en España. 1–16. Available online at: https://www.msssi.gob.es/en/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/DocsZika/ERR_Zika_22julio2016.pdf

- López De Lera, D. (1995). La inmigración en España a fines del siglo XX. Los que vienen a trabajar y los que vienen a descansar. *Rev Española Investig Sociológicas*. 71–72, 225–45.
- Lucientes-Curdi, J., Molina-Moreno, R., Amela-Heras, C., Simon-Soria, F., Santos-Sanz, S., Sánchez-Gómez, A., et al. (2014). Dispersion of *Aedes albopictus* in the Spanish mediterranean area. *Eur. J. Public Health*. 24, 637–640. doi: 10.1093/eurpub/cku002
- Macnamara, F. N. (1954). Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 48, 139–145.
- Maria, A., Maquart, M., Makinson, A., Flusin, O., Segondy, M., Leparcoffart, I., et al. (2016). Zika virus infections in three travellers returning from South America and the Caribbean respectively, to Montpellier, France, December 2015 to January 2016. *Euro Surveill*. 21:30131. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.6.30131
- Marrama-Rakotoarivony, L., and Zeller, H. (2012). *Guidelines for the Surveillance of Invasive Mosquitoes in Europe*. Technical Report, ECDC.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (MSSSI). (2016). *Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Plan Nacional de Preparación y Respuesta Frente a Enfermedades Transmitidas Por Vectores. Parte I: Dengue, Chikungunya y Zika*. 77. Available online at: https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/DocsZika/Plan_Nac_enf_vectores_20160720.pdf
- Montalvo, T., Fernández, L., Franco, S., and Peracho, V. (2016). El programa de vigilancia y control de mosquitos en Barcelona. *Viure Salut*. 105, 15–6.
- Mysorekar, I. U., and Diamond, M. S. (2016). Modeling Zika virus infection in pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 4, 481–484. doi: 10.1056/NEJMcibr1605445
- Paz-Bailey, G., Rosenberg, E. S., Doyle, K., Munoz-Jordan, J., Santiago, G. A., Klein, L., et al. (2017). Persistence of Zika Virus in body fluids - preliminary report. *N. Engl. J. Med.* doi: 10.1056/NEJMoa1613108. [Epub ahead of print].
- Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2016). *Protocolo de Vigilancia en Salud Pública Enfermedad por Virus Zika*. Bogotá: Instituto Nacional de Salud.
- Reynolds, M. R., Jones, A. M., Petersen, E. E., Lee, E. H., Rice, M. E., Bingham, A., et al. (2017). Vital signs: update on Zika Virus-Associated Birth Defects and Evaluation of All, U.S. Infants with Congenital Zika Virus Exposure- U.S. Zika Pregnancy Registry, 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 66, 366–373. doi: 10.15585/mmwr.mm6613e1
- Sochacki, T., Jourdain, F., Perrin, Y., Noel, H., Paty, M. C., de Valk, H., et al. (2016). Imported chikungunya cases in an area newly colonised by *Aedes albopictus*: mathematical assessment of the best public health strategy. *Euro Surveill*. 5:21. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.18.30221
- Suy, A., Sulleiro, E., Rodó, C., Vázquez, É., Bocanegra, C., Molina, I., et al. (2016). Prolonged Zika Virus Viremia during pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 29, 2611–2613. doi: 10.1056/NEJMc1607580.
- Tran, A., L'Ambert, G., Lacour, G., Benoit, R., Demarchi, M., Cros, M., et al. (2013). A rainfall- and temperature-driven abundance model for *Aedes albopictus* populations. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 10, 1698–1719. doi: 10.3390/ijerph10051698
- U. S. Department of Health and Human Services., Schuler-Faccini, L., Paz, S., Semenza, J. C., Tetro, J. A., Cadu, R., et al. (2016). *WHO Statement On The First Meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and Observed Increase in Neurological Disorders and Neonatal Malformations*. 44, 302–317. Available online at: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/es/>
- White, M. K., Wollebo, H. S., Beckham, J. D., Tyler, K. L., and Khalili, K. (2016). Zika virus: an emergent neuropathological agent. *Ann. Neurol.* 80, 479–489. doi: 10.1002/ana.24748
- WHO (2016a). *Zika Situation Report. Zika Virus, Microcephaly and Guillain-Barré Síndrome*. Available online at: <http://reliefweb.int/report/world/zika-virus-microcephaly-and-guillain-barr-syndrome-situation-report-15-december-2016>
- WHO (2016b). *Zika Virus Technical Report. Interim Risk Assessment European Region*. Available online at: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/309981/Zika-Virus-Technical-report.pdf?ua=1
- WHO (2016c). *Interim Guideline. Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus*. WHO. Available online at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204421/1/WHO_ZIKV_MOC_16.1_eng.pdf?ua=1
- World Health Organization (2016). *Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus-Interim Guidance Update*. Geneva: World Health Organization.
- Zammarchi, L., Stella, G., Mantella, A., Bartolozzi, D., Tappe, D., Günther, S., et al. (2015). Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *J. Clin. Virol.* 63, 32–35. doi: 10.1016/j.jcv.2014.12.005

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Millet, Montalvo, Bueno-Marí, Romero-Tamarit, Prats-Uribe, Fernández, Camprubí, del Baño, Peracho, Figuerola, Sulleiro, Martínez, Caylà and Zika Working Group in Barcelona. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

