

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LA PRUEBA RT-PCR PARA DENGUE,  
ZIKA Y CHIKUNGUNYA EN ORINA**

**Por**

**DR. CHRISTIAN GERARDO ALFARO RIVERA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
SUBESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA**

**DICIEMBRE 2019**

**“RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LA PRUEBA RT-PCR PARA DENGUE,  
ZIKA Y CHIKUNGUNYA EN ORINA”**

**Aprobación de la tesis:**



---

**Dr. Michel Fernando Martínez Reséndez  
Director de tesis**



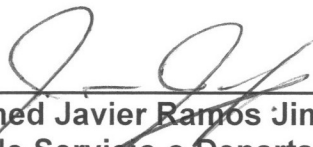
---

**Dr. Eduardo Pérez Alba  
Coordinador de Enseñanza**



---

**Dr. Michel Fernando Martínez Reséndez  
Coordinador de Investigación**



---

**Dr. med Javier Ramos Jiménez  
Jefe de Servicio o Departamento**



---

**Dr. med Felipe Arturo Morales Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y Paloma, quienes me han enseñado a amar al ser humano y el apoyo incondicional como ejemplo de vida.

A mis maestros Dr. Michel, Dr. Camacho, Dr. Ramos, Dr. Eduardo, Dr. Reynaldo y Dr Pedro. Su mentoría continuará siendo fundamental en mi desarrollo humano y profesional.

A las Doctoras Elvira, Paola, Samantha y Rayo. Su consejo y asesoría fueron piezas clave para la realización de este proyecto.

A Laura y Teresa. Aprender con su compañía ha sido la mejor de las experiencias.

A Natalia, Christian y Elizabeth.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESUMEN.....	7
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN.....	9
Capítulo III	
3. HIPÓTESIS.....	18
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS.....	19
Capítulo V	
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20

Capítulo VI

6. RESULTADOS.....23

Capítulo VII

7. DISCUSIÓN.....29

Capítulo VIII

8. CONCLUSIÓN.....33

Capítulo X

10.BIBLIOGRAFÍA.....34

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

CDC: Center for Disease and Control.

CHKV: Virus chikungunya

DENV: virus dengue.

IgG: Inmunoglobulina G.

IgM: Inmunoglobulina M

NS1: Non-structural protein 1 (Proteína no estructural 1, siglas en inglés).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

rt-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, por sus siglas en inglés.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ZIKV: Virus zika

# CAPÍTULO I

## RESUMEN

### **Introducción:**

Las enfermedades causadas por virus zika, dengue y chikungunya representan un problema de salud vigente para México. Los métodos diagnósticos basados en serología carecen de adecuado rendimiento, por lo que nuevos métodos diagnósticos necesitan ser estudiados y validados en distintos líquidos corporales.

### **Material y Métodos:**

Se realizó una búsqueda de expedientes a quienes se haya realizado una prueba rt-PCR para DENV, ZIKV; CHKV en suero y orina del 1ero de septiembre del 2016 al 30 de septiembre del 2019. Se obtuvieron variables clínicas y demográficas de los expedientes de pacientes con cualquier resultado positivo. Se evaluó el rendimiento de la prueba rt-PCR en orina mediante cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo.

### **Resultados:**

Se realizaron un total de 976 pruebas rt-PCR en suero y orina. De estas, 331 (33.91%) resultaron positivas para cualquiera de los tres virus. De estas pruebas se excluyeron 124 expedientes incompletos, por lo que al final en la caracterización demográfica y análisis de variables clínicas se incluyeron un total de 207 expedientes (62.53%) de las pruebas positivas.

Un total de 184 muestras fueron positivas para ZIKV. 52 de estas fueron positivas para solo en suero (28.2%), 76 (41.03%) solo en orina y hubo una correlación de detecciones de ARN en suero y orina en 56 muestras (30.43%). 792 muestras fueron negativas para ZIKV.

Para virus DENV, 129 muestras fueron positivas. 94 (72.86%) solo en suero, 6 (4.65%) solo en orina y 29 (22.58%) mostraron correlación suero-orina. 846 muestras resultaron negativas para DENV.

Las características clínicas de los pacientes con pruebas positivas se muestran en la tabla 1 para virus dengue, tabla 2 para virus zika y tabla 3 para chikungunya. Destaca que las pacientes con estado de embarazo fueron mayoría en las detecciones de cualquier de los virus.

Las sensibilidad de la prueba en orina para ZIKV fue de 51.80%, especificidad de 91.20% con un valor predictivo positivo de 42.40% y valor predictivo negativo de 93.80%. Para DENV, la sensibilidad fue de 23.57%, especificidad de 99.20%, valor predictivo positivo de 82.85% y valor predictivo negativo de 90.0%. Para CHKV la sensibilidad fue de 28.50%, especificidad de 99.50%, valor predictivo positivo de 50% y valor predictivo negativo de 98.96%.

### **Conclusiones:**

La realización de la prueba rt-PCR para ZIKV, DENV, CHKV en orina y suero incrementa la prevalencia del diagnóstico de arbovirus en la población estudiada. El mejor rendimiento diagnóstico se obtuvo al combinar rt-PCR en suero y orina, tomando en cuenta el alto valor predictivo negativo.



## CAPITULO II

### INTRODUCCIÓN:

#### **Arbovirus**

Las enfermedades causadas por arbovirus (Arthropode Borne Virus) representan un grave problema de salud a nivel mundial. Tiene en común, de acuerdo a la descripción original de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 1967<sup>1</sup>, una transmisión biológica entre vertebrados llevada a cabo por artrópodos hematófagos. La clasificación compone un total de 500 virus, de los cuales 150 son patógenos al ser humano<sup>1</sup>. Los arbovirus se dividen en tres principales familias:

1. Bunyaviridae
  - a. Encefalitis de La Crosse.
  - b. Hantavirus.
  - c. Fiebre Orepuche.
2. Flaviviridae
  - a. Dengue.
  - b. Fiebre amarilla.
  - c. Zika.
3. Togaviridae
  - a. Chikungunya.
  - b. Mayaro.

Dentro de los vectores que transmiten estas enfermedades destacan los mosquitos, garrapatas, pulgas, etc. Los vectores con mayor relevancia para la epidemiología local en México y Latinoamérica son los mosquitos del género *Aedes*, como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Debido a este mismo mecanismo de transmisión, los virus pueden co-circular en la misma región geográfica durante la misma temporada del año; por lo tanto se han reportado casos de coinfecciones.<sup>1</sup>

Para los fines de la presente investigación, la descripción se concentrará en solo tres virus transmitidos por mosquitos: Zika, Dengue y Chikungunya.

### **Virus Zika**

El virus zika pertenece a la familia Flaviviridae y al género flavivirus. Su material genético se compone de una sola cadena de RNA. Se han identificado dos linajes principales: el asiático y el africano; mientras que su transmisión se ha identificado en ambientes selváticos y urbanos. Se identificó por primera vez en 1947 en monos Rhesus durante investigaciones en Uganda para Fiebre Amarilla<sup>2</sup>.

El brote más reciente inició en 2007 en la Polinesia Francesa y para 2013 se registraron casos en Brasil. Al año 2017 todos los países de América Latina y el Caribe habían reportado casos de la enfermedad. En México el primer caso fue reportado en Nuevo León en 2016. De acuerdo con información de la Organización Panamericana de la Salud (OPS)<sup>3</sup>, durante 2015 a 2017 se

reportaron un total de 5,667 casos de virus zika. Los estados con mayor incidencia fueron Colima, Veracruz, Guerrero, Yucatán y Quintana Roo. El año con mayor casos confirmados fue 2016<sup>3</sup>.

Su transmisión, a diferencia de otros arbovirus, excede la de ser una enfermedad transmitida por vectores y se ha identificado el contagio por vía sexual, transfusión sanguínea y materno-fetal<sup>4,5</sup>.

El periodo de incubación dura de entre tres a siete días y los síntomas que predominan son la fiebre, artralgia, rash y conjuntivitis no purulenta. Se presenta, además: cefalea, mialgias, dolor retro-ocular edema y vómito. Se ha descrito una relación temporal y geográfica entre a infección por virus Zika y un aumento en la incidencia de síndrome de Guillain-Barré; así como meningoencefalitis y mielitis aguda. La transmisión materno fetal del virus resulta en un espectro de anomalías fetales aún por ser caracterizadas por completo; sin embargo, se sabe que hay una relación estrecha entre casos de microcefalia y el hallazgo de material genético del virus en el líquido amniótico de mujeres embarazadas con infección en el primer trimestre, llegando a ser detectadas en un 29% de las pacientes embarazadas y con infección hasta la semana 18<sup>4,5</sup>.

El tratamiento de la infección se limita al soporte sintomático<sup>5</sup>.

## **Dengue**

El virus del Dengue es un Favivirus de la familia Flaviviridae. Existen cuatro serotipos (1-4) distintos que comparten cerca del 65% de su material genético (una cadena única de ARN) y todos son transmitidos por los mosquitos *Aedes* en

ambientes selváticos y urbanos. El virus es endémico de más de 100 países en América, África, Asia, el Pacífico y algunas regiones del Mediterráneo<sup>6</sup>. En México, durante 2018 se reportaron un total de 78,621 casos de infección por virus dengue, de los cuales solo se tiene diagnóstico confirmado por laboratorio en 12,706 casos (16.16%)<sup>7</sup>. Esta tendencia, sin embargo, ha ido en ascenso pues en 2019 a la semana 48 se tienen contabilizados 251,445 casos con diagnóstico confirmado en 37,057 (14.73%), 135 muertes y una incidencia de 192.30 casos por 100,000 habitantes<sup>7</sup>.

El periodo de incubación de la enfermedad va de 3 a 7 días desde el contagio y sigue un curso trimodal: una fase inicial febril, una fase crítica (donde la fiebre cede) y una fase de recuperación<sup>8,9</sup>. *Fase febril:* Se caracteriza por fiebre alta acompañada de cefalea, vómito, mialgias, artralgias dolor articular y en ocasiones de un rash macular diseminado. En el laboratorio destaca una hepatitis leve y trombocitopenia con leucopenia leves. Esta fase suele durar de 3 a 7 días y la mayoría de los pacientes recuperan sin complicaciones. *Fase crítica:* Se presenta solo en una proporción pequeña de pacientes. Se caracteriza por una permeabilidad vascular aumentada que coincide con la defervescencia y se hace evidente por hemoconcentración (elevación del hematocrito), hipoproteinemia, derrame pleural, ascitis y una presión de pulso disminuida. La fuga vascular puede progresar hacia un estado de choque que puede ser identificado por hepatomegalia, aumento rápido del hematocrito junto a una caída rápida del conteo plaquetario, dolor abdominal refractario a tratamiento sintomático, serositis, sangrados y alteración del estado de alerta. Las manifestaciones

hemorrágicas aparecen en esta etapa. Una trombocitopenia leve a moderada es universal en los pacientes con dengue. *Etapas de resolución:* En esta fase, la fuga plasmática cede y los laboratorios regresan a valores normales. Puede haber un nuevo rash que se resuelve de forma descamativa y los síntomas desaparecen.<sup>10</sup>

Debido al curso grave que puede tomar la enfermedad, se generó la siguiente clasificación para la rápida identificación de casos serios<sup>10</sup>:

- *Dengue sin datos de alarma:* náusea, vómito, rash, cefalea, dolor retro-ocular, leucopenia, signo de torniquete positivo.
- *Dengue con datos de alarma:* dolor abdominal, vómito persistente, acumulación de líquido en tercer espacio, sangrado de mucosas, letargia o agitación, hepatomegalia >2cm, incremento rápido del hematocrito con descenso de plaquetas.
- *Dengue grave:* Choque, edema agudo de pulmón, sangrado severo, elevación >1000x transaminasas, conciencia alterada y falla orgánica.

## **Chikungunya**

El virus chikungunya es, a diferencia de los dos virus previos, un alfavirus. Comparte vector con el virus zika y dengue (*Aedes*). Se han registrado transmisiones materno-fetales y a través de transfusión de sangre y trasplante de órganos sólidos<sup>11</sup>.

Es endémico de regiones del Oeste africano (donde su seroconversión a la edad adulta puede ser de hasta el 50%). En el año 2013 se registró un brote

en la Isla de San Martín, con registros posteriores en el Caribe, América del Sur y Florida<sup>12</sup>.

El periodo de incubación desde la picadura de mosquito es de aproximadamente tres días, similar a los otros dos arbovirus expuestos. La viremia rápidamente alcanza niveles altos y se puede evidenciar seroconversión con IgM e IgG de tres a ocho días posteriores. La IgM permanece positiva durante 1 a 3 meses y posterior a esto sólo permanece detectable la IgG<sup>11</sup>.

La enfermedad inicia de forma abrupta con fiebre alta (>39°C), astenia, adinamia, mialgias y artralgias severas, cefalea y rash. De forma característica, las mialgias y artralgias durante la viremia son intensas y en ocasiones no permiten al paciente la deambulacón. A diferencia de otras arbovirosis, sólo el 15% de estos pacientes no presentan clínica y seroconvierten de forma asintomática<sup>11</sup>.

### **Métodos diagnósticos:**

Los principales métodos diagnósticos de estas enfermedades son serológicos y moleculares. Debido a que comparten un mismo vector y canal epidemiológico, la co-circulcaión es frecuente y las reacciones cruzadas de las pruebas serológicas entre los virus son comunes<sup>13</sup>.

### **Dengue:**

El diagnóstico de Dengue se puede realizar de las siguientes maneras:

- Cultivo viral.

- Seroconversión de IgM contra Dengue.
- Incremento en cuatro títulos la IgG contra Dengue.
- Detección de antígeno NS1.
- PCR positiva para detección de RNA viral.

La viremia es detectada rápidamente a partir del cuarto día de fiebre y lleva una relación directa con la duración de la fiebre. Los títulos de IgM anti-Dengue se identifican a partir del quinto día y persisten por dos a tres meses. El IgG se detecta a partir del día 8 de fiebre; sin embargo cobra importancia en infecciones posteriores. El diagnóstico de la infección en los primeros días de la enfermedad, previos a la seroconversión con IgM, es posible con la identificación del antígeno NS1 (Non-structural protein 1) mediante ELISA y kits de diagnóstico rápido inmunocromatográfico. Estos kits han reportado sensibilidades de entre 54 y 90%<sup>9</sup>.

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rt-PCR por sus siglas en inglés) detecta la viremia y serotipo específico de dengue dentro de la primer semana de clínica y se puede emplear en suero, sangre y orina; así como en tejidos. En un estudio publicado en 2015 se reportaron tres detecciones de RNA de dengue en pacientes con un cuadro comprobado en días previos<sup>9</sup>.

### **Zika:**

A diferencia de Dengue, enfermedad para la que existen múltiples métodos diagnósticos que confirman la presencia del virus, en Zika no existe un kit comercial de diagnóstico serológico validado y disponible. De acuerdo a lo reportado en estudios previos, la sensibilidad de las pruebas serológicas varía

del 50 a 100%; con especificidad del 100%<sup>13</sup>. Sin embargo, la detección molecular del RNA viral está validado y es el método más utilizado en la actualidad. Esta detección molecular requiere de dos pasos: un primer paso en el que se realiza una transcripción reversa del RNA viral de cadena singular a DNA y posteriormente una ampliación del DNA. La gran mayoría de los protocolos de Reacción en Cadena de la Polimerasa tienen como objetivo en gen codificador NS5 de la porción 3' del genoma viral (esto debido a la alta conservación de esta parte del genoma)<sup>14,15</sup>.

### **Chikungunya:**

Al igual que con el virus Zika, la enfermedad ocasionada por el virus chikungunya requiere de la utilización de PCR en tiempo real (rt-PCR) para confirmar el diagnóstico durante la primera semana de síntomas (período donde la viremia es más alta)<sup>14</sup>. La serología en CHKV se ve limitada por la limitada expresión antigénica del virus y el alto porcentaje de reacciones cruzadas entre esta y otras arbovirosis<sup>11</sup>.

En un estudio publicado por Musso D, de 48 muestras de pacientes con enfermedad por virus chikunguya, sólo encontraron dos muestras positivas en orina<sup>16</sup>.

### **Diagnóstico de Arbovirus (ZIKV, DENV, CHKV) mediante rt-PCR.**

La reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de arbovirosis se aprobó por el CDC (Center for Disease Control) para realizarse en suero y líquido cefalorraquídeo para los virus de dengue, zika y chikungunya; además de en



orina y amnios para el diagnóstico de Zika. En esta prueba se amplifican las siguientes secuencias genéticas<sup>14,15</sup>:

- Virus dengue: 5'UTR.
- Virus zika: Gen de la cápsula.
- Virus chikungunya: Proteína no estructural 1 (nSP1)

## **CAPÍTULO III**

### **HIPÓTESIS**

Realizar rt-PCR para arbovirus (ZIKV, DENV, CHKV) en suero y orina incrementa el rendimiento diagnóstico de la prueba para estas enfermedades.

### **HIPOTESIS NULA**

La prueba rt-PCR para arbovirus (DENV, ZIKV, CHKV) en suero y orina no incrementa el rendimiento diagnóstico de la prueba en estas enfermedades.

## **CAPITULO IV**

### **OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO PRINCIPAL:**

- Determinar la utilidad diagnóstica de añadir la detección de virus dengue, zika y chikungunya mediante rt-PCR en orina (además de suero) en pacientes con la definición epidemiológica de estas arbovirosis.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba rt-PCR para arbovirus en orina comparado con rt-PCR en suero.
- Determinar el número necesario de pruebas a realizar para diagnosticar un caso de arbovirosis mediante rt-PCR en suero y orina.
- Identificar los pacientes que solo mostraron ARN viral en orina.
- Determinar el umbral de detección (cycle-treshold) para la identificación de ARN viral en orina.
- Determinar la co-circulación de arbovirus.

## **CAPÍTULO V**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **DISEÑO DEL ESTUDIO**

El presente es un estudio retrospectivo, observacional, abierto y descriptivo.

#### **MATERIAL:**

Se realizó una búsqueda de expedientes a quienes se haya realizado una prueba rt-PCR para DENV, ZIKV; CHKV en suero y orina en el “Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico Especializado” (LADIME) del departamento de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” del 1ero de septiembre del 2016 al 30 de septiembre del 2019. Se obtuvo y registró el sexo, edad, semanas de gestación (en caso de estar embarazada) días de clínica, biometría hemática completa, pruebas de función hepática, comorbilidades, serología para arbovirus (en caso de contar con ella) y se recabaron las siguientes características clínicas: Días de fiebre previos a la realización del estudio, presencia de erupción, conjuntivitis, artralgias, mialgias, cefalea, dolor abdominal, dolor retroocular, alteración neurológica.

Se buscó además el umbral de ciclos de detección en la amplificación de ARB realizada en el laboratorio para los resultados de ZIKV.

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Pacientes mayores de 18 años a quien se haya realizado una prueba rt-PCR para virus zika, dengue y chikungunya.

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

Pacientes que no cuenten con prueba rt-PCR.

Para el análisis demográfico de características clínicas, se excluyeron los pacientes con expediente faltante o incompleto.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Se utilizó un cálculo de tamaño de muestra para prueba diagnóstica para evaluar sensibilidad de la prueba de ensayo rt-PCR en orina de sujetos infectados por virus zika, dengue y chikungunya que resultó en 144 sujetos de investigación por prueba diagnóstica. En la estadística descriptiva se reportarán frecuencias y porcentajes para variables categóricas mientras para las variables cuantitativas se reportaron medidas de tendencia central y dispersión numérica (media/mediana; desviación estándar/ rango intercuartílico).

En la estadística inferencial se evaluó la distribución de la muestra por medio de la prueba de Kolmogorov- Smirnov. Se compararon valores de precisión diagnóstica por medio de tablas cruzadas de 2x2.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se calcularon sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo tomando en cuenta la prueba rt-PCR con resultado “detectado” en sangre como Estándar de Oro y comparador. Se consideraron significativos los valores de  $p \leq 0.05$ . Se utilizó el paquete estadístico SPSSv20IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Versión 25 Armonk, NY: IBM Corp.

## CAPÍTULO VI

### RESULTADOS

Se realizaron un total de 976 pruebas rt-PCR en suero y orina. De estas, 331 (33.91%) resultaron positivas para cualquiera de los tres virus. De estas pruebas se excluyeron 124 expedientes incompletos, por lo que al final en la caracterización demográfica y análisis de variables clínicas se incluyeron un total de 207 expedientes (62.53%) de las pruebas positivas.

Un total de 184 muestras fueron positivas para ZIKV. 52 de estas fueron positivas para solo en suero (28.2%), 76 (41.03%) solo en orina y hubo una correlación de detecciones de ARN en suero y orina en 56 muestras (30.43%). 792 muestras fueron negativas para ZIKV.

Para virus DENV, 129 muestras fueron positivas. 94 (72.86%) solo en suero, 6 (4.65%) solo en orina y 29 (22.58%) mostraron correlación suero-orina. 846 muestras resultaron negativas para DENV.

	<b>Suero (+)</b>	<b>Orina (+)</b>	<b>Suero y Orina</b>	<b>Total:</b>	<b>No Detectado:</b>
ZIKV	52 (28.2%)	76 (41.30%)	56 (30.43%)	184	792
DENV	94 (72.86%)	6 (4.65%)	29 (22.48%)	129	846
CHKV	10 (55.5%)	4 (22.2%)	4 (22.2%)	18	957

Tabla 1. Pruebas positivas de acuerdo a virus detectado y muestra.

Las características clínicas de los pacientes con pruebas positivas se muestran en la tabla 2, 3 y 4 para virus dengue, tabla 2 para virus zika y tabla 3 para chikungunya. Destaca que las pacientes con estado de embarazo fueron mayoría en las detecciones de cualquier de los virus.

La media de días de clínica al momento de tomar las muestras fue de 2.62 días (1-8) para los pacientes con muestra positiva en orina para DENV, 2.67 (1-12) para DENV en suero ( $p = 0.028$ ), 3.03 para pacientes con ZIKV en orina y 3.41 (1-60) días para ZIKV en suero ( $p=0.035$ ). La información completa de un paciente con CHKV positivo solo en orina incluido en el análisis no se completó, por lo que solo se tomaron en cuenta las variables de CHKV en suero. De esta manera, la media de días de clínica para los pacientes con CHKV en suero fue de 3.33 (3-4).

El promedio de umbral de ciclos para detección de ZIKV en orina fue de 30.2 y 11.5 en suero. La información del umbral de ciclos para los virus dengue y chikungunya no se tenía registrada.

Se realizó un subanálisis de las pacientes embarazadas debido al alto porcentaje de pacientes con esta característica encontradas en el estudio (Tabla 4). La media de semanas de gestación fue de 27.58 (IC 95%, 25.81 – 29.36;  $p=0.98$ ), la media de días de clínica fue de 1.90 (IC 95%, 1.65-2.15;  $p=0.32$ ).



	ZIKA		P
	ZIKV ORINA	ZIKV SUERO	
<b>N</b>	73	53	
<b>Edad:</b>	23.78 (15-48)	23.42 (8-40)	0.194
<b>Hombres</b>	6	7	
<b>Mujeres</b>	67	46	
<b>Embarazadas</b>	65 (89%)	41 (77.4-%)	0.35
<b>Semanas de Gestación</b>	26.0 (0 - 40)	20.7 (0-39.4)	0.085
<b>Días de Clínica</b>	3.03 (1-60)	3.41 (1-60)	0.035
<b>Presencia de Fiebre</b>	28 (38.4%)	19 (35.8%)	0.486
<b>Días de Fiebre</b>	.86 (0-10)	.7 (0-5)	0.333
<b>Cefalea</b>	37 (50.7%)	24 (45.3%)	0.234
<b>Conjuntivitis</b>	10 (13.7%)	6 (11.3%)	0.011
<b>Rash</b>	49 (67.1%)	37 (69.8%)	0.395
<b>Mialgias/Artralgias</b>	28 (38.4%)	23 (43.4%)	0.31
<b>Alteración neurológica</b>	4 (5.5%)	2 (3.8%)	0.035
<b>Dolor abdominal</b>	13 (17.8%)	6 (11.3%)	0.116
<b>Dolor retroocular</b>	22 (30.1%)	18 (34%)	0.269
<b>Hemoglobina (gr/dL)</b>	11.8 (7.04 - 15.6)	12.2 (7.04-15.6)	0.228
<b>Hematocrito (%)</b>	35.8 (20 - 46.2)	37.1 (20-46.2)	0.255
<b>Leucocitos (x 1,000 cel/mm3)</b>	9.8 (.76 - 43.10)	10.2 (.76-40)	0.205
<b>Plaquetas (x 1,000 cel/mm3)</b>	222,357 (38,000 - 191,500)	312,398 (40,000 - 329,200)	0.027
<b>Umbral de Ciclos</b>	30.2 (0 - 38.5)	11.5 (0-47)	

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes con detección de ZIKV.

	DENGUE		<i>P</i>
	DENV ORINA	DENV SUERO	
<b>N</b>	17	99	
<b>Edad:</b>	24.9 (16-58)	28.7 (15-65)	0.042
<b>Hombres</b>	2	11	
<b>Mujeres</b>	15	88	
<b>Embarazadas</b>	12 (70.6%)	46 (46.5%)	0.026
<b>Semanas de Gestación</b>	23.28 (0-40)	12.5 (0-40)	0.098
<b>Días de Clínica</b>	2.62 (1-8)	2.67 (1-12)	0.028
<b>Presencia de Fiebre</b>	13 (76.5%)	81 (81.8%)	0.19
<b>Días de Fiebre</b>	2.69 (1-8)	37 (37.4%)	0.144
<b>Cefalea</b>	11 (64.7%)	73 (73.7%)	0.088
<b>Conjuntivitis</b>	12 (70.6%)	11 (11.1%)	0.062
<b>Rash</b>	1 (5.9%)	14 (14.1%)	0.21
<b>Mialgias/Artralgias</b>	7 (41.2%)	68 (68.7%)	0.063
<b>Alteración neurológica</b>	3 (17.6%)	8 (8.1%)	0.109
<b>Dolor abdominal</b>	4 (23.5%)	33 (33.3%)	0.016
<b>Dolor retroocular</b>	4 (23.5%)	53 (53.5%)	0.089
<b>Hemoglobina (gr/dL)</b>	11.7 (9.68-15.3)	13.27 (8.81-17.9)	0.093
<b>Hematocrito (%)</b>	36.8 (30.2-49.5)	40.6 (27.1-55.5)	0.061
<b>Leucocitos (x 1,000 cel/mm<sup>3</sup>)</b>	8.8 (2.93-15.10)	6.63 (2.2-19.6)	0.022
<b>Plaquetas (x 1,000 cel/mm<sup>3</sup>)</b>	228,792 (50,000-407,000)	216,696 (18,100-2,000,000)	0.005

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes con detección de DENV.

	CHIKUNGUNYA		<i>P</i>
	CHKV ORINA	CHKV SUERO	
<b>N</b>	1	4	-
<b>Edad:</b>		23.25 (18-37)	-
<b>Hombres</b>	1	1	
<b>Mujeres</b>	NA	3	
<b>Embarazadas</b>	NA	1 (25)	-
<b>Semanas de Gestación</b>	NA	29 (única paciente)	-
<b>Días de Clínica</b>	NA	3.33 (3-4)	-
<b>Presencia de Fiebre</b>	NA	2 (50%)	-
<b>Días de Fiebre</b>	NA	2 (1-3)	-
<b>Cefalea</b>	NA	1 (25)	-
<b>Conjuntivitis</b>	NA	1 (25)	-
<b>Rash</b>	NA	1 (25%)	-
<b>Mialgias/Artralgias</b>	NA	2 (50%)	-
<b>Alteración neurológica</b>	NA	1 (25%)	-
<b>Dolor abdominal</b>	NA	1 (25%)	-
<b>Dolor retroocular</b>	NA	3 (75%)	-
<b>Hemoglobina (gr/dL)</b>	NA	11.9 (10-14)	-
<b>Hematocrito (%)</b>	NA	37.3 (34-44)	-
<b>Leucocitos (x 1,000 cel/mm<sup>3</sup>)</b>	NA	8.6 (7-11)	-
<b>Plaquetas (x 1,000 cel/mm<sup>3</sup>)</b>	NA	307,666 (206,000 - 451,000)	

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes con detección de CHKV.

La sensibilidad de la prueba en orina para ZIKV fue de 51.80%, especificidad de 91.20% con un valor predictivo positivo de 42.40% y valor predictivo negativo de 93.80%. Para DENV, la sensibilidad fue de 23.57%, especificidad de 99.20%, valor predictivo positivo de 82.85% y valor predictivo negativo de 90.0%. Para CHKV la sensibilidad fue de 28.50%, especificidad de 99.50%, valor predictivo positivo de 50% y valor predictivo negativo de 98.96%.

El cálculo de número de pruebas necesarias a realizar para diagnosticar un caso de arbovirosis (NNT) resultó en 33 para ZIKV, 10 para DENV y 168 para CHKV.

Se documentaron cuatro casos de co-circulación de arbovirosis: dos de ZIKV detectado en orina con DENV detectado en suero, uno de zika detectado en orina y CHKV detectado en orina y suero y un último caso de ZIKV detectado en suero y orina con CHKV detectado en orina.

La prevalencia identificada incrementó en los tres arbovirus al añadir rt-PCR en orina para ZIKV, DENV y CHKV a la prueba en suero (tabla 5). El mayor incremento de prevalencia se registró en ZIKV, con una prevalencia previa de 5.32%, prevalencia de 11.0% postprueba en orina con una diferencia de 5.68%.

## CAPÍTULO VII

### DISCUSIÓN

Nuestro estudio demuestra la utilidad de solicitar rt-PCR en suero y orina para pacientes con sospecha de arbovirosis. A nuestro conocimiento, es el primer reporte de pacientes a quien se solicitan ambas pruebas al momento de primer contacto con servicios de salud en un episodio febril. Aunque los valores de sensibilidad son bajos, la alta especificidad y un muy alto valor predictivo negativo agregan utilidad a la prueba realizada exclusivamente en orina; sin embargo, añadir la prueba en orina a las muestras solicitadas en suero incrementa el rendimiento y capacidad diagnóstica para estas arbovirosis.

Se lograron detectar un total de 86 casos más de arbovirosis al detectar ARN mediante rt-PCR. De estos, 76 son para ZIKV, 6 DENV y 4 CHKV. Hubo correlación de la prueba entre suero y orina en 30.43% para ZIKV, 22.48% para DENV y 22.2% para CHKV.

La baja sensibilidad que mostró la prueba en orina puede ser explicada por la media de días de clínica que presentaban los pacientes al momento de tomar la muestra. Nuestros pacientes acudieron al hospital y por lo tanto se realizó la muestra en lo general antes del tercer día de síntomas, periodo durante el cual la viruria aún no se manifiesta. De acuerdo con estudios previos, la viremia de ZIKV inicia a la par de las manifestaciones clínicas, mientras que la viruria dura 8 días y suele presentarse posterior a la

defervescencia<sup>21,22</sup>. St George et al<sup>17</sup>, describió en turistas que regresaron de zonas endémicas de virus zika una correlación de 11 muestras y 50 muestras solo en orina (63%). De la misma manera, Bingham et al<sup>18</sup> reportaron en 55 pacientes de Florida 52 detecciones de ARN viral en orina (95%). En ambos estudios, los pacientes ya tenían diagnóstico de infección por ZIKV y la muestra fue tomada posterior al inicio de los síntomas, en promedio posterior al tercer día. Los periodos de eliminación viral en orina se han estudiado en mujeres embarazadas (población de particular interés a partir de los hallazgos de microcefalia y otras alteraciones del sistema nervioso central en los productos de mujeres que adquirieron la enfermedad en el primer trimestre del embarazo) y se ha descrito una duración de hasta 30 días. La media de umbral de ciclos para las detecciones de RNA viral de ZIKV en orina fue de 30.2, comparado con 11.5 en suero, lo que se puede interpretar de forma indirecta como una mayor carga viral en suero que en orina.

Para la infección por dengue, la detección de viruria por rt-PCR es menor a la reportada con ZIKV. Van der Bossche R et al<sup>19</sup>, describen en 21 pacientes una correlación del 50% en muestras pareadas de suero y orina a partir del día 7 y del 100% entre la semana 1 y 7. Las concentraciones pico en muestras seriadas de los mismos pacientes se obtuvieron al día 10 de clínica. Hirayama et al<sup>20</sup>, reportaron en 53 pacientes haciendo comparación de cultivo viral, rt-PCR en orina, rt-PCR en suero, IgG e IgM una detección de ARN viral en orina del 25% en los días 0-3 y de 32% a partir del día 4. Solo hubo dos detecciones exclusivas en orina. A propósito de las virurias por dengue, nosotros detectamos 6 casos y

una correlación de 22.58% al día 3. En reportes previos se ha logrado aislar el virus del dengue en biopsias renales de pacientes que acudieron con diagnóstico de fiebre del dengue y daño renal agudo; junto a esto, recientemente se describió un caso de transmisión sexual de dengue. De esta forma, nuestro estudio y los reportes previos destacan un probable rol fisiopatogénico del virus en el sistema genitourinario aún por ser estudiado.

Nuestras detecciones de virus CHKV fueron pocas, como también reportaron Musso et al en una muestra de 48 pacientes con solo 3% (2 muestras) detectadas en orina.

Nuestro estudio tiene varias fortalezas. Primero, el número de muestras realizadas (976) y pruebas positivas (331) superan por mucho a los reportes similares previos. Esto soporta con mayor solidez el análisis estadístico y sus resultados. Segundo, incluimos un número grande mujeres embarazadas, población de particular interés en el diagnóstico de arbovirosis y quienes mantienen virurias más prolongadas que la población no embarazada. Tercero, encontramos un alto valor predictivo negativo para pacientes que acuden en el tercer día de síntomas y una prueba sin detección de ARN viral en orina.

Sin embargo, reconocemos algunas limitantes. En primer lugar, la baja sensibilidad que encontramos se puede explicar por una falta de estandarización en el manejo preanalítico de las muestras y en pacientes con una media de días de síntomas baja (DENV: 2.7, ZIKV 2.85, CHKV 3.33). Segundo, no se realizó un seguimiento de muestras seriado, de tal forma que se podría detectar ARN viral

a partir del tercer día y caracterizar las dinámicas de viremia y viruria en nuestra población.



## **CAPÍTULO VIII**

### **CONCLUSIÓN**

La realización de la prueba rt-PCR para ZIKV, DENV, CHKV en orina y suero incrementa la prevalencia del diagnóstico de arbovirus en la población estudiada.

Al tercer día de clínica, la sensibilidad es baja; pero cuenta con mayor valor predictivo negativo.

Recomendamos continuar realizando rt-PCR en suero y orina en pacientes con sospecha de arbovirosis debido al incremento en los diagnósticos y el alto valor predictivo negativo.

## CAPÍTULO IX

### BIBLIOGRAFÍA

1. Young P.R. (2018) Arboviruses: A Family on the Move. In: Hilgenfeld R., Vasudevan S. (eds) Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1062. Springer, Singapore
2. Baud D, et al. "An update on Zika virus infection" Lancet 2017; 390: 2099–109
3. Panamerican Health Organization, "Zika Epidemiological Report", September 2017. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-phe-zika-situation-report-mex.pdf> Accesado diciembre 2019.
4. Calvet G-A, et al. "zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis" Curr Opin Infect Dis 2016, 29:459–466
5. Petersen L, et al. "Zika Virus" N Engl J Med 2016;374:1552-63.
6. McFee R, et al. "Selected mosquito borne illnesses - Dengue" Disease-a-Month (2018)
7. Panamerican Health Organization "Reported Cases of Dengue Fever in the Americas 2018" <https://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html> accesado diciembre 2019
8. Guzman M, et al. "Dengue infection" Nature Disease Primers 2016

9. Guman M, et al. "Dengue: a continuing global threat" *Nature Reviews Microbiology* 2010.
10. Guzman M, et al "Dengue", *Lancet* 2015; 385: 453–65
11. Johnson B. et al, "Laboratory Diagnosis of Chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic Assays" *JID* 2016;214(55):S471-4
12. Panamerican Health Organization "Casos reportados de Chikungunya en Las Americas" <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-dic-22-phe-CHIKV-casos-se-51.pdf> Accesado diciembre 2019.
13. Safronetz D, et al "Evaluation of 5 Commercially available zika virus immunoassays" *Emerg Infect Dis.* 2017 Sep; 23(9): 1577–1580
14. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades "Prueba Trioplex RCP-TR en tiempo real" Abril 2017.
15. Santiago G, et al. "Performance of the Trioplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue and chikungunya viruses" *Nature Communications* (2018)9;1391
16. Musso et al. "Detection of Chikungunya virus in saliva and urine" *Virology Journal* (2016) 13:102
17. St George K, Sohi IS, Dufort EM, et al. Zika virus testing considerations: lessons learned from the first 80 real-time reverse transcription-PCR-positive cases diagnosed in New York State. *J Clin Microbiol* 2017; 55:535–44
18. Bingham AM, et al. Comparison of test results for Zika virus RNA in urine, serum, and saliva specimens from persons with travel-associated Zika

virus disease—Florida, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016; 65:475–8

19. Van den Bossche "Recovery of dengue virus from urine samples by real-time RT-PCR" *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Jul;34(7):1361-7
20. Hirayama, et al. "Detection of Dengue Virus Genome in Urine by Real-Time Reverse Transcriptase PCR: a Laboratory Diagnostic Method Useful after Disappearance of the Genome in Serum" *J Clin Microbiol* 50:2047–2052
21. Paz-Bailey G, et al. "Persistence of Zika Virus in Body Fluids – Preliminary Report" *N Engl J Med* 2018; 379:1234-1243
22. Gourinat A-C et al, "Detection of Zika Virus in Urine". *Emerg Infect Dis*. 2015 Jan; 21(1): 84–86.