

# Recomendaciones para la detección y el diagnóstico por laboratorio de infecciones por arbovirus en la Región de las Américas



**OPS**



Organización  
Panamericana  
de la Salud



Organización  
Mundial de la Salud  
OFICINA REGIONAL PARA LAS  
Américas



# Recomendaciones para la detección y el diagnóstico por laboratorio de infecciones por arbovirus en la Región de las Américas

Washington, D.C., 2022

**OPS**



Organización  
Panamericana  
de la Salud



Organización  
Mundial de la Salud

OFICINA REGIONAL PARA LAS Américas

ISBN: 978-92-75-32587-2 (PDF)

ISBN: 978-92-75-32588-9 (Versión impresa)

© **Organización Panamericana de la Salud, 2022**

Algunos derechos reservados. Esta obra está disponible en virtud de la licencia Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Organizaciones intergubernamentales de Creative Commons (CC BY-NC-SA 3.0 IGO).



Con arreglo a las condiciones de la licencia, se permite copiar, redistribuir y adaptar la obra con fines no comerciales, siempre que se utilice la misma licencia o una licencia equivalente de Creative Commons y se cite correctamente, como se indica más abajo.

En ningún uso que se haga de esta obra debe darse a entender que la Organización Panamericana de la Salud (OPS) respalda una organización, producto o servicio específicos. No está permitido utilizar el logotipo de la OPS.

**Adaptaciones:** si se hace una adaptación de la obra, debe añadirse, junto con la forma de cita propuesta, la siguiente nota de descargo: “Esta publicación es una adaptación de una obra original de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Las opiniones expresadas en esta adaptación son responsabilidad exclusiva de los autores y no representan necesariamente los criterios de la OPS”.

**Traducciones:** si se hace una traducción de la obra, debe añadirse, junto con la forma de cita propuesta, la siguiente nota de descargo: “La presente traducción no es obra de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). La OPS no se hace responsable del contenido ni de la exactitud de la traducción”.

**Cita propuesta:** Organización Panamericana de la Salud. Recomendaciones para la detección y el diagnóstico por laboratorio de infecciones por arbovirus en la Región de las Américas. Washington, D.C.; 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275325872>.

**Datos de catalogación:** pueden consultarse en <http://iris.paho.org>.

**Ventas, derechos y licencias:** para adquirir publicaciones de la OPS, diríjase a [sales@paho.org](mailto:sales@paho.org). Para presentar solicitudes de uso comercial y consultas sobre derechos y licencias, véase [www.paho.org/es/publicaciones/permisos-licencias](http://www.paho.org/es/publicaciones/permisos-licencias).

**Materiales de terceros:** si se desea reutilizar material contenido en esta obra que sea propiedad de terceros —como cuadros, figuras o imágenes—, corresponde al usuario determinar si se necesita autorización para tal reutilización y obtener la autorización del titular del derecho de autor. Recae exclusivamente sobre el usuario el riesgo de que se deriven reclamaciones de la infracción de los derechos de uso de un elemento que sea propiedad de terceros.

**Notas de descargo generales:** las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, por parte de la OPS, juicio alguno sobre la condición jurídica de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto del trazado de sus fronteras o límites. Las líneas discontinuas en los mapas representan de manera aproximada fronteras respecto de las cuales puede que no haya pleno acuerdo.

La mención de determinadas sociedades mercantiles o de nombres comerciales de ciertos productos no implica que la OPS los apruebe o recomiende con preferencia a otros análogos. Salvo error u omisión, las denominaciones de productos patentados llevan letra inicial mayúscula.

La OPS ha adoptado todas las precauciones razonables para verificar la información que figura en la presente publicación. No obstante, el material publicado se distribuye sin garantía de ningún tipo, ni explícita ni implícita. El lector es responsable de la interpretación y el uso que haga de ese material, y en ningún caso la OPS podrá ser considerada responsable de daño alguno causado por su utilización.

PHE/IHM/2022

Diseño: © Prographics

Fotografías de cubierta: © auimeesri/Adobe Stock, © Kateryna\_Kon/Adobe Stock y © OPS

# Índice

Agradecimientos .....	vi
Siglas .....	viii
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Emergencia y ciclo de vida de los arbovirus</b> .....	<b>3</b>
1.1 Estructura, genoma y ciclo de vida de los arbovirus .....	3
1.2 Origen y dinámica evolutiva de los arbovirus .....	5
<b>2 Toma, conservación y transporte de muestras</b> .....	<b>8</b>
2.1 Muestras para el diagnóstico de infecciones arbovirales .....	8
2.2 Información epidemiológica y clínica adjunta a las muestras .....	10
2.3 Envío de muestras al laboratorio .....	10
2.4 Recepción y manipulación de las muestras en el laboratorio .....	11
2.5 Envío de muestras a los laboratorios de referencia .....	12
<b>3 Bioseguridad y flujo de trabajo en el laboratorio</b> .....	<b>13</b>
3.1 Consideraciones sobre bioseguridad .....	13
3.2 Flujo de trabajo en el laboratorio .....	14
<b>4 Diagnóstico por laboratorio del dengue, el chikunguña, el Zika y la fiebre amarilla</b> .....	<b>15</b>
4.1 Diagnóstico virológico: métodos directos .....	15
4.2 Diagnóstico serológico: métodos indirectos .....	22
4.3 Algoritmos recomendados para el diagnóstico por laboratorio de infecciones por los virus del dengue, el chikunguña, el Zika y la fiebre amarilla .....	27

<b>5</b>	<b>Diagnóstico por laboratorio de infecciones por los virus Mayaro y Oropouche</b>	<b>34</b>
5.1	Infección por el virus Mayaro.....	34
5.2	Infección por el virus Oropouche.....	35
<b>6</b>	<b>Diagnóstico por laboratorio de otras infecciones arbovirales neurotrópicas</b>	<b>36</b>
6.1	Métodos virológicos.....	37
6.2	Métodos serológicos.....	39
<b>7</b>	<b>Caracterización de genotipos y linajes por secuenciación nucleotídica</b>	<b>41</b>
	Referencias .....	43

## Figuras

Figura 1	Cinética del virus del dengue, la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG en muestras de suero en infecciones primarias y secundarias . . . . .	23
Figura 2	Algoritmo para pruebas virológicas en casos sospechosos de dengue, chikunguña y zika . . . . .	29
Figura 3	Algoritmo para pruebas serológicas en casos sospechosos de dengue y zika . . . . .	29
Figura 4	Algoritmo para la confirmación de casos de fiebre amarilla por laboratorio . . . . .	32
Figura 5	Algoritmo para la confirmación por laboratorio de casos mortales de fiebre amarilla. . . . .	33
Figura 6	Métodos diagnósticos de encefalitis por arbovirus . . . . .	37

## Cuadros

Cuadro 1	Muestras para el diagnóstico de infecciones arbovirales. . . . .	9
Cuadro 2	Pruebas moleculares de referencia para la detección de ácido ribonucleico de los virus del dengue, el chikunguña, el Zika y la fiebre amarilla . . . . .	17
Cuadro 3	Períodos de detección molecular de los arbovirus en muestras biológicas . . . . .	19
Cuadro 4	Muestras para detección molecular de los virus del dengue, el chikunguña, el Zika y la fiebre amarilla en casos mortales . . . . .	20

Cuadro 5	Muestras para la detección de virus del dengue, el chikunguña y la fiebre amarilla por inmunohistoquímica en casos mortales. . . . .	21
Cuadro 6	Pruebas de IgM de referencia para la detección de infecciones por los virus del dengue, el chikunguña, el Zika y la fiebre amarilla . . . . .	24
Cuadro 7	Pruebas moleculares de referencia para la detección de ácido ribonucleico de determinados arbovirus neurotrópicos . . . . .	38

# Agradecimientos

En la elaboración de esta publicación participaron las siguientes personas (por orden alfabético):

Joshua Anzinger  
Universidad de las Indias Occidentales,  
Kingston (Jamaica)

Betânia Paiva Drumond  
Universidad Federal de Minas Gerais,  
Belo Horizonte (Brasil)

Eva Harris  
Universidad de California, Berkeley  
(Estados Unidos de América)

José A. Usme-Ciro  
Universidad Cooperativa de Colombia,  
Santa Marta (Colombia)

Laura Kramer  
Centro Wadsworth, Departamento de  
Salud del Estado de Nueva York, Albany  
(Estados Unidos de América)

Las siguientes personas contribuyeron a la revisión de la publicación (por país):

Cintia Marcela Fabbri, Victoria Celina Luppó y  
María Alejandra Morales  
Instituto Nacional de Enfermedades Virales  
Humanas Pergamino (Argentina)

Guadalupe Guzmán  
Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí,  
La Habana (Cuba)

Daniele Barbosa de Almeida Medeiros, Valéria  
Lima Carvalho, Jannifer Oliveira Chiang y  
Raimunda do Socorro da Silva Azevedo  
Instituto Evandro Chagas, Belém (Brasil)

Alison Jane Basile, Aaron Brault y Amy J. Lambert  
Centros para el Control y la Prevención de  
Enfermedades Fort Collins (Estados Unidos de  
América)

Mauricio Lacerda Nogueira  
Escuela de Medicina de São José do Rio Preto,  
São José do Rio Preto (Brasil)

Jorge Muñoz-Jordan  
Centros para el Control y la Prevención de  
Enfermedades, Puerto Rico (Estados Unidos de  
América)



Claudia Rosales Jiménez, Karina Ruíz Tovar,  
Mónica Salas García, Belem Torres Longoria y  
Mauricio Vázquez Pichardo  
Instituto de Diagnóstico y Referencia  
Epidemiológicos, Ciudad de México (México)

Brechla Moreno Arévalo  
Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios  
de la Salud, Ciudad de Panamá (Panamá)

También contribuyeron a la elaboración, edición y revisión de esta publicación las siguientes personas (por orden alfabético) de la Organización Panamericana de la Salud: Sylvain Aldighieri, Thais dos Santos, Leticia Franco, Gabriel González-Escobar, Lionel Gresh, Juliana Leite, Mariana Leone, Jairo Méndez-Rico y José Luis San Martín.

# Siglas

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>CDC</b>	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América (por su sigla en inglés)
<b>CHIKV</b>	virus del chikunguña (por su sigla en inglés)
<b>DENV</b>	virus del dengue (por su sigla en inglés)
<b>EEEV</b>	virus de la encefalitis equina del este (por su sigla en inglés)
<b>ELISA</b>	ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (por su sigla en inglés)
<b>EPP</b>	equipo de protección personal
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de América (por su sigla en inglés)
<b>IFI</b>	prueba de inmunofluorescencia indirecta
<b>IPK</b>	Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (Cuba)
<b>LCR</b>	líquido cefalorraquídeo
<b>MAC-ELISA</b>	ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas para captura de anticuerpos de tipo inmunoglobulina M (por su sigla en inglés)
<b>MAYV</b>	virus Mayaro (por su sigla en inglés)
<b>NS</b>	no estructural
<b>OROV</b>	virus Oropouche (por su sigla en inglés)
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa (por su sigla en inglés)
<b>PRNT</b>	prueba de neutralización por reducción de placas (por su sigla en inglés)
<b>RT-PCR</b>	reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (por su sigla en inglés)
<b>SGB</b>	síndrome de Guillain-Barré
<b>SLEV</b>	virus de la encefalitis de San Luis (por su sigla en inglés)

<b>VEEV</b>	virus de la encefalitis equina venezolana (por su sigla en inglés)
<b>WEEV</b>	virus de la encefalitis equina del oeste (por su sigla en inglés)
<b>WNV</b>	virus del Nilo occidental (por su sigla en inglés)
<b>YFV</b>	virus de la fiebre amarilla (por su sigla en inglés)
<b>ZIKV</b>	virus del Zika (por su sigla en inglés)



# Introducción

Los virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) infectan a los seres humanos principalmente a través de la picadura de artrópodos hematófagos (por ejemplo, mosquitos, garrapatas y jejenes). Hay más de 100 arbovirus que causan infección y enfermedad en los seres humanos. Estas infecciones pueden ser desde asintomáticas hasta poner en riesgo la vida (1).

Los arbovirus constituyen un grupo polifilético de virus de varias familias y géneros (1), e incluyen *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*), *Alphavirus* (familia *Togaviridae*), *Orthobunyavirus* (familia *Peribunyaviridae*), *Phlebovirus* (familia *Phenuiviridae*) y *Coltivirus* (familia *Reoviridae*). La mayoría tiene un genoma de ARN monocatenario (de sentido positivo para las familias *Flaviviridae* y *Togaviridae* y negativo para la familia *Peribunyaviridae* y *Phenuiviridae*), mientras que los de la familia *Reoviridae* tienen ácido ribonucleico (ARN) bicatenario (1). Los arbovirus más importantes en las Américas son los flavivirus, entre ellos, los virus del dengue (DENV, por su sigla en inglés), del Zika (ZIKV, por su sigla en inglés), de la fiebre amarilla (YFV, por su sigla en inglés), del Nilo occidental (WNV, por su sigla en inglés) y de la encefalitis de San Luis (SLEV, por su sigla en inglés). También son frecuentes los alfavirus, entre los que se encuentran los virus del chikunguña (CHIKV, por su sigla en inglés), Mayaro (MAYV, por su sigla en inglés) y los de las encefalitis equinas, y el virus Oropouche (OROV, por su sigla en inglés), del género *Orthobunyavirus*.

Esta publicación se elaboró como parte de la *Estrategia para la prevención y el control de las enfermedades arbovirales*, adoptada por el 55.º Consejo Directivo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en septiembre del 2016 (2). En particular, se refiere a la cuarta línea estratégica de acción, que destaca la importancia de reforzar la capacidad técnica de la Red de Laboratorios de Diagnóstico de Arbovirus en la Región de las Américas (RELDA) (2).

El propósito de esta publicación es brindar recomendaciones técnicas a los laboratorios de salud pública de las Américas sobre las muestras y pruebas que se usan en los laboratorios de vigilancia de las arbovirosis y la interpretación de sus resultados. El documento también le será útil a los centros de investigación y laboratorios de universidades que tengan que identificar infecciones arbovirales como parte de su investigación, para contribuir a la caracterización de los arbovirus y al entendimiento de su dinámica de transmisión.

Los virus que se incluyen aquí se seleccionaron en consenso de expertos y se agrupan en tres categorías:

- Arbovirus que circulan o han circulado reciente y ampliamente en las Américas y que causan una carga de enfermedad significativa: DENV, CHIKV, ZIKV y YFV.
- Arbovirus que han causado brotes en un número limitado de países y territorios de la Región y que tienen el potencial de reemerger en un futuro próximo: MAYV y OROV.
- Otros arbovirus neurotrópicos que circulan en la Región, cuyo potencial de reemergencia podría ser más limitado, pero que pueden causar cuadros clínicos de gravedad en seres humanos y animales; por ejemplo, los virus de las encefalitis equinas del este (EEEV), venezolana (VEEV) y del oeste (WEEV), WNV y SLEV.

La presentación clínica y el manejo de estas arbovirosis se describen en el *Instrumento para el diagnóstico y la atención a pacientes con sospecha de arbovirosis (3)*, que trata principalmente de las enfermedades causadas por DENV, CHIKV y ZIKV, e incluye también información sobre las enfermedades causadas por WNV, YFV, OROV, MAYV y los virus de las encefalitis equinas. El diagnóstico diferencial de estas enfermedades también se ha descrito en otras publicaciones (3-5).

# Emergencia y ciclo de vida de los arbovirus

## 1.1 Estructura, genoma y ciclo de vida de los arbovirus

Los virus presentados en este documento tienen envoltura y una sola cadena de ARN monocatenario como material genético, lo cual conlleva varias implicaciones para la detección viral: 1) los virus envueltos suelen ser menos estables que los virus no envueltos, lo cual afecta el aislamiento viral; 2) el ARN monocatenario es químicamente lábil y se degrada con facilidad en presencia de ribonucleasas, que siempre están presentes; en consecuencia, es necesario tomar medidas específicas para mantener la integridad de la partícula viral y su ARN genómico durante los procesos de obtención, manipulación, almacenamiento y transporte de las muestras; 3) la variabilidad genética de los virus ARN afecta el diagnóstico molecular, ya que los cambios en el genoma pueden repercutir en la capacidad de detectar el virus de manera eficiente; y 4) dentro de cada familia de arbovirus existen similitudes y diferencias estructurales y genéticas que pueden afectar la capacidad para detectar estos virus en forma específica.

### 1.1.1 Estructura, genoma y ciclo de vida de los flavivirus

El género *Flavivirus* abarca más de 50 especies, muchas de ellas transmitidas por artrópodos. Los viriones tienen envoltura y forma esférica, y su tamaño es de 40 a 60 nanómetros. La partícula viral consiste en un genoma ARN monocatenario lineal, no segmentado y de sentido positivo, de 10 a 11 kb, en una nucleocápside icosaédrica. La estructura del genoma, por lo general, se conserva entre los miembros del género, con genes que codifican tres proteínas estructurales: cápside (C), premembrana (prM) y envoltura (E), así como siete proteínas no estructurales (NS, por su sigla en inglés): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. El ciclo de vida del virus comienza con la unión de la proteína E a

los receptores celulares y la internalización del virus por endocitosis. Las condiciones al interior del endosoma favorecen la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma, con liberación de la cápside y el ARN genómico en el citoplasma. El ARN genómico funciona como ARN mensajero (ARNm), que se traduce en un polipéptido único en el retículo endoplásmico rugoso. A continuación, ese polipéptido es procesado por proteasas virales y de la célula hospedera en proteínas virales. El genoma viral se replica en el citoplasma de la célula hospedera mediante un ARN intermediario monocatenario de sentido negativo y luego se ensamblan nuevas partículas que maduran en los compartimientos intracelulares y se liberan de las células por exocitosis (6).

### 1.1.2 Estructura, genoma y ciclo de vida de los alfavirus

El género *Alphavirus* es el único de la familia *Togaviridae*. El virión del alfavirus tiene un diámetro de 70 nanómetros y contiene una copia única del ARN genómico monocatenario no segmentado de sentido positivo de aproximadamente 11 a 12 kb, una nucleocápside icosaédrica y una envoltura compuesta de una bicapa lipídica en la que se insertan glicoproteínas virales. El genoma viral codifica un polipéptido único que da origen a cinco proteínas estructurales: la cápside (C); las proteínas E2 y E3 de la envoltura (producidas a partir de un precursor único, pE2), 6K y E1. La proteína E2 reconoce los receptores de las células hospederas y la E1 participa en el proceso de fusión. Las proteínas no estructurales (NSP1-4) también se forman a partir de un solo polipéptido y participan en la replicación del genoma viral, en la regulación de la transcripción y traducción celular, y en la modulación de la respuesta inmunitaria innata. Durante una infección, el virus se une a un receptor de la célula hospedera que lo absorbe por endocitosis. El pH bajo del endosoma causa una reestructuración del virión, que a su vez induce la fusión de las membranas y la liberación posterior de la nucleocápside al citoplasma. El ARN viral se libera de la nucleocápside y permite la síntesis de proteínas no estructurales que activan la replicación viral (mediante un ARN intermediario monocatenario de sentido negativo) y la transcripción de un ARNm para la síntesis de proteínas estructurales. En el citoplasma se producen genomas nuevos, que se ensamblan con proteína C para formar nucleocápsides, mientras que las proteínas de la envoltura maduran en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Por último, se ensamblan las partículas virales nuevas secretadas a partir de la membrana celular (7, 8).

### 1.1.3 Estructura, genoma y ciclo de vida de los orthobunyavirus

El virus Oropouche (OROV, por su sigla en inglés) pertenece al género *Orthobunyavirus* de la familia *Peribunyaviridae*, el género más grande de virus ARN, que incluye más de 80 virus. Los virus de este género tienen envoltura y forma esférica, con un diámetro de 80 a 120 nanómetros. Su genoma es segmentado y se compone de tres moléculas de ARN monocatenarias de sentido negativo: L (grande, del inglés *large*) de 6,9 kb; M (mediano) de 4,5 kb y S (pequeño, del inglés *small*) de 1,5 kb. El segmento S codifica la nucleocápside y una proteína no estructural; el segmento M codifica las proteínas precursoras de la envoltura Gn y Gc, además de otra proteína no estructural. El segmento L codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN (o ARN replicasa). La unión del virión con la célula hospedera es mediada por las glicoproteínas Gc y Gn y seguida de la fusión y liberación de la nucleocápside en el citoplasma. El genoma es transcrito y los ARNm resultantes son traducidos para producir las



proteínas virales. El genoma se replica mediante ARN intermediarios de sentido positivo. Las proteínas Gc y Gn forman dímeros en el retículo endoplásmico y pasan al aparato de Golgi, donde se unen a ribonucleoproteínas (que contienen el genoma viral, la nucleocápside y la ARN replicasa) para formar los nuevos viriones. Por último, las células infectadas secretan las partículas virales (9).

El OROV, debido a la naturaleza segmentada de su genoma, puede recombinarse con otros virus del género *Orthobunyavirus*. Esta recombinación genómica genera diversidad y puede afectar las propiedades del virus, por ejemplo, su patogenicidad. Se han descrito varios virus resultantes de estas recombinaciones en Brasil, Perú y Venezuela, entre ellos, los virus Iquitos, Madre de Dios y Perdões (9, 10). Estos virus tienen los segmentos S y L del OROV y segmentos M únicos. Además de su relevancia biológica, la recombinación también puede influir en la detección de estos virus.

## 1.2 Origen y dinámica evolutiva de los arbovirus

Los arbovirus con relevancia clínica médica tienen en común su origen: surgen de ciclos naturales en los que participan vectores de especies selváticas de artrópodos (principalmente mosquitos) y vertebrados (mamíferos y aves) como hospederos amplificadores (11). La emergencia de arbovirus es un proceso relativamente frecuente, ejemplificado con la emergencia independiente de los DENV 1, 2 y 4, en los que se ha demostrado la existencia de antecesores selváticos exclusivos (12).

### 1.2.1 Factores principales de la emergencia de los arbovirus

La emergencia de los arbovirus y las epidemias que estos causan pueden considerarse un tema ecológico y evolutivo, ya que dependen, principalmente, del contacto físico entre seres humanos y virus en sus ciclos enzoóticos o epizooticos, así como de la adaptación de los virus a un hospedero nuevo y a vectores urbanos también nuevos. Las zonas rurales cercanas a bosques, la presencia de vectores puente que se alimentan de vertebrados selváticos y seres humanos, la caza, la deforestación, la minería y toda actividad humana en zonas rurales y selváticas aumentan el riesgo de que emerjan virus de fuentes selváticas (13, 14). El cambio climático, que también es consecuencia de la actividad antropogénica, se ha asociado a la mayor dispersión de los vectores y, por lo tanto, se lo considera otro factor de importancia en la emergencia de los virus (15).

La mayoría de los arbovirus son virus de ARN, cuya evolución rápida es consecuencia de la convergencia de tasas altas de mutación, poblaciones numerosas y tiempos de generación cortos (16). Las diversas etapas del proceso de transmisión viral hacen que los virus ARN respondan mediante la generación de poblaciones virales genéticamente heterogéneas o cuasiespecies (17). Las variantes virales pueden establecerse, extinguirse o mantenerse como polimorfismo por selección natural (según su ventaja selectiva) y deriva genética (al azar) (18).

### 1.2.2 Emergencia viral y ciclos de transmisión

La emergencia de los arbovirus en las poblaciones humanas se ha descrito como un proceso que ocurre paso a paso y que comienza con una infección por contacto directo fortuito con huéspedes o

vectores que constituyen el reservorio natural durante el ciclo selvático. La infección puede extenderse y pasar por diversas etapas (de esporádicas a frecuentes) hasta constituir un ciclo urbano de transmisión exclusiva de persona a persona (19). Se han descrito ciclos selváticos y enzoóticos entre los arbovirus que circulan en el medio urbano, hecho que respalda su emergencia o reemergencia de antecesores selváticos (20-23).

Los arbovirus pueden clasificarse en tres grupos, según su aparición y ciclo de transmisión. El primer grupo incluye los virus que circulan en un ciclo urbano, causan epidemias y son endémicos en varios países. Entre ellos están el DENV, CHIKV y, más recientemente, el ZIKV. El YFV formó parte de este grupo hasta la primera mitad del siglo xx, cuando el desarrollo de la vacuna y las campañas de erradicación del mosquito *Aedes aegypti*, vector de la infección, permitieron interrumpir el ciclo urbano de la fiebre amarilla en las Américas (24). Los arbovirus que han establecido un ciclo urbano se han mantenido gracias a diversos factores; entre ellos, el más importante es el aumento de la densidad demográfica. La primera vez que los virus traspasan los límites de su ciclo selvático se encuentran con una población sin inmunidad. De haber una población de vectores competentes de alta densidad, la transmisión suele ser eficaz y puede establecerse un comportamiento epidémico. Hay varios elementos que afectan la reproducción del mosquito en el medio urbano; entre ellos, la urbanización no planificada, sin servicios sanitarios ni agua potable y un desconocimiento del problema de parte de la comunidad cuya participación en acciones de control vectorial es insuficiente. Estos virus pueden lograr niveles epidémicos cuando la población humana susceptible es suficiente para mantener la transmisión; posteriormente, la incidencia disminuye, a medida que aumenta la inmunidad de rebaño. Cuando el número de personas susceptibles o la densidad del vector es muy baja o inexistente (por ejemplo, en la estación seca), el virus probablemente persiste como resultado de la transmisión vertical en el mosquito vector o debido a la tolerancia de sus huevos a la disecación y su capacidad de sobrevivir por largos períodos (25, 26).

El segundo grupo incluye a los arbovirus que tienen capacidad potencial o demostrada de transmitirse de persona a persona, aunque en la actualidad circulen en un ciclo enzoótico en el que participan vertebrados salvajes y mosquitos. Los arbovirus de este grupo pueden causar infecciones esporádicas en seres humanos por traspaso directo de los límites de su transmisión enzoótica o por vectores puente, como consecuencia de que haya seres humanos que viven o trabajan muy cerca de espacios naturales en las denominadas “zonas de emergencia”. Un ejemplo actual de este grupo es el YFV, que ha generado un brote significativo en Brasil desde fines del 2016, sin que haya pruebas de transmisión de persona a persona a través de vectores urbanos, especialmente, el mosquito *A. aegypti* (27, 28). La circulación enzoótica de OROV se ha descrito en las Américas con casos humanos esporádicos, además de transmisión sostenida por un vector urbano (*Culicoides paraensis*) (9, 10, 29). El virus de Mayaro (MAYV, por su sigla en inglés) también puede clasificarse en este grupo; recientemente hubo dos casos de coinfección MAYV-DENV y MAYV-CHIKV en una zona sin reservorios conocidos, lo cual podría indicar que la transmisión de MAYV de persona a persona es posible (30, 31).

No se ha observado la transmisión enzoótica de DENV, CHIKV y ZIKV en las Américas; sin embargo, preocupa su establecimiento potencial en relación con la salud pública (32, 33), ya que existe evidencia de infección o exposición de algunas especies de vertebrados salvajes y mosquitos (34-37).

El tercer grupo está constituido por arbovirus con ciclos epizooticos establecidos que abarcan la fauna salvaje o animales domésticos que actúan como hospederos o reservorios de amplificación y, de manera esporádica, afectan al ser humano como hospedero final (11). El límite principal al comportamiento epidémico de estos virus está en la baja viremia de los seres humanos, que no es suficiente para sostener una segunda ronda de transmisión (38, 39). No obstante, la circulación de estos arbovirus en hospederos de amplificación, que a menudo están en contacto estrecho con las personas, constituye una amenaza significativa y debería ser parte de la vigilancia epidemiológica. Algunos de los virus pertenecientes a este grupo son el WNV, el VEEV, el EEEV, el WEEV y el SLEV.

### 1.2.3 Variabilidad genética de los arbovirus

Los virus ARN se caracterizan por su evolución rápida, propiedad que se debe principalmente a la falta de actividad correctora de la replicasa viral o ARN polimerasa dependiente del ARN. En consecuencia, las mutaciones se incorporan en grandes números, a razón de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  sustituciones/nucleótido por ronda de replicación, es decir, un promedio de una mutación por genoma replicado en un genoma típico de 10 kb (40, 41). Dado que se produce hasta un total de  $10^{12}$  virus por día en un hospedero único, hay un número equivalente de mutaciones acumuladas que permiten, potencialmente, evitar cualquier condición adversa. En experimentos controlados con clones virales de variabilidad reducida, se ha demostrado que los virus ARN establecen rápidamente una población heterogénea de mutantes en el hospedero y favorecen así su potencial de adaptación y, por lo tanto, la colonización de hospederos nuevos (42). Las poblaciones virales pasan por un proceso de selección natural, que se basa en las capacidades de cada variante y su posibilidad de ser transmitida a hospederos nuevos (43). Por lo tanto, la adaptación del virus a dos o más especies necesarias para su ciclo de vida (especie humana y especie artrópoda) limita la acumulación de mutaciones y, en cierta medida, su evolución. En estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* se ha evaluado el riesgo de emergencia viral y la función de los diversos vectores y especies hospederas; en los resultados se describieron reemplazos mínimos de nucleótidos que regulan la capacidad de un arbovirus de reproducirse en un hospedero. Ejemplos de ello son la mutación CHIKV A226V como adaptación al mosquito *A. albopictus* durante la reemergencia del virus en el océano Índico (44); cambios para pasar de una dinámica enzoótica a una epizootica y epidémica relacionados con mutaciones del gen E2 del VEEV (45, 46), y mutaciones relacionadas con el aumento del potencial de transmisibilidad del ZIKV (47). No obstante, la variabilidad genética de los virus ARN está limitada por el umbral de error al cual la variabilidad es compatible con la capacidad de mantener la función proteínica y la integridad viral. Asimismo, los arbovirus deben poder replicarse en el vertebrado que les sirve de hospedero y en el vector filogenéticamente distante, lo cual es un obstáculo para el virus.

# Toma, conservación y transporte de muestras

## 2.1 Muestras para el diagnóstico de infecciones arbovirales

Los tipos de muestra que son útiles para diagnosticar las infecciones arbovirales dependen de la infección que se sospeche y se desee diagnosticar, del tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas y de la disponibilidad de la muestra. Los principales tipos de muestra figuran en el cuadro 1.

Además, se ha descrito el uso de muestras de sangre seca en papel de filtro para la detección de varias infecciones arbovirales por métodos virológicos y serológicos (48-53). Para decidir el uso de este tipo de muestras se deberá considerar la abundancia en la sangre capilar de la molécula que se quiera detectar (ARN o antígeno viral, anticuerpo), el tipo de papel de filtro y las condiciones de transporte y almacenamiento (54).

Es fundamental el cumplimiento de los criterios establecidos para la toma, la manipulación y el envío de las muestras para garantizar la confiabilidad de los resultados de las pruebas. Estos criterios y estándares deben ser elaborados por las autoridades de salud pública locales e incluir los siguientes puntos fundamentales:

- Personal calificado y entrenado en todos los pasos de toma, manipulación y envío de las muestras.

- Protocolos y estándares de calidad establecidos para la toma de muestras y la recopilación de la información del paciente.
- Condiciones de higiene y bioseguridad en las áreas de toma de muestras.
- Almacenamiento correcto de las muestras y trazabilidad de estas y de la información de los pacientes bajo estándares de calidad.
- Todas las muestras deben tomarse, guardarse y enviarse en envases plásticos (tubos y viales, entre otros) aprobados para uso clínico y deben identificarse con claridad. Nunca se deben usar envases de vidrio.
- Mantenimiento de la cadena de frío para garantizar la integridad de las muestras. La cadena de frío es esencial cuando se trata de los métodos moleculares, que requieren ARN viral no

### CUADRO 1 Muestras para el diagnóstico de infecciones arbovirales

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD RECOMENDADA	CANTIDAD MÍNIMA	TOMA Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA	TEMPERATURA DE MANIPULACIÓN Y TRANSPORTE
Sangre completa sin anticoagulante	5 ml	1 ml	Tubo sin anticoagulante	2-8 °C <sup>a</sup>
Suero	2,5 ml	0,5 ml	Sin aditivos	≤2-8 °C
Sangre completa con anticoagulante	5 ml	1 ml	Tubo con EDTA u otro anticoagulante <sup>b</sup>	2-8 °C <sup>a</sup>
Plasma <sup>c</sup>	2,5 ml	0,5 ml	Sin aditivos <sup>b</sup>	≤2-8 °C
Orina	5 ml	1 ml	Sin aditivos	≤2-8 °C
Saliva	2,5 ml	0,5 ml	Sin aditivos	≤2-8 °C
Líquido cefalorraquídeo <sup>d</sup>	1 ml	0,25 ml	Sin aditivos	≤2-8 °C
Líquido amniótico <sup>d</sup>	1 ml	0,25 ml	Sin aditivos	≤2-8 °C
Tejido fresco	1 × 1 × 1 cm	0,5 × 0,5 × 0,5 cm	Sin aditivos	≤2-8 °C
Tejido en solución estabilizadora de ARN	1 × 1 × 1 cm	0,5 × 0,5 × 0,5 cm	Solución estabilizadora de ARN	Según instrucciones del fabricante
Tejido fijado en formol	1 × 1 × 1 cm	0,5 × 0,5 × 0,5 cm	10% formol amortiguado <sup>e</sup>	Temperatura ambiente o 2-8 °C <sup>a</sup>
Bloques de tejido fijado en formol y embebido en parafina	n/a	n/a	n/a	Temperatura ambiente o 2-8 °C <sup>a</sup>

Notas: <sup>a</sup> No congelar.

<sup>b</sup> En los métodos moleculares, evitar el uso de heparina como anticoagulante.

<sup>c</sup> El plasma se considera equivalente al suero para la mayoría de las pruebas diagnósticas, con la excepción de análisis moleculares de plasma heparinizado. En este documento, cuando se menciona suero, se refiere a suero propiamente tal o a plasma no heparinizado, a no ser que se indique lo contrario.

<sup>d</sup> Solo por indicación clínica. No tomar una muestra con el solo propósito de identificar el agente etiológico.

<sup>e</sup> Usar aproximadamente 10 veces el volumen de la muestra.

ARN: ácido ribonucleico; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (por su sigla en inglés); n/a: no es aplicable.

degradado (y del aislamiento viral, para el que debe mantenerse la integridad de las partículas virales). Cuando sea difícil conservar la cadena de frío, la estabilidad del ARN en líquidos corporales o tejidos puede mantenerse mediante el agregado de soluciones comerciales estabilizadoras de ARN.

- Cumplimiento de estándares de uso y almacenamiento de datos e información personal del paciente.

## 2.2 Información epidemiológica y clínica adjunta a las muestras

A las muestras se debe adjuntar un conjunto mínimo de datos epidemiológicos y clínicos del paciente que respalden la selección de las pruebas por realizar y la interpretación de los resultados. Esta información suele volcarse en un formulario epidemiológico normalizado. La información demográfica debe incluir un código de identificación personal del paciente, edad, sexo, lugar de residencia, estado de embarazo y semana de gestación, historia de viaje reciente (con el destino y las fechas) y de vacunación contra la fiebre amarilla u otros arbovirus (con las fechas). La información clínica debe describir todos los signos y síntomas de la definición y la clasificación de caso de las enfermedades arbovirales (3, 4, 55), la fecha de inicio de los síntomas, si hubo necesidad de hospitalizar al paciente (y si se internó en cuidados intensivos), el diagnóstico clínico e información acerca del médico tratante. También debe incluir los resultados del laboratorio clínico (hemograma, resultado de la prueba de torniquete, análisis de orina y enzimas hepáticas) y datos de la toma de la muestra (tipo, fecha, hora, proveedor de servicios). Por último, se deben incluir las pruebas solicitadas. En los casos mortales, deberá adjuntarse el informe de la autopsia, si corresponde.

## 2.3 Envío de muestras al laboratorio

A continuación, se indican las recomendaciones generales para el envío de muestras al laboratorio:

- Las muestras deberán embalsarse de acuerdo con las normas locales e internacionales (56). Siempre se debe usar triple empaque.
- Deben incluirse todos los registros clínicos y epidemiológicos.
- Las muestras se enviarán, de ser posible, dentro de las primeras 48 horas a partir de la toma.
- Si las muestras se envían dentro de las 48 horas de la toma:
  - se mantendrán refrigeradas (2-8 °C);
  - se enviarán a una temperatura de  $\leq 2-8$  °C;
  - los tejidos fijados en formol pueden conservarse y enviarse a temperatura ambiente, y
  - las muestras de sangre no deben congelarse.
- Si el lugar donde se tomó la muestra tiene la capacidad necesaria, especialmente si las muestras no pueden enviarse dentro de las 48 horas indicadas:
  - separar el suero de la sangre completa o total;
  - congelar todas las muestras, con la excepción de las de sangre completa y tejidos fijados, y

- mantener la cadena de frío al enviar las muestras al laboratorio (se pueden utilizar geles refrigerantes, hielo seco o nitrógeno líquido).
- Es fundamental mantener la integridad de las muestras mediante la cadena de frío para aquellas en las que se realizarán pruebas por métodos virológicos directos.
- Las muestras para pruebas serológicas pueden mantenerse refrigeradas (2-8 °C) más tiempo para facilitar el traslado.
- En todos los casos, es necesario evitar los ciclos de congelación y descongelación.

## 2.4 Recepción y manipulación de las muestras en el laboratorio

Se deben garantizar las condiciones de higiene y bioseguridad en las áreas de recepción de muestras. Una vez recibidas las muestras en el laboratorio, es necesario documentar sus condiciones al momento de la recepción, y garantizar la trazabilidad de las alícuotas y las condiciones de almacenamiento correctas. También son esenciales los protocolos para la detección y la limpieza de derrames de muestras biológicas.

### 2.4.1 Sangre completa, suero, plasma y otros líquidos biológicos

Las recomendaciones que figuran a continuación se aplican a la sangre completa, al suero y a otros líquidos biológicos (orina, saliva y líquidos cefalorraquídeo y amniótico):

- Las muestras pueden mantenerse refrigeradas (2-8 °C) si se procesan o se envían al laboratorio de referencia en un plazo de 48 horas.
- Las muestras de sangre completa habrán de procesarse (suero o preparación de plasma) después de recibidas, sin haberlas congelado.
- Las muestras recibidas en el laboratorio deben separarse en varias alícuotas.
- Las muestras se mantendrán congeladas (-10 a -20 °C) si se van a procesar pasadas las 48 horas.
- Para el almacenamiento prolongado, las muestras para métodos serológicos se mantendrán congeladas de -10 a -20 °C (o menos), mientras que las muestras para métodos virológicos se mantendrán a -70 °C (o menos), siempre que sea posible.
- Es necesario evitar los ciclos de congelación y descongelación.

### 2.4.2 Muestras de tejido

Las recomendaciones siguientes se aplican a la manipulación de muestras de tejido:

- Las muestras de tejido fresco para extracción de ARN o aislamiento viral se procesarán de inmediato o se almacenarán a -70 °C (o menos) sin ningún aditivo.
- Las muestras de tejido en solución estabilizadora de ARN se procesarán o se congelarán, según las instrucciones del fabricante.

- Las muestras de tejido fijado deberán embeberse en parafina para los análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos. Los bloques de tejido fijado en formol y embebido en parafina se pueden almacenar a temperatura ambiente por períodos prolongados.
- Las muestras de tejido fijado y los bloques de parafina también sirven para la extracción de ARN, si no se dispone de muestras de tejido fresco o congelado.

### 2.4.3 Ácido ribonucleico

Las recomendaciones siguientes se aplican a la manipulación de muestras para extracción de ARN o de ARN ya extraído:

- Garantizar la ausencia de ribonucleasas.
- Almacenar el ARN extraído a una temperatura de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  o menor (el ARN se mantiene estable a esa temperatura por varios meses).

## 2.5 Envío de muestras a los laboratorios de referencia

Para el envío de muestras a los laboratorios de referencia, es preciso seguir las recomendaciones que se indican a continuación:

- Mantener la cadena de frío, preferiblemente con hielo seco o geles refrigerantes. Utilizar siempre triple empaque (56).
- Las muestras deberán enviarse, de preferencia, en un plazo de 48 horas después de obtenidas.
- Las muestras habrán de empacarse, marcarse y etiquetarse correctamente y registrarse como de categoría B (56, 57).
- A los envíos deben adjuntarse los registros clínicos y epidemiológicos completos. Las muestras de tejido deben ir acompañadas por el informe de la cirugía o de la autopsia.
- Cuando se envíen muestras de tejido fijado, es preferible hacerlo en bloques de parafina, a temperatura ambiente. Si se espera que durante el transporte la temperatura sea alta, pueden usarse geles refrigerantes (no congelar).
- Las muestras de tejidos fijados deben empacarse separadas de las de tejido fresco y otras muestras, ya que el formol es volátil y puede afectar esas últimas.
- El envío a los laboratorios de referencia regionales y a los centros colaboradores de la OPS/OMS se coordinará con el laboratorio destinatario y con la Oficina Regional de la OPS.



# Bioseguridad y flujo de trabajo en el laboratorio

## 3.1 Consideraciones sobre bioseguridad

El personal de laboratorio que trabaje con muestras biológicas deberá estar vacunado contra la hepatitis B y la fiebre amarilla; también tendrá que usar un equipo de protección personal (EPP). Además, se deberán tomar todas las precauciones necesarias para evitar la exposición percutánea. Las muestras biológicas frescas, cualquiera sea su tipo, deberán considerarse potencialmente infecciosas (58, 59). Todo proceso que incluya la manipulación de muestras debe realizarse en cabinas de bioseguridad de clase II certificadas. Lo anterior incluye la etapa de lisis realizada durante la extracción de ARN (véase el apartado 5.1.1.1). Las muestras obtenidas de la lisis se consideran no infecciosas, aunque esto podría no aplicarse en el caso de algunos virus, como el de Ébola (60). La manipulación de ARN extraído no necesita llevarse a cabo en cabinas de bioseguridad. Para las pruebas serológicas se podrá considerar la realización de los ensayos en cabinas de bioseguridad y la previa inactivación al calor de una alícuota de la muestra, siempre que el protocolo del ensayo lo permita. En general, los tejidos fijados se consideran no infecciosos. Las recomendaciones de bioseguridad relacionadas con el aislamiento de virus y pruebas de neutralización dependen de la cepa de virus que se cultive y de las normas nacionales (58). Para las pruebas de neutralización se recomienda utilizar cepas vacunales o de baja patogenicidad.

## 3.2 Flujo de trabajo en el laboratorio

Las pruebas de amplificación y detección de ácidos nucleicos, también denominadas pruebas moleculares, son muy sensibles, ya que pueden detectar cantidades mínimas (1 a 10 copias) de una secuencia nucleotídica de interés. Esto también constituye una desventaja, puesto que el ADN producido durante el proceso de amplificación puede contaminar el ambiente, los equipos e insumos del laboratorio. En consecuencia, los laboratorios deberán tener áreas específicas para cada fase de la realización de una prueba molecular. Cada una de esas áreas deberá contar con sus propios equipos, pipetas e insumos. Los reactivos y materiales no deberán contener nucleasas. Las superficies, estantes, cabinas, centrifugas y micropipetas deberán limpiarse de manera sistemática y ser descontaminadas con reactivos que eliminen las ribonucleasas, con radiación ultravioleta y con una solución recién preparada de hipoclorito de sodio al 10% seguida de etanol al 70%. Los EPP también serán de uso exclusivo para cada área del laboratorio. En general, se justifica contar con las tres áreas siguientes (61):

- Área de preparación de reactivos (área limpia) para almacenar insumos y preparar los reactivos y las mezclas. En este espacio no deberá haber muestras ni controles positivos.
- Área de preparación de muestras donde se preparan los controles positivos, se extrae el ácido nucleico y se agregan las muestras y los controles positivos a la mezcla.
- Área de amplificación para los instrumentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés).

El flujo del trabajo en el laboratorio debe ser unidireccional, desde el área de preparación de reactivos hasta la de preparación de muestras y, por último, al área de amplificación. No debe permitirse la circulación del personal en sentido contrario al flujo (en un mismo día), ni el de muestras, reactivos e insumos (62-64). En algunos laboratorios se reduce aún más el riesgo de contaminación mediante el uso de presión positiva en el área de preparación de reactivos y presión negativa en el resto del laboratorio. El uso de instrumentos de PCR en tiempo real evita la manipulación de productos de amplificación (amplicones), lo cual disminuye el riesgo de contaminación. Cuando se utiliza PCR convencional, es necesario contar con otra área dentro del laboratorio para la electroforesis, la purificación del amplicón para secuenciación del ADN o para PCR anidada. Habrá que maximizar las medidas de precaución para evitar la contaminación con las pruebas de PCR anidadas, cuyos productos de la primera ronda de amplificación sirven como diana para la segunda ronda.

# Diagnóstico por laboratorio del dengue, el chikunguña, el Zika y la fiebre amarilla

En este capítulo se describen los métodos de laboratorio para detectar las infecciones por DENV, CHIKV, ZIKV y YFV; también se analiza la interpretación de los resultados de las pruebas y el principio general de cada uno de los métodos de laboratorio.

## **4.1 Diagnóstico virológico: métodos directos**

Los métodos virológicos permiten la identificación directa de los virus o de uno de sus componentes. Los principales métodos son la detección de secuencias del genoma, la detección de antígenos y el aislamiento, que se describen a continuación.

### **4.1.1 Métodos moleculares: amplificación y detección del genoma viral**

Se han desarrollado varios métodos para la amplificación y detección subsiguiente de secuencias nucleotídicas específicas. Estas pruebas de amplificación de ácido nucleico se basan, en su mayoría, en la PCR. Otras técnicas, como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por su sigla en inglés) y la amplificación mediada por transcripción (TMA, por su sigla en inglés) también permiten la amplificación del genoma y pueden usarse para el diagnóstico molecular; por ejemplo, para la detección de ZIKV (65, 66).

#### **4.1.1.1 Extracción de ácido ribonucleico**

Para los métodos moleculares, suele ser necesario extraer los ácidos nucleicos de la muestra y purificarlos antes de la amplificación. Para ello, los líquidos corporales como el suero, el plasma, la orina, la saliva y el líquido cefalorraquídeo pasan por un proceso de lisis y extracción, mientras que las muestras de tejido fresco, fijado en formol o conservado en soluciones estabilizadoras de ARN, requieren un proceso previo de disrupción y homogenización. Los cortes de bloques de parafina deben desparafinarse con xilol u otros solventes antes de la disrupción y homogenización. Esta última puede lograrse mediante procedimientos enzimáticos o mecánicos. Según el tipo de muestra, existen diversos kits comerciales y protocolos caseros para la desparafinización, la disrupción, la homogeneización, la lisis y la purificación de ARN. Para la extracción del ARN, los insumos y los reactivos no deben contener ribonucleasas, las superficies de trabajo y el equipo utilizado en el proceso deben limpiarse en profundidad y se deben usar guantes sin talco.

#### **4.1.1.2 Transcripción inversa**

Dado que los virus analizados en este documento tienen un genoma ARN, es necesario sintetizar un ADN complementario (ADNc) a partir del ARN viral antes de la amplificación por PCR. Esto se logra por transcripción inversa. La combinación de ambas técnicas se denomina reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por su sigla en inglés).

La RT-PCR puede realizarse por dos métodos. Para el primero, es necesario obtener ADNc en un paso independiente, para el que se pueden usar hexámeros aleatorios, iniciadores de frecuencia específica o iniciador oligonucleótido poli-T (para virus con cola de poli-A). Si se busca detectar diversos agentes virales, es preferible usar hexámeros aleatorios, puesto que permiten la transcripción inversa de todos los ARN de la muestra. Luego se usa una alícuota de ADNc como molde para las PCR específicas de cada virus. El procedimiento completo se conoce como RT-PCR en dos pasos. En el otro método, conocido como RT-PCR en un solo paso, se usa una mezcla de transcriptasa inversa y ADN polimerasa en un solo tubo para la síntesis de ADNc de secuencia específica y su amplificación subsiguiente por PCR. A menudo, esta opción se recomienda con fines diagnósticos, porque no requiere manipulación del ADNc y, por lo tanto, disminuye el riesgo de contaminación.

#### **4.1.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa**

Estas pruebas pueden ser convencionales (o de punto final, en las que los productos finales de la amplificación se separan e identifican según su tamaño por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida) o en tiempo real (con monitoreo de la amplificación durante toda la reacción mediante fluorescencia). Algunas de estas pruebas pueden detectar diversos arbovirus de manera simultánea (pruebas o ensayos *multiplex*).

Las pruebas RT-PCR de referencia para la detección de DENV, CHIKV, ZIKV y YFV se describen en el cuadro 2. La lista no se limita a las pruebas que se pueden usar en la detección molecular de esos virus. Se pueden usar otras pruebas, siempre y cuando hayan sido evaluadas de manera rigurosa frente a las pruebas de referencia. Cabe destacar que la armonización de las pruebas que se usan en la Región

## CUADRO 2 Pruebas moleculares de referencia para la detección de ácido ribonucleico de los virus del dengue, el chikunguña, el Zika y la fiebre amarilla

VIRUS	TIPO DE PRUEBA	SECUENCIA DIANA	OBSERVACIONES
DENV, CHIKV y ZIKV <sup>1</sup>	RT-PCR <i>multiplex</i> en tiempo real	DENV: 5' UTR CHIKV: NSP1 ZIKV: envoltura	RT-PCR Trioplex en tiempo real para la detección simultánea de tres ARN virales
DENV <sup>2</sup>	RT-PCR <i>multiplex</i> en tiempo real	DENV-1: NS5 DENV-2: envoltura DENV-3: prM DENV-4: prM	CDC DENV-1-4 RT-PCR tiempo real para la detección simultánea y tipificación de los cuatro tipos de DENV
CHIKV <sup>3</sup>	RT-PCR <i>singleplex</i> en tiempo real	NSP1 NSP2	Iniciadores y sonda: CHIK856F, CHIK962C y CHIK908FAM Iniciadores y sonda: CHIKV3855F, CHIKV3957C y CHIKV3886FAM
ZIKV	RT-PCR <i>singleplex</i> en tiempo real	Envoltura <sup>4</sup> NS2b <sup>a</sup>	Usar solo los iniciadores y sonda: ZIKV 1087, 1163c y 1108FAM (antes denominados ZIKV 1086, 1162c y 1107FAM) También se pueden usar los iniciadores y sonda: ZIKV 4481, 4552c y 4507cFAM
YFV <sup>b</sup>	RT-PCR <i>singleplex</i> en tiempo real	5' UTR <sup>5</sup> 5' UTR <sup>a</sup>	Iniciadores y sonda: YFaIIIF, YFaIIIR y YFaIIP Iniciadores y sonda: YF14-34, YF115C y YF34-57FAM

Notas: <sup>a</sup> Departamento de Arbovirus de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América y sede regional de la OPS en Washington, DC. Las secuencias y los protocolos se encuentran disponibles en: <https://www.paho.org/es/temas/dengue/red-laboratorios-diagnostico-arbovirus-relda>.

<sup>b</sup> Estos protocolos detectan todas las cepas del virus, incluida la cepa vacunal YFV17D. Para la detección específica de la cepa YFV17D se puede considerar el protocolo de Hughes y col.: Hughes HR, Russell BJ, Mossel EC, Kayiwa J, Lutwama J, Lambert AJ. Development of a real-time reverse transcription-PCR Assay for global differentiation of yellow fever virus vaccine-related adverse events from natural infections. *J Clin Microbiol.* 2018;56(6).

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América (por su sigla en inglés); CHIKV: virus del chikunguña (por su sigla en inglés); DENV: virus del dengue (por su sigla en inglés); NS: proteína no estructural (por su sigla en inglés); prM: proteína premembrana; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (por su sigla en inglés); UTR: región no traducida (por su sigla en inglés); YFV: virus de la fiebre amarilla (por su sigla en inglés); ZIKV: virus del Zika (por su sigla en inglés).

Fuentes: <sup>1</sup> Santiago GA, Vazquez J, Courtney S, Matias KY, Andersen LE, Colon C, et al. Performance of the Trioplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. *Nat Commun.* 2018;9(1):1391.

<sup>2</sup> Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7):e2311.

<sup>3</sup> 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-S4.

<sup>4</sup> 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(8):1232-9. Doi: 10.3201/eid1408.080287.

<sup>5</sup> Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Mendez JA, Nakoune ER, et al. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol.* 2012;50(12):4054-60.

de las Américas facilitaría la comparación de los datos nacionales y también la asistencia técnica que puedan proporcionar la OPS y los centros colaboradores a los laboratorios de salud pública.

#### **4.1.1.4 Dinámica de la detección molecular de los arbovirus en distintas muestras biológicas**

El proceso de amplificación aumenta la sensibilidad de las pruebas moleculares. Estas pruebas también son muy específicas, siempre y cuando la región del genoma viral que se está amplificando muestre la diferencia entre el virus diana y otros virus genéticamente relacionados. Sin embargo, la sensibilidad real de las pruebas moleculares depende del nivel del ARN viral que se quiere detectar en una muestra biológica particular y de la dinámica temporal de esos niveles con respecto al inicio de los síntomas de la enfermedad. Hay varios ejemplos de situaciones que afectan la sensibilidad de la detección molecular: descenso de la viremia de DENV, CHIKV, ZIKV y YFV con el tiempo transcurrido a partir del inicio de los síntomas, menor viremia de ZIKV en comparación con DENV y CHIKV (67), o niveles más altos de ARN de ZIKV en orina en comparación con suero (4). Los plazos en que se pueden detectar DENV, CHIKV, ZIKV y YFV en muestras biológicas se describen en el cuadro 3. Es importante considerar que la fecha de inicio de los síntomas a menudo la proporciona el paciente y puede ser objeto de sesgo, en especial en los casos de infección por ZIKV, que suele causar pocos síntomas. Por último, la calidad de la muestra es clave para garantizar la sensibilidad de las pruebas moleculares.

#### **4.1.1.5 Métodos moleculares para el diagnóstico viral en casos mortales**

La infección por virus de la fiebre amarilla, al igual que por DENV y CHIKV (y, en algunos casos, ZIKV) puede ser letal. Por consiguiente, es importante confirmar o descartar estos casos mediante pruebas de laboratorio *post mortem*. Además de las muestras descritas en el cuadro 3, los métodos moleculares pueden usarse para detectar ARN viral en tejidos. El cuadro 4 contiene una lista de tejidos que pueden emplearse para el diagnóstico molecular de los casos mortales con sospecha de fiebre amarilla, dengue, chikunguña o zika.

#### **4.1.1.6 Métodos genéricos para detección molecular**

Algunas pruebas de RT-PCR tienen por objeto detectar el género del virus, con base en las secuencias genéticas conservadas entre virus de un mismo género. Por ejemplo, las pruebas genéricas están diseñadas para detectar virus de los géneros *Flavivirus*, *Alphavirus*, *Peribunyavirus* y *Phlebovirus*. Estas pruebas también se denominan pan-flavivirus, pan-alfavirus, pan-peribunyavirus y pan-flebovirus, respectivamente (68-75). En la actualidad, estas pruebas tienen limitaciones, entre las que se encuentran que son RT-PCR convencionales (y, a veces, RT-PCR anidadas), su sensibilidad es variable según el virus que se ha de detectar y suele ser más baja que las pruebas RT-PCR específicas para cada virus, y no han sido suficientemente evaluadas por los centros colaboradores de la OPS/OMS. Luego de obtener un resultado positivo mediante una prueba RT-PCR genérica, es necesario identificar el virus infectante mediante una prueba específica para ese virus o realizar la secuenciación del producto amplificado (véase el capítulo 7).

### CUADRO 3 Períodos de detección molecular de los arbovirus en muestras biológicas

VIRUS	TIPO DE MUESTRA	DÍAS TRANSCURRIDOS DESDE EL INICIO DE LOS SÍNTOMAS <sup>A</sup>
DENV <sup>1</sup>	Suero <sup>1</sup>	1-7
CHIKV <sup>2</sup>	Suero <sup>2</sup>	1-8
	Suero <sup>3</sup>	1-4 a 5 <sup>b</sup>
	Orina <sup>3</sup>	1-15 <sup>b</sup>
ZIKV	Sangre completa <sup>4,6</sup>	1-28
	LCR <sup>c,3</sup>	Indiferente <sup>d</sup>
	Saliva <sup>3</sup>	1-4 a 5
YFV	Suero <sup>7</sup>	1-10

Notas: <sup>a</sup> En general, se observa un descenso de la viremia de DENV, CHIKV, ZIKV y YFV con el tiempo transcurrido a partir del inicio de los síntomas, lo que puede afectar la sensibilidad de la detección molecular.

<sup>b</sup> Se han registrado períodos de detección más largos en mujeres embarazadas: Oduyebo T, Polen KD, Walke HT, Reagan-Steiner S, Lathrop E, Rabe IB, et al. Update: Interim guidance for health care providers caring for pregnant women with possible Zika virus exposure - United States (Including U.S. territories), July 2017. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2017;66(29):781-93.

<sup>c</sup> Solo por indicación clínica. No tomar la muestra con el solo propósito de identificar el agente etiológico.

<sup>d</sup> Si bien la sospecha de síndrome neurológico podría darse fuera del período de detección, se recomienda realizar la detección molecular en las muestras disponibles (véase el apartado 4.3).

CHIKV: virus del chikunguña (por su sigla en inglés); DENV: virus del dengue (por su sigla en inglés); LCR: líquido cefalorraquídeo; YFV: virus de la fiebre amarilla (por su sigla en inglés); ZIKV: virus del Zika (por su sigla en inglés).

Fuentes: <sup>1</sup> Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América. Dengue: Laboratory Guidance and Diagnostic Testing. Atlanta: CDC; 2017 [consultado el 6 de diciembre del 2018]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dengue/clinicalab/laboratory.html>.

<sup>2</sup> Organización Panamericana de la Salud, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América. Preparedness and response for chikungunya virus introduction in the Americas. Washington, DC: OPS; 2011 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/CHIKV-English.pdf>.

<sup>3</sup> Organización Panamericana de la Salud. Guía para la vigilancia de la enfermedad por el virus del Zika y sus complicaciones. Edición 2018. Washington, DC: OPS; 2018 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49518>.

<sup>4</sup> Santiago JM, Vazquez J, Courtney S, Matias KY, Andersen LE, Colon C, et al. Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. Nat Commun. 2018;9(1):1391.

<sup>5</sup> Lustig Y, Mendelson E, Paran N, Melamed S, Schwartz E. Detection of Zika virus RNA in whole blood of imported Zika virus disease cases up to 2 months after symptom onset, Israel, December 2015 to April 2016. Euro Surveill. 2016;21(26).

<sup>6</sup> 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.

<sup>7</sup> Organización Panamericana de la Salud. Diagnóstico por laboratorio de la infección por virus de la fiebre amarilla. Washington, DC: OPS; 2018 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=46875&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=46875&lang=es).

Estas pruebas pueden servir para realizar un tamizaje más amplio de los virus que podrían estar presentes en la muestra. En un caso con sospecha de infección, una combinación de pruebas RT-PCR genéricas podría ser útil para determinar el género del agente etiológico, luego de la cual se hará una RT-PCR específica o secuenciación nucleotídica. Las pruebas genéricas también pueden usarse para el tamizaje de muestras de vigilancia con resultados negativos para los virus sospechados clínicamente. Así, podrían detectarse virus no caracterizados antes en la Región, como sucedió con la identificación de virus del complejo Punta Toro (género *Phlebovirus*, familia *Phenuiviridae*) en Panamá (76).

#### CUADRO 4 Muestras para detección molecular de los virus del dengue, el chikunguña, el Zika y la fiebre amarilla en casos mortales

VIRUS	MUESTRA RECOMENDADA	OTRAS MUESTRAS
DENV <sup>1,2</sup>	Hígado	Bazo, riñón, pulmón, ganglios linfáticos, timo, médula ósea, LCR <sup>a</sup> y cerebro <sup>a</sup>
CHIKV <sup>3</sup>	b	Suero, LCR <sup>a</sup> cerebro <sup>a</sup> y cualquier muestra de tejido disponible <sup>b</sup>
ZIKV <sup>4</sup>	Cerebro, hígado, riñón y placenta	-
YFV <sup>5</sup>	Hígado, riñón	Bazo, cerebro, pulmón, corazón y ganglios linfáticos

Notas: <sup>a</sup> Útil en los casos con sospecha de encefalopatía o encefalitis por DENV o CHIKV.

<sup>b</sup> No se recomienda ninguna muestra en particular. Tratar de hacer la detección en cualquier muestra disponible.

CHIKV: virus del chikunguña (por su sigla en inglés); DENV: virus del dengue (por su sigla en inglés); LCR: líquido cefalorraquídeo; YFV: virus de la fiebre amarilla (por su sigla en inglés); ZIKV: virus del Zika (por su sigla en inglés).

Fuentes:

<sup>1</sup> Organización Mundial de la Salud. Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control: nueva edición. Ginebra: OMS; 2009 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44504>.

<sup>2</sup> Organización Mundial de la Salud. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control. 2.ª edición. Ginebra: OMS; 1997 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41988/9241545003\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41988/9241545003_eng.pdf).

<sup>3</sup> Organización Panamericana de la Salud, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América. Preparedness and response for chikungunya virus introduction in the Americas. Washington, DC: OPS; 2011 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/CHIKV-English.pdf>.

<sup>4</sup> Organización Panamericana de la Salud. Guía para la vigilancia de la enfermedad por el virus del Zika y sus complicaciones. Edición 2018. Washington, DC: OPS; 2018 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49518>.

<sup>5</sup> Organización Panamericana de la Salud. Diagnóstico por laboratorio de la infección por virus de la fiebre amarilla. Washington, DC: OPS; 2018 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=46875&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=46875&lang=es).

### 4.1.2 Detección de antígenos virales

La detección de antígenos virales, es decir, proteínas y glicoproteínas, depende principalmente de su presencia y abundancia en las muestras biológicas. El mejor antígeno arboviral para detección en suero es la proteína NS1 del DENV. La detección de antígenos por inmunohistoquímica en cortes de tejido también es útil en los casos mortales en que se sospeche una infección por arbovirus, en especial los causados por la fiebre amarilla.

#### 4.1.2.1 Detección de la proteína DENV NS1 mediante ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas

La proteína NS1 del DENV es secretada por las células infectadas y puede detectarse en suero, tanto en individuos con una infección primaria como secundaria. El período de detección es más largo en las infecciones primarias (es decir, la primera infección por DENV de una persona) que en las secundarias (infecciones posteriores por DENV) (figura 1). De la misma manera, la sensibilidad de la detección es más baja en las infecciones secundarias. En general, la concentración de la proteína NS1 en suero disminuye a lo largo de la infección y, en simultáneo, se reduce la sensibilidad de la detección. Si bien la cinética temporal de la proteína NS1 varía entre las infecciones primarias y secundarias, por lo general no es posible determinar si la infección aguda del paciente es una u otra al momento de analizar las muestras. La sensibilidad de la detección de NS1 también varía entre los serotipos de DENV (77-82).



La proteína NS1 del DENV se puede detectar en el laboratorio por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por su sigla en inglés). También hay pruebas inmunocromatográficas para detectar la proteína, pero son menos sensibles que las de ELISA y, por lo general, no se recomiendan para los laboratorios de referencia. Ya se han evaluado varios ELISA y pruebas rápidas de NS1 en la Región y se ha determinado su sensibilidad y especificidad (78, 83). No obstante, estas evaluaciones tuvieron lugar antes de la emergencia del ZIKV en la Región y, por lo tanto, será necesario reevaluar su especificidad en la situación epidemiológica actual de circulación simultánea de varios flavivirus).

Hasta el momento, no se han evaluado antígenos para la detección de CHIKV, ZIKV o YFV en suero ni en otros tipos de muestra.

#### 4.1.2.2 Detección de antígenos virales por inmunohistoquímica

Para la confirmación del diagnóstico de casos de arbovirosis mortales, puede detectarse antígeno en cortes de tejido por inmunohistoquímica o por inmunofluorescencia. Los antígenos se detectan mediante anticuerpos específicos, que pueden conjugarse con un fluoróforo o una enzima para la detección (método directo) o que pueden detectarse por medio de un anticuerpo secundario conjugado (método indirecto). En general, esos métodos se combinan con análisis histopatológicos para detectar alteraciones histológicas típicas de algunas arbovirosis, como los cuerpos de Councilman en el hígado de los pacientes con fiebre amarilla. Hoy en día, se emplea la técnica de inmunohistoquímica sobre todo para la detección de antígeno de YFV, en cuyo caso, los tejidos preferidos son los de hígado y riñón (84). Las muestras de bazo, cerebro, pulmón, corazón y ganglio linfático también pueden ser útiles (cuadro 5). Se recomienda el uso de anticuerpos monoclonales debidamente caracterizados, por ejemplo, 2D12 (85). La técnica de inmunohistoquímica también se ha aplicado en el diagnóstico de casos mortales de dengue (86, 87) y chikunguña (5) (cuadro 5).

### **CUADRO 5** Muestras para la detección de virus del dengue, el chikunguña y la fiebre amarilla por inmunohistoquímica en casos mortales

VIRUS	TEJIDO RECOMENDADO	OTRAS MUESTRAS DE TEJIDO
YFV	Hígado, riñón	Bazo, cerebro, pulmón, corazón y ganglio linfático
DENV	Hígado	Bazo, riñón, pulmón, ganglio linfático, timo, médula ósea y cerebro <sup>a</sup>
CHIKV	Cerebro <sup>a</sup>	Cualquier otra muestra de tejido disponible <sup>b</sup>

Notas: <sup>a</sup> Útil en los casos con sospecha de encefalopatía o encefalitis por DENV o CHIKV.

<sup>b</sup> No se recomienda una muestra en particular. Tratar de hacer la detección en cualquier muestra disponible.

CHIKV: virus del chikunguña (por su sigla en inglés); DENV: virus del dengue (por su sigla en inglés); LCR: líquido cefalorraquídeo; YFV: virus de la fiebre amarilla (por su sigla en inglés); ZIKV: virus del Zika (por su sigla en inglés).

### 4.1.2.3 Potencial reactividad cruzada en pruebas de detección de antígeno viral

La detección de antígenos virales depende del uso de anticuerpos y, dada la similitud de los antígenos virales dentro de un mismo género, es necesario tomar en cuenta la posibilidad de reactividad cruzada entre las pruebas, ya que puede afectar su especificidad. En particular, debe evaluarse el desempeño de las pruebas de ELISA y las pruebas rápidas de NS1 de DENV cuando exista circulación simultánea de diversos flavivirus (por ejemplo, DENV, ZIKV y YFV). A la fecha, dos estudios han informado una especificidad alta de las pruebas de ELISA y de NS1 de DENV en casos de zika confirmados por laboratorio (88, 89). Los anticuerpos monoclonales para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia también deben ser seleccionados y evaluados cuidadosamente para garantizar su especificidad.

### 4.1.3 Aislamiento viral

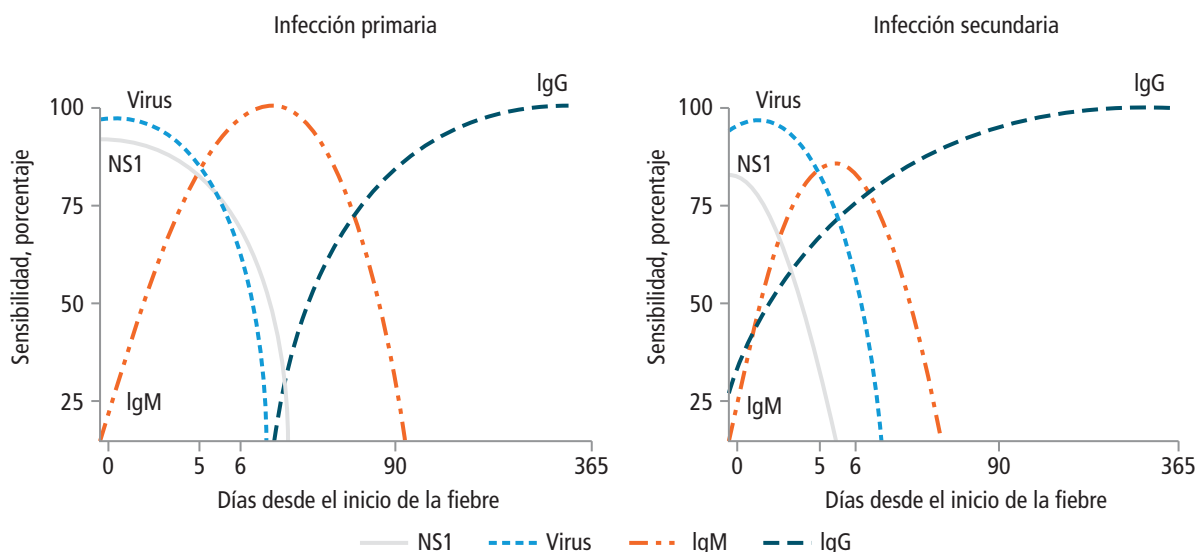
El aislamiento de los virus se lleva a cabo principalmente en cultivo celular o por inoculación de ratones lactantes y otros roedores. A menudo se utilizan líneas celulares de mamíferos (sobre todo, cultivos de células Vero) al igual que células de mosquitos (por ejemplo, cultivos de células C6/36) (86, 90, 91). Se puede usar una amplia variedad de muestras para el aislamiento de arbovirus, incluidos suero, sangre completa, LCR, tejidos de seres humanos y de animales, y mosquitos. En casos mortales, las muestras de tejido deben tomarse dentro de las 24 horas posteriores a la muerte.

En la mayoría de las infecciones por arbovirus, el aislamiento viral no se usa para el diagnóstico habitual ni es un requisito para la confirmación del diagnóstico. La complejidad técnica (entre otras, la necesidad de contar con infraestructura para la preparación y el mantenimiento de los cultivos de células y bioterios), los costos y la bioseguridad necesaria en relación con ciertos virus, así como la necesidad de identificar los virus aislados por RT-PCR o por inmunofluorescencia, complican el uso y la oportunidad temporal del diagnóstico mediante aislamiento viral. Sin embargo, es importante aislar cepas cuyo genotipo y fenotipo se puedan caracterizar y que puedan servir como referencia y controles para las pruebas serológicas y moleculares. Por lo demás, el aislamiento del virus permite detectar virus nuevos, con lo cual se convierte en un instrumento importante de la vigilancia de virus emergentes y reemergentes.

## 4.2 Diagnóstico serológico: métodos indirectos

Los métodos serológicos se basan en la detección de la respuesta inmunitaria a la infección viral, en particular, los anticuerpos que se detectan principalmente en suero (y LCR en los casos de enfermedad neurológica). La sensibilidad de los métodos serológicos depende, sobre todo, de la dinámica temporal de la producción de anticuerpos, que ha sido bien caracterizada en el caso de las infecciones por DENV (55, 92). En la infección primaria, los anticuerpos IgM anti-DENV aumentan de forma gradual durante la primera semana después del inicio de los síntomas, mientras que los anticuerpos IgG se pueden detectar entre el quinto y el séptimo día de inicio de los síntomas (figura 1). En comparación, durante una infección secundaria por DENV, los anticuerpos IgG se producen antes y alcanzan niveles más altos, mientras que los niveles de anticuerpos IgM suelen ser más bajos que en la infección primaria (92, 93).

**FIGURA 1** Cinética del virus del dengue, la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG en muestras de suero en infecciones primarias y secundarias



Fuente: Adaptada de Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Dengue Clinical Case Management (DCCM) course. Atlanta: CDC; 2018. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dengue/training/cme/ccm/page53677.html>.

Los anticuerpos IgM disminuyen en las semanas o meses posteriores a la infección, aunque también se ha descrito una persistencia más larga según el virus infectante. Los anticuerpos IgG son de larga duración y pueden detectarse de por vida.

#### 4.2.1 Detección de anticuerpos de tipo inmunoglobulina M

Los anticuerpos IgM contra distintos arbovirus pueden detectarse por ELISA, principalmente mediante la utilización de la prueba de ELISA de captura de anticuerpos de tipo IgM (MAC-ELISA, por su sigla en inglés) u otras pruebas inmunológicas, como las de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Varios laboratorios han elaborado procedimientos caseros para pruebas MAC-ELISA que utilizan virus inactivados o proteínas virales recombinantes como antígenos. Las elaboradas por los centros colaboradores de la OPS/OMS incluyen las de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América (CDC, por su sigla en inglés) para ZIKV, DENV, CHIKV y YFV (5, 94-96) y las del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí de Cuba (IPK) para DENV (52, 86) (cuadro 6). Es más, se han optimizado kits a partir de las pruebas MAC-ELISA de los CDC para YFV y del IPK para DENV que facilitan su utilización (86, 94) (cuadro 6). Además, hay varias pruebas comerciales para detectar anticuerpos IgM. La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de América (FDA, por su sigla en inglés) ha autorizado varias pruebas ELISA para detectar IgM de DENV y ZIKV (97-99). El desempeño de varias pruebas comerciales también ha sido evaluado con conjuntos de muestras bien caracterizadas por los laboratorios de la Región, especialmente para

## CUADRO 6 Pruebas de IgM de referencia para la detección de infecciones por los virus del dengue, el chikunguña, el Zika y la fiebre amarilla

VIRUS	TIPO DE MUESTRA	PRUEBAS DE LOS CENTROS COLABORADORES DE LA OPS/OMS	PRUEBAS APROBADAS POR LA FDA	EVALUACIONES REALIZADAS POR LOS CENTROS COLABORADORES DE LA OPS/OMS
DENV	Suero, LCR <sup>a</sup>	Dengue MAC-ELISA de los CDC <sup>1</sup> MAC-ELISA dengue del IPK <sup>2, 3</sup>	4	5-7,b
CHIKV	Suero, LCR <sup>a</sup>	MAC-ELISA CHIKV de los CDC <sup>8</sup>	-	9
ZIKV	Suero, LCR <sup>a</sup>	MAC-ELISA Zika de los CDC <sup>10,11</sup>	11,12	13, 14
YFV	Suero, LCR <sup>a</sup>	MAC-ELISA YF de los CDC <sup>1,15</sup> MAC-HD YF de los CDC <sup>15</sup>	-	-

Notas: <sup>a</sup> Solo por indicación clínica. No tomar la muestra con el solo propósito de identificar el agente etiológico.

<sup>b</sup> Estas evaluaciones se realizaron antes de la introducción del ZIKV en la Región; la reactividad cruzada con este virus no se estudió.

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América (por su sigla en inglés); CHIKV: virus del chikunguña (por su sigla en inglés); DENV: virus del dengue (por su sigla en inglés); FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de América (por su sigla en inglés); IPK: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí de Cuba; LCR: líquido cefalorraquídeo; MAC-ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas para captura de anticuerpos de tipo IgM (por su sigla en inglés); OPS/OMS: Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud; YFV: virus de la fiebre amarilla (por su sigla en inglés); ZIKV: virus del Zika (por su sigla en inglés).

Fuentes: <sup>1</sup> Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol.* 2000;38(5):1823-6.

<sup>2</sup> Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización de los virus del dengue. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2013.

<sup>3</sup> Vazquez S, Saenz E, Huelva G, Gonzalez A, Kouri G, Guzman M. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. *Rev Panam Salud Publica.* 1998;3(3):174-8.

<sup>4</sup> Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos de América, Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos de América. Global Unique Device Identification Database (GUDID). Bethesda: NLM; 2018 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://accessgudid.nlm.nih.gov/>.

<sup>5</sup> 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):e3171.

<sup>6</sup> Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):436-40.

<sup>7</sup> Programa Especial para la Investigación y Capacitación de Enfermedades Tropicales, Iniciativa para una Vacuna Pediátrica contra el Dengue.

Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. Ginebra: OMS; 2009 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44067>.

<sup>8</sup> Organización Panamericana de la Salud, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América. Preparedness and response for chikungunya virus introduction in the Americas. Washington, DC: OPS; 2011 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/CHIKV-English.pdf>.

<sup>9</sup> Johnson BW, Goodman CH, Holloway K, de Salazar PM, Valadere AM, Drebot MA. Evaluation of commercially available chikungunya virus immunoglobulin M detection assays. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(1):182-92.

<sup>10</sup> 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(8):1232-9. Doi: 10.3201/eid1408.080287.

<sup>11</sup> Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos de América. Zika virus response updates from FDA: emergency use authorization. Silver Spring: FDA; 2022 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-issues/zika-virus-response-updates-fda#eua>.

<sup>12</sup> Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos de América. Zika virus response updates from FDA: medical products. Silver Spring: FDA; 2022 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-issues/zika-virus-response-updates-fda#medicalproducts>.

<sup>13</sup> Basile AJ, Goodman C, Horiuchi K, Sloan A, Johnson BW, Kosoy O, et al. Multi-laboratory comparison of three commercially available Zika IgM enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol Methods.* 2018;260:26-33.

<sup>14</sup> Basile AJ, Ao J, Horiuchi K, Semenova V, Steward-Clark E, Schiffer J. Performance of InBios ZIKV Detect 2.0 IgM Capture ELISA in two reference laboratories compared to the original ZIKV Detect IgM Capture ELISA. *J Virol Methods.* 2019;271:113671.

<sup>15</sup> Basile AJ, Goodman C, Horiuchi K, Laven J, Panella AJ, Kosoy O, et al. Development and validation of an ELISA kit (YF MAC-HD) to detect IgM to yellow fever virus. *J Virol Methods.* 2015;225:41-8.

DENV (83, 100, 101), CHIKV (102) y ZIKV (103, 104) (cuadro 6). No obstante, es necesario señalar que las evaluaciones de las pruebas de DENV se llevaron a cabo antes de la emergencia del ZIKV en las Américas y que la reactividad cruzada con ese último virus no se estudió (83, 100, 101). En consecuencia, es necesario realizar más evaluaciones para determinar su especificidad. Como en el caso de los métodos moleculares, la lista de pruebas de referencia no limita el desarrollo ni el uso de otras pruebas, las que habrá que evaluar antes de utilizarlas para la vigilancia sistemática.

La detección de IgM se realiza en suero o en LCR en los casos de enfermedad neurológica con muestra disponible. En estos casos, se recomienda procesar en paralelo las muestras de suero y LCR. La muestra de LCR se estudia pura o poco diluida (dilución máxima de 1:5). La presencia de IgM en el LCR confirma una infección reciente del sistema nervioso central teniendo siempre en cuenta la potencial persistencia de los anticuerpos IgM y la potencial reactividad cruzada entre virus de un mismo género (véase el apartado 5.2.4).

#### **4.2.2 Detección de anticuerpos de tipo inmunoglobulina G**

En general, los anticuerpos de tipo inmunoglobulina G (IgG) se detectan por ELISA, a pesar de que se pueden usar otras técnicas, como la inmunofluorescencia, la fijación del complemento y la inhibición de la hemaglutinación, al igual que los inmunoensayos por microesferas (MIA, por su sigla en inglés). Dado que los anticuerpos IgG son de larga duración, el valor diagnóstico de las mediciones de IgG en una única muestra es limitado. Para confirmar la infección es necesario detectar seroconversión de IgG o un aumento de cuatro veces o más de los títulos de IgG entre la muestra de la etapa aguda y la muestra de la etapa de convalecencia (94). Para la titulación se necesita una prueba de IgG cuantitativa, pero la mayoría de las pruebas comerciales de IgG son cualitativas. Además, la reactividad cruzada de los anticuerpos IgG entre virus del mismo género limita también el uso de la detección de IgG (véase el apartado 4.2.4). No obstante, estudios recientes sugieren que los anticuerpos contra la proteína NS1 muestran una mejor especificidad que los anticuerpos contra la proteína de la envoltura, lo cual podría ayudar al diagnóstico (103, 105, 106).

#### **4.2.3 Detección de anticuerpos neutralizantes**

La detección de anticuerpos neutralizantes mediante la prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT, por su sigla en inglés) es considerada el ensayo de referencia para la detección serológica de infecciones arbovirales (107). La PRNT, al igual que otras pruebas de neutralización, se basa en la capacidad de los anticuerpos séricos de las personas infectadas de inhibir (es decir, neutralizar) la infección viral en cultivos celulares. Se usan diluciones seriadas de suero para calcular el título necesario para reducir el número de placas virales en determinada proporción (por ejemplo, 90% para PRNT<sub>90</sub>). Para la prueba se necesita contar con las condiciones para realizar cultivo celular, además de los recursos y el tiempo necesarios. Se ha usado una gran variedad de líneas celulares, cepas virales y otras condiciones y métodos analíticos para PRNT, por lo que la estandarización de las condiciones de este ensayo es esencial (107-109).

En general, se requiere una seroconversión o un aumento de cuatro veces o más de los títulos de anticuerpos entre la muestra de la etapa aguda y la muestra de la etapa de convalecencia para la confirmación del agente infectante. No obstante, se ha observado reactividad cruzada entre anticuerpos neutralizantes contra virus de un mismo género, especialmente en personas con infección secundaria por flavivirus, que pueden mostrar un aumento de los títulos de anticuerpos neutralizantes a varios flavivirus de manera simultánea (95, 110). Por esta razón, se recomienda realizar la detección concomitante de anticuerpos neutralizantes contra un panel de flavivirus que contenga los virus relevantes según el contexto epidemiológico. Sin embargo, en la infección secundaria, el incremento de los títulos contra el virus que causó la infección primaria puede ser mayor que el aumento de los títulos contra el virus que causa la infección secundaria, fenómeno conocido como el *pecado original antigénico* (111). Este fenómeno complica la interpretación de los resultados.

#### 4.2.4 Limitaciones de los métodos serológicos

Las técnicas serológicas tienen varias limitaciones. La primera es que un resultado positivo de una prueba para IgM en una muestra única es solo presuntivo de infección aguda, ya que los anticuerpos detectados pueden provenir de una infección reciente no necesariamente originada por el cuadro agudo. En el caso de enfermedades para las cuales hay vacuna, los anticuerpos detectados también pueden provenir de una vacunación reciente. La persistencia de anticuerpos IgM aún no se ha caracterizado del todo para infecciones por DENV, CHIKV, ZIKV y YFV, y algunos datos parecen indicar que esos anticuerpos pueden persistir por más tiempo de lo que se pensó en un comienzo (112-114). En el caso de los anticuerpos IgG, que persisten por más tiempo que los anticuerpos IgM, su detección en una única muestra solo sirve para una interpretación provisional. Para la confirmación de la infección aguda por el laboratorio es necesario tener muestras pareadas: una de la fase aguda (habitualmente obtenida en la primera semana después del inicio de los síntomas) y otra de la fase convaleciente (obtenida, de manera ideal, al menos dos semanas después de la primera). La seroconversión de IgM (resultado negativo de la muestra de la fase aguda y positivo de la de convalecencia) o un aumento de la IgG o de los títulos de anticuerpos neutralizantes entre las dos muestras (aumento de cuatro veces o más de los títulos de anticuerpos) confirman la infección aguda. Sin embargo, la confirmación del agente etiológico se ve limitada por la reactividad cruzada de las pruebas serológicas en infecciones por virus de un mismo género o por la vacunación contra ellos.

La reactividad cruzada es más frecuente en las infecciones secundarias que en las primarias; por lo tanto, en zonas donde circulan de forma simultánea o han circulado diversos flavivirus (la situación epidemiológica actual en gran parte de las Américas), la probabilidad de reactividad cruzada es alta. También se ha observado reactividad cruzada entre distintos alfavirus, aunque no se ha caracterizado tan ampliamente como en los flavivirus. Por ende, las muestras con resultados positivos de IgM para un flavivirus o alfavirus habrán de analizarse con un panel de pruebas de IgM. Las pruebas diferenciales que se utilicen habrán de basarse en la situación epidemiológica de la zona de residencia o exposición del caso en cuestión. En la actualidad, hay pruebas más específicas en desarrollo. En general, las pruebas de neutralización tienen mayor especificidad que las de detección de anticuerpos IgM o IgG. Aun así,

la reactividad cruzada entre flavivirus también se ha documentado en las pruebas de neutralización (95, 115) y se recomienda realizar pruebas diferenciales con un panel de flavivirus. Como ya se indicó, sobre todo en infecciones secundarias, puede que sea posible determinar el flavivirus infectante, aun cuando se realicen pruebas paralelas para varios virus.

Por último, la escasez de pruebas comerciales evaluadas por separado y de reactivos para las pruebas de referencia caseras limitan aún más el uso de los métodos serológicos.

#### **4.2.5 Uso e interpretación de los métodos serológicos**

A pesar de sus limitaciones, las pruebas serológicas forman parte de los métodos de diagnóstico de las infecciones por arbovirus por varias razones: 1) el uso de los métodos virológicos depende de la disponibilidad de muestras de buena calidad obtenidas de manera oportuna; 2) el paciente puede presentarse al diagnóstico cuando ha pasado la fase virémica; 3) no siempre se dispone de métodos virológicos, porque para ellos se necesitan áreas y equipos específicos en el laboratorio; además, los métodos serológicos (en particular, las pruebas de ELISA caseras) son mucho más baratos y más fáciles de realizar que los virológicos y pueden utilizarse con mayor facilidad en una red de laboratorios locales; 4) la combinación de métodos virológicos y serológicos puede mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico (84, 116); y 5) los métodos serológicos son esenciales cuando el virus y sus componentes se encuentran con menor frecuencia en muestras biológicas, como en el caso de recién nacidos con síndrome congénito por zika o en pacientes con síndromes neurológicos asociados a la infección por ZIKV u otros arbovirus.

Cuando solo se cuenta con resultados de laboratorio provenientes de pruebas serológicas, su interpretación debe hacerse con cautela. Por ejemplo, cuando se aplican métodos serológicos en muestras únicas para la vigilancia sistemática de un virus en particular, las tendencias observadas pueden deberse a un virus diferente, aunque del mismo género, y los resultados deberán interpretarse como tales mientras no se obtenga más información. El personal de salud y los pacientes, mediante orientación antes y después de la realización de la prueba, deberán conocer estas limitaciones para evitar así una interpretación errónea de los resultados. La integración de la información del laboratorio con los antecedentes clínicos y epidemiológicos y su análisis por equipos multidisciplinarios locales y nacionales deberán tener prioridad a la hora de interpretar los resultados y, de ser necesario, para las acciones de alerta y respuesta.

### **4.3 Algoritmos recomendados para el diagnóstico por laboratorio de infecciones por los virus del dengue, el chikunguña, el Zika y la fiebre amarilla**

Los algoritmos diagnósticos recomendados incluyen métodos moleculares y serológicos. Los algoritmos se utilizan para el diagnóstico del paciente y en la vigilancia epidemiológica y de laboratorio. Permiten dar seguimiento a una situación epidemiológica determinada y la consecuente aplicación de acciones de prevención y control. Los algoritmos constituyen una guía para las autoridades nacionales y

los laboratorios de referencia, y deben de ser adaptados a cada lugar y situación epidemiológica de forma dinámica.

Cuando se aplica un algoritmo, se deben considerar: 1) la situación epidemiológica del área o país, que puede ser variable debido a factores ambientales, climáticos y demográficos, políticas de vacunación y de salud en general, virus circulantes y antecedentes inmunitarios de la población, entre otros; 2) la capacidad del laboratorio para utilizar los algoritmos recomendados tanto a nivel nacional como local; 3) la disponibilidad de pruebas y reactivos necesarios, que puede ser limitada; y 4) la situación epidemiológica específica, ya se trate de un brote por un virus conocido, la emergencia de un nuevo virus en el área o país, o la circulación simultánea de varios virus, que puede afectar la aplicación e interpretación de los algoritmos de laboratorio. Por lo tanto, los algoritmos recomendados que se describen a continuación deben adaptarse en cada país a las necesidades de la vigilancia epidemiológica y a la capacidad de laboratorio. Además, es importante integrar los resultados de laboratorio con la información clínica, epidemiológica y ambiental para una caracterización adecuada de la situación epidemiológica.

Debido a las limitaciones de los métodos serológicos mencionados, siempre que sea posible deberá darse prioridad a los métodos virológicos, en especial a los moleculares, con la debida consideración de los costos y la eficiencia. También habría que realizar la toma y el análisis de muestras pareadas de las fases aguda y convaleciente para un subconjunto de los casos. Este abordaje puede facilitar la determinación del agente etiológico por serología; asimismo, es indispensable para evaluar el desempeño de las pruebas de diagnóstico serológico y es especialmente relevante en presencia de un nuevo brote. Por último, en la situación epidemiológica actual, en la que circulan simultáneamente varios alfavirus y flavivirus en la Región, el análisis con métodos serológicos de la respuesta inmunitaria en muestras pareadas, junto con la detección molecular de la etiología viral, podrían a menudo ser necesarios para la caracterización íntegra de los brotes.

### **4.3.1 Casos sospechosos de dengue, chikunguña y zika**

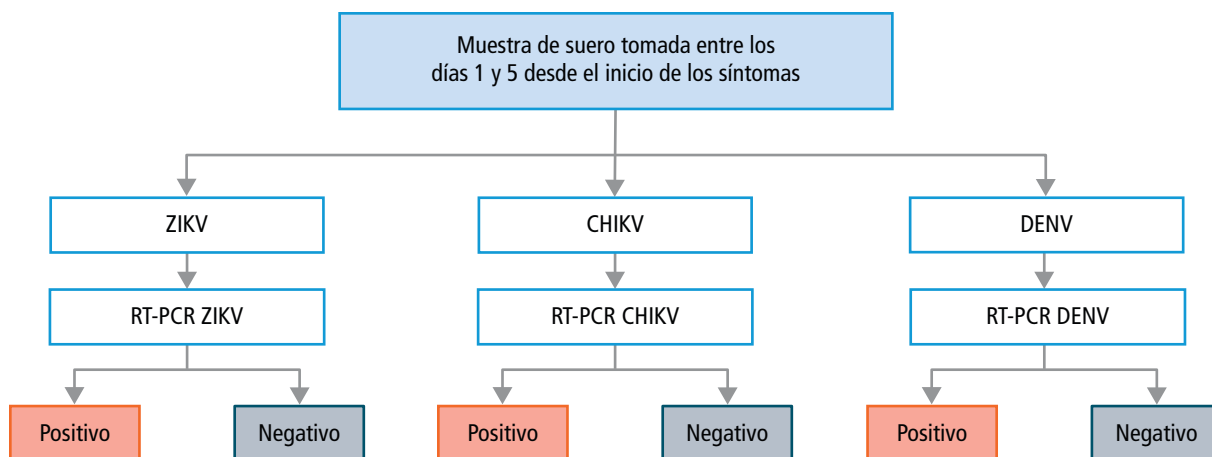
Los algoritmos para pruebas virológicas y serológicas de casos sospechosos de dengue, chikunguña y zika (figuras 2 y 3) ya han sido publicados (4).

#### **4.3.1.1 Pruebas virológicas**

Según la presentación clínica, del contexto epidemiológico y de la disponibilidad de ensayos de RT-PCR *multiplex*, la detección de DENV, CHIKV y ZIKV puede intentarse de manera secuencial o en paralelo. Como se indica en la figura 2, durante la fase aguda de la infección, el suero es la muestra preferida para las pruebas habituales de RT-PCR de DENV, CHIKV y ZIKV. Sin embargo, la orina y la sangre completa también se pueden usar para la detección de ZIKV en la fase aguda. Mientras que ZIKV típicamente muestra una viremia baja y corta, DENV y CHIKV pueden detectarse en el suero hasta por 7 y 8 días, respectivamente. Los períodos de probable presencia de los ARN virales en diferentes tipos de muestras se resumen en el cuadro 3. Durante la fase aguda, también se puede usar la prueba de



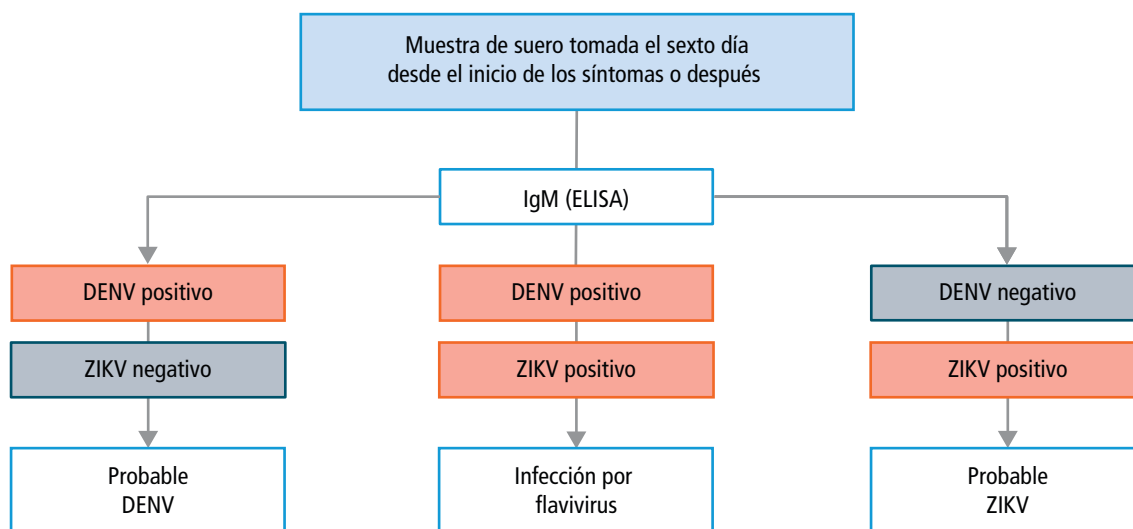
**FIGURA 2** Algoritmo para pruebas virológicas en casos sospechosos de dengue, chikunguña y zika



*Nota:* CHIKV: virus del chikunguña; DENV: virus del dengue; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; ZIKV: virus del Zika, por sus siglas en inglés.

*Fuente:* Adaptada de Organización Panamericana de la Salud. Guía para la vigilancia de la enfermedad por el virus del Zika y sus complicaciones. Washington, DC: OPS; 2018. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49518>.

**FIGURA 3** Algoritmo para pruebas serológicas en casos sospechosos de dengue y zika



*Nota:* CHIKV: virus del chikunguña; DENV: virus del dengue; ELISA: ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas; ZIKV: virus del Zika, por sus siglas en inglés.

*Fuente:* Adaptada de Organización Panamericana de la Salud. Guía para la vigilancia de la enfermedad por el virus del Zika y sus complicaciones. Washington, DC: OPS; 2018. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49518>.

antígeno NS1 de DENV (en este caso, solo la muestra de suero es adecuada). Por último, los resultados negativos de RT-PR pueden ser causados por una fase virémica ya terminada y, en estos casos, se pueden realizar pruebas serológicas.

#### **4.3.1.2 Pruebas serológicas**

Para las pruebas serológicas se requieren muestras de suero. Como se presenta en los apartados 4.2.4 sobre las limitaciones de los métodos serológicos y 4.2.5 sobre el uso y la interpretación de los métodos serológicos, una prueba de IgM positiva en una muestra única no confirma una infección aguda. Según el contexto epidemiológico, es posible que deban incluirse en el diagnóstico diferencial otros flavivirus que no sean DENV y ZIKV. En ausencia de otros resultados de laboratorio, las pruebas positivas para más de una IgM de flavivirus se interpretan como una infección reciente por flavivirus. Las pruebas de anticuerpos neutralizantes (realizadas idealmente en muestras de la fase aguda y de la fase de convalecencia pareadas) pueden esclarecer los resultados de reactividad cruzada. Es de destacar que la IgM también puede no estar presente o encontrarse por debajo de los límites de detección en algunas infecciones secundarias por flavivirus.

La infección por CHIKV no se incluye en el algoritmo, ya que la serología de alfavirus muestra mucha menos reactividad cruzada que la serología de flavivirus. Sin embargo, según el contexto epidemiológico, podría ser necesario el diagnóstico diferencial con otros alfavirus.

#### **4.3.1.3 Consideraciones especiales para casos con sospecha de síndrome de Guillain-Barré y otros síndromes neurológicos asociados al virus del Zika**

En estos casos, es necesario obtener muestras de sangre y orina, que serán procesadas por métodos moleculares, cualquiera sea el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas. Cuando por indicación clínica se obtengan muestras de LCR, también habrán de analizarse por métodos moleculares. Las muestras de orina son las que han mostrado mayor sensibilidad para métodos moleculares, con aproximadamente 60% de resultados positivos; la sensibilidad en suero, plasma y LCR es baja (de aproximadamente 5%) (117-123). Si bien un resultado positivo por una prueba molecular confirma la infección por ZIKV, un resultado negativo no descarta la infección, por lo cual habrá que realizar pruebas serológicas. Para ello podrán usarse muestras de suero y LCR, cuyos resultados se interpretarán según los algoritmos generales (figuras 2 y 3). Cualquier resultado de IgM positivo para ZIKV sugiere que el caso se asocia con ZIKV, ya que la asociación de DENV con el síndrome de Guillain-Barré (SGB) es menos común. Sin embargo, dada la persistencia potencial de anticuerpos IgM, también habrá que considerar, y descartar, otras causas de SGB antes de confirmar que el SGB se debe a una infección reciente por ZIKV (4).

#### **4.3.1.4 Consideraciones especiales para casos sospechosos de microcefalia y otros síndromes congénitos asociados al virus del Zika**

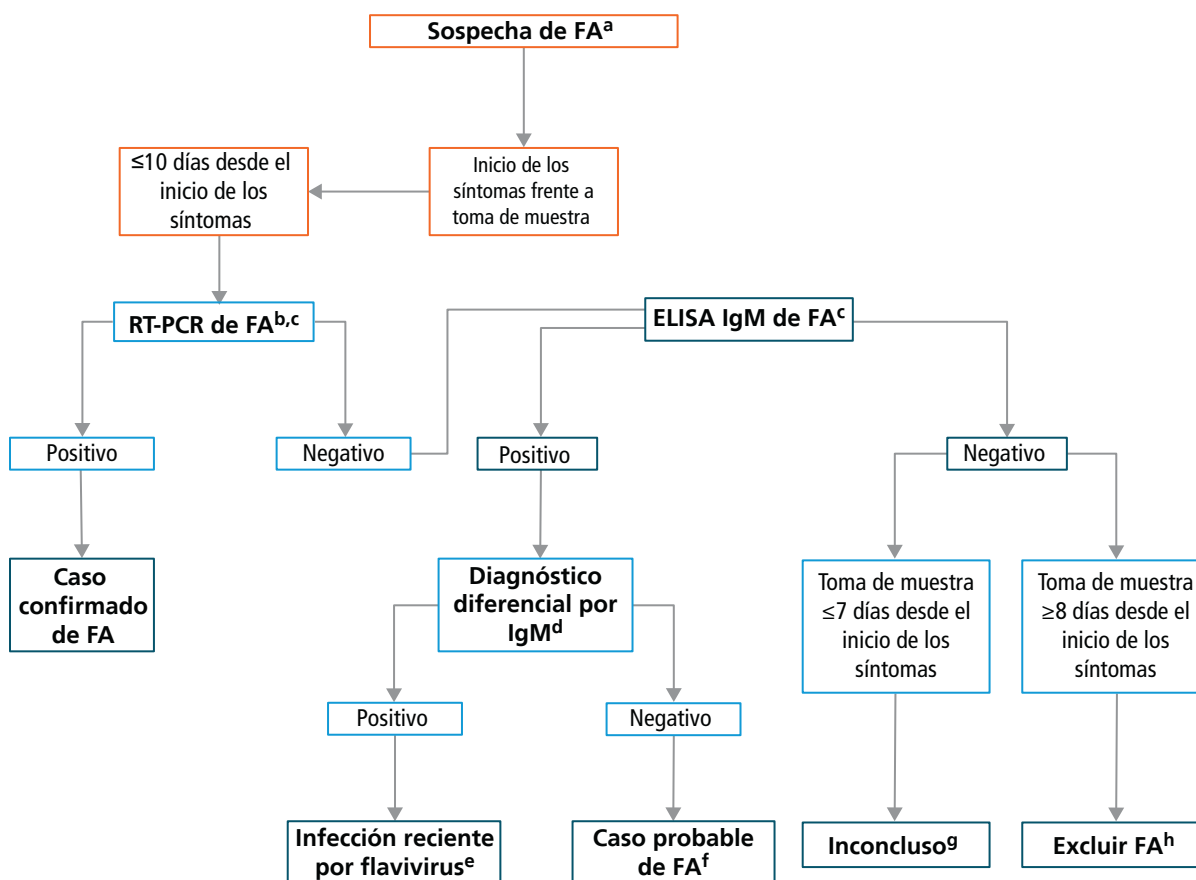
La infección por ZIKV en las embarazadas puede detectarse según se recomienda en los algoritmos de las figuras 2 y 3. Se ha observado que el período de detección, tanto en suero como en orina, es más

largo en las embarazadas (124). El virus también se puede detectar en líquido amniótico. Al nacimiento, se debe tomar una muestra de tejido placentario, además de suero y orina del recién nacido (124). De tomarse sangre del cordón umbilical, habrá que hacerlo con cuidado para evitar la contaminación de la muestra con sangre materna. Las muestras de sangre y orina del recién nacido deben tomarse durante los dos primeros días de vida. Se debe tratar de llevar a cabo la detección molecular de ZIKV en tejido placentario, sangre y orina (y LCR si se obtuvo por razones clínicas), aunque la mayoría de las pruebas son negativas al nacimiento. Por lo tanto, es esencial la serología en casos con resultados negativos de las pruebas moleculares. Dado que la infección intrauterina por ZIKV probablemente sea la primera infección por flavivirus del recién nacido, se considera que la detección de anticuerpos IgM de ZIKV sugiere la infección por ese virus (4). Cuando se sospeche infección congénita por ZIKV, se recomienda hacer pruebas de laboratorio para descartar otras infecciones, como citomegalovirus, virus del herpes simple, rubéola, virus de la inmunodeficiencia humana, toxoplasmosis y sífilis (4). Es importante destacar el estudio conjunto de la madre y el recién nacido para facilitar la interpretación de los resultados de serología. Por ejemplo, una prueba IgG o PRNT negativa para ZIKV en la madre al momento del parto permite descartar la infección por este agente.

#### **4.3.2 Casos sospechosos de fiebre amarilla**

Los algoritmos para la confirmación de casos de fiebre amarilla (figura 4), incluidos los casos mortales (figura 5) se presentan y analizan en las recomendaciones de la OPS para el diagnóstico por laboratorio de la infección por virus de la fiebre amarilla (84).

**FIGURA 4** Algoritmo para la confirmación de casos de fiebre amarilla por laboratorio



Notas: <sup>a</sup> Sin historial de vacunación de fiebre amarilla en los últimos 30 días o con historial de vacunación desconocido.

<sup>b</sup> Los laboratorios que solo tengan la capacidad de realizar RT-PCR o ELISA IgM deben procesar las muestras con la técnica disponible. Los resultados deben interpretarse de acuerdo con el algoritmo.

<sup>c</sup> La sensibilidad de la RT-PCR es mayor en los primeros 10 días desde el inicio de los síntomas. Sin embargo, se ha descrito la detección hasta 14 días desde el inicio, en particular en casos graves (y mortales).

<sup>d</sup> Debe incluir el virus del dengue, así como otros flavivirus, dependiendo de la situación epidemiológica de la zona o el país.

<sup>e</sup> Considerar la posibilidad de realizar una prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT, por su sigla en inglés) en un laboratorio de referencia. Este resultado no descarta la fiebre amarilla. Por tanto, en zonas en las que no se ha registrado circulación reciente de esta última, este resultado debe ser investigado.

<sup>f</sup> Un resultado positivo por IgM en una muestra única no es confirmatorio. Deben emplearse criterios clínicos y epidemiológicos adicionales para la interpretación final del caso, en particular en zonas en las que no se ha registrado circulación reciente de fiebre amarilla.

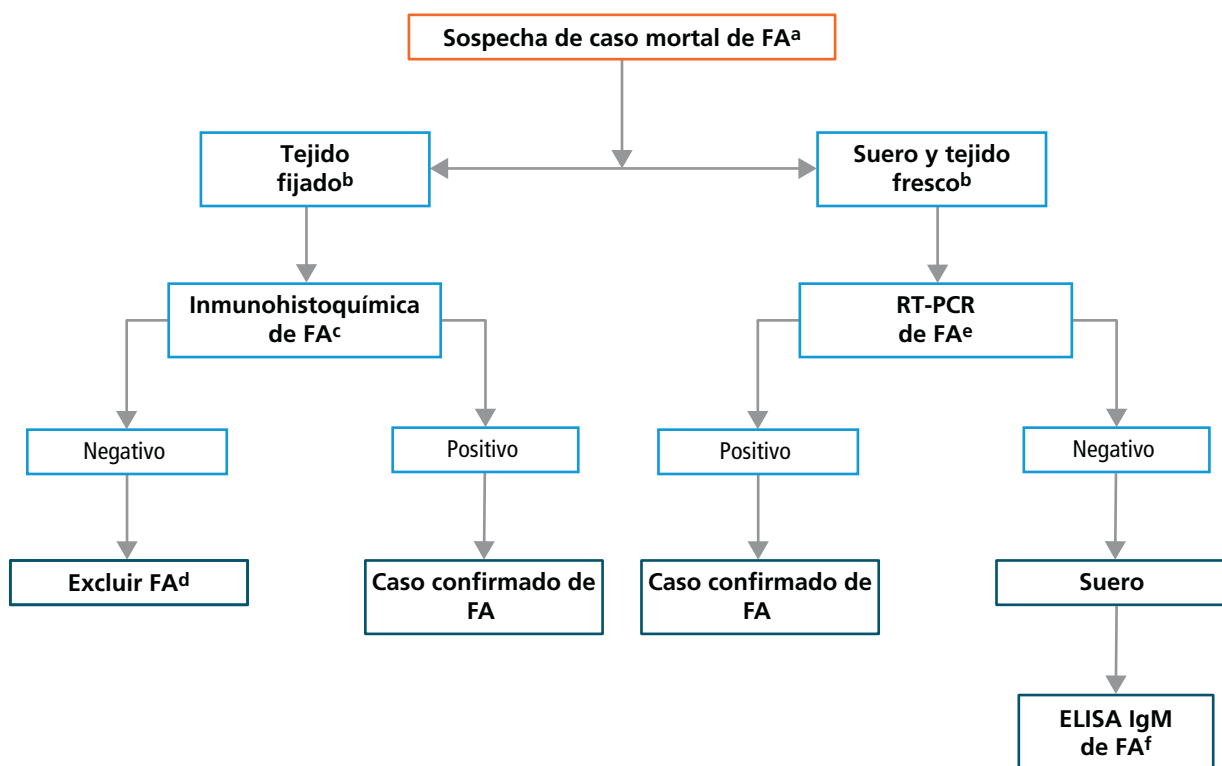
<sup>g</sup> Solicitar una segunda muestra y procesarla de acuerdo con el algoritmo.

<sup>h</sup> Investigar los casos y realizar el diagnóstico clínico diferencial.

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (por su sigla en inglés); FA: fiebre amarilla; IgM: inmunoglobulina M; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (por su sigla en inglés).

Fuente: Adaptada de Organización Panamericana de la Salud. Diagnóstico por laboratorio de la infección por virus de la fiebre amarilla. Washington, D.C.: OPS; 2018. Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=46875&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=46875&lang=es).

**FIGURA 5** Algoritmo para la confirmación por laboratorio de casos mortales de fiebre amarilla



*Notas:* <sup>a</sup> Sin historial de vacunación de fiebre amarilla en los últimos 30 días o con historial de vacunación desconocido.

<sup>b</sup> Deben tomarse muestras de tejido fresco y fijado, en particular del hígado y del riñón.

<sup>c</sup> La inmunohistoquímica debe realizarse en tejido hepático y renal y, de ser posible, en otros tejidos.

<sup>d</sup> Investigar los casos y realizar el diagnóstico clínico diferencial.

<sup>e</sup> La RT-PCR debe realizarse con ARN extraído a partir de suero y tejido fresco.

<sup>f</sup> Seguir la interpretación descrita en el algoritmo para confirmación por laboratorio de casos de fiebre amarilla (véase la figura 4).

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (por su sigla en inglés); FA: fiebre amarilla; IgM: inmunoglobulina M; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (por su sigla en inglés).

*Fuente:* Adaptada de Organización Panamericana de la Salud. Diagnóstico por laboratorio de la infección por virus de la fiebre amarilla. Washington, DC: OPS; 2018. Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=46875&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=46875&lang=es).

# Diagnóstico por laboratorio de infecciones por los virus Mayaro y Oropouche

## 5.1 Infección por el virus Mayaro

La fiebre de Mayaro es causada por el virus del mismo nombre (género *Alphavirus*, familia *Togaviridae*). El virus Mayaro (MAYV, por su sigla en inglés) forma parte del complejo del virus del bosque Semliki; este es un grupo serológico de alfavirus que incluye al CHIKV y que puede presentar reactividad cruzada entre sus miembros. Ese hecho, aunado a la naturaleza inespecífica de los síntomas de la infección por MAYV y el carácter endémico de diversos arbovirus en la Región de las Américas, puede llevar a errores de diagnóstico.

Las pruebas de laboratorio para detectar MAYV incluyen la detección de ARN viral en el suero por RT-PCR (125-127), y el aislamiento del virus que se puede realizar mediante la inoculación de suero, sangre completa o tejidos del paciente en cultivos de células C6/36 o de células Vero, o por inoculación intracerebral en ratones lactantes (128-130). Sin embargo, el período de viremia es corto (en general, hasta seis días después del inicio de síntomas), lo cual afecta el uso de estas técnicas. Por otra parte, los anticuerpos IgM contra MAYV se producen de 3 a 5 días después del inicio de síntomas y pueden durar hasta por tres meses, mientras que los anticuerpos IgG duran años (128-130). Se han usado diversas pruebas serológicas caseras para detectar anticuerpos contra el MAYV, entre ellas, ELISA, inmunofluorescencia, inhibición de la hemaglutinación, fijación de complemento o pruebas de neutralización (128-130). Esas pruebas, incluida la de ELISA IgM, pueden presentar reactividad cruzada con otros alfavirus, especialmente los del complejo del virus del bosque de Semliki, aunque en menor

medida que para los flavivirus (131) (véase el apartado 4.2.4). El MAYV induce la formación de placas en células Vero o BHK-21, lo que permite el uso de la PRNT. Entre las pruebas serológicas, la PRNT se considera como el estándar de oro para demostrar la infección por MAYV, aunque también puede presentar reactividad cruzada. La confirmación por serología requiere, en general, muestras de la fase aguda y de la fase de convalecencia pareadas para establecer la seroconversión o el aumento del título de anticuerpos (128). Por lo tanto, si las muestras apropiadas están disponibles, se prefieren las pruebas moleculares.

## 5.2 Infección por el virus Oropouche

El virus Oropouche (OROV, por su sigla en inglés), que causa la fiebre de Oropouche, es parte del serogrupo Simbu, del género *Orthobunyavirus*, familia *Peribunyaviridae*, que incluye varios virus clasificados en siete complejos y dos subclados filogenéticos (9). Al igual que otros arbovirus que causan enfermedad febril, el diagnóstico clínico del OROV es muy difícil. Se ha observado leucopenia y aumento de las enzimas transaminasas en algunos pacientes, aunque se trata de signos inespecíficos (10, 29). Por consiguiente, el diagnóstico de laboratorio es esencial para confirmar los casos de fiebre de Oropouche. Un aspecto relevante que hay que considerar en relación con el diagnóstico de laboratorio de este virus es que tiene un genoma de tres segmentos: S, M y L (véase el apartado 1.1.3). La fase aguda de la fiebre de Oropouche dura habitualmente entre dos y siete días (9, 10, 29) y en ese período puede lograrse la detección molecular o el aislamiento viral. Los métodos moleculares son útiles para detectar genoma viral en muestras de suero y de LCR (9, 10, 29, 126). La mayoría estos métodos se basan en la detección del segmento S, aunque también es importante el segmento M para distinguir los OROV recombinantes de los que no lo son (9, 132). El aislamiento viral puede realizarse por inoculación intracerebral en ratones lactantes o por inoculación en cultivos de células Vero o de células C6/36 (9).

Los anticuerpos se detectan en suero durante la fase de convalecencia, en general a partir del quinto día de inicio de los síntomas (9, 29). El diagnóstico serológico de OROV incluye métodos caseros, como la PRNT, la fijación de complemento, la inmunofluorescencia, la inhibición de la hemaglutinación y el ELISA IgM e IgG (9, 10, 29). También se han detectado anticuerpos IgM e IgG en muestras de LCR (10).

Al igual que con otros arbovirus, se prefiere realizar pruebas moleculares, siempre y cuando se cuente con las muestras apropiadas.

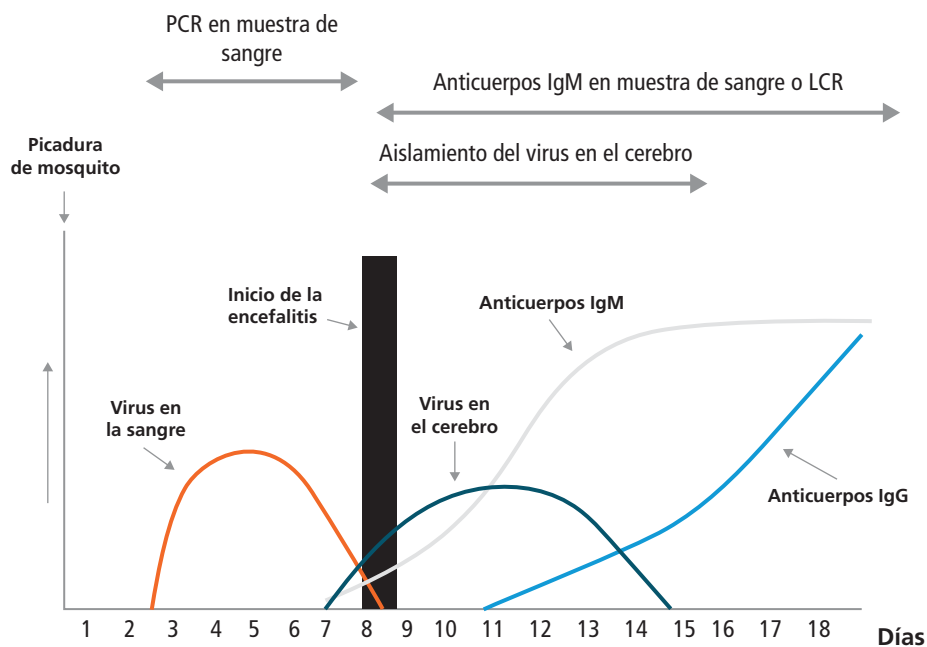
# Diagnóstico por laboratorio de otras infecciones arbovirales neurotrópicas

La infección por arbovirus de diversas familias y provenientes de distintas zonas geográficas puede causar manifestaciones neurológicas inmediatas o tardías en los seres humanos. Esas infecciones incluyen las causadas por flavivirus (WNV, SLEV, virus de la encefalitis japonesa [JEV, que actualmente no circula en las Américas], entre otros) y alfavirus (por ejemplo, EEEV, VEEV, WEEV). Es más, las infecciones por DENV, CHIKV y ZIKV también se han asociado con encefalitis y otros síndromes neurológicos (3-5, 55). Existen pautas de la OPS y los CDC para el diagnóstico por laboratorio de la infección por WNV (133, 134) y de la OMS para el JEV (135).

Cuando se reciben las muestras de suero o de LCR en el laboratorio, se deben priorizar estudios para detectar virus o ácido nucleico, siempre y cuando la toma de muestra se haya hecho en el momento de la enfermedad recomendado (figura 6). Para la mayoría de estos virus, el período de viremia es muy corto una vez que comienza la encefalitis. Si los resultados son negativos, se usan pruebas serológicas para los arbovirus pertinentes, con base en las especies que circulan en la zona geográfica donde pudo haberse producido la infección y que causan síntomas compatibles con los del caso. La infección neurológica se confirma cuando se obtienen resultados positivos por RT-PCR de punto final o en tiempo real, o del aislamiento viral a partir de muestras de LCR.



**FIGURA 6** Métodos diagnósticos de encefalitis por arbovirus



Nota: LCR: líquido cefalorraquídeo; PCR: reacción en cadena de la polimerasa (por su sigla en inglés).

Fuente: Adaptada de Davis LE, Beckham JD, Tyler KL. North American encephalitic arboviruses. *Neurol Clin.* 2008;26(3):727-57, con autorización de Elsevier.

## 6.1 Métodos virológicos

Los arbovirus neurotrópicos se pueden detectar en la sangre, en general durante la fase aguda de la infección, es decir, en los primeros dos a cuatro días. Al igual que para otros arbovirus, se pueden usar los métodos virológicos descritos a continuación.

### 6.1.1 Detección molecular del ácido ribonucleico viral

Se puede usar RT-PCR en muestras de suero o de LCR mediante la aplicación de los protocolos para tiempo real o punto final y el uso de iniciadores y sondas específicos para cada virus; en el cuadro 7 se presentan las pruebas de referencia. Para la identificación del virus también pueden usarse los protocolos genéricos (pan-alfavirus y pan-flavivirus) seguidos de secuenciación nucleotídica. Si las muestras proceden de material de autopsia, por ejemplo de cerebro (la más común), las pruebas moleculares deberán realizarse a partir del estudio de varios cortes de tejido de distintas partes del órgano.

### 6.1.2 Aislamiento viral

El aislamiento viral se realiza mediante la inoculación de sangre o suero del paciente en cultivos de líneas celulares, por ejemplo, células Vero, células de mosquito C6/36 o, para alfavirus, fibroblastos de

## CUADRO 7 Pruebas moleculares de referencia para la detección de ácido ribonucleico de determinados arbovirus neurotrópicos

VIRUS	TIPO DE PRUEBA	SECUENCIA DIANA	OBSERVACIONES
EEEV <sup>1,2</sup>	RT-PCR <i>singleplex</i> en tiempo real	E2	Iniciadores EEE 9391 y EEE 9459c y sonda EEE 9414
	RT-PCR dúplex en tiempo real	E1	Dúplex con SLEV
VEEV <sup>3</sup>	RT-PCR <i>singleplex</i> en tiempo real	NSP2	-
WEEV <sup>1,3</sup>	RT-PCR <i>singleplex</i> en tiempo real	E1	-
		C	-
SLEV <sup>4,2</sup>	RT-PCR <i>singleplex</i> en tiempo real	prM/E	-
	RT-PCR dúplex tiempo real	NS5	Dúplex con EEEV
WNV <sup>5</sup>	RT-PCR <i>singleplex</i> en tiempo real	3' UTR	Iniciadores WN3'NC hacia adelante ( <i>forward</i> ), WN3'NC hacia atrás ( <i>reverse</i> ) y sonda WN3'NC
		E	Iniciadores WNENV hacia adelante ( <i>forward</i> ), WN3'ENV hacia atrás ( <i>reverse</i> ) y sonda WNENV

*Nota:* C: proteína de la cápside; E: proteína de la envoltura; EEEV: virus de la encefalitis equina del este (por su sigla en inglés); NS: no estructural (por su sigla en inglés); prM: proteína premembrana; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (por su sigla en inglés); SLEV: virus de la encefalitis de San Luis (por su sigla en inglés); UTR: región no traducida (por su sigla en inglés); VEEV: virus de la encefalitis equina venezolana (por su sigla en inglés); WEEV: virus de la encefalitis equina del oeste (por su sigla en inglés); WNV: virus del Nilo occidental (por su sigla en inglés).

*Fuentes:* <sup>1</sup> Lambert AJ, Martin DA, Lanciotti RS. Detection of North American eastern and western equine encephalitis viruses by nucleic acid amplification assays. *J Clin Microbiol.* 2003;41(1):379-85.

<sup>2</sup> Hull R, Nattanmai S, Kramer LD, Bernard KA, Tavakoli NP. A duplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of St. Louis encephalitis and eastern equine encephalitis viruses. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62(3):272-9.

<sup>3</sup> Powers AM, Roehrig JT. Alphaviruses. En: Stephenson J, Warnes A (eds.). *Diagnostic Virology Protocols.* 2.ª edición. Nueva York: Humana Press; 2011.

<sup>4</sup> Lanciotti RS, Kerst AJ. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4506-13.

<sup>5</sup> Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2000;38(11):4066-71.

embriones de pollo o pato. Los cultivos celulares inoculados deben observarse a diario en el microscopio en busca de evidencia de efecto citopático. Cuando sea importante aislar el virus y el cultivo celular dé un resultado negativo, se puede realizar una inoculación intracerebral a ratones o hámsteres de 1 a 4 días de edad. La confirmación del aislamiento viral se puede realizar por inmunofluorescencia, neutralización o, específicamente, por RT-PCR o análisis de la secuencia nucleotídica. Las pruebas de inmunofluorescencia y RT-PCR son rápidas y sus resultados están disponibles en pocas horas. El aislamiento viral puede ser lento y demorar incluso algunas semanas y requerir varios pases del cultivo celular. Su sensibilidad depende de la condición de la muestra y de las células utilizadas.

### 6.1.3 Inmunohistoquímica

Para las pruebas inmunohistoquímicas y de RT-PCR se pueden utilizar muestras de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina.

Los resultados negativos en cultivos celulares o en pruebas sobre tejido no descartan la presencia de un agente infeccioso. Las causas de resultados negativos pueden ser que no se haya mantenido la muestra de manera apropiada para preservar al virus infectante o que la sección de tejido haya sido de una localización donde no había antígeno viral. Las infecciones pueden ser focales o con títulos virales bajos y, en consecuencia, no detectables.

## 6.2 Métodos serológicos

Por la brevedad de la duración de la viremia, la serología es la base del diagnóstico de las infecciones arbovirales que se asocian con un cuadro neurológico. Es posible realizar pruebas serológicas en suero y en LCR; se recomienda estudiar ambas muestras de manera simultánea en los pacientes con afectación neurológica (véase el apartado 4.2.1). No obstante, la toma de muestra de LCR es un procedimiento más invasivo y el volumen obtenido es, por lo general, menor que el de suero, por lo cual el suero es la muestra de elección para los casos que no presenten un cuadro neurológico.

A continuación, se describen los métodos serológicos disponibles.

### 6.2.1 Detección de anticuerpos de tipo inmunoglobulina M

La detección de anticuerpos IgM contra un virus específico en una única muestra de suero o LCR mediante MAC-ELISA sugiere una infección reciente con el virus, pero su interpretación puede complicarse por reactividad cruzada con otros virus del mismo género, especialmente en el caso de los flavivirus. Los anticuerpos IgM específicos contra los flavivirus normalmente se detectan en muestras de suero de la fase aguda, es decir, de 3 a 8 días a partir del inicio de la enfermedad, y perduran entre 30 y 90 días. Incluso se ha documentado persistencia de estos anticuerpos por más de un año, en el caso de WNV y SLEV (136, 137). Por lo tanto, los resultados positivos para anticuerpos IgM deben interpretarse con cautela, puesto que podrían no representar al agente etiológico de la infección aguda. Si se toma una muestra de suero en los primeros ocho días desde el inicio de la enfermedad, el hecho de que no se detecte IgM específica contra el virus no permite descartar el diagnóstico de infección viral, y es posible que haya que repetir la prueba más tarde.

Las pruebas IgM disponibles incluyen los MAC-ELISA desarrollados por los CDC (EEEV [138]; SLEV y WNV [139]; JEV [140]). Para el WNV, la FDA ha aprobado una serie de ensayos ELISA IgM (99); para el JEV hay una prueba comercial ELISA IgM que ha sido evaluada en comparación con la MAC-ELISA de los CDC (141). Además, en los CDC se ha desarrollado un inmunoensayo por microesferas dúplex para IgM del WNV y el SLEV (142).

### 6.2.2 Detección de anticuerpos de tipo inmunoglobulina G

Los anticuerpos IgG aparecen de 5 a 7 días después del inicio de síntomas. La prueba ELISA para IgG y el inmunoensayo por microesferas sirven para medir el nivel de anticuerpos IgG. Un aumento de cuatro veces o más del título de anticuerpos IgG en muestras pareadas de suero (tomadas durante los 5 a 7 días después del inicio de los síntomas y por lo menos 3 semanas después) indica la infección por el

agente que se trataba de detectar en las muestras. Las excepciones son los casos con aumento de títulos de anticuerpos debido al pecado original antigénico, es decir, el aumento del título de anticuerpos contra el agente infectante primario luego de una infección secundaria por un virus estrechamente relacionado (111). Un resultado positivo en una única prueba de IgG en suero solo indica que hubo infección en el pasado en un momento no determinado.

### 6.2.3 Pruebas de neutralización por reducción de placas

Las pruebas de neutralización por reducción de placas (PRNT, por su sigla en inglés) tienen alta especificidad cuando se trata de infecciones primarias, pero la especificidad por virus se pierde cuando se trata de pacientes con infección secundaria; esto se debe a la reactividad cruzada entre virus muy cercanos y al fenómeno del pecado original antigénico. La disponibilidad de muestras de suero pareadas tomadas en las fases aguda y convaleciente podrían facilitar la interpretación de la prueba, pero con las limitaciones ya expuestas.

### 6.2.4 Inmunofluorescencia

Estas pruebas detectan anticuerpos IgG, IgM e IgA en el suero. Su reactividad es muy amplia, pero se pueden usar para afinar la identificación del agente viral a nivel de familia. Las láminas se preparan con células Vero infectadas y, por lo general, se realiza una IFI con anticuerpos monoclonales para lograr mayor especificidad, de ser posible.

También se puede usar fijación del complemento e inhibición de la hemaglutinación, aunque esos métodos han sido reemplazados en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico por las pruebas ya descritas.

### 6.2.5 Uso de virus quiméricos para pruebas de neutralización por reducción de placas

Para las PRNT es necesario usar virus infecciosos viables que puedan formar placas claras en el cultivo celular. Además, para usar esta prueba con JEV, WNV y SLEV se sugiere nivel de bioseguridad 3 (BSL-3, por su sigla en inglés), que no está disponible en muchos laboratorios de salud pública. Los virus DENV 1, 2, 3 y 4 no necesitan altos niveles de contención, pero no siempre forman placas claras y fáciles de cuantificar, lo que dificulta la lectura de los resultados de PRNT. Por su parte, el WNV y el SLEV pueden formar placas de diversos tamaños que aparecen en distintos momentos. Por ello, en los CDC, se aprovechó el uso de ChimeriVax<sup>®</sup>, un virus recombinante atenuado, desarrollado a partir de la cepa 17D de la vacuna contra la fiebre amarilla, en el que se reemplazaron las proteínas prM y E del virus por las de WNV, SLEV, JEV o DENV 1 a 4. En las PRNT, los virus quiméricos se comportan casi de la misma manera que los virus salvajes y forman placas más rápidamente y más claras que los virus salvajes DENV 1, 3 y 4 (143). También se han desarrollado virus quiméricos que contienen las proteínas prM y E de ZIKV para PRNT; estos forman placas hasta dos días antes que el virus salvaje.

# Caracterización de genotipos y linajes por secuenciación nucleotídica

Los arbovirus de genoma ARN, al igual que la mayoría de los virus ARN, son de alta plasticidad genética y gran potencial evolutivo y de adaptación. A veces, hay distintos tipos y serotipos en una especie, como es el caso del DENV (tipos 1 a 4). Los virus o tipos de virus se subdividen en genotipos y estos, en linajes. Los tipos, genotipos y linajes virales tienen distintas características genéticas (genotipo) que pueden reflejarse en propiedades biológicas diferentes (fenotipo). Las diferencias genéticas entre tipos, genotipos o linajes pueden afectar la replicación del virus en vectores y hospederos, la transmisión del virus y la gravedad de la enfermedad que producen; también pueden estar asociadas con la distribución geográfica y el potencial epidémico del virus. Por otra parte, las diferencias genéticas y biológicas entre estos virus pueden afectar las pruebas diagnósticas y la detección de los arbovirus, como es el caso de las pruebas moleculares y serológicas.

La vigilancia genómica mediante secuenciación nucleotídica permite identificar los tipos, genotipos y linajes de los virus que circulan en una zona determinada. Los análisis filogenéticos y de la evolución de las secuencias de nucleótidos virales brindan conocimientos importantes sobre el origen, la evolución, la emergencia, la epidemiología, la transmisión y la patogenia de los arbovirus, y ayudan a entender estos procesos. Tal información también contribuye al establecimiento de métodos diagnósticos y medidas de prevención y control. La genotipificación viral es especialmente importante en situaciones de brotes, en que los virus emergen o reemergen en una zona dada, así como cuando se notifican resultados clínicos

atípicos. La secuenciación nucleotídica también se usa para detectar virus infectantes en muestras positivas mediante pruebas moleculares genéricas (véase el apartado 4.1.1.6). La vigilancia genómica oportuna también es importante para monitorear la compatibilidad de las secuencias de los iniciadores y las sondas que se utilizan en la RT-PCR con las secuencias de los virus que circulan en la Región.

Existen distintas tecnologías de secuenciación nucleotídica que se pueden usar en la caracterización genética, desde la secuenciación de Sanger (de incorporación de didesoxinucleótidos terminales) hasta la secuenciación de nueva generación (NGS, por su sigla en inglés). Hay distintas estrategias para amplificar y secuenciar amplicones o para secuenciar directamente el genoma viral sin amplificación previa (27, 144-146). El uso de secuencias de nucleótidos virales en los análisis filogenéticos permite comparar diferentes secuencias y determinar los tipos y genotipos virales. También hay distintas estrategias para realizar análisis filogenéticos. Existen instrumentos automatizados para la genotipificación de los arbovirus, incluidos el DENV, el CHIKV, el ZIKV y el YFV (147).

# Referencias

1. Control of Communicable Diseases Manual. 20.<sup>a</sup> edición. Heymann DL, editor. Washington, DC: American Public Health Association; 2015.
2. Organización Panamericana de la Salud. Estrategia para la prevención y control de las enfermedades arbovirales. 55.<sup>o</sup> Consejo Directivo, 68.<sup>a</sup> Sesión del Comité Regional de la OMS para las Américas; 26-30 de septiembre del 2016. Washington, DC: OPS; 2016 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/CD55-16-s.pdf>.
3. Organización Panamericana de la Salud. Instrumento para el diagnóstico y la atención a pacientes con sospecha de arbovirosis. Washington, DC: OPS; 2017 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/31448>.
4. Organización Panamericana de la Salud. Guía para la vigilancia de la enfermedad por el virus del Zika y sus complicaciones. Edición 2018. Washington, DC: OPS; 2018 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49518>.
5. Organización Panamericana de la Salud, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América. Preparedness and response for chikungunya virus introduction in the Americas. Washington, DC: OPS; 2011 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/CHIKV-English.pdf>.
6. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*. 2009;5(4):318-28.
7. Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol*. 2009;4(7):837-56.
8. Leung JY, Ng MM, Chu JJ. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. *Adv Virol*. 2011;2011:249640.
9. Travassos da Rosa JF, de Souza WM, Pinheiro FP, Figueiredo ML, Cardoso JF, Acrani GO, et al. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96(5):1019-30.
10. Sakkas H, Bozidis P, Franks A, Papadopoulou C. Oropouche Fever: A Review. *Viruses*. 2018;10(4).
11. Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, chikungunya, and other emerging vector-borne viral diseases. *Annu Rev Med*. 2018;69:395-408.
12. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*. 2000;74(7):3227-34.
13. Braack L, Gouveia de Almeida AP, Cornel AJ, Swanepoel R, de Jager C. Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):29.
14. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis*. 1995;1(1):7-15.
15. 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):e18.
16. Coffey LL, Vasilakis N, Brault AC, Powers AM, Triplet F, Weaver SC. Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(19):6970-5.

17. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76(2):159-216.
18. Lequime S, Fontaine A, Ar Gouilh M, Moltini-Conclois I, Lambrechts L. Genetic Drift, Purifying Selection and Vector Genotype Shape Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity in Mosquitoes. *PLoS Genet.* 2016;12(6):e1006111.
19. Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J. Origins of major human infectious diseases. *Nature.* 2007;447(7142):279-83.
20. Weaver SC, Winegar R, Manger ID, Forrester NL. Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Res.* 2012;94(3):242-57.
21. Rossi SL, Nasar F, Cardosa J, Mayer SV, Tesh RB, Hanley KA, et al. Genetic and phenotypic characterization of sylvatic dengue virus type 4 strains. *Virology.* 2012;423(1):58-67.
22. Vasilakis N, Fokam EB, Hanson CT, Weinberg E, Sall AA, Whitehead SS, et al. Genetic and phenotypic characterization of sylvatic dengue virus type 2 strains. *Virology.* 2008;377(2):296-307.
23. Dick GW. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1953;47(1):13-48.
24. Soper FL. The elimination of urban yellow fever in the Americas through the eradication of *Aedes aegypti*. *Am J Public Health Nations Health.* 1963;53:7-16.
25. Joshi V, Mourya DT, Sharma RC. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67(2):158-61.
26. Trpis M. Dry season survival of *Aedes aegypti* eggs in various breeding sites in the Dar es Salaam area, Tanzania. *Bull World Health Organ.* 1972;47(3):433-7.
27. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Goes de Jesus J, Aguiar RS, Iani FCM, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science.* 2018;361(6405):894-9.
28. Organización Panamericana de la Salud. Actualización epidemiológica: fiebre amarilla, 7 de diciembre de 2018. Washington, DC: OPS; 2018 [consultado el 17 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/7-diciembre-2018-fiebre-amarilla-actualizacion-epidemiologica-0>.
29. Romero-Alvarez D, Escobar LE. Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. *Microbes Infect.* 2018;20(3):135-46.
30. Lednicky J, De Rochars VM, Elbadry M, Loeb J, Telisma T, Chavannes S, et al. Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(11):2000-2.
31. White SK, Mavian C, Elbadry MA, Beau De Rochars VM, Paisie T, Telisma T, et al. Detection and phylogenetic characterization of arbovirus dual-infections among persons during a chikungunya fever outbreak, Haiti 2014. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(5):e0006505.
32. Althouse BM, Vasilakis N, Sall AA, Diallo M, Weaver SC, Hanley KA. Potential for Zika virus to establish a sylvatic transmission cycle in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(12):e0005055.
33. Lourenco-de-Oliveira R, Failloux AB. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(6):e0005698.
34. Abundes-Gallegos J, Salas-Rojas M, Galvez-Romero G, Perea-Martinez L, Obregon-Morales CY, Morales-Malacara JB, et al. Detection of dengue virus in bat flies (Diptera: Streblidae) of common vampire bats, *Desmodus rotundus*, in Progreso, Hidalgo, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2018;18(1):70-3.
35. de Figueiredo ML, de CGA, Amarilla AA, de SLA, de SOA, de Araujo RF, et al. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Virol J.* 2010;7:152.
36. Morales MA, Fabbri CM, Zunino GE, Kowalewski MM, Luppo VC, Enria DA, et al. Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, dengue, Saint Louis encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and yellow fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of Northeastern Argentina. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(2):e0005351.



37. Lavergne A, Lacoste V, Germain A, Matheus S, Dussart P, Deparis X, et al. [Dengue virus infection in neotropical forest mammals: incidental hosts or potential reservoirs?]. *Med Trop (Mars)*. 2009;69(4):345-50.
38. Kramer LD, Hardy JL, Presser SB, Houk EJ. Dissemination barriers for western equine encephalomyelitis virus in *Culex tarsalis* infected after ingestion of low viral doses. *Am J Trop Med Hyg*. 1981;30(1):190-7.
39. Lord CC, Rutledge CR, Tabachnick WJ. Relationships between host viremia and vector susceptibility for arboviruses. *J Med Entomol*. 2006;43(3):623-30.
40. Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates. *J Virol*. 2010;84(19):9733-48.
41. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*. 1992;122(2):281-8.
42. Escarmis C, Gomez-Mariano G, Davila M, Lazaro E, Domingo E. Resistance to extinction of low fitness virus subjected to plaque-to-plaque transfers: diversification by mutation clustering. *J Mol Biol*. 2002;315(4):647-61.
43. Grubaugh ND, Fauver JR, Ruckert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna S, Murrieta RA, et al. Mosquitoes transmit unique West Nile virus populations during each feeding episode. *Cell Rep*. 2017;19(4):709-18.
44. 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):e201.
45. Anishchenko M, Bowen RA, Paessler S, Austgen L, Greene IP, Weaver SC. Venezuelan encephalitis emergence mediated by a phylogenetically predicted viral mutation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(13):4994-9.
46. Brault AC, Powers AM, Weaver SC. Vector infection determinants of Venezuelan equine encephalitis virus reside within the E2 envelope glycoprotein. *J Virol*. 2002;76(12):6387-92.
47. Liu Y, Liu J, Du S, Shan C, Nie K, Zhang R, et al. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature*. 2017;545(7655):482-6.
48. Andriamandimby SF, Heraud JM, Randrianasolo L, Rafisandratansoa JT, Andriamamonjy S, Richard V. Dried-blood spots: a cost-effective field method for the detection of chikungunya virus circulation in remote areas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):e2339.
49. Balmaseda A, Saborio S, Tellez Y, Mercado JC, Perez L, Hammond SN, et al. Evaluation of immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for dengue diagnosis and epidemiological studies. *J Clin Virol*. 2008;43(3):287-91.
50. Matheus S, Chappert JL, Cassadou S, Berger F, Labeau B, Bremand L, et al. Virological surveillance of dengue in Saint Martin and Saint Barthelemy, French West Indies, using blood samples on filter paper. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(1):159-65.
51. Prado I, Rosario D, Bernardo L, Alvarez M, Rodriguez R, Vazquez S, et al. PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. *J Virol Methods*. 2005;125(1):75-81.
52. Vazquez S, Saenz E, Huelva G, Gonzalez A, Kouri G, Guzman M. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. *Rev Panam Salud Publica*. 1998;3(3):174-8.
53. Matheus S, Huc P, Labeau B, Bremand L, Enfissi A, Merle O, et al. The use of serum spotted onto filter paper for diagnosing and monitoring chikungunya virus infection. *J Clin Virol*. 2015;71:89-92.
54. Lim MD. Dried Blood Spots for Global Health Diagnostics and Surveillance: Opportunities and Challenges. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;99(2):256-65.
55. Organización Mundial de la Salud. Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control: nueva edición. Ginebra: OMS; 2009 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44504>.
56. Organización Mundial de la Salud. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2021-2022: applicable as from 1 January 2021. Ginebra: OMS; 2021 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019720>.

57. Asociación Internacional de Transporte Aéreo. Reglamentación sobre mercancías peligrosas. 63.ª edición. Montreal: IATA; 2022.
58. Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 6.ª edición. Washington, DC: HHS; 2020 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/labs/BMBL.html>.
59. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 4.ª edición. Ginebra: OMS; 2020 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337956>.
60. Smither SJ, Weller SA, Phelps A, Eastaugh L, Ngugi S, O'Brien LM, et al. Buffer AVL alone does not inactivate Ebola virus in a representative clinical sample type. *J Clin Microbiol*. 2015;53(10):3148-54.
61. Clinical and Laboratory Standards Institute. Establishing molecular testing in clinical laboratory environments; approved guideline. CLSI document MM19-A. Wayne, Pennsylvania: CLSI; 2011.
62. McCreedy B, Callaway T. Laboratory design and workflow. En: Persing D, Smith T, Tenover F, White T (eds.). *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1993. p. 149-59.
63. Mifflin TE. Setting up a PCR laboratory. *CSH Protoc*. 2007;2007:pdb top14.
64. Viana RV, Wallis CL. Good clinical laboratory practice (GCLP) for molecular based tests used in diagnostic laboratories. En: Akyar I, editor. *Wide spectra of quality control* [consultado el 15 de marzo del 2022]. Londres: IntechOpen; 2011. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/good-clinical-laboratory-practice-gclp-for-molecular-based-tests-used-in-diagnostic-laboratories>.
65. Ren P, Ortiz DA, Terzian ACB, Colombo TE, Nogueira ML, Vasilakis N, et al. Evaluation of Aptima Zika Virus Assay. *J Clin Microbiol*. 2017;55(7):2198-203.
66. Kurosaki Y, Martins DBG, Kimura M, Catena ADS, Borba M, Mattos SDS, et al. Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Sci Rep*. 2017;7(1):13503.
67. Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clin Infect Dis*. 2016;63(12):1584-90.
68. de Morais Bronzoni RV, Baleotti FG, Ribeiro Nogueira RM, Nunes M, Moraes Figueiredo LT. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol*. 2005;43(2):696-702.
69. Pfeffer M, Proebster B, Kinney RM, Kaaden OR. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;57(6):709-18.
70. Sanchez-Seco MP, Echevarria JM, Hernandez L, Estevez D, Navarro-Mari JM, Tenorio A. Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol*. 2003;71(1):140-9.
71. Sanchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernandez L, Valdes K, Guzman MG, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods*. 2005;126(1-2):101-9.
72. Sanchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, Guzman G, Tenorio A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J Virol Methods*. 2001;95(1-2):153-61.
73. Moreli ML, Aquino VH, Cruz AC, Figueiredo LT. Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-nested-PCR. *J Med Virol*. 2002;66(1):139-42.
74. Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):1922-7.

75. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol*. 1998;72(1):73-83.
76. Gundacker ND, Carrera JP, Castillo M, Diaz Y, Valenzuela J, Tamhane A, et al. Clinical manifestations of Punta Toro virus species complex infections, Panama, 2009. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(5):872-4.
77. Bessoff K, Delorey M, Sun W, Hunsperger E. Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(10):1513-8.
78. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8).
79. 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(10):e3193.
80. Lima Mda R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7):e738.
81. Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar LA, Parra B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virology*. 2010;7:361.
82. Ramirez AH, Moros Z, Comach G, Zambrano J, Bravo L, Pinto B, et al. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with dengue virus in Venezuela. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;65(3):247-53.
83. 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):e3171.
84. Organización Panamericana de la Salud. Diagnóstico por laboratorio de la infección por virus de la fiebre amarilla. Washington, DC: OPS; 2018 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=46875&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=46875&lang=es).
85. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Monath TP. Monoclonal antibodies distinguish between wild and vaccine strains of yellow fever virus by neutralization, hemagglutination inhibition, and immune precipitation of the virus envelope protein. *Virology*. 1983;125(1):8-17.
86. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización de los virus del dengue. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2013.
87. Pelegrino JL, Arteaga E, Rodriguez AJ, Gonzalez E, Frontela MD, Guzman MG. Normalización de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de antígenos del virus dengue en tejidos embebidos en parafina. *Rev Cubana Med Trop*. 1997;49(2):100-7.
88. Lima M, Chouin-Carneiro T, Azeredo E, Barbosa LS, Souza TMA, Silva J, et al. The inability of a dengue NS1 ELISA to detect Zika infections. *Sci Rep*. 2019;9(1):18596.
89. Matheus S, Boukhari R, Labeau B, Ernault V, Bremand L, Kazanji M, et al. Specificity of Dengue NS1 Antigen in Differential Diagnosis of Dengue and Zika Virus Infection. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(9):1691-3.
90. Medina F, Medina JF, Colon C, Vergne E, Santiago GA, Muñoz-Jordan JL. Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage. *Curr Protoc Microbiol*. 2012;Chapter 15:Unit 15D 2.
91. Medina FA, Torres G, Acevedo J, Fonseca S, Casiano L, De Leon-Rodriguez CM, et al. Duration of the Presence of Infectious Zika Virus in Semen and Serum. *J Infect Dis*. 2019;219(1):31-40.
92. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S30-8.

93. Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araujo ES, Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol.* 1999;14(3):183-9.
94. Basile AJ, Goodman C, Horiuchi K, Laven J, Panella AJ, Kosoy O, et al. Development and validation of an ELISA kit (YF MAC-HD) to detect IgM to yellow fever virus. *J Virol Methods.* 2015;225:41-8.
95. 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(8):1232-9. Doi: 10.3201/eid1408.080287.
96. Martin DA, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol.* 2000;38(5):1823-6.
97. Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos de América. Zika virus response updates from FDA: medical products. Silver Spring: FDA; 2022 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-issues/zika-virus-response-updates-fda#medicalproducts>.
98. Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos de América. Zika Virus response updates from FDA: emergency use authorization. Silver Spring: FDA; 2022 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-issues/zika-virus-response-updates-fda#eua>.
99. Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos de América, Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos de América. Global Unique Device Identification Database (GUDID). Bethesda: NLM; 2018 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://accessgudid.nlm.nih.gov/>.
100. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):436-40.
101. Fondo para la Infancia de las Naciones Unidas, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Banco Mundial, Programa Especial de Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales, Iniciativa para una Vacuna Pediátrica contra el Dengue. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. Ginebra: OMS; 2009 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44067>.
102. Johnson BW, Goodman CH, Holloway K, de Salazar PM, Valadere AM, Drebot MA. Evaluation of commercially available chikungunya virus immunoglobulin M detection assays. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(1):182-92.
103. Basile AJ, Goodman C, Horiuchi K, Sloan A, Johnson BW, Kosoy O, et al. Multi-laboratory comparison of three commercially available Zika IgM enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol Methods.* 2018;260:26-33.
104. Safronetz D, Sloan A, Stein DR, Mendoza E, Barairo N, Ranadheera C, et al. Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(9):1577-80.
105. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(31):8384-9.
106. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science.* 2016;353(6301):823-6.
107. Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol.* 2008;21(2):123-32.
108. Salje H, Rodriguez-Barraquer I, Rainwater-Lovett K, Nisalak A, Thaisomboonsuk B, Thomas SJ, et al. Variability in dengue titer estimates from plaque reduction neutralization tests poses a challenge to epidemiological studies and vaccine development. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(6):e2952.
109. Thomas SJ, Nisalak A, Anderson KB, Libraty DH, Kalayanaroj S, Vaughn DW, et al. Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(5):825-33.

110. Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett AD, Smith DJ, et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 12):2821-9.
111. Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32(1):154-6.
112. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América. Prolonged IgM antibody response in people infected with Zika virus: implications for interpreting serologic testing results for pregnant women. 2017 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/45492>.
113. Gibney KB, Edupuganti S, Panella AJ, Kosoy OI, Delorey MJ, Lanciotti RS, et al. Detection of anti-yellow fever virus immunoglobulin m antibodies at 3-4 years following yellow fever vaccination. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(6):1112-5.
114. Griffin I, Martin SW, Fischer M, Chambers TV, Kosoy O, Falise A, et al. Zika virus IgM detection and neutralizing antibody profiles 12-19 months after illness onset. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(2):299-303.
115. Lindsey NP, Staples JE, Powell K, Rabe IB, Fischer M, Powers AM, et al. Ability To Serologically Confirm Recent Zika Virus Infection in Areas with Varying Past Incidence of Dengue Virus Infection in the United States and U.S. Territories in 2016. *J Clin Microbiol.* 2017;56(1).
116. Hunsperger EA, Munoz-Jordan J, Beltran M, Colon C, Carrion J, Vazquez J, et al. Performance of dengue diagnostic tests in a single-specimen diagnostic algorithm. *J Infect Dis.* 2016;214(6):836-44.
117. Brasil P, Sequeira PC, Freitas AD, Zogbi HE, Calvet GA, de Souza RV, et al. Guillain-Barre syndrome associated with Zika virus infection. *Lancet.* 2016;387(10026):1482.
118. Brito Ferreira ML, Antunes de Brito CA, Moreira AJP, de Moraes Machado MI, Henriques-Souza A, Cordeiro MT, et al. Guillain-Barre syndrome, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis associated with Zika virus infection in Brazil: detection of viral RNA and isolation of virus during late infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97(5):1405-9.
119. Langerak T, Yang H, Baptista M, Doornekamp L, Kerkman T, Codrington J, et al. Zika Virus Infection and Guillain-Barre Syndrome in Three Patients from Suriname. *Front Neurol.* 2016;7:233.
120. Parra B, Lizarazo J, Jimenez-Arango JA, Zea-Vera AF, Gonzalez-Manrique G, Vargas J, et al. Guillain-Barre Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. *N Engl J Med.* 2016;375(16):1513-23.
121. Roze B, Najioullah F, Ferge JL, Apetse K, Brouste Y, Cesaire R, et al. Zika virus detection in urine from patients with Guillain-Barre syndrome on Martinique, January 2016. *Euro Surveill.* 2016;21(9):30154.
122. Roze B, Najioullah F, Ferge JL, Dorleans F, Apetse K, Barnay JL, et al. Guillain-Barre Syndrome Associated With Zika Virus Infection in Martinique in 2016: A Prospective Study. *Clin Infect Dis.* 2017;65(9):1462-8.
123. Watrin L, Ghawche F, Larre P, Neau JP, Mathis S, Fournier E. Guillain-Barre Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(14):e3257.
124. Oduyebo T, Polen KD, Walke HT, Reagan-Steiner S, Lathrop E, Rabe IB, et al. Update: Interim guidance for health care providers caring for pregnant women with possible Zika virus exposure - United States (Including U.S. territories), July 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017;66(29):781-93.
125. Long KC, Ziegler SA, Thangamani S, Hausser NL, Kochel TJ, Higgs S, et al. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(4):750-7.
126. Naveca FG, Nascimento VAD, Souza VC, Nunes BTD, Rodrigues DSG, Vasconcelos P. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(7):510-3.
127. Waggoner JJ, Rojas A, Mohamed-Hadley A, de Guillen YA, Pinsky BA. Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine. *J Clin Virol.* 2018;98:1-4.

128. Wang E, Paessler S, Aguilar PV, Carrara AS, Ni H, Greene IP, et al. Reverse transcription-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection and differentiation of alphavirus infections. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):4000-8.
129. Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Rodriguez Y, Pacheco Y, Anaya JM, Ramirez-Santana C. Mayaro: an emerging viral threat? *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):163.
130. Mota MTdO, Ribeiro MR, Vedovello D, Nogueira ML. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. *Future Virol.* 2015;10(9):1109-22.
131. Calisher CH, el-Kafrawi AO, Al-Deen Mahmud MI, Travassos da Rosa AP, Bartz CR, Brummer-Korvenkontio M, et al. Complex-specific immunoglobulin M antibody patterns in humans infected with alphaviruses. *J Clin Microbiol.* 1986;23(1):155-9.
132. Nunes MRT, de Souza WM, Savji N, Figueiredo ML, Cardoso JF, da Silva SP, et al. Oropouche orthobunyavirus: Genetic characterization of full-length genomes and development of molecular methods to discriminate natural reassortments. *Infect Genet Evol.* 2018;68:16-22.
133. Organización Panamericana de la Salud. Laboratory Diagnosis of West Nile Virus Encephalitis Virus Infection. Washington, DC: OPS; 2016 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/WNV-Detection-and-Laboratory-Diagnosis-Dec-2016.pdf>.
134. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América. West Nile virus in the United States: guidelines for surveillance, prevention, and control. 4<sup>th</sup> Revision. Atlanta: CDC; 2013 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/wnvGuidelines.pdf>.
135. Organización Mundial de la Salud. Manual for the Laboratory Diagnosis of Japanese Encephalitis Virus Infections. Ginebra: OMS; 2007.
136. Roehrig JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS, et al. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(3):376-9.
137. Spinsanti LI, Farias AA, Aguilar JJ, del Pilar Diaz M, Contigiani MS. Immunoglobulin G subclasses in antibody responses to St. Louis encephalitis virus infections. *Arch Virol.* 2011;156(10):1861-4.
138. Goodman CH, Russell BJ, Velez JO, Laven JJ, Bagarozzi DA, Jr., Moon JL, et al. Production of a Sindbis/Eastern Equine Encephalitis chimeric virus inactivated cell culture antigen. *J Virol Methods.* 2015;223:19-24.
139. Martin DA, Noga A, Kosoy O, Johnson AJ, Petersen LR, Lanciotti RS. Evaluation of a diagnostic algorithm using immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate human West Nile virus and St. Louis encephalitis virus infections during the 2002 West Nile virus epidemic in the United States. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(6):1130-3.
140. Robinson JS, Featherstone D, Vasanthapuram R, Biggerstaff BJ, Desai A, Ramamurty N, et al. Evaluation of three commercially available Japanese encephalitis virus IgM enzyme-linked immunosorbent assays. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(5):1146-55.
141. Johnson BW, Goodman CH, Jee Y, Featherstone DA. Differential diagnosis of Japanese encephalitis virus infections with the Inbios JE Detect and DEN Detect MAC-ELISA kits. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(4):820-8.
142. Johnson AJ, Noga AJ, Kosoy O, Lanciotti RS, Johnson AA, Biggerstaff BJ. Duplex microsphere-based immunoassay for detection of anti-West Nile virus and anti-St. Louis encephalitis virus immunoglobulin M antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(5):566-74.
143. Johnson BW, Kosoy O, Hunsperger E, Beltran M, Delorey M, Guirakhoo F, et al. Evaluation of chimeric Japanese encephalitis and dengue viruses for use in diagnostic plaque reduction neutralization tests. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(7):1052-9.
144. Cruz CD, Torre A, Troncos G, Lambrechts L, Leguia M. Targeted full-genome amplification and sequencing of dengue virus types 1-4 from South America. *J Virol Methods.* 2016;235:158-67.

145. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc.* 2017;12(6):1261-76.
146. Stapleford KA, Moratorio G, Henningsson R, Chen R, Matheus S, Enfissi A, et al. Whole-genome sequencing analysis from the chikungunya virus Caribbean outbreak reveals novel evolutionary genomic elements. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004402.
147. University of KwaZulu-Natal. Genome Detective Virus Tool Version 1.112. 2017 [consultado el 15 de marzo del 2022]. Disponible en: <http://krisp.ukzn.ac.za/app/typingtool/virus/>.

La infección causada en el ser humano por los arbovirus, como los del dengue, la fiebre amarilla, el chikunguña y el Zika, se produce a través de la picadura de artrópodos hematófagos (mosquitos, garrapatas y jejenes, entre otros). Hay más de 100 tipos de arbovirus y la gravedad de las infecciones que estos desencadenan varía desde asintomática hasta potencialmente mortal. Los brotes causados por estos virus son cada vez más comunes en las regiones tropicales y subtropicales, incluida gran parte de la Región de las Américas, lo que los convierte en un tema de preocupación a nivel internacional. Según la Organización Mundial de la Salud, casi 4000 millones de personas viven en zonas donde los arbovirus plantean actualmente una amenaza para la salud pública.

En esta publicación se presentan recomendaciones técnicas para los laboratorios de salud pública que participan en el diagnóstico y la vigilancia de los arbovirus. En ella se incluyen los tipos de muestras más útiles para diagnosticar infecciones; se enumeran los conjuntos de datos clínicos mínimos para la rotulación y el análisis de muestras; y se describen las mejores prácticas para el procesamiento y la manipulación de muestras, junto con los flujos de trabajo recomendados y las consideraciones de bioseguridad. Las pruebas más adecuadas para cada uno de los arbovirus más comunes se presentan con los algoritmos recomendados para el diagnóstico. Se incluyen tanto los métodos de diagnóstico directo, a través de la detección genómica, la detección de antígenos y el aislamiento de los virus, como los métodos serológicos indirectos (que no detectan al virus en sí sino la respuesta inmunitaria a la infección viral).

Además de estar dirigida al personal de los laboratorios de salud pública, su público destinatario principal, esta publicación también será útil para los centros de investigación que detectan infecciones por arbovirus como parte de sus tareas de investigación.

**OPS**



Organización  
Panamericana  
de la Salud



Organización  
Mundial de la Salud  
OFICINA REGIONAL PARA LAS  
Américas

[www.paho.org](http://www.paho.org)

