

Infecciones por Zika virus

Sistemas de ensayo de EUROIMMUN para el diagnóstico del Zika virus

Zika virus

El Zika virus (ZIKV) pertenece a la familia de los flavivirus que engloba un total de más de 50 especies de virus. Los representantes más conocidos son el virus del dengue, de la fiebre amarilla y del Nilo occidental. El Zika virus se aisló por primera vez en el año 1947, pero sólo llegó a ser más conocido por una serie de epidemias en los años pasados.

Desde el 2013, se ha reportado un número creciente de brotes de infecciones por Zika virus en diferentes regiones, entre ellas el sudeste Asiático, Polinesia y regiones adyacentes en el Pacífico, algunas islas del Caribe, y más de 30 países en Norte-, Centro-, y Sudamérica.

El virus se transmite a las personas por las mordeduras de mosquitos del género *Aedes*, cuales actúan como vector del virus. Mosquitos hembras infectadas transmiten el virus cuando chupan la sangre. Otra vía de transmisión es la transmisión perinatal, es decir, la transmisión de la madre infectada al feto. Se han reportado también casos de transmisión sexual y por transfusiones de sangre.

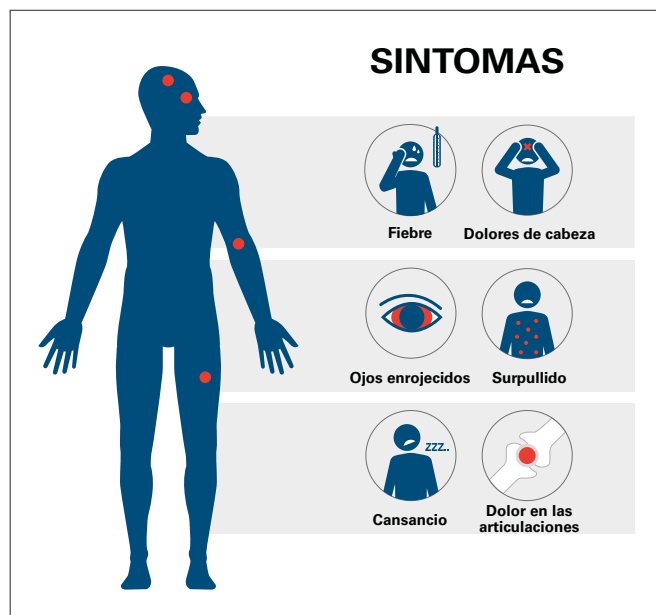


Síntomas

En la mayoría de los casos (un 80%), los pacientes infectados por el Zika virus no muestran síntomas. Sólo un 20% muestra síntomas que por lo general incluyen exantema, fiebre, dolores de cabeza y articulaciones, y conjuntivitis. Estos síntomas aparecen normalmente a los 3 a 12 días después de la picadura del mosquito y persisten por 2 a 7 días. Normalmente, el curso de la enfermedad es leve y autolimitado. Los síntomas son muy parecidos a los de una infección por el virus del dengue o chikungunya.

Durante la epidemia del Zika del 2015 y 2016, se ha observado en el Brasil y varios otros países un incremento significativo de trastornos neurológicos como el síndrome de Guillain-Barré. Además, un número inusualmente alto de bebés nació con la malformación craneal-cerebral, microcefalia. El nexo entre las infecciones por Zika virus y

la ocurrencia de trastornos neurológicos o malformaciones fetales se considera casi completamente confirmado. El tema se está investigando con gran intensidad.



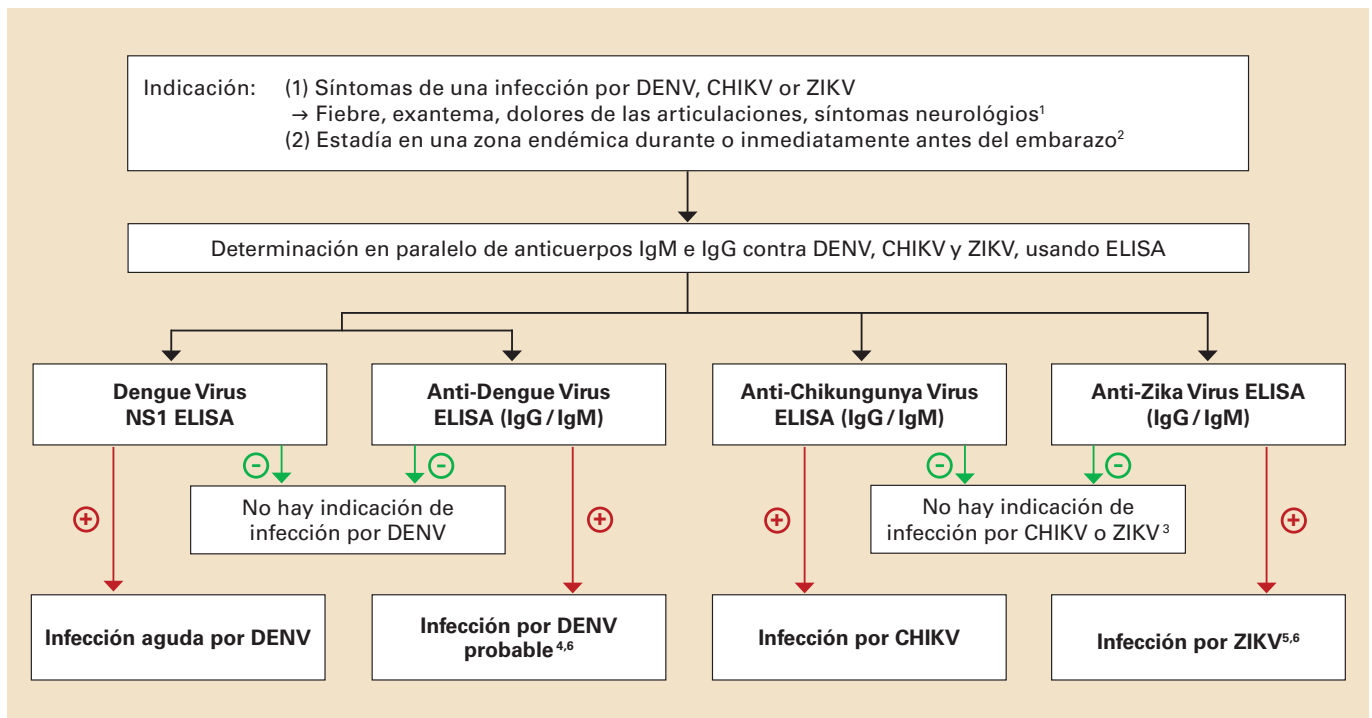
Diagnóstico

Las infecciones por Zika virus se diagnostican o por detección directa de la ARN viral o por detección indirecta, por determinación de anticuerpos. La detección directa del virus es posible por máximo una semana después de la aparición de síntomas. Los anticuerpos específicos se pueden detectar por un período más largo y pueden indicar no sólo infecciones agudas, sino también infecciones pasadas.

A partir del quinto día de una infección, los anticuerpos de la clase IgM se pueden detectar en el suero del paciente. Aproximadamente 2 a 3 días después de la aparición de anticuerpos de clase IgM, también anticuerpos de la clase IG son detectables. Sin embargo, ambas clases de anticuerpos también pueden aparecer al mismo momento. La determinación de anticuerpos se puede llevar a cabo usando pruebas serológicas como ELISA o de inmunofluorescencia indirecta (IFI). En la interpretación de resultados serológicos se tiene que tomar en cuenta la estrecha relación entre los flavivirus que conlleva el riesgo de reacciones cruzadas de los anticuerpos específicos. La reactividad cruzada es sólo mínima en pacientes sin contacto previo con otro flavivirus. Sin embargo, en el caso de infección previa o vacuna con otro flavivirus, hay que contar con una reactividad cruzada pronunciada. No obstante, ésta se puede evitar usando el antígeno altamente específico NS1.

Diagnóstico diferencial por serología usando ELISA

En casos sospechosos de infección por virus del dengue, chikungunya o Zika virus (DENV, CHIKV, ZIKV), EUROIMMUN recomienda seguir el siguiente esquema para el diagnóstico diferencial. Si la muestra de sangre se tomó dentro de 7 días después de la aparición de síntomas, se recomienda realizar también una prueba de RT-PCR en suero o orina como método de detección directa.



¹ p.ej. Pérdida de movilidad, sensación de tener las extremidades entumecidas, paresis ascendientes, paresis faciales o pérdida de los reflejos musculares como síntomas del síndrome de Guillain-Barré (GBS).

² Hombres que han estado en zonas endémicas y de los que la pareja está embarazada también debieran examinarse ya que el Zika virus se puede transmitir también por vía sexual.

³ En casos en los que se sospecha una infección por la imagen clínica y en el diagnóstico de embarazo, una muestra de seguimiento se debiera tomar después de 1 a 2 semanas: Si ésta resulta negativa, una infección aguda es bastante improbable.

⁴ No se puede excluir la reactividad cruzada con otros flavivirus. En infecciones secundarias por otros flavivirus, el título IgG del dengue puede superar incluso el título que causa la infección aguda.

⁵ Resultados falso-positivos pueden ocurrir en sueros de pacientes con infecciones agudas por plasmodium.

⁶ Constelaciones serológicas posibles y su significado en las infecciones con flavivirus (p.ej. DENV, ZIKV, virus de la encefalitis por garrapatas (TBEV), virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo occidental, entre otros):

IgM	IgG	Incremento de título en muestra de seguimiento después de 1 a 2 semanas.	Indicación de
+	-/+*	si	Infección aguda <u>sin</u> contacto previo con flavivirus (infección primaria)
-/+**	+	si	Infección aguda después de contacto previo con otro flavivirus en el pasado (infección secundaria)
-	+	no	Infección pasada o contacto con el virus en el pasado

* Los anticuerpos IgG normalmente ocurren al mismo momento como los IgM, o poco después. ** En el caso de contacto previo con otro flavivirus, la respuesta de IgM puede ocurrir de forma demorada o reducida, o no ocurrir en absoluto.

Datos de estudio sobre los ELISA

Sensibilidad y especificidad

En un estudio se investigaron 129 muestras con el Anti-Zika Virus ELISA (IgG) y el Anti-Zika Virus ELISA (IgM). 29 muestras eran de pacientes con infección por Zika virus, determinado por el WHOCC. Como grupo de referencia se usaron 100 muestras de suero de mujeres embarazadas sanas. Tomando en cuenta ambas clases de inmunoglobulina, la sensibilidad del Anti-Zika Virus ELISA ascendía al 97%, la especificidad al 100% para ambos. Observando las clases de inmunoglobulina por separado, la sensibilidad del Anti-Zika Virus ELISA (IgG) ascendía al 76%, y la del Anti-Zika Virus ELISA (IgM) al 86%. Dependiendo de la fase de la enfermedad, es posible que sólo una clase de inmunoglobulina esté presente.

En otro estudio se investigaron grupos de referencia de zonas no-endémicas. Ellos incluyeron sueros de donantes de sangre sin hallazgos (origen de muestras: Alemania, EEUU, Africa y Sudamérica), embarazadas sanas (origen de muestras: Alemania, EEUU) y niños sanos (origen de muestras: Alemania). La especificidad determinada del ELISA IgG ascendía al 99,8%, la del ELISA IgM al 99,7%.

La especificidad alta del ELISA de EUROIMMUN, y su reactividad cruzada muy reducida se confirmaron en un estudio de la clínica universitaria de Friburgo y el Instituto Bernhard-Nocht de Medicina Tropical (Huzly et al., 2016). Se investigaron muestras de suero de pacientes europeos con infecciones por flavivirus o vacunados, tanto como muestras de pacientes con enfermedades virales agudas. El estudio mostró una especificidad del 100% para el Anti-Zika Virus ELISA (IgG) y una especificidad del 98% para el Anti-Zika Virus ELISA (IgM).

Reactividad cruzada

Gracias al uso de una proteína altamente específica recombinante como antígeno, las reacciones cruzadas se pueden evitar casi por completo en los ELISA de EUROIMMUN. La investigación de grupos de sueros de pacientes caracterizados por clínica y serología, con títulos de anticuerpos de clase IgG e IgM altos contra otros flavivirus y virus chikungunya mostró una reactividad cruzada muy reducida. Las muestras de dengue provienen de pacientes en los que la infección se ha confirmado por una PCR positiva o la determinación de NS1 positiva. Las muestras de pacientes con infecciones por virus chikungunya provienen del brote de CHIKV en La Réunion. En estas muestras de pacientes con síntomas se determinaron por serología títulos altos de anticuerpos de clases IgG e IgM contra CHIKV.

n = 129		WHOCC, Hamburgo/ Laboratorio de rutina, Alemania*		
		positivo	casos límites	negativo
EUROIMMUN Anti-Zika Virus- ELISA (IgG y IgM) en conjunto	positivo	28	0	0
	casos límites	1	0	0
	negativo	0	0	100

* 29 Muestras de pacientes con infecciones por Zika virus: Centro de cooperación de la OMS para Arbovirus y Fiebres hemorrágicas (WHOCC), Hamburgo, Alemania; 100 muestras de mujeres embarazadas sanas. Laboratorio de rutina, Alemania

Número total de sueros: 1072	n	Anti-Zika-Virus ELISA positivo	
		IgG	IgM
Donantes de sangre, Alemania	500	0,2%	0,2%
Donantes de sangre, EEUU	100	1%	0%
Donantes de sangre, Florida, EEUU	57	0%	1,7%
Donantes de sangre, Argentina	99	0%	1%
Donantes de sangre, Zimbabue.	128	0%	0%
Embarazadas, Alemania	100	0%	0%
Niños ≤ 10 años, Alemania	88	0%	0%

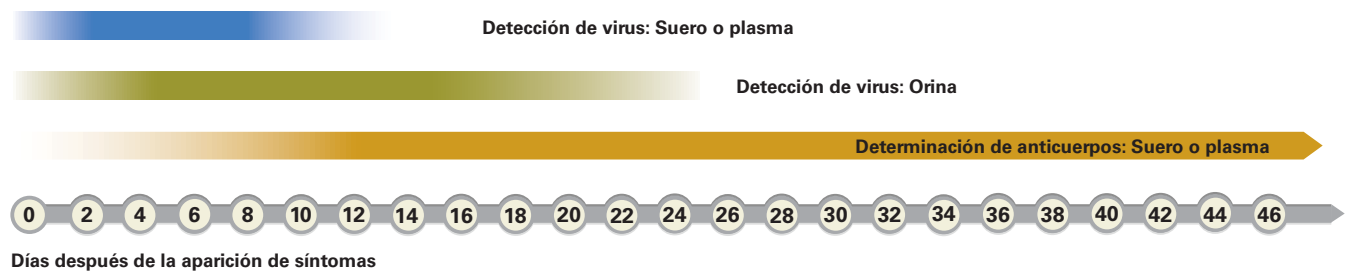
Cohorte (Huzly et al.)	Anti-Zika Virus ELISA positivo			
	n (IgG)	IgG	n (IgM)	IgM
Infección por TBEV	21	0%	38	0%
Infección por virus del dengue	10	0%	16	0%
Vacuna contra la fiebre amarilla	15	0%	15	0%
Infección por virus del la hepatitis C	16	0%	–	–
IgM policlonal	–	–	52	5,8%

Anticuerpos contra	n	Anti-Zika Virus ELISA positivo	
		IgG	IgM
Virus chikungunya	19	0%	0%
Virus del dengue	119	0%	0%
Virus de la encefalitis japonesa	25	4%	0%
Virus de la fiebre amarilla	12	0%	0%
Virus del Nilo occidental	34	0%	2,9%
Virus TBE	81	0%	0%

Nota: Infecciones dobles o infecciones previas con otro flavivirus pueden ocurrir particularmente en zonas endémicas. En estos casos, los resultados positivos no se deben a una reactividad cruzada de los respectivos anticuerpos.

Intervalos temporales para el diagnóstico fiable de infecciones por Zika virus

El método ideal para detectar una infección por Zika virus depende de la fase de la enfermedad. En una fase temprana, se puede detectar la ARN viral. El Zika virus se puede detectar en la sangre por RT-PCR hasta una semana después de la aparición de síntomas. En mujeres embarazadas infectadas, el virus se puede detectar incluso hasta varias semanas más tarde en casos aislados (Driggers et al., 2016). La detección por PCR en orina es posible por más tiempo que en suero o plasma. Aquí, resultados positivos se pueden obtener hasta 2 a 4 semanas después de la aparición de síntomas. Si la infección data de más de 7 días, se recomiendan pruebas serológicas. Los anticuerpos se pueden detectar en la sangre del paciente a partir del día 5.



Día después de la aparición de síntomas	DetECCIÓN de virus	DetECCIÓN de virus	Serología (IgG/IgM)
	RT-PCR Suero	RT-PCR Orina	ELISA o IIFT
1-7	+	+	-/+
8-27	-	+	+
a partir de 28	-	-	+

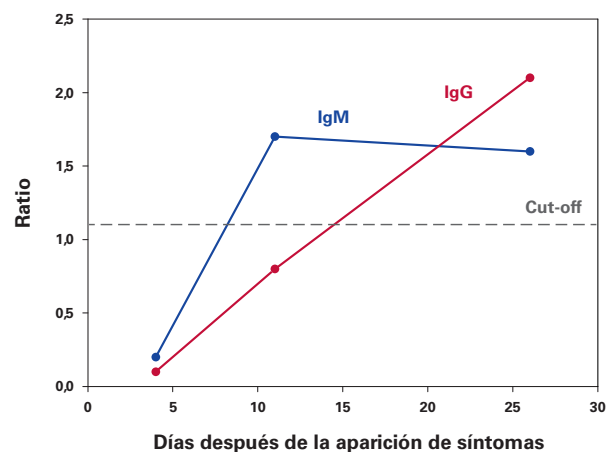
Caso ejemplar: Paciente PCR positivo

Los Anti-Zika Virus ELISA (IgG e IgM) se evaluaron en estudios externos. El grupo de sueros se compuso de 23 muestras PCR positivas (un total de 82 muestras, incluidas muestras de seguimiento). En todos los pacientes se detectó una seroconversión, lo que demuestra una sensibilidad de 100%. Abajo se presenta un caso ejemplar característico:

Paciente: Paciente volviendo de Brasil

- En la primera muestra de suero, tomada el 4. día después de la aparición de síntomas, aún no se pueden detectar anticuerpos en la sangre. En esta fase temprana el diagnóstico por PCR es imprescindible.
- En la muestra de seguimiento (día 11), anticuerpos de clase IgM están presentes. En el transcurso de la enfermedad, también los de clase IgG serán detectables.

Días después de la aparición de síntomas.	EUROIMMUN Anti-Zika Virus ELISA	
	IgM (Ratio)	IgG (Ratio)
4	0,2	0,1
11	1,7	0,8
26	1,6	2,1



Evaluación de la prueba por ratio:

Negativo: Ratio < 0,8

Casos límites: Ratio ≥ 0,8 a 1,1

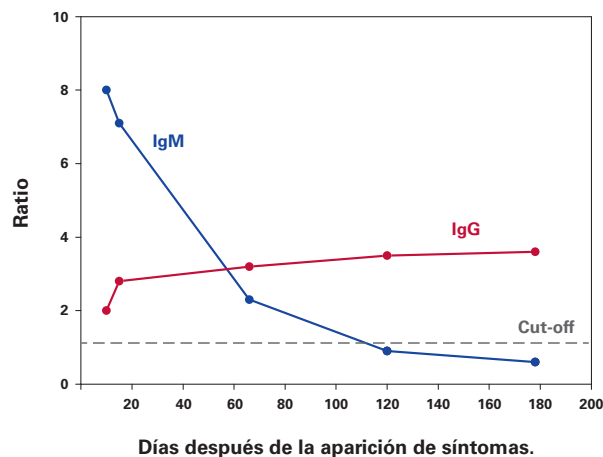
Positivo: Ratio ≥ 1,1

Caso ejemplar: Persona regresando de viaje

Paciente: Paciente regresando de Colombia

- Los niveles de IgG son positivos después de la aparición de síntomas. Incremento lento del título sobre un período prolongado de tiempo.
- Nivel de IgM positivo en el inicio, disminuyendo en el transcurso del tiempo, y negativo después de aprox. 120 días.

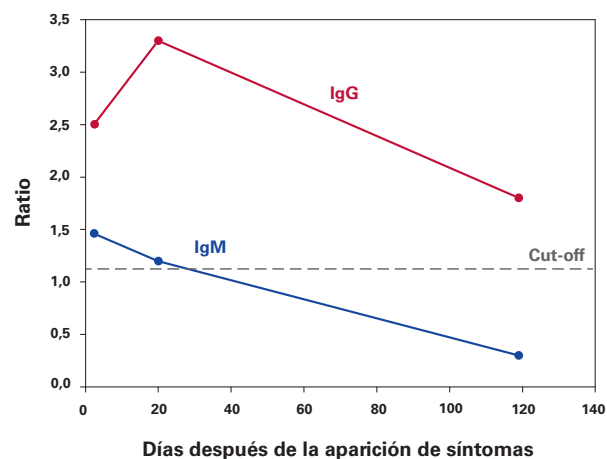
Días después de la aparición de síntomas	EUROIMMUN Anti-Zika Virus ELISA	
	IgM (Ratio)	IgG (Ratio)
10	8,0	2,0
15	7,1	2,8
66	2,3	3,2
120	0,9	3,5
178	0,6	3,6



Paciente: Paciente regresando de Brasil

- Niveles de IgG e IgM positivos después de la aparición de síntomas. Disminución lenta a través de varios meses.
- Título de IgM negativo después de aprox. 3 semanas, nivel de IgG positivo a esta altura.

Días después de la aparición de síntomas	EUROIMMUN Anti-Zika Virus ELISA	
	IgM (Ratio)	IgG (Ratio)
3	1,5	2,4
20	1,2	3,3
119	0,3	1,8

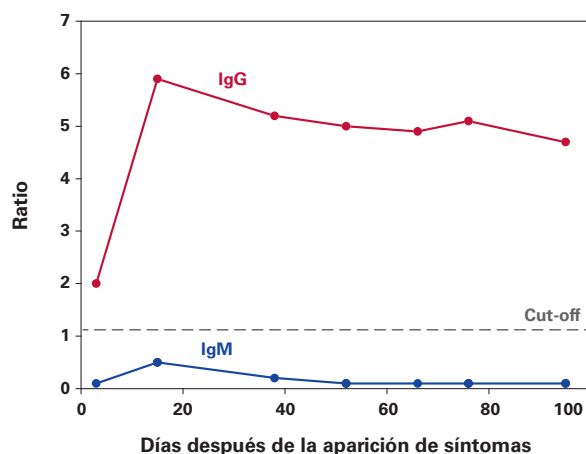


Caso ejemplar: Paciente de zona endémica

Paciente: 18 años, Colombia

- Nivel de IgM negativo a través del total del período.
- Nivel de IgG positivo ya el 3. días después de la aparición de síntomas (literatura: a partir de día 5 a 6).

Días después de la aparición de síntomas	EUROIMMUN Anti-Zika Virus ELISA	
	IgM (Ratio)	IgG (Ratio)
3	0,1	2,0
15	0,5	5,9
38	0,2	5,2
52	0,1	5,0
66	0,1	4,9
76	0,1	5,1
95	0,1	4,7



Inmunofluorescencia indirecta:

Aparte de los sistemas de ensayo ELISA, EUROIMMUN ofrece ensayos de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de infecciones por Zika virus. Hay tres productos disponibles:

- **Anti-Zika Virus IFI:** Para el cribado por anticuerpos anti-Zika virus
- **Mosaico de Fiebres arbovirales 2** Para el diagnóstico diferencial de infecciones por Zika virus, virus del dengue y chikungunya que causan síntomas parecidos.
- **Perfil de Arbovirus 3** Ideal para la investigación de reacciones cruzadas entre los flavivirus.

Células infectadas con diferentes arbovirus se usan como sustrato. En el caso de una reacción positiva fluorescen estructuras finamente hasta gruesamente granulares, sobre todo en el area del citoplasma. Particularmente en las células infectadas por Zika virus, ocurre un patrón de fluorescencia parecido a una red, con una densa reactividad perinuclear (vea imagen abajo).

Con los mosaicos/perfiles de flavivirus, varios anticuerpos específicos se pueden determinar simultáneamente. Pueden contribuir a aclarar reactividades cruzadas entre los diferentes flavivirus y permiten un diagnóstico diferencial en el caso de imágenes clínicas parecidas.

* ZIKV: Zika Virus, DENV: Virus del dengue, CHIKV: Virus chikungunya, TBEV: TBEV, WNV: WNV, JEV: Virus de la encefalitis japonesa, YFV: Virus de la fiebre amarilla

Reactividad cruzada

Dado que los productos de IFI usan partículas completas del virus como antígeno (al contrario de los ELISA), hay que contar con reactividades cruzadas de los anticuerpos contra virus del género flavivirus. En infecciones primarias por flavivirus, el título de anticuerpos dominante que causa la infección normalmente se puede determinar usando una serie de diluciones de las muestras de pacientes. En infecciones secundarias de flavivirus, hay que contar con una reactividad cruzada alta de los anticuerpos IgG, y los títulos finales son iguales o parecidos en todos los sustratos de flavivirus. Aún así, en algunos casos, la determinación de los anticuerpos IgM permite la diferenciación.

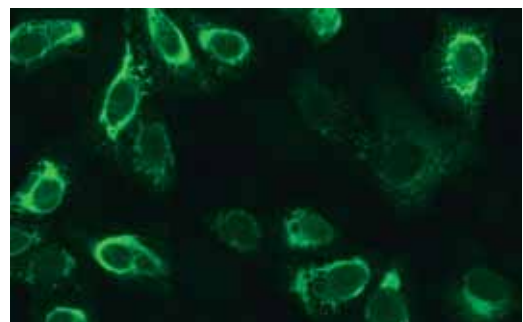
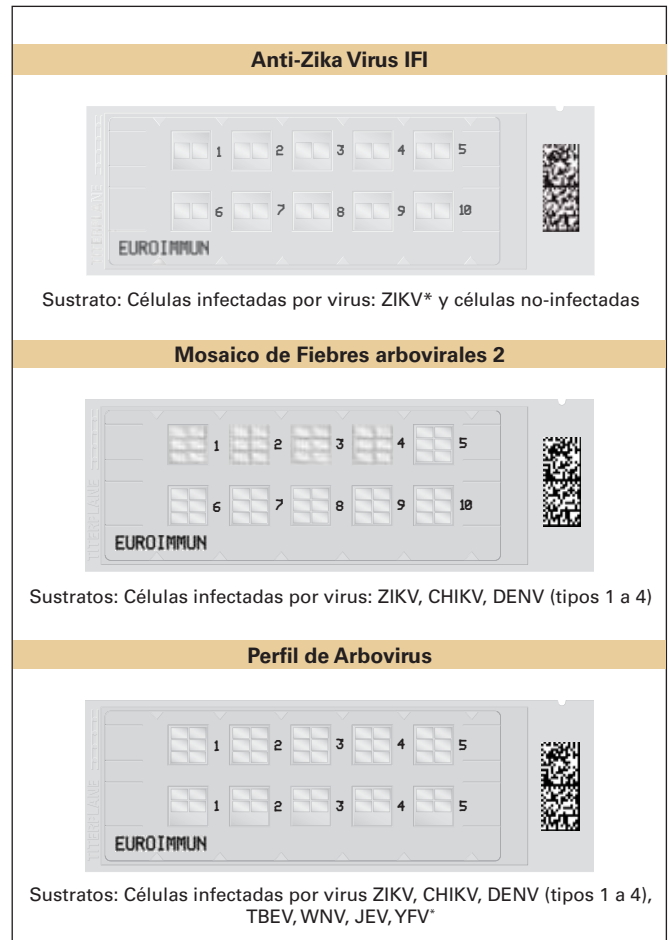


Imagen de fluorescencia, reacción positiva: Anticuerpos IgG contra Zika virus.

Automatización:

ELISA

Los Anti-Zika Virus ELISA son aptos para el procesamiento de instrumentos de análisis completamente automatizados. Son validados para los instrumentos Analyzer I y Analyzer I-2P de EUROIMMUN, tanto como el instrumento DSX de Dynex. También es posible la automatización en otros instrumentos de análisis. Sin embargo, la combinación debe ser validada por el usuario.

IFI

Los ensayos de IFI para la detección de infecciones por Zika virus se pueden procesar de forma automática con los instrumentos de laboratorio Sprinter y Sprinter XL. Todos los pasos, de la dilución y asignatura de muestras, hasta la incubación y lavado de los portaobjetos, se realizan automáticamente. En breve, la evaluación de los portaobjetos incubados en el microscopio también será posible con el microscopio de inmunofluorescencia apoyado por el computador, EUROPattern.



EUROIMMUN Analyzer I-2P

EUROIMMUN Sprinter XL

Sobrevista de productos:

Sistemas de ensayo	Número de pedido
Anti-Zika Virus ELISA (IgM)	EI 2668-9601 M
Anti-Zika Virus ELISA (IgG)	EI 2668-9601 G
Anti-Zika Virus IFI (IgG o IgM)	FI 2668-#### G/M
Mosaico de Fiebres arbovirales 2 (IgG o IgM)	FI 2668-####-1 G/M
Mosaico de Fiebres arbovirales 2 EUROPattern (IgG o IgM)	FR 2668-####-1 G/M
Perfil de Arbovirus 3 (IgG o IgM)	FI 2668-####-3 G/M

Publicaciones:

- 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(16):pii=30203
- Granger D, Gomez LJ, Schimek M, Dubbels M, Mosquera JA, Christensen J, Bistodau S, Strain A, Theel ES. Zika virus Antibody Detection: Evaluation of Three Different Serologic Methodologies. Poster CVS 2016 (USA)
- Frank C, Cadar D, Schlaphof A, Neddersen N, Günther S, Schmidt-Chansit J, Tappe D. Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. *Euro Surveill.* 2016; 21(23):pii=30252
- Zanluca C, Dos Santos CN. Zika virus – an overview. *Microbes Infect.* 2016 May;18(5):295-301
- Johansson MA, Mier-Y-Teran-Romero L, Reefhuis J, Gilboa SM, Hills SL. Zika and the Risk of Microcephaly. *N Engl J Med.* 2016 May 25
- Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Jul;29(3):487-524
- Zhang FC, Li XF, Deng YO, Tong YG, Qin CF. Excretion of infectious Zika virus in urine. *Lancet Infect Dis.* 2016 May 2
- Driggers RW, Ho CY, Korhonen, et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. *N Engl J Med* (2016) March
- Fourcade C, Mansuya JM, Dutertre MD, Delobel B. Viral load kinetics of Zika virus in plasma, urine and saliva in a couple returning from Martinique, French West Indies. *Journal of Clinical Virology*, Jun 2016
- Calleri G, Burdino E, Bonora S, Raso R. Zika virus infection in two travelers returning from an epidemic area to Italy, 2016: Algorithm for diagnosis and recommendations, *Travel Medicine and Infectious Disease* (2016)