

CAPÍTULO 4

ESTUDIO MOLECULAR COMPARATIVO DE LA FRECUENCIA DE DENGUE Y ZIKA EN SUERO Y SALIVA DE MUJERES EN EDAD REPRODUCTIVA DEL ESTADO DE GUERRERO

Data de aceite: 01/04/2024

Luz del Carmen Alarcón Romero

Profesora investigadora de la facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México
<https://orcid.org/0000-0002-2074-4889>

Ma. Isabel Zubillaga Guerrero

Profesora investigadora de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México
<https://orcid.org/0000-0003-4025-4585>

Carlos Ignacio Machain William

Investigador en el Laboratorio de Vacunología y Virus Tropicales del Instituto Politécnico Nacional. CDMX
<https://orcid.org/0000-0001-9172-0166>

Berenice Illades Aguiar

Profesora investigadora de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México
<https://orcid.org/0000-0003-3937-335X>

Ana María Espinosa García

Responsable del Servicio de Farmacología Clínica. Hospital General de México
<https://orcid.org/0000-0003-3255-4051>

María José Montenegro Rivera

Egresada del grupo de investigación en Ciencias Básicas y Educación. Universidad del Quindío. Armenia, Quindío, Colombia

Julio Alberto Pinzón Barrera

Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México

Yazmín Gómez Gómez

Profesora investigadora de la facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México
<https://orcid.org/0000-0001-8367-9730>

Mariana Villegas Hernández

Egresada de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México

RESUMEN: Introducción. El virus Zika provoca complicaciones neurológicas y muerte fetal. Al igual que Dengue, se asocian a abortos espontáneos. Analizamos la frecuencia de estos virus en suero y saliva

de mujeres guerrerenses en edad reproductiva. Metodología. Se incluyeron 30 mujeres con reacción febril. Se extrajo ARN por Trizol y la detección molecular por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Resultados. El 66.7% presentó virus Dengue en suero y saliva. Detectamos el ARN del virus Zika en 63.3% (saliva) y 50% (suero). Encontramos que más del 50% de las mujeres tuvieron coinfección viral. Los síntomas frecuentes fueron fiebre >38°C, dolor de cabeza, mialgias, artralgias, dolor retro-ocular y conjuntivitis. Conclusiones. La frecuencia del virus Dengue y Zika por RT-qPCR en suero y saliva en período febril, representa un problema en la salud reproductiva y evidencia a la saliva como alternativa no invasiva y de fácil obtención para la detección oportuna de estos virus en mujeres en edad fértil.

PALABRAS-CLAVE: Dengue, Zika, Suero, Saliva, qRT-PCR

COMPARATIVE MOLECULAR STUDY OF THE FREQUENCY OF DENGUE AND ZIKA IN SERUM AND SALIVA OF WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE IN THE STATE OF GUERRERO

ABSTRACT: Introduction. The Zika virus causes neurological complications and fetal death. Like Dengue, they are associated with spontaneous abortions. We analyzed the frequency of these viruses in serum and saliva of Guerrero women of reproductive age. Methodology. 30 women with febrile reaction were included. RNA was extracted by Trizol and Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Results. 66.7% presented Dengue virus in serum and saliva. We detected Zika virus RNA in 63.3% (saliva) and 50% (serum). We found that more than 50% of the women had viral coinfection. The frequent symptoms were fever >38°C, headache, myalgia, arthralgia, retro-ocular pain and conjunctivitis. Conclusions. The frequency of Dengue and Zika viruses by RT-qPCR in serum and saliva in the febrile period represents a problem in reproductive health and evidence of saliva as a non-invasive and easily obtained alternative for the timely detection of these viruses in women of age. fertile.

KEYWORDS: Dengue, Zika, Serum, Saliva, RT-qPCR

INTRODUCCIÓN

Los virus Dengue y Zika son transmitidos por mosquitos *Aedes aegypti*, ambos pertenecen a la familia *Flaviviridae* y género *flavivirus* (Lindenbach *et al.*, 2007). En México, en el 2023, se han reportado 44, 257 casos confirmados de Dengue, siendo las mujeres las más afectadas (>50%); en el estado de Guerrero, la secretaría de salud reportó 1, 891 de Dengue y la circulación de los 4 serotipos, donde el serotipo 1 fue el más frecuente con 320 casos confirmados (Secretaría de Salud, 2023). Se ha evidenciado que el Dengue grave durante el embarazo se asocia con una alta tasa de sufrimiento fetal, parto por cesárea, mortalidad materna (Machain-Williams *et al.*, 2018) y abortos espontáneos (Adjei *et al.*, 2021). Por otra parte, desde la introducción del virus Zika en las Américas, se le ha asociado con microcefalia en recién nacidos y síndrome de Guillan-Barré en adultos (Calvet *et al.*, 2016; Cao-Lormeau *et al.*, 2016). En México se ha reportado la pérdida de audición en el 75% de niños (4.9 ± 0.8 meses) expuestos al Zika en el útero, particularmente entre

aquellos con microcefalia (Verján-Carrillo *et al.*, 2021), así como abortos espontáneos asociados a este virus (Rivadeneira-Espinar *et al.*, 2019). En nuestro país en el 2023 se registraron 27 casos confirmados de Zika y en el estado de Guerrero no se reportaron casos de Zika (Secretaría de salud, 2023), sin embargo, en el 2019 se reportó mediante la prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT), la co-circulación de los 4 serotipos de Dengue y casos de Zika en suero de pacientes con enfermedad febril aguda (Núñez-Avellaneda *et al.*, 2019).

El virus Zika y Dengue producen manifestaciones clínicas similares, por lo que representa un desafío para el diagnóstico médico en las regiones donde circulan ambos virus; en México, cotidianamente se utiliza la prueba de laboratorio mediante el ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), **método** que detecta el antígeno viral y con menor frecuencia la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) (Núñez-Avellaneda *et al.*, 2019). A nivel mundial se utilizan pruebas serológicas; sin embargo, estas técnicas son menos sensibles para el diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad, por lo tanto, para superar estos problemas cruciales, generalmente se necesitan enfoques moleculares dirigidos a la detección de ácidos nucleicos de interés mediante RT-qPCR (da Conceição *et al.*, 2023). La recolección de muestras de sangre puede resultar difícil de aplicar a toda una población, como recién nacidos, niños pequeños, ancianos, hemofílicos y pacientes refractarios, especialmente si sus síntomas y signos clínicos son moderados. En este contexto, recientemente se ha investigado el posible uso de muestras no invasivas (saliva) en la detección molecular de Zika, que presentan un mayor nivel de aceptación para la recolección (Fraiture *et al.*, 2021). En este sentido, en este estudio demostramos con éxito la detección del ARN viral (RT-qPCR) de Dengue y Zika en muestras de saliva y suero de mujeres guerrerenses en edad reproductiva. Además, el uso de muestras de saliva ofreció una ventana de detección más amplia en comparación con el uso de muestras de suero.

METODOLOGÍA

Sensibilización de la población y toma de muestras

Se divulgó la información por medio de trípticos y volantes informativos. Se incluyeron 30 mujeres residentes del estado de Guerrero con reacción febril que acudieron al Laboratorio de Investigación en Citopatología e Histoquímica de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la UAGro. Las participantes firmaron el consentimiento informado y se obtuvieron datos sociodemográficos y clínicos a través de la encuesta. Este proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Autónoma de Guerrero (No. CB-005/23) y recibió financiamiento No. 00000000321792 en la convocatoria de infraestructura CONAHCyT 2022. Para la obtención de suero se recomendó ayuno de 8 a 12 horas, no

fumar ni ingerir medicamentos previos a para la extracción sanguínea. Se utilizó el sistema Vacutainer empleando tubos con gel separador, previniendo el intercambio entre el suero sanguíneo y células. En el caso de la saliva se recomendó no haber ingerido alimentos o bebidas salvo agua, no realizar aseo bucal, los labios deben estar libres de maquillaje y no provocar sangrado de encías previo a la toma de muestra. Para la obtención de esta muestra, se estimuló la secreción de saliva obteniendo un mínimo de 3mL en un tubo estéril. Las muestras fueron transportadas a 4 °C hasta su procesamiento.

Extracción de ARN viral y RT-qPCR para Dengue y Zika

El ARN del suero y saliva fue extraído utilizando el reactivo TRIzol (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las recomendaciones de la estandarización, a través de cuatro fases, la primera fue la homogenización por vortex, seguida de la separación de fases, agregando 100 µL de cloroformo; la tercera fue la precipitación del ARN, transfiriendo la fase acuosa a un nuevo tubo para posteriormente agregar 250 µL de alcohol isopropílico, dejándolo incubar por una noche a -20°C y finalmente la fase de lavados, resuspensión y posterior almacenamiento a -80°C. Los lavados se realizaron mediante centrifugación; dos lavados con 500 µL de etanol al 75% en H₂O en DEPC y la resuspensión con 45 µL de H₂O en DEPC al 0.1%. Se cuantificó el ARN con el equipo NanoDrop (Thermo Scientific Nano Drop 2000c) y la integridad del ARN se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Para la detección de los dos arbovirus se utilizó un kit de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (No. Catálogo, K0251; Thermofisher), posteriormente se preparó de manera independiente un mix de PCR para cada arbovirus que incluyó: 10µL qPCR Máster Mix (2X), 0.5 µL RT, 0.5 µL Forward primer, 0.5 µL Reverse primer, 4.5 µL Agua libre de nucleasas y 4 µL de ARN en un volumen total de 20 µL. Los primers degenerados para Dengue fueron: AAGGACTAGAGGTTAKAGGAGACCC (Den Fw) y GGCGYTCTGTGCCTGGAWTGATG (Den Rw) amplificando la región 3' UTR; los primers para Zika fueron: AGGATCATAGGTGATGAAGAAAAGT (Zik Fw) y CCTGACAACACTAAGATTGGTGC (Zik Rw) para la región NS5 parcial y 3' UTR. Las condiciones de amplificación fueron 60 °C por 30 min, seguida de 45 ciclos (95°C por 3 minutos, 95°C por 15 segundos y 60 °C por 60 segundos) para Dengue; mientras que para Zika fueron 50 °C por 15 min, seguida de 40 ciclos (95°C por 3 minutos, 95°C por 15 segundos y 60 °C por 30 segundos) en el equipo QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, 96-well, 0.2 mL (Applied Biosystems™ (No. Inventario: 56159). Como controles positivos se utilizaron muestras de suero conocidas de pacientes positivos a estos arbovirus y como controles negativos se sustituirá el ARN por agua libre de nucleasas. Un resultado positivo se interpretó cuando se observe una curva amplificación por arriba de la línea del umbral de detección ($C_T \leq 34$), de lo contrario el resultado es negativo ($C_T > 34$) (Xu *et al.*, 2016).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa STATA v.16.0. Se obtuvieron frecuencias absolutas, así como relativas de las variables del estudio, estas fueron comparadas a través de la prueba exacta de Fisher o X^2 . Los resultados con valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

En la tabla 1, se muestran los resultados del diagnóstico molecular en muestras de suero y saliva y las características generales de las mujeres en edad reproductiva, a pesar de que no hubo diferencias significativas, encontrando en este estudio que 22 mujeres (73.3%) de la población fueron positiva a Dengue y 27 (90%) (Figura 1) fueron positivas a Zika (Figura 2). Cabe señalar que, de las 30 mujeres estudiadas, 20 (66.7%) y 15 (50%) tuvieron coinfección de ambos virus en suero, mientras que 20 (66.7%) y 19 (63.3%) tuvieron coinfección de estos arbovirus en saliva (Tabla 1). Además, la mayoría de las mujeres que fueron positivas a estos virus, refirieron una edad entre los 26 a 35 años, las cuales residen en Chilpancingo de los Bravo (región centro) y Ajuchitlán del Progreso (región tierra caliente) del estado de Guerrero. Las mujeres positivas a Dengue en suero (20%) y saliva (15%) habían presentado un aborto; mientras que las mujeres positivas a Zika en suero y saliva reportaron haber tenido un aborto en un 20% y 10.5%, respectivamente.

	DENGUE POS n=22 (73.3%)						ZIKA POS n=27 (90%)										
	SUERO			SALIVA			SUERO			SALIVA							
	NEG n=10 (33.3)	POS n=20 (66.7)	T n=30 (100)	p	NEG n=10 (33.3)	POS n=20 (66.7)	T n=30 (100)	p	NEG n=15 (50)	POS n=15 (50)	T n=30 (100)	p	NEG n=11 (36.7)	POS n=19 (63.3)	T n=30 (100)	p	
Edad (años)																	
15-25	3 (30)	4 (20)	7 (23.3)	0.8*	5 (50)	2 (10)	7 (23.3)	0.05*	4 (26.7)	3 (20)	7 (23.3)	1.0*	4 (36.4)	3 (15.8)	7 (23.3)	0.52*	
26-35	5 (50)	12 (60)	17 (56.7)		4 (40)	13 (65)	17 (56.7)		8 (53.3)	9 (60)	17 (56.7)		5 (45.4)	12 (63.2)	17 (56.7)		5 (45.4)
36-45	2 (20)	4 (20)	6 (20)		1 (10)	5 (25)	6 (20)		3 (20)	3 (20)	6 (20)		2 (18.2)	4 (21)	6 (20)		
Residencia																	
Acapulco	1 (10)	0	1 (3.3)		1 (10)	0	1 (3.3)		1 (6.7)	0	1 (3.3)		1 (9.1)	0	1 (3.3)		
Chilpancingo	8 (80)	7 (35)	15 (50)		7 (70)	8 (40)	15 (50)		6 (40)	9 (60)	15 (50)		7 (63.6)	8 (42.1)	15 (50)		
Ajuchitlán	1 (10)	9 (45)	10 (33.4)	0.03*	1 (10)	9 (45)	10 (33.4)	0.03*	4 (26.6)	6 (40)	10 (33.4)	0.16*	2 (18.2)	8 (42.1)	10 (33.4)	0.45*	
Quechultenango	0	1 (5)	1 (3.3)		1 (10)	0	1 (3.3)		1 (6.7)	0	1 (3.3)		0	1 (5.3)	1 (3.3)		
Zumpango	0	3 (15)	3 (10)		0	3 (15)	3 (10)		3 (20)	0	3 (10)		1 (9.1)	2 (10.5)	3 (10)		
Abortos																	
No	9 (90)	16 (80)	25 (83.3)	0.64*	8 (80)	17 (85)	25 (83.3)	1.0*	13 (86.7)	12 (80)	25 (83.3)	1.0*	8 (72.7)	17 (89.5)	25 (83.3)	0.32*	
Sí	1 (10)	4 (20)	5 (16.7)		2 (20)	3 (15)	5 (16.7)		2 (13.3)	3 (20)	5 (16.7)		3 (27.3)	2 (10.5)	5 (16.7)		

Abreviaturas: NEG: Negativo; POS: Positivo; T: Total; Prueba exacta de Fisher*.

Tabla 1. Características generales de la población y el diagnóstico molecular del Dengue y Zika en suero y saliva.

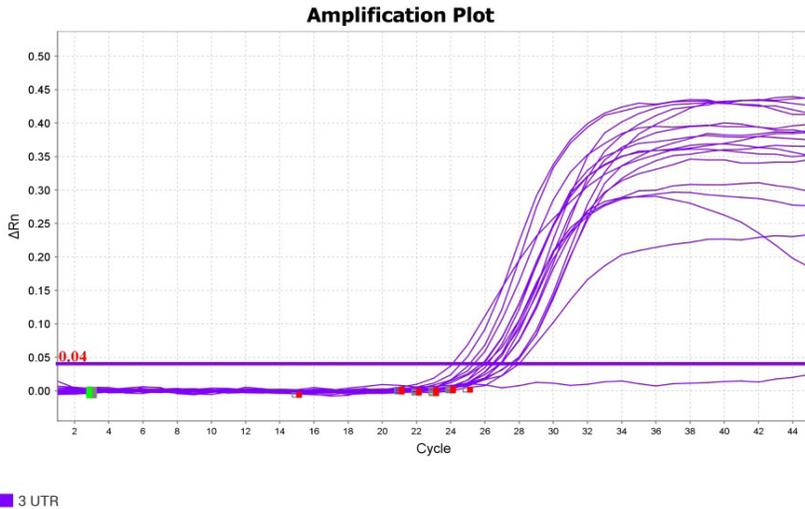


Figura 1. Curvas de amplificación del virus Dengue por RT-qPCR. En la figura se observa la positividad al DENV (región 3'UTR) en muestras de suero y saliva. Positivo ($Ct \leq 34$), negativo ($Ct > 34$).

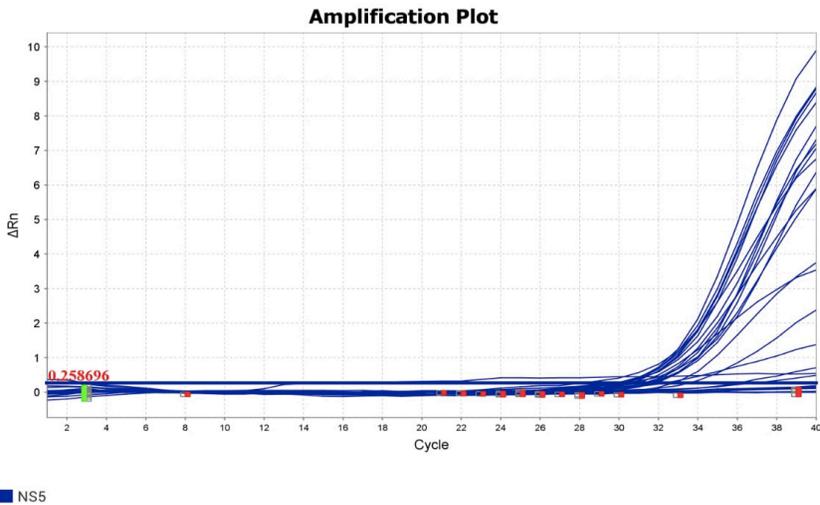


Figura 2. Curvas de amplificación del virus Zika por RT-qPCR. En la figura se observa la positividad al ZIKV (región NS5 parcial y 3UTR) en muestras de suero y saliva. Positivo ($Ct \leq 34$), negativo ($Ct > 34$).

También encontramos el genoma de ambos virus, en los dos fluidos en los primeros 7 días, más frecuentemente. Es importante destacar que ambos virus pueden ser detectados en suero y saliva más de 14 días después del inicio de los síntomas (Tabla 2). Con respecto a los signos y síntomas de las pacientes que fueron positivas a Dengue y Zika observamos que la mayoría presentó fiebre $>38^\circ\text{C}$, la cual duró de 1-3 días ($p=0.03$); también se observó dolor de cabeza, mialgias, artralgias (manos, pies, tobillos, cadera y espalda) ($p=0.04$), dolor retro-orbital, conjuntivitis, así como náuseas (Tabla 2).

	DENGUE				ZIKA										
	SUERO		SALIVA		SUERO		SALIVA								
	NEG n=10 (33.3)	POS n=20 (66.7)	T n=30 (100)	p	NEG n=10 (33.3)	POS n=20 (66.7)	T n=30 (100)	p							
Tiempo transcurrido desde los síntomas hasta el diagnóstico	1 – 7 días	7 (70)	12 (60)	19 (63.3)	6 (60)	13 (65)	19 (63.3)	7 (46.7)	12 (80)	19 (63.3)	9 (81.8)	10 (52.6)	19 (63.3)	0.32*	
		8 – 14 días	3 (30)	5 (25)	8 (26.7)	0.7*	4 (40)	4 (20)	8 (26.7)	0.32*	6 (40)	2 (13.3)	8 (26.7)		0.16*
>14 días	0	3 (15)	3 (10)		0	3 (15)	3 (10)	2 (13.3)	1 (6.7)	3 (10)	0	3 (15.8)	3 (10)		
Fiebre >38°C															
No	2 (20)	6 (30)	8 (26.7)	0.68*	1 (10)	7 (35)	8 (26.7)	4 (26.7)	4 (26.7)	8 (26.7)	3 (27.3)	5 (26.3)	8 (26.7)	1.0*	
	Si	8 (80)	14 (70)	22 (73.3)		9 (90)	13 (65)	22 (73.3)	0.21*	11 (73.3)	11 (73.3)	22 (73.3)	8 (72.7)	14 (73.7)	22 (73.3)
Duración fiebre 38°C															
No	2 (20)	6 (30)	8 (26.7)		1 (10)	7 (35)	8 (26.7)	4 (26.7)	4 (26.7)	8 (26.7)	3 (27.3)	5 (26.3)	8 (26.7)		
	1-3 días	6 (60)	13 (65)	19 (63.3)	0.53*	6 (60)	13 (65)	19 (63.3)	0.03*	8 (53.3)	11 (73.3)	19 (63.3)	6 (54.5)	13 (68.4)	19 (63.3)
4-5 días	2 (20)	1 (5)	3 (10)		3 (30)	0	3 (10)	3 (20)	0	3 (10)	2 (18.2)	1 (5.3)	3 (10)		
Dolor de cabeza															
No	0	1 (5)	1 (3.3)	1.0*	0	1 (5)	1 (3.3)	1 (6.7)	0	1 (3.3)	0	1 (5.3)	1 (3.3)	1.0*	
	Si	10 (100)	19 (95)	29 (96.7)		10 (100)	19 (95)	29 (96.7)	1.0*	14 (93.3)	15 (100)	29 (96.7)	11 (100)	18 (94.7)	29 (96.7)
Dolor muscular															

No	0	2 (10)	2 (6.7)	0.54*	0	2 (10)	2 (6.7)	0.54*	0	² _(13.3)	2 (6.7)	0.48*	0	² _(10.5)	2 (6.7)	0.52*
	10 (100)	18 (90)	28 (93.3)		10 (100)	18 (90)	28 (93.3)		15 (100)	13 (86.7)	28 (93.3)		11 (100)	17 (89.5)	28 (93.3)	
Si																
Dolor retro-orbital																
	No	2 (20)	9 (45)	¹¹ _(36.7)	0.25*	2 (20)	9 (45)	¹¹ _(36.7)	0.25*	6 (40)	⁵ _(33.3)	¹¹ _(36.7)	0.7 ⁿ	³ _(27.3)	8 (42)	¹¹ _(36.7)
Si	8 (80)	¹¹ ₍₅₅₎	¹⁹ _(63.3)		8 (80)	¹¹ ₍₅₅₎	¹⁹ _(63.3)		9 (60)	¹⁰ _(66.7)	¹⁹ _(63.3)		⁸ _(72.7)	¹¹ ₍₅₈₎	¹⁹ _(63.3)	
Conjuntivitis																
	No	7 (70)	¹³ ₍₆₅₎	²⁰ _(66.7)	1.0**	6 (60)	¹⁴ ₍₇₀₎	²⁰ _(66.7)	0.69*	¹² ₍₈₀₎	⁸ _(53.3)	²⁰ _(66.7)	0.25*	⁶ _(54.6)	¹⁴ _(73.7)	²⁰ _(66.7)
Si	3 (30)	7 (35)	¹⁰ _(33.3)		4 (40)	6 (30)	¹⁰ _(33.3)		3 (20)	⁷ _(46.7)	¹⁰ _(33.3)		⁵ _(45.4)	⁵ _(26.3)	¹⁰ _(33.3)	
Exantema																
	No	10 (100)	¹⁵ ₍₇₅₎	²⁵ _(83.3)	0.14*	10 (100)	¹⁵ ₍₇₅₎	²⁵ _(83.3)	0.14*	¹² ₍₈₀₎	¹³ _(86.7)	²⁵ _(83.3)	1.0*	10 (91)	¹⁵ ₍₇₉₎	²⁵ _(83.3)
Si	0	5 (25)	⁵ _(16.7)		0	5 (25)	⁵ _(16.7)		3 (20)	² _(13.3)	⁵ _(16.7)		1 (9)	4 (21)	⁵ _(16.7)	
Sangrado																
	No	10 (100)	¹⁹ ₍₉₅₎	²⁹ _(96.7)	1.0*	9 (90)	²⁰ ₍₁₀₀₎	²⁹ _(96.7)	0.33*	¹⁴ _(93.3)	¹⁵ ₍₁₀₀₎	²⁹ _(96.7)	1.0*	¹¹ ₍₁₀₀₎	¹⁸ _(94.7)	²⁹ _(96.7)
Si	0	1 (5)	¹ _(3.3)		1 (10)	0	¹ _(3.3)		1 (6.7)	0	¹ _(3.3)		0	1 (5.3)	¹ _(3.3)	
Prurito																
	No	8 (80)	¹³ ₍₆₅₎	²¹ ₍₇₀₎	0.68*	8 (80)	¹³ ₍₆₅₎	²¹ ₍₇₀₎	0.68*	⁸ _(53.3)	¹³ _(86.7)	²¹ ₍₇₀₎	0.1*	⁹ _(81.8)	¹² _(63.2)	²¹ ₍₇₀₎
Si	2 (20)	7 (35)	⁹ ₍₃₀₎		2 (20)	7 (35)	⁹ ₍₃₀₎		4 (26.7)	² _(13.3)	⁹ ₍₃₀₎		² _(18.2)	⁷ _(36.8)	⁹ ₍₃₀₎	
Atralgia en manos																

No	3 (30)	8 (40)	$\frac{11}{(36.7)}$	0.7*	3 (30)	8 (40)	$\frac{11}{(36.7)}$	0.7*	$\frac{7}{(46.7)}$	$\frac{4}{(26.7)}$	$\frac{11}{(36.7)}$	0.45*	$\frac{3}{(27.3)}$	$\frac{8}{(42.1)}$	$\frac{11}{(36.7)}$	0.46*
Si	7 (70)	$\frac{12}{(60)}$	$\frac{19}{(63.3)}$		7 (70)	$\frac{12}{(60)}$	$\frac{19}{(63.3)}$		8 (53.3)	$\frac{11}{(73.3)}$	$\frac{19}{(63.3)}$		$\frac{8}{(72.7)}$	$\frac{11}{(57.9)}$	$\frac{19}{(63.3)}$	
Artralgia en pies																
No	3 (30)	5 (25)	$\frac{8}{(26.7)}$	1.0*	3 (30)	5 (25)	$\frac{8}{(26.7)}$	1.0*	$\frac{4}{(26.7)}$	$\frac{4}{(26.7)}$	$\frac{8}{(26.7)}$	1.0*	$\frac{3}{(27.3)}$	$\frac{5}{(26.3)}$	$\frac{8}{(26.7)}$	1.0*
Si	7 (70)	$\frac{15}{(75)}$	$\frac{22}{(73.3)}$		7 (70)	$\frac{15}{(75)}$	$\frac{22}{(73.3)}$		$\frac{11}{(73.3)}$	$\frac{11}{(73.3)}$	$\frac{22}{(73.3)}$		$\frac{8}{(72.7)}$	$\frac{14}{(73.7)}$	$\frac{22}{(73.3)}$	
Artralgia en tobillos																
No	4 (40)	10(50)	$\frac{14}{(46.7)}$	0.7*	4 (40)	$\frac{10}{(50)}$	$\frac{14}{(46.7)}$	0.7*	6 (40)	$\frac{8}{(53.3)}$	$\frac{14}{(46.7)}$	0.46*	$\frac{5}{(45.4)}$	$\frac{9}{(47.4)}$	$\frac{14}{(46.7)}$	0.91**
Si	6 (60)	$\frac{10}{(50)}$	$\frac{16}{(53.3)}$		6 (60)	$\frac{10}{(50)}$	$\frac{16}{(53.3)}$		9 (60)	$\frac{7}{(46.7)}$	$\frac{16}{(53.3)}$		6 (54.6)	$\frac{10}{(52.6)}$	$\frac{16}{(53.3)}$	
Otro lugar de la artralgia en el cuerpo																
No	6 (60)	7 (35)	$\frac{13}{(43.32)}$		6 (60)	7 (35)	$\frac{13}{(43.32)}$		$\frac{5}{(33.3)}$	$\frac{8}{(53.3)}$	$\frac{13}{(43.32)}$		$\frac{5}{(45.46)}$	$\frac{8}{(42.1)}$	$\frac{13}{(43.32)}$	
Cuello	0	1 (5)	$\frac{1}{(3.33)}$		0	1 (5)	$\frac{1}{(3.33)}$		1 (6.7)	0	$\frac{1}{(3.33)}$		0	1 (5.3)	$\frac{1}{(3.33)}$	
Cadera	0	3 (15)	3 (10)		1 (10)	2 (10)	3 (10)		1 (6.7)	$\frac{2}{(13.3)}$	3 (10)		$\frac{1}{(9.09)}$	$\frac{2}{(10.5)}$	3 (10)	
Espalda	2 (20)	4 (20)	6 (20)		1 (10)	5 (25)	6 (20)		$\frac{4}{(26.7)}$	$\frac{2}{(13.3)}$	6 (20)		0	$\frac{6}{(31.6)}$	6 (20)	
Rodilla	1 (10)	0	$\frac{1}{(3.33)}$	0.56*	1 (10)	0	$\frac{1}{(3.33)}$	0.6*	0	1 (6.7)	$\frac{1}{(3.33)}$	0.41*	$\frac{1}{(9.09)}$	0	$\frac{1}{(3.33)}$	0.04*
Cuello y espalda	0	1 (5)	$\frac{1}{(3.33)}$		0	1 (5)	$\frac{1}{(3.33)}$		0	1 (6.7)	$\frac{1}{(3.33)}$		$\frac{1}{(9.09)}$	0	$\frac{1}{(3.33)}$	
Espalda y costillas	0	1 (5)	$\frac{1}{(3.33)}$		0	1 (5)	$\frac{1}{(3.33)}$		0	1 (6.7)	$\frac{1}{(3.33)}$		$\frac{1}{(9.09)}$	0	$\frac{1}{(3.33)}$	
Piernas y brazos	0	1 (5)	$\frac{1}{(3.33)}$		0	1 (5)	$\frac{1}{(3.33)}$		1 (6.7)	0	$\frac{1}{(3.33)}$		$\frac{1}{(9.09)}$	0	$\frac{1}{(3.33)}$	

Piernas y pantorrilla	0	2 (10)	2 (6.7)		0	2 (10)	2 (6.7)		0	2 (10.5)	2 (6.7)					
Fodillias y coxis	1 (10)	0	¹ (3.33)		1 (10)	0	¹ (3.33)		² (13.2)	0	¹ (3.33)		0	¹ (9.09)	0	¹ (3.33)
Otros síntomas																
No	7 (70)	9 (45)	¹⁶ (53.32)		7 (70)	9 (45)	¹⁶ (53.32)		¹¹ (73.2)	⁵ (33.3)	¹⁶ (53.32)		⁴ (45.44)	¹¹ (57.8)	¹⁶ (53.32)	
Diarrea	1 (10)	1 (5)	2 (6.7)		1 (10)	1 (5)	2 (6.7)		0	² (13.3)	2 (6.7)		¹ (9.09)	1 (5.3)	2 (6.7)	
Náuseas	0	4 (20)	⁴ (13.3)		0	4 (20)	⁴ (13.3)		1 (6.7)	3 (20)	⁴ (13.3)		¹ (9.09)	³ (15.7)	⁴ (13.3)	
Dolor abdominal	0	1 (5)	¹ (3.33)		1 (10)	0	¹ (3.33)		1 (6.7)	0	¹ (3.33)		0	1 (5.3)	¹ (3.33)	
Dolor de estómago	0	1 (5)	¹ (3.33)	0.63*	0	1 (5)	¹ (3.33)	0.63*	0	1 (6.7)	¹ (3.33)	0.06*	0	1 (5.3)	¹ (3.33)	0.4*
Presión baja	0	1 (5)	¹ (3.33)		0	1 (5)	¹ (3.33)		1 (6.7)	0	¹ (3.33)		0	1 (5.3)	¹ (3.33)	
Cansancio y náuseas	0	1 (5)	¹ (3.33)		0	1 (5)	¹ (3.33)		0	1 (6.7)	¹ (3.33)		¹ (9.09)	0	¹ (3.33)	
Náuseas y vómito	1 (10)	0	¹ (3.33)		0	1 (5)	¹ (3.33)		1 (6.7)	0	¹ (3.33)		0	1 (5.3)	¹ (3.33)	
Diarrea y náuseas	0	1 (5)	¹ (3.33)		0	1 (5)	¹ (3.33)		0	1 (6.7)	¹ (3.33)		¹ (9.09)	0	¹ (3.33)	
Dolor de estómago, diarrea y náuseas	1 (10)	1 (5)	2 (6.7)		1 (10)	1 (5)	2 (6.7)		0	² (13.3)	2 (6.7)		² (18.2)	0	2 (6.7)	

Abreviaturas: NEG: Negativo; POS: Positivo; T: Total; Prueba exacta de Fisher*: Prueba de Chi²**.

Tabla 2. Relación del cuadro clínico de la población con el diagnóstico molecular del Dengue y Zika en suero y saliva.

Por otro lado, analizamos algunos factores de riesgo importantes en la población positiva a estos arbovirus y observamos que más del 80% vive cerca de lotes baldíos, tienen contenedores de agua (>90%), la cual almacenan por más de 5 días y no la tapan. También encontramos que las pacientes no usan mosquiteros, pabellones y repelentes comerciales. Es importante mencionar que la mayoría de la población mencionó usar abate en sus pilas de agua (63.3%), pero no fumigan sus hogares (>70%) (Datos no mostrados). No se encontró relación entre los factores de riesgo y la positividad a estos virus.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El estado de Guerrero tiene el segundo índice de pobreza más alto a nivel nacional (69.7%), lo que coloca a la entidad entre las de mayor disparidad de acceso a la salud. Se sabe que las mujeres son más propensas a ser afectadas por las condiciones del entorno, situación que repercute de manera importante en su salud (Coneval, 2018). Datos recientes indican que existe un interés creciente por los arbovirus desde la perspectiva de la salud reproductiva, tras la introducción del Zika en América y su posterior circulación endémica (Blitvich *et al.*, 2020). Mientras que el virus Dengue es el *flavivirus* más importante desde el punto de vista médico y epidemiológico debido a que se han reportado más de 390 millones de infecciones al año a nivel mundial por alguno de sus serotipos (1-4) (Bhatt *et al.*, 2013). En el presente estudio encontramos que el 73.3% y 90% de la población fueron positivas a Dengue y Zika, respectivamente. Hasta donde sabemos, el presente estudio, es el primero que evalúa a ambos virus en una población de mujeres en edad reproductiva y el primero en reportar una coinfección de ambos virus en más del 50% de la población en ambas muestras. Las pacientes positivas tenían una edad entre 26-35 años, las cuales eran de la región centro y tierra caliente del estado donde ya se han reportado casos de al menos Dengue, pero no de Zika (Secretaría de Salud, 2023); estos datos sugieren que, debido a la falta de pruebas de detección moleculares, hay un subregistro del virus Zika en el estado, lo cual ya sido reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (Núñez-Avellaneda *et al.*, 2019).

Por otra parte, las mujeres positivas a estos virus habían presentado abortos espontáneos. Se ha reportado que el virus Zika se asocia a abortos espontáneos (Rivadeneira-Espinar *et al.*, 2019) y datos recientes indican que el virus Dengue también podría asociarse con abortos (Adjei *et al.*, 2021). Sin embargo, una limitante de este trabajo es que no se tiene la fecha exacta en la que se dieron los abortos y si esas mujeres fueron diagnosticadas con estos virus en ese momento.

La mayoría de los análisis suelen ser realizados por laboratorios de diagnóstico utilizando muestras de suero; sin embargo, la recolección de muestras de suero no representa la estrategia más sencilla para una implementación masiva porque requiere infraestructura médica y equipos de salud (Fraiture *et al.*, 2021). Por lo que se está

evaluando el uso de muestras no invasivas como la saliva. En este estudio encontramos que el ARN del virus Dengue se detectó en el 66.7% de las muestras de saliva y suero; mientras que el virus Zika se detectó en el 63.3% en saliva y 50% en suero. Es importante resaltar que ambos virus se detectaron más frecuentemente en los primeros 7 días de la infección, que hasta donde se sabe, son los días ideales para la detección molecular, debido a la alta carga viral (da Conceição *et al.*, 2023). Interesantemente, encontramos ARN de Zika y Dengue en suero en una mujer (3.3%) en el día 22 posterior al inicio de los síntomas y al día 23 en una mujer (3.3%) en una muestra de saliva. En este sentido, en un estudio se detectó el ARN de Dengue en saliva y orina >14 días después del inicio de síntomas (Mizuno *et al.*, 2007).

No existen evidencias de detección de virus Zika en suero en este grupo de mujeres por RT-qPCR, solo se han detectado anticuerpos IgM contra Zika en embarazadas de Kenia (Osoro *et al.*, 2022) y en líquido amniótico a través de RT-qPCR y secuenciación metagenómica viral de nueva generación en mujeres embarazadas de Brasil, lo cual refuerza la posible asociación entre este virus y los casos de microcefalia en neonatos en Brasil, ya que el virus atraviesa la barrera placentaria (Calvet *et al.*, 2016). Interesantemente, no hay evidencias en la literatura sobre la detección de estos virus en saliva en este grupo de mujeres, no obstante, la utilidad de este fluido en la detección de virus Zika recientemente ha sido reportada en 18 de 22 pacientes de Nueva Caledonia y Guayana Francesa (Fraiture *et al.*, 2021); lo que sugiere la capacidad potencial de las muestras no invasivas para abarcar un mayor número de casos infectados que las muestras invasivas (Humaidi *et al.*, 2021). Por otra parte, los signos y síntomas de las pacientes que fueron positivas a estos virus fueron fiebre >38 °C de 1-3 días de duración, dolor de cabeza, mialgias, dolor retro-orbital, artralgias (manos, pies, tobillos, cadera y espalda) y náuseas. No hubo diferencias significativas entre la sintomatología referida por las mujeres y el diagnóstico viral, no obstante, estos síntomas se han reportado en otros estudios asociados a estos virus (Machain-Williams *et al.*, 2018; Fraiture *et al.*, 2021; Adjei *et al.*, 2021). Lo cual nos muestra la complejidad en el diagnóstico clínico médico y nos alienta a realizar el diagnóstico molecular para ofrecer un mejor diagnóstico diferencial, mejorar los tratamientos, evidenciar coinfecciones y la co-circulación.

Finalmente, a pesar de no encontrar diferencias significativas entre las variables de riesgo y la frecuencia de Dengue, Zika y a la coinfección viral en mujeres en edad reproductiva; algunos de estos factores de riesgo ya han sido relacionados con la propagación del mosquito *Aedes Aegypti* en Cuba (Bandera *et al.*, 2017). En nuestro estado, la región del centro y tierra caliente poseen condiciones de humedad y temperatura hacen que se acelere el ciclo de reproducción del vector, eclosionando más rápido las larvas y el desarrollo de las pupas y posterior crecimiento a mosquitos adultos y por lo tanto aumentando la circulación del vector (Eiman *et al.*, 2016).

En conclusión, los resultados demuestran la alta frecuencia de detección del ARN viral del Zika (63.3%) y Dengue (66.7%); así como la coinfección de ambos virus (>50%) en una fase temprana en muestras de saliva comparada con suero de mujeres en edad reproductiva con sintomatología clínica, lo que representa un problema de salud pública en este grupo de edad y evidencia a la saliva como una muestra biológica no invasiva, de fácil colección y que puede usarse como una alternativa para la detección molecular de estos virus; además puede ser relevante para la búsqueda de otras infecciones víricas como la causada por virus Chikungunya, por lo que es indispensable incrementar el tamaño de la muestra para seguir explorando esta propuesta y factores de riesgo asociados, en adición, se demuestra la necesidad de seguir fomentando el diagnóstico molecular oportuno de estos virus en las mujeres en edad fértil y con reacción febril, para el seguimiento de los casos y la vigilancia de los brotes.

REFERENCIAS

Adjei, Naomi N et al. "Diagnosis of dengue fever in a patient with early pregnancy loss," *BMJ case reports*, Vol. 14, No. 8 e243968, 2021.

Bandera-Jiménez D et al. "Factores de riesgo relacionados con la positividad al mosquito *Aedes aegypti* en viviendas del área de salud del Policlínico Municipal," *MEDISAN Rev.* Vol. 21, No. 8, 2017.

Bhatt, Samir et al. "The global distribution and burden of dengue," *Nature*, Vol. 496, No. 7, 2013.

Blitvich, Bradley J et al. "Sexual Transmission of Arboviruses: A Systematic Review." *Viruses*, vol. 12, No. 9, 2020.

Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Consultado en internet el 20 de noviembre de 2023. Dirección de internet: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/871831/sem45.pdf>

Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Consultado en internet el 20 de noviembre de 2023. Dirección de internet: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/870935/Pano_dengue_45_2023.pdf

Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Consultado en internet el 20 de noviembre de 2023. Dirección de internet: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/870975/CuadroCasosZikayEmb_SE45_2023.pdf

Calvet, Guilherme et al. "Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study." *The Lancet. Infectious diseases*, Vol. 16, No. 6, 2016.

Cao-Lormeau, Van-Mai et al. "Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study." *Lancet (London, England)*, Vol. 387, No. 10027, 2016.

Consejo Nacional de Evaluación de la Política del Desarrollo Social. Consultado en internet el 20 de noviembre de 2023. Dirección de internet: https://www.coneval.org.mx/coordinacion/entidades/Guerrero/Paginas/Pobreza_2018.aspx

- da Conceição**, Pâmela Jóyce Previdelli et al. "Detection of DENV-2 and ZIKV coinfection in southeastern Brazil by serum and urine testing." *Medical microbiology and immunology*, Vol. 212, No. 3, 2023.
- Eiman**, M., Introini, M.V., Ripoll, C. (2016). Directrices para la Prevención y Control de *Aedes aegypti*. Ministerio de Salud de la Nación, Argentina.
- Fraiture**, Marie-Alice et al. "Non-Invasive versus Invasive Samples for Zika Virus Surveillance: A Comparative Study in New Caledonia and French Guiana in 2015-2016." *Microorganisms*, Vol. 9, No. 6, 2021
- Humaidi**, Mahathir et al. "Non-Invasive Dengue Diagnostics-The Use of Saliva and Urine for Different Stages of the Illness." *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, Vol. 11, No. 8, 2021.
- Lindenbach**, B. D., Thiel, H.-J., and Rice, C. M. "Flaviviridae: the viruses and their replication" in *Fields Virology*. 5th edn. eds. D. M. Knipe and P. Howley (Philadelphia, US: Lippincott Williams & Wilkin), 2007.
- Mizuno**, Y et al. "Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 101, No. 7, 2007.
- Nunez-Avellaneda**, Daniel et al. "Co-Circulation of All Four Dengue Viruses and Zika Virus in Guerrero, Mexico, 2019." *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N. Y.)*, Vol. 21, No. 6, 2021.
- Osoro**, Eric et al. "Prevalence of microcephaly and Zika virus infection in a pregnancy cohort in Kenya, 2017-2019." *BMC medicine*, Vol. 20, No. 1, 2022.
- Rivadeneira-Espinar**, Paola G et al. "Zika as a cause of spontaneous abortion in endemic areas." "Zika como causa de aborto espontáneo en zonas endémicas." *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, Vol. 76, No. 4, 2019.
- Verján-Carrillo**, Erika J et al. "Factors associated with increased odds of sensorineural hearing loss in infants exposed to the Zika virus during pregnancy." *Journal of infection in developing countries*, Vol. 15, No. 4, 2021.
- Xu**, Ming-Yue et al. "Detection of Zika virus by SYBR green one-step real-time RT-PCR." *Journal of virological methods*, Vol. 236, 2016.