

Advertencia

El presente documento es una versión preliminar; la información que contiene está sujeta a modificaciones, pues este documento está siendo revisado por el Comité de Ética de la Organización Mundial de la Salud.

La versión definitiva de este protocolo normalizado, “Estudio longitudinal prospectivo en una cohorte de pacientes infectados por el virus del Zika para medir la persistencia viral en los líquidos corporales”, se publicará tan pronto haya concluido la revisión ética.

Protocolo normalizado:

Estudio longitudinal prospectivo en una cohorte de pacientes infectados por el virus del Zika para medir la persistencia viral en los líquidos corporales

Contacto:

Maria Van Kerkhove
Centro para la Salud Mundial
Instituto Pasteur
maria.van-kerkhove@pasteur.fr

Nathalie Broutet
Departamento de Salud Reproductiva e Investigaciones Conexas
Organización Mundial de la Salud
broutetn@who.int

Ludovic Reveiz
Gestión del Conocimiento, Bioética e Investigación
Organización Panamericana de la Salud
reveizl@paho.org

Agradecimientos

El presente esquema de protocolo se basa en el protocolo de persistencia del virus del Zika (ZIKV) elaborado por el Ministerio de Salud del Brasil, los Institutos de Investigación de Fiocruz, el Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed (WRAIR) y la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS).

Los colaboradores del Instituto Pasteur, la OMS y los miembros del Consorcio para la Normalización de la Seroepidemiología de la Gripe (CONSISE) adaptaron este protocolo como herramienta genérica para la investigación de la infección por el ZIKV. Han sido muchas las personas que han intervenido en la redacción y la revisión de este protocolo; sus nombres se enumeran en la lista que figura al final del documento.

Este protocolo ha sido traducido por La Organización Panamericana de Salud. Sin embargo, no es la versión definitiva y se actualizará periódicamente por parte de los autores.

Más información sobre CONSISE, en su sitio web.

© 2016 Organización Mundial de la Salud

All rights reserved. Publications of the World Health Organization are available on the WHO web site or can be purchased from WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel.: +41 22 791 3264; fax: +41 22 791 4857; e-mail: bookorders@who.int).

Requests for permission to reproduce or translate WHO publications –whether for sale or for non-commercial distribution– should be addressed to WHO Press through the WHO website.

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

All reasonable precautions have been taken by the World Health Organization to verify the information contained in this publication. However, the published material is being distributed without warranty of any kind, either expressed or implied. The responsibility for the interpretation and use of the material lies with the reader. In no event shall the World Health Organization be liable for damages arising from its use.

Licencia

El presente documento ha sido creado por miembros del Instituto Pasteur en colaboración con la OMS. Se distribuye con licencia [Creative Commons Attribution Non-commercial ShareAlike](#) versión 4.0. Es posible copiar, adaptar, distribuir y transmitir libremente este protocolo con las condiciones siguientes: *a)* mención de la fuente original; *b)* trabajo no usado con fines comerciales; y *c)* toda forma modificada del presente documento se distribuye libremente con las mismas condiciones.

RESUMEN DEL PROTOCOLO

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el Instituto Pasteur, las redes de Fiocruz, CONSISE e ISARIC y muchos otros grupos internacionales de investigación han generado protocolos y cuestionarios normalizados de investigación clínica y epidemiológica destinados a abordar cuestiones clave de salud pública en relación con el virus del Zika (ZIKV).

El brote actual de ZIKV afecta a un vasto territorio geográfico, que se extiende por toda América y el Caribe y algunas zonas de África. El uso de protocolos normalizados de investigación permitirá comparar los resultados de los distintos estudios en todas las regiones y países, y podría llegar a mejorar la calidad de los estudios de observación al identificar y reducir al mínimo los sesgos. Además, los datos recopilados con estos protocolos normalizados se usarán para afinar y actualizar las recomendaciones para prevenir la propagación del ZIKV, la vigilancia y la definición de casos de microcefalia, para ayudar a conocer mejor la propagación, la gravedad, el espectro y las repercusiones del ZIKV en la comunidad, y para orientar las medidas de salud pública, en especial las dirigidas a las embarazadas y las parejas que planean un embarazo.

Cada uno de estos protocolos normalizados, incluido el descrito a continuación, se ha diseñado para aumentar al máximo la probabilidad de recopilar sistemáticamente muestras biológicas y datos epidemiológicos, clínicos y de exposición, y compartirlos rápidamente en un formato fácilmente agregable, tabulable y analizable en múltiple entornos diferentes a nivel mundial. Animamos a todos los centros de investigación a contribuir a este esfuerzo con independencia de su disponibilidad de recursos o volumen de pacientes, aunque teniendo en cuenta que la propiedad de los datos primarios sigue correspondiendo a cada país o centro concreto.

El protocolo descrito a continuación es un estudio longitudinal prospectivo de cohorte, diseñado para recopilar datos con el fin de determinar el riesgo de distintos cuadros clínicos relacionados con un virus patógeno en una población determinada. En este protocolo normalizado de investigación se describen los métodos para seguir una cohorte de pacientes infectados por el ZIKV y medir en ella la persistencia del ZIKV en distintos líquidos corporales. Los datos recopilados en este protocolo normalizado se usarán para afinar y actualizar las recomendaciones de vigilancia, para ayudar a conocer mejor la propagación, la gravedad y el espectro de la enfermedad, y para adaptar las medidas de salud pública, en especial las dirigidas a las embarazadas y las parejas que planean un embarazo.

Otros protocolos actualmente en fase de desarrollo son:

- Estudio de casos y testigos para evaluar posibles factores de riesgo relacionados con la microcefalia; entre ellos, la infección por el ZIKV
- Estudio de casos y testigos para evaluar posibles factores de riesgo relacionados con el síndrome de Guillain-Barré; entre ellos, la infección por el ZIKV
- Estudio longitudinal prospectivo en una cohorte de mujeres y recién nacidos expuestos al ZIKV durante el embarazo
- Estudio longitudinal prospectivo en una cohorte de recién nacidos y lactantes nacidos de madres expuestas al ZIKV durante el embarazo
- Estudio transversal de seroprevalencia de la infección por el ZIKV en la población general
- Protocolo de caracterización clínica de la infección por el ZIKV en el contexto de otros arbovirus cocirculantes

Los comentarios para el usuario van resaltados en color morado en todo el documento, pues es posible que cada usuario deba modificar ligeramente los métodos apuntados en función del contexto local en el cual vaya a llevarse a cabo este estudio.

ÍNDICE

Resumen del protocolo	4
Índice	6
1 Introducción.....	7
2 Procedimientos del estudio	9
3 Criterios de valoración y análisis estadísticos	18
4 Presentación de los resultados.....	19
5 Estudios complementarios	19
6 Agradecimientos.....	21
Apéndices	22
Apéndice A: Descripción del estudio y plantilla para el formulario de consentimiento fundamentado.....	22
Apéndice B: Cuestionario normalizado	22
Apéndice C: Lista de cebadores publicados para detectar y cuantificar el virus del Zika por RT-PCR en tiempo real (Cao-Lormeau, Blake et al. 2016).....	23

1 INTRODUCCIÓN

En los meses siguientes a la declaración, por parte de la OMS, de una emergencia de salud pública de importancia internacional el 1 de febrero del 2016, han ido publicándose cada vez más datos que apuntan a una posible asociación entre la exposición al ZIKV en las embarazadas y la microcefalia y otros defectos congénitos en el feto (Besnard, Eyrolle-Guignot et al. 2016; Brasil, Pereira et al. 2016; Broutet, Krauer et al. 2016; Cauchemez, Besnard et al. 2016; Driggers, Ho et al. 2016; Kleber de Oliveira, Cortez-Escalante et al. 2016; Mlakar, Korva et al. 2016; Musso y Gubler 2016; Schuler-Faccini, Ribeiro et al. 2016). Recientemente se ha demostrado la presencia de ARN del ZIKV tanto en muestras encefálicas de bebés nacidos con microcefalia como en el líquido amniótico de las madres expuestas al ZIKV durante el embarazo (Calvet, Aguiar et al. 2016; Oliveira Melo, Malinger et al. 2016). Ello implica que, como ya se ha observado para otras infecciones neonatales (grupo TORCHS) susceptibles de transmisión maternofilar y que causan defectos congénitos como la microcefalia, existe una variedad de otros efectos posibles —además de la microcefalia— como consecuencia de la exposición al ZIKV durante el embarazo (Jones, López et al. 2003; Naing, Scott et al. 2016; Yazigi, De Pecoulas et al. 2016).

Sigue siendo limitado, no obstante, el conocimiento que tenemos de la biología del ZIKV en general y de su patogenia en los seres humanos. Se cree que el período intrínseco de incubación de la infección por el ZIKV es parecido al del dengue, con aparición de signos y síntomas agudos habitualmente al cabo de 3 a 10 días del contagio. Tras la infección, el ZIKV se ha detectado en muestras de sangre, orina, semen, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido amniótico y leche materna. En la mayor parte de las personas infectadas por el ZIKV, el virus se detecta en la sangre entre varios días y una semana después de la aparición de los síntomas; sin embargo, datos recientes parecen indicar que la viremia podría mantenerse durante un tiempo considerablemente mayor en las embarazadas. Se ha observado asimismo que el virus persiste más tiempo en la orina y el semen, y recientemente se ha documentado la transmisión sexual del ZIKV. Sin un conocimiento más detallado de la cinética de la infección por el ZIKV en los distintos compartimientos biológicos, será difícil articular medidas racionales para prevenir la transmisión del virus en las poblaciones de las zonas endémicas.

En el presente protocolo para un estudio prospectivo de cohorte se describen los métodos para seguir una cohorte de pacientes infectados por el ZIKV con el fin de determinar en ella la persistencia del ZIKV en diversos líquidos corporales. Este estudio abordará las siguientes cuestiones de salud pública:

1. ¿En qué líquidos corporales persiste el ZIKV?
2. ¿Durante cuánto tiempo siguen eliminando los convalecientes ZIKV infeccioso a través de distintos líquidos corporales después de que el virus ya no sea detectable en la sangre?
3. ¿Cuál es el riesgo de transmisión sexual del ZIKV?

Comentario: Antes de presentar el protocolo a un Comité de Ética o Junta de Revisión Institucional local o nacional, debe actualizarse la introducción con los datos de investigación más recientes y una descripción complementaria de las características epidemiológicas del brote en el país en que vaya a realizarse el estudio.

1.1 OBJETIVOS

Los datos recopilados en este estudio se usarán para afinar y actualizar las recomendaciones de vigilancia, para ayudar a conocer mejor la propagación, la gravedad y el espectro de la enfermedad, y para adaptar las medidas de salud pública, en especial las dirigidas a las embarazadas y las parejas que planean un embarazo.

Los **objetivos principales** de este estudio son:

- Evaluar la presencia y la duración de persistencia de ZIKV infeccioso y sus marcadores (ARN específico del ZIKV, antígenos, anticuerpos, respuesta de los linfocitos T e inmunidad innata) en sangre, orina, saliva, líquido bucal, semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, sangre menstrual, secreción rectal y leche materna de personas infectadas que acuden a un consultorio durante la enfermedad aguda y convalecencia.
- Comparar la presencia y la duración de persistencia de ZIKV infeccioso procedente de personas infectadas en sus contactos domésticos infectados o no infectados.
- Determinar la relación entre los factores del anfitrión, los factores ambientales (características sociodemográficas, enfermedades crónicas como diabetes, hipertensión arterial, obesidad, respuesta inmunitaria celular y respuesta inmunitaria humoral [anticuerpos]) y la presencia de coinfecciones (dengue, chikunguña, VIH y sífilis), por un lado, y la duración de persistencia del virus en los líquidos corporales, por el otro.

Comentario: Los estudios longitudinales prospectivos de cohortes, como el descrito aquí, brindan la oportunidad de evaluar otros **objetivos secundarios**; entre ellos, por ejemplo, los dos siguientes:

- Evaluar la proporción de infecciones asintomáticas entre los contactos domésticos de un caso infectado inicial.
- Evaluar la posibilidad de reinfección o reactivación del virus en los casos durante el período de estudio.

Comentario: Cabe la posibilidad de incorporar otros objetivos secundarios al protocolo, según las características del brote y el contexto local.

2 PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Resumen: Estudio prospectivo de observación en una cohorte de hombres y mujeres mayores de 18 años con positividad por RT-PCR para el ZIKV en muestras de sangre u orina, y sus contactos domésticos tanto sintomáticos como asintomáticos.

2.1 ÁMBITO DEL ESTUDIO

La selección de los centros de incorporación de pacientes debe hacerse teniendo en cuenta:

- Densidad alta de población
- Circulación alta del ZIKV
- Red sólida de salud comunitaria
- Laboratorios con capacidad de realizar: cultivo de virus, determinación de antígenos del ZIKV, RT-PCR, IgM/IgG, determinación de anticuerpos neutralizantes (específicos para Zika, dengue y chikunguña), pruebas de detección del VIH (Ac o Ac-Ag), sífilis (RPR, TPHA) y secuenciación genética del ZIKV

2.2 SELECCIÓN E INCORPORACIÓN DE LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

2.2.1 POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Selección de los casos iniciales: En este estudio participarán hombres y mujeres (incluidas embarazadas) mayores de 18 años, sintomáticos y con muestras de sangre u orina que hayan dado positivo por RT-PCR para el ZIKV. Se considerarán posibles casos iniciales las personas que soliciten atención clínica en establecimientos de asistencia sanitaria identificadas por el grupo de investigación.

Selección de los casos domésticos: Se considerará que conforman el hogar todas las personas que comparten unidad residencial como domicilio habitual o vivían allí durante la enfermedad del caso inicial. Los contactos domésticos deberán hacerse análisis en el mismo establecimiento de asistencia sanitaria en que se diagnosticó el caso inicial. Todos los contactos domésticos mayores de 18 años se considerarán como participantes en el estudio en calidad de posibles casos domésticos.

2.2.2 CRONOGRAMA DE SEGUIMIENTO DE LOS PARTICIPANTES

Incorporación al estudio y visita inicial: Lo ideal es que se incorporen al estudio todos los hombres y mujeres con síntomas de infección por el ZIKV que soliciten atención clínica en un establecimiento de asistencia sanitaria. A todo posible participante se le explicará en qué consiste el estudio y se le pedirá que firme el formulario de consentimiento fundamentado. A continuación, deberá rellenar un breve cuestionario demográfico y de exposición al virus, que irá seguido de la recogida de muestras. En caso de positividad para el ZIKV por RT-PCR en las muestras de sangre u orina, se obtendrá una lista de los contactos domésticos. Se explicará asimismo el estudio a los contactos domésticos y se le pedirá que firmen el formulario de consentimiento fundamentado. A continuación, también los

contactos deberán rellenar el breve cuestionario demográfico y de exposición al virus, seguido de la recogida de muestras.

Seguimiento: Los casos iniciales que hayan otorgado su consentimiento y hayan dado positivo al ZIKV serán objeto de seguimiento durante 12 meses para evaluar la persistencia del virus, la reactivación o la reinfección al cabo de 2, 4, 10, 20, 30, 60, 90, 180 y 360 días después de la visita inicial y recogida de muestras.

Los contactos domésticos que hayan otorgado su consentimiento serán objeto de seguimiento durante 12 meses para evaluar la transmisión del virus al cabo de 3, 5, 11, 21, 30, 60, 90, 180 y 360 días después de la visita inicial y recogida de muestras.

2.2.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión:

Caso inicial: Todo hombre o mujer (incluso embarazada) mayor de 18 años, sintomático y con muestras de sangre u orina con positividad para el ZIKV por RT-PCR.

Contacto familiar: Todo hombre o mujer (incluso embarazada) mayor de 18 años, sintomático o asintomático, que comparta unidad residencial con un caso inicial o viviera allí durante la enfermedad del caso inicial.

Criterios de exclusión:

Personas de ambos sexos menores de 18 años, incapaces de otorgar su consentimiento fundamentado, que no otorgan su consentimiento fundamentado o que presentan cualquier contraindicación para las punciones venosas.

2.2.4 CONSENTIMIENTO FUNDAMENTADO

Durante la primera entrevista con un posible caso inicial, un miembro capacitado del equipo de investigación explicará al participante la finalidad del estudio y solicitará su consentimiento fundamentado por escrito. Se comunicará al participante que su participación es voluntaria y en todo momento podrá abandonar el estudio sin necesidad de aducir motivo alguno y sin consecuencias. Se recabará de todos los participantes en el estudio su consentimiento fundamentado por escrito.

En el consentimiento fundamentado se recabará autorización expresa de la obtención de datos sociodemográficos y muestras de sangre, orina, saliva, líquido bucal, semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, sangre menstrual, secreción rectal y leche materna, según corresponda, para la finalidad propuesta del estudio, así como la posibilidad de que las muestras puedan enviarse fuera del país de origen para su análisis y que las muestras puedan usarse en el futuro para fines de investigación. También se indicará en él que toda infección presunta o confirmada por el ZIKV podrá notificarse a las autoridades nacionales en conformidad con los requisitos del Reglamento Sanitario Internacional (RSI).

Si el participante está conforme, deberá rellenar el formulario de consentimiento con su nombre y apellido en letra legible, fecha y firma tanto del participante como del miembro del equipo de investigación por duplicado, antes de que pueda llevarse a cabo ningún procedimiento como parte del estudio actual. El miembro del equipo de investigación es responsable de obtener el consentimiento del participante por escrito.

Una vez firmado el formulario de consentimiento fundamentado, se hará una copia para entregarla al participante. La versión original del formulario de consentimiento de cada participante quedará en posesión del equipo de investigación, que estará obligado a conservarla en un lugar seguro hasta que hayan transcurrido 15 años del final del estudio.

En el apéndice A se ofrece un ejemplo de información para los participantes y una plantilla del formulario de consentimiento fundamentado.

2.2.5 INCENTIVOS PARA PARTICIPAR Y COMPENSACIÓN

El principal beneficio de este estudio es la frecuencia de los análisis en personas posiblemente expuestas al ZIKV, lo cual permitirá detectar a tiempo cualquier anomalía o riesgo y adoptar las decisiones oportunas. Indirectamente, los datos recopilados en este estudio ayudarán a mejorar y orientar los esfuerzos para prevenir la propagación del virus. Todos los participantes en el estudio recibirán, además, información complementaria sobre medios de protección contra los mosquitos vectores del ZIKV, sobre otros posibles modos de transmisión del ZIKV y sobre el riesgo de microcefalia, ofrecida por asistentes sociales y profesionales de la salud capacitados.

La posibilidad de ofrecer una compensación económica (p. ej., para los gastos que implique el acudir a las revisiones médicas) dependerá del contexto del estudio, y las políticas locales deben determinarse de forma específica para cada estudio concreto.

Comentario: El abordaje clínico de los pacientes no forma parte de este protocolo de investigación; queda a discreción del médico responsable y debe llevarse a cabo de conformidad con las normas asistenciales habituales en el centro correspondiente.

2.3 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se solicitará la debida autorización ética de acuerdo con las autoridades locales, regionales y nacionales. El patrocinador y los investigadores se comprometerán a realizar este estudio en conformidad con la [Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial \(AMM\)](#) (Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos), adoptada por la 64.^a Asamblea General de la AMM, Fortaleza (Brasil), octubre del 2013.

Comentario: Los siete protocolos normalizados están en fase de revisión por parte del [Comité de Ética](#) de la OMS.

2.3.1 BENEFICIOS Y RIESGOS PARA LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

El principal beneficio de este estudio es la frecuencia de los análisis en personas posiblemente expuestas al ZIKV, lo cual permitirá detectar a tiempo cualquier anomalía o riesgo y adoptar las decisiones oportunas. Indirectamente, los datos recopilados en este estudio ayudarán a mejorar y orientar los esfuerzos para prevenir la propagación del virus.

Todas las muestras biológicas se recogerán en conformidad con los procedimientos médicos habituales y siguiendo las normas corrientes de actuación. Todos los riesgos asociados a la recogida de muestras biológicas se explicarán en conformidad con la práctica habitual para el correspondiente establecimiento de asistencia sanitaria. La obtención de una pequeña cantidad de sangre, orina, saliva, líquido bucal, semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, sangre menstrual, secreción rectal y leche materna, con el fin de determinar la exposición al ZIKV en cada visita del estudio, entraña un riesgo mínimo para los participantes en el estudio. Se comunicará a los participantes sus resultados personales (p. ej., si hay indicios de infección por el ZIKV o alguna otra infección pertinente). Todos los resultados analíticos son propiedad de cada participante y deben proporcionarse a cada participante con la mayor prontitud posible.

Comentario: Tanto en el protocolo en sí como en su correspondiente formulario de consentimiento fundamentado deben explicarse las pruebas analíticas que se realizarán en las distintas muestras obtenidas, cómo se usarán los resultados de dichas pruebas y cómo se comunicarán a los participantes. Todo ello dependerá probablemente de los requisitos exigidos por el comité de ética local.

La prevención de la infección por el ZIKV y el tratamiento posterior a las pruebas del ZIKV seguirán las directrices nacionales y de la OMS, que pueden ir actualizándose:

- En caso de prueba del ZIKV negativa, se ofrecerá información sobre protección contra la infección por el ZIKV.
- En caso de prueba del ZIKV positiva (infección por el ZIKV) en una mujer en edad fecunda, se ofrecerá a la mujer (y también a su pareja, si lo desea) información exacta y basada en la evidencia sobre la posible repercusión de la infección por el ZIKV en el embarazo [probabilidad de anomalías congénitas en relación con la infección por el ZIKV].

Comentario: En la siguiente publicación de la OMS se ofrece más información sobre la conducta asistencial ante un resultado positivo de ZIKV durante el embarazo: “Orientación provisional — Atención en el embarazo en el contexto del brote de virus de Zika” (13 de mayo del 2016).

Las mujeres que lleven a término su embarazo deben recibir atención y apoyo apropiados para controlar la ansiedad, el estrés y el entorno del parto. Los planes para la atención y el manejo del bebé poco después del nacimiento deben comentarse con los padres durante el embarazo, de ser posible en interconsulta con un pediatra o neuropediatra.

Las mujeres que deseen interrumpir el embarazo deben recibir información exacta acerca de las opciones legalmente permitidas, incluida la reducción de daños donde la atención deseada no resulte de fácil acceso.

Todas las mujeres, con independencia de cuál sea su elección personal con respecto al destino del embarazo, deben ser tratadas con respeto y dignidad.

2.4 RECOPIACIÓN Y GESTIÓN DE DATOS

2.4.1 RECOPIACIÓN DE DATOS

Tras haber obtenido el consentimiento fundamentado de los casos iniciales considerados aptos, se pasará un cuestionario normalizado a todos los participantes en el estudio. En el momento de su incorporación al estudio, se recogerá de los **casos iniciales** y de sus **contactos domésticos** la siguiente información:

- Datos demográficos generales, incluido nivel socioeconómico (determinado según el índice de riqueza)
- Antecedentes médicos personales (entre ellos, vacunas recibidas) y familiares, y datos de la enfermedad actual
- Factores de riesgo conocidos y posibles (factores demográficos, modo de vida, factores ecológicos, infecciones anteriores, etc.) para la infección por el ZIKV; incluidos antecedentes de viajes, exposición a vectores y medidas de protección frente a los vectores
- Exploración física general efectuada por un profesional de la salud capacitado
- Signos y síntomas de infección por el ZIKV
- Análisis de laboratorio en muestras de sangre, orina, saliva, líquido bucal, semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, sangre menstrual, secreción rectal y leche materna, según corresponda, para confirmar exposición al ZIKV u otras infecciones pertinentes: por arbovirus (p. ej., dengue) o TORCHS (toxoplasmosis, otras infecciones [p. ej., varicela, etc.], rubéola, citomegalovirus, herpes, VIH, sífilis)

En cada visita de seguimiento, se recogerá de los **casos iniciales** y de sus **contactos domésticos** la siguiente información:

- Datos clínicos; entre ellos, cualquier tratamiento recibido entre una visita de seguimiento y la siguiente
- Signos y síntomas de infección por el ZIKV u otras infecciones pertinentes (p. ej., arbovirus, TORCHS)
- Análisis de laboratorio en muestras de sangre, orina, saliva, líquido bucal, semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, sangre menstrual, secreción rectal y leche materna, según corresponda, para confirmar exposición al ZIKV u otras infecciones pertinentes: por arbovirus (p. ej., dengue) o TORCHS (toxoplasmosis, otras infecciones [p. ej., varicela, etc.], rubéola, citomegalovirus, herpes, VIH, sífilis)

- Se solicitará a las mujeres menstruantes que aporten una muestra de sangre menstrual lo más cercana posible al primer día de la regla, y una segunda muestra antes de que termine la menstruación. La obtención de estas muestras de sangre menstrual no tiene por qué ser simultánea con la de los demás líquidos corporales. Si la menstruación no coincide con el momento de recogida de las demás muestras, se pedirá a la mujer que acuda para la recogida de muestras en días diferentes según corresponda. Esta circunstancia se explicará en el momento de la incorporación al estudio.

Comentario: El Ministerio de Salud del Brasil, los Institutos de Investigación de Fiocruz, el Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed y la OPS/OMS han elaborado un cuestionario normalizado específicamente diseñado para este protocolo. El cuestionario contiene las variables y datos básicos que deben recogerse en los participantes para abordar los objetivos de este estudio. Cabe la posibilidad de añadir más preguntas a discreción del grupo de investigación. El cuestionario está diseñado para que pueda aplicarlo personal capacitado, sin necesidad de títulos médicos avanzados o especializados.

2.4.2 GESTIÓN DE DATOS

Todos los datos recopilados se conservarán en bases de datos y toda la información identificable de los participantes, como su nombre y domicilio, tendrá asignada una clave de identificación asignada de forma aleatoria y con garantía de anonimato. La ubicación y los requisitos de seguridad de la base de datos dependerán de la normativa nacional, y por tanto se determinará de forma individualizada en cada estudio concreto. Se elaborará una copia de la base de datos, protegida por contraseña y sin datos identificables (nombre y domicilio), y se enviará al o los gerentes de datos designados para el correspondiente análisis estadístico de los datos.

Los resultados de las pruebas analíticas se transmitirán al centro encargado de centralizar y analizar los datos, a su vez responsable de hacer llegar luego los resultados analíticos a los participantes en el estudio. Los resultados de las pruebas analíticas deben comunicarse a los participantes o a su prestador de atención primaria.

La identidad de los participantes estará protegida en todo momento, y solamente se harán públicos datos resumidos de los resultados agrupados. Los formularios originales de recopilación de datos se conservarán bajo llave según lo dispuesto por las leyes nacionales durante un período prolongado tras el final del estudio. Se elaborará asimismo un registro de identificación que deberá conservarse en un lugar seguro y bajo llave dentro del país en el que se lleve a cabo el estudio.

2.5 RECOGIDA DE MUESTRAS Y PRUEBAS ANALÍTICAS

2.5.1 RECOGIDA, ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Sangre: Para obtener muestras de suero, se extraerá sangre entera mediante punción venosa en tubos de vacío sin anticoagulante, y tras su coagulación se procede a separar el suero por centrifugación. Se extraerá una muestra de sangre venosa para medir en el suero los anticuerpos IgM e IgG anti-ZIKV y el antígeno del ZIKV. Comentario: Lo ideal es recoger tres tubos de 5 ml, pero es posible llevar a cabo el estudio con un solo tubo de 5 ml.

Para obtener muestras de plasma, se extraerá sangre entera mediante punción venosa en tubos de vacío con EDTA, y se dejan reposar o se centrifugan para separar el plasma.

Para determinar citocinas, debe utilizarse heparina como anticoagulante.

- Hacen falta 500 µl de muestra fresca para realizar las pruebas de serología y RT-PCR
- Dos alícuotas de 1 ml se congelan a -70°C para las pruebas de serología y RT-qPCR
- Tres alícuotas de 2 ml se congelan a -70°C para determinaciones futuras
- Pueden enviarse fuera una alícuota de 1 ml de suero y 5 ml de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Orina:

- Se recogerán 20 ml de orina en un frasco con tapa de rosca
- Tres alícuotas de 2 ml se congelan a -70°C para RT-qPCR
- Tres alícuotas de 2 ml se congelan para determinaciones futuras

Líquidos bucales (saliva, líquido crevicular), semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, sangre menstrual, secreción rectal, leche materna: Para estas muestras, es importante obtener:

- Al menos 500 µl para pruebas de serología y RT-qPCR (si procede)
- Otros 500 µl más que se congelan a -70°C para determinaciones futuras

Se solicitará a los participantes su consentimiento para conservar sus muestras en biobancos para investigaciones futuras. Las muestras de los participantes que otorguen su consentimiento se conservarán a -70°C . Las muestras que den positivo por RT-PCR se procesarán también para cultivo y aislamiento de virus.

Recogida de las muestras: Todos los tubos de recogida de muestras se rotularán con una clave de identificación que se anotará en el cuestionario de entrevista. Se anotarán asimismo el momento y lugar de obtención de la muestra y el nombre de la persona que recoge la muestra.

Almacenamiento y conservación de las muestras: A menos que se especifique lo contrario, todos los tubos con muestras se almacenarán temporalmente en hielo llevado por el equipo del estudio hasta que puedan transportarse al laboratorio:

- Refrigerados (entre 2 y 8°C) si está previsto su procesamiento (o envío a un laboratorio de referencia) en un plazo de 48 horas.
- Congelados (entre -10 y -20°C) si está previsto su procesamiento en un plazo de 3 a 7 días.
- Congelados (-70°C) si está previsto su procesamiento después de una semana. Las muestras pueden conservarse durante períodos prolongados.

Si fuera necesario el transporte aéreo, las muestras se despacharán —en la medida de lo posible— en envasado triple con hielo seco en un plazo de 48 horas; o, como mínimo, se mantendrá la cadena de frío con geles de refrigeración.

Transporte de las muestras: El transporte de muestras dentro de las fronteras nacionales debe respetar los reglamentos nacionales pertinentes, y el transporte internacional debe respetar los [reglamentos internacionales](#) pertinentes. Las muestras originales deberán ir envasadas, rotuladas y marcadas (si se usa hielo seco) y documentadas como sustancias de la categoría B.

Comentario: Deben separarse de cada muestra por lo menos dos alícuotas, y al menos una de ellas se conservará para análisis futuros. De esta forma, las muestras pueden permanecer en el país, y enviar solamente las alícuotas a un laboratorio de referencia, de ser necesario. Ello dependerá de los requisitos exigidos por el comité local de ética.

2.5.2 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Los análisis de laboratorio se llevarán a cabo en el país del centro de investigación que obtuvo las muestras biológicas o en colaboración con un laboratorio externo colaborador, según sea necesario. Deben separarse de cada muestra por lo menos dos alícuotas, y al menos una de ellas se conservará para análisis futuros. En el cuadro 1 se enumeran las principales pruebas descritas para la detección y el diagnóstico diferencial de la infección por el ZIKV.

Comentario: La lista de pruebas analíticas y agentes patógenos ofrecida a continuación puede estar sujeta a modificaciones según las capacidades del laboratorio local y los microbios patógenos circulantes; por consiguiente, debe revisarse específicamente para cada estudio concreto.

Comentario: El virus de la fiebre amarilla puede incluirse en la lista de agentes patógenos investigables en las zonas en las que esté circulando actualmente.

Cuadro 1: *Lista de análisis biológicos que se efectuarán en las muestras recogidas*

Tipo de muestra	Análisis	Agente patógeno	Observaciones
Suero	Serología: IgM e IgG	Virus del Zika, virus del chikunguña, virus del dengue, citomegalovirus, virus de la coriomeningitis linfocitaria, virus de la varicela-zóster, toxoplasmas, virus del herpes simple, virus de la rubéola	En caso de resultado positivo, se usará la misma muestra para la técnica de neutralización por reducción de placas (TNRP)
Orina, líquidos bucales (saliva, líquido crevicular), semen, sudor, lágrimas, secreción vaginal, sangre menstrual, secreción rectal, leche materna	RT-PCR en tiempo real	Virus del Zika, virus del chikunguña, virus del dengue, citomegalovirus, virus de la coriomeningitis linfocitaria, virus de la varicela-zóster, toxoplasmas, virus del herpes simple, virus de la rubéola	

La confirmación analítica de infección reciente por ZIKV consiste en:

- Presencia de antígeno o ARN del ZIKV en el suero u otras muestras (p. ej., líquido bucal, tejidos, orina, sangre entera); o bien
- Si el paciente tiene ácido nucleico específico tanto de ZIKV como de virus del chikunguña o virus del dengue, es preciso hacer un análisis sérico de confirmación; la infección por el ZIKV se confirma si: positividad de anticuerpos IgM anti-ZIKV y valor de PRNT90 ZIKV ≥ 20 y razón de valor de PRNT90 ZIKV ≥ 4 con respecto a otros flavivirus; y exclusión de otros flavivirus.

- Cultivo de virus para determinar si hay virus vivos en una muestra determinada de líquidos corporales.

Métodos serológicos: Pueden ser necesarias múltiples determinaciones serológicas para confirmar la seropositividad. Aun cuando la reactividad cruzada de los anticuerpos con otros virus genéticamente relacionados es mínima durante la primoinfección, el suero de las personas con antecedentes de infección por otros flavivirus (especialmente los virus del dengue, de la fiebre amarilla y del Nilo Occidental) puede causar reactividad cruzada. La técnica de neutralización por reducción de placas (TNRP) ofrece mayor especificidad para la detección de anticuerpos neutralizantes (IgG), pero se han documentado también con ella reacciones cruzadas. De hecho, en algunos pacientes con antecedentes de infección por otros flavivirus se ha descrito un aumento al cuádruple de los valores de anticuerpos neutralizantes con la infección por el ZIKV. Por lo tanto, el tamizaje primario debe efectuarse mediante técnicas de ELISA, inmunoanálisis o pruebas de inmunofluorescencia, y la confirmación debe incluir una técnica de neutralización del virus.

Métodos moleculares: El método preferido para detectar y cuantificar la presencia de partículas virales de ZIKV en los líquidos corporales es la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa) en tiempo real. Diversos equipos de investigación y laboratorios de diagnóstico han diseñado múltiples cebadores específicos para el ZIKV (véanse ejemplos en el apéndice C). Existen también equipos comerciales, pero solo para uso exclusivo en investigación (Musso y Gubler, 2016). Todavía no se ha logrado la normalización óptima entre laboratorios. Dado que la elección de los cebadores depende de la diversidad genética de las cepas de ZIKV actualmente circulantes, es posible que deba adaptarse este aspecto para cada estudio concreto.

Genotipificación/secuenciación completa seleccionada: Lo ideal es que el análisis genómico adicional se lleve a cabo en un subconjunto de muestras positivas mediante métodos de secuenciación completa. Se explorarán la secuenciación hologenómica y la determinación de cargas virales afines. Los procedimientos posteriores de confirmación, como la PCR cuantitativa en tiempo real, se realizarán según se considere necesario, preferentemente con reactivos comerciales o, en su defecto, mediante ensayos de laboratorio adaptados a partir de la bibliografía. Si fracasan otros métodos moleculares para determinar las secuencias del virus, es posible obtener los virus mediante cocultivo con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) activadas.

Comentario: Si estas pruebas analíticas no están disponibles en el país, pueden enviarse las muestras al extranjero para su análisis, según los reglamentos del comité local de ética.

Comentario: Estas recomendaciones están sujetas a actualización conforme vayan apareciendo nuevas pruebas diagnósticas fiables disponibles para uso clínico.

3 CRITERIOS DE VALORACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

3.1 CONSIDERACIONES SOBRE EL TAMAÑO MUESTRAL

Se trata de un estudio prospectivo de observación de cohortes, por lo que de antemano no puede determinarse con exactitud el tamaño muestral requerido. Sin embargo, teniendo en cuenta la escasez de datos existentes sobre eliminación de virus, incluso un número reducido de participantes aportaría información científica aprovechable sobre este asunto y permitiría mejorar las recomendaciones de salud pública.

A continuación ofrecemos los argumentos para justificar la estimación del tamaño muestral necesario para otros líquidos corporales distintos de la sangre, a partir de una estimación hipotética de la prevalencia de persistencia de un 50% al cabo de 12 meses.

Con un intervalo bilateral de confianza de 95% del 10% (o margen de error de $\pm 5\%$), bastaría con disponer de una muestra de 385 hombres y 385 mujeres con positividad para el ZIKV en orina o en sangre al inicio del estudio.

Para tener en consideración el efecto del diseño (ED) o agrupamiento a nivel doméstico, aplicamos un ED de 1,5 presuponiendo un tamaño familiar de 3 participantes infectados por ZIKV y una correlación intrafamiliar de 0,25, lo cual nos da un tamaño muestral de 576. Presuponemos asimismo que un 10% de los participantes (casos iniciales y contactos domésticos) se habrán perdido de vista para el seguimiento al final del primer año, por lo que el tamaño inicial de la muestra debería ser de 634 hombres y 634 mujeres. Redondeamos esta cifra a 650 hombres y 650 mujeres.

La estimación del tamaño muestral es tentativa, pues existe poca información publicada sobre las tasas de persistencia del ZIKV en los líquidos corporales. El tamaño muestral final estimado es de 650 hombres y 650 mujeres para evaluar el criterio principal de valoración: tasa global de persistencia del ZIKV al cabo de 12 meses, en hombres y mujeres (teniendo ya en consideración el efecto del diseño o agrupamiento y los pacientes perdidos de vista para el seguimiento). Puesto que aún no se conoce bien la importancia de los distintos factores de riesgo, se llevarán a cabo de forma exploradora análisis por subgrupos y se explorará también el efecto de los distintos factores sobre el criterio principal de valoración mediante modelos de análisis multivariante.

3.2 VARIABLES DE VALORACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los siguientes análisis estadísticos y criterios principales de valoración corresponden a los objetivos principales descritos anteriormente. Corresponde al grupo de investigación definir los criterios secundarios de valoración en virtud de los objetivos secundarios elegidos.

Cuadro 2: *Análisis estadísticos correspondientes a los objetivos principales*

Objetivo	Variable de valoración	Análisis estadístico
1. Evaluar la presencia y la duración de persistencia de ZIKV infeccioso y sus marcadores	Detección de ARN del ZIKV en muestras de líquidos corporales en diferentes momentos	Media, mediana e intervalo de carga viral para cada muestra de líquidos corporales

2. Comparar la presencia y la duración de persistencia de ZIKV infeccioso procedente de personas infectadas en sus contactos domésticos infectados o no infectados	Detección de ARN del ZIKV en muestras de líquidos corporales en diferentes momentos en diferentes contactos domésticos	Comparación estadística (p. ej.: prueba de la <i>t</i> , prueba de Mann-Whitney)
3. Determinar la relación entre los factores del anfitrión, los factores ambientales y la presencia de coinfecciones, por un lado, y la duración de persistencia del ZIKV en los líquidos corporales, por el otro	Datos demográficos, análisis de laboratorio y resultados de la exploración clínica recopilados en los participantes en el estudio	Regresión logística
4. Evaluar la proporción de infecciones asintomáticas entre los contactos domésticos de un caso infectado inicial.	Detección de ARN del ZIKV y características clínicas en los contactos domésticos	Número de casos asintomáticos de ZIKV entre los contactos domésticos / número total de contactos domésticos
5. Evaluar la posibilidad de reinfección o reactivación del virus en los casos durante el período de estudio	Detección de ARN del ZIKV y características clínicas: evolución temporal	Número de casos iniciales de ZIKV reinfectados o reactivados / número total de casos iniciales de ZIKV

4 PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los informes de resultados de este estudio deben elaborarse siguiendo la lista de verificación para estudios de cohortes de la [Iniciativa STROBE](#), e incluir información suficiente para luego poder agrupar los datos con los de otros estudios semejantes.

Entre la información importante que debe aportarse en el informe cabe mencionar: 1) número de casos iniciales incorporados al estudio; 2) número de contactos domésticos sintomáticos y asintomáticos incorporados al estudio; y 3) duración y frecuencia de las pruebas de seguimiento.

Es importante asimismo documentar plenamente el diseño del estudio, incluidos los métodos de incorporación de participantes, el planteamiento para determinar la infección por el ZIKV, los métodos de laboratorio usados y las variables de valoración.

Lo ideal es que la información se recopile en un formato normalizado y que los datos (anónimos) se compartan entre los distintos grupos que llevan a cabo protocolos semejantes.

5 ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

El presente protocolo aborda cuestiones específicas en relación con la posible asociación entre la infección por el ZIKV y diversas anomalías congénitas en el feto. Cabe la posibilidad, no obstante, de investigar otros aspectos de la infección por el ZIKV durante el embarazo según el contexto del estudio. Por consiguiente, puede plantearse la posibilidad de llevar a cabo otros estudios complementarios en combinación con este protocolo.

Existen los siguientes protocolos normalizados de investigación sobre el ZIKV:

- Estudio de casos y testigos para evaluar posibles factores de riesgo relacionados con la microcefalia; entre ellos, la infección por el ZIKV
- Estudio de casos y testigos para evaluar posibles factores de riesgo relacionados con el síndrome de Guillain-Barré; entre ellos, la infección por el ZIKV
- Estudio longitudinal prospectivo en una cohorte de mujeres y recién nacidos expuestos al ZIKV durante el embarazo
- Estudio longitudinal prospectivo en una cohorte de recién nacidos y lactantes nacidos de madres expuestas al ZIKV durante el embarazo
- Estudio transversal de seroprevalencia de la infección por el ZIKV en la población general
- Protocolo de caracterización clínica de la infección por el ZIKV en el contexto de otros arbovirus cocirculantes

6 AGRADECIMIENTOS

Este protocolo normalizado se basa en el estudio de persistencia del ZIKV que van a llevar a cabo el Ministerio de Salud del Brasil, los Institutos de Investigación de Fiocruz, el Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed, la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud.

Han sido muchas las personas implicadas en la creación y revisión de este protocolo: Adele Benzaken (Ministerio de Salud, Brasil), Elisete Duarte (Ministerio de Salud, Brasil), Ana Izabel Menezes (Ministerio de Salud, Brasil), Silvana Giozza (Ministerio de Salud, Brasil), Mariana Verotti (Ministerio de Salud, Brasil), André Abreu (Ministerio de Salud, Brasil), Thayssa Fonseca (Ministerio de Salud, Brasil), Ana Bispo (Fiocruz, Rio de Janeiro), Guilherme Calvet (Fiocruz, Rio de Janeiro), Marcus Lacerda (Fiocruz, Manaus), Ana Maraia de Brito (Fiocruz, Recife), Patrícia Brasil (Fiocruz), Patrícia Sequeira (Fiocruz), Camilla Botto de Menezes (Fiocruz), Flor Martínez Espinosa (Fiocruz), Tereza Magalhães (Fiocruz), Kayvon Modjarrad (Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed), Lydie Trautmann (Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed), Morgane Rolland (Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed), Rasmi Thomas (Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed), Glen Nuckolls (Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares, NIH), Masy Wong (Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares, NIH), Leandro Sereno (Organización Panamericana de la Salud), Ximena Pamela Díaz Bermúdez (Organización Panamericana de la Salud), Maeve de Mello (Organización Panamericana de la Salud), Massimo Ghidinelli (Organización Panamericana de la Salud), Ludovic Reveiz (Organización Panamericana de la Salud), Nathalie Broutet (Organización Mundial de la Salud), Edna Kara (Organización Mundial de la Salud), Robyn Meurant (Organización Mundial de la Salud), Willy Urassa (Organización Mundial de la Salud), Ndema Habib (Organización Mundial de la Salud), Pierre Formenty (Organización Mundial de la Salud), Sihem Landoulsi (Organización Mundial de la Salud), Anna Thorson (Organización Mundial de la Salud), João Paulo Souza (Organización Mundial de la Salud), Maria Van Kerkhove (Instituto Pasteur), Rebecca Grant (Instituto Pasteur), Sibylle Bernard Stoecklin (Instituto Pasteur) y Anna Funk (Instituto Pasteur).

Comentario: Debe revisarse esta lista y añadir otras personas (con su filiación) según corresponda.

APÉNDICES

Apéndice A: Descripción del estudio y plantilla para el formulario de consentimiento fundamentado

Remítase a la descripción del estudio y el consentimiento fundamentado desarrollados específicamente para este protocolo por el Ministerio de Salud del Brasil, los Institutos de Investigación de Fiocruz, el Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed y la OPS/OMS.

Contacto: Nathalie Broutet
Departamento de Salud Reproductiva e Investigaciones Conexas
Organización Mundial de la Salud
broutetn@who.int

Apéndice B: Cuestionario normalizado

Remítase al cuestionario normalizado elaborado específicamente para este protocolo por el Ministerio de Salud del Brasil, los Institutos de Investigación de Fiocruz, el Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed y la OPS/OMS.

Contacto: Nathalie Broutet
Departamento de Salud Reproductiva e Investigaciones Conexas
Organización Mundial de la Salud
broutetn@who.int

Apéndice C: Lista de cebadores publicados para detectar y cuantificar el virus del Zika por RT-PCR en tiempo real (Cao-Lormeau, Blake et al. 2016)

Diana ZIKV	Nombre del cebador/sonda	Secuencia del cebador	Posición del cebador	Referencia
M/E	ZIKV835	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	835-857	(Lanciotti, Kosoy et al., 2008)
	ZIKV911c	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	911-890	
	ZIKV860F FAM	CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG	860-886	
pE	ZIKV1086	CCGCTGCCCAACACAAG	1086-1102	(Lanciotti, Kosoy et al., 2008)
	ZIKV1162c	CCACTAACGTTCTTTGCAGACAT	1162-1139	
	ZIKV1107FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACTCAA	1107-1137	
E	ZIKVENVF	GCTGGDGCRCACACHGGRAC	1538-1558	(Faye, Faye et al. 2008)
	ZIKVENVR	RTCYACYGCCATYTGGRCTG	1902-1883	
NS5	ZIKVF9027a	CCTTGATTCTTGAACGAGGA	9121-9141	(Balm, Lee et al. 2012)
	ZIKVR9197ca	AGAGCTTCATTCTCCAGATCAA	9312-9290	
NS5	Cebador directo	AARTACACATACCARAACAAAGTGGT	9271-9297	(Faye, Faye et al. 2013)
	Cebador inverso	TCCRCTCCYCTYTGGTCTTG	9352-9373	
	Sonda FAM	CTYAGACCAGCTGAAR	9304-9320	