



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



**GENERACIÓN DE UN BANCO DE AISLADOS CLÍNICOS DE *FLAVIVIRUS*  
CIRCULANTES EN REGIONES ENDÉMICAS DE MÉXICO**

T E S I S

Que para obtener el título de:

**BIÓLOGO**

P R E S E N T A

**Laura Alejandra López Campa**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. José Bustos Arriaga**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Con todo mi cariño*  
*A mi madre, hermanos y sobrinos*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis el Dr. José Bustos Arriaga por confiar en mí para realizar este proyecto, por compartir su tiempo y sus conocimientos. Al igual que por su paciencia, ayuda y empeño en el desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales, Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, Dr. Felipe Vaca Paniagua, Dr. Luis Enrique Arias Romero y el Dr. Federico Ávila Moreno, por su apoyo, consejos, comprensión y observaciones.

A quienes hicieron posible el trabajo en el laboratorio 17 durante el proyecto, Q.F.B. Tannya Karen Castro Jiménez, CD. Gustavo Guerrero López y Laura Cristina Gómez Legorreta.

Agradezco el apoyo financiero para la realización de este proyecto al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM con el proyecto IA209017, así como al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto PN2029.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mi madre por alentarme y apoyarme en cada paso que doy. Gracias por ayudarme a alcanzar esta meta de la cual formas parte y por todo lo que me has brindado desde siempre, tienes el lugar más grande e importante en mi vida y corazón, te amo.

A mis hermanos que tanto amo, Irlanda y Daniel, por esa alegría y apoyo que me brindan. Luis Ángel, Gabriel, Milagros, Ángel y Valentina, gracias por hacerme tan feliz, son mi vida.

A mi padre por el apoyo económico brindado durante mi carrera y con quien comparto este logro.

A mi tía Isabel y mi primo Isaac por su apoyo incondicional y la confianza puesta en mí.

A Frida Barrón Coronel por acompañarme en este camino, por todo el tiempo compartido, por los buenos momentos que se quedaron para siempre, por las risas, el cariño y el apoyo. Te quiero mucho.

A quienes compartieron conmigo clases, tareas y prácticas de campo inolvidables, por estar en los malos ratos, pero sobre todo por estar en los mejores momentos formando parte de mi vida y por sacarme siempre una sonrisa, Daniel Corona García, Daniel Flores Alta, Laura Cristina Gómez Legorreta, Yael Reyes Cruz y Rosa María Sánchez Sandoval, mil gracias, los quiero siempre en mi vida. Otro particular a Cris porque en estos dos años compartimos trabajo, fracasos y frustraciones, y estuviste a diario aguantándome, muchas gracias.

A Leticia Lizeth Flores Noguérón por brindarme una amistad tan linda y entrañable, por escucharme todas las noches, por las risas interminables, por siempre esperarme y hacerme sentir en casa. Gracias por estar.

A todos ustedes, mi más grande reconocimiento y gratitud

# TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEORICO.....	4
<b>Generalidades de flavivirus.....</b>	4
<b>Estructura y ciclo replicativo.....</b>	4
<i>Virión y genoma viral.....</i>	4
<i>Ciclo replicativo.....</i>	6
<b>Historia natural de la infección por DENV y ZIKV.....</b>	7
<i>DENV.....</i>	7
<i>ZIKV.....</i>	9
<b>Transmisión.....</b>	10
<b>Vectores y su distribución geográfica.....</b>	11
<b>Epidemiología de los flavivirus.....</b>	13
<i>Epidemiología del DENV.....</i>	13
<i>Epidemiología del ZIKV.....</i>	14
<i>Epidemiología de Zika y dengue en México.....</i>	14
<b>Diagnóstico de DENV y ZIKV.....</b>	16
<b>Variabilidad genética de los virus RNA.....</b>	19
<b>Evidencia de la variabilidad genética del virus DENV y ZIKV en México.....</b>	20
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
<b>Muestras.....</b>	24
<b>Virus.....</b>	24
<b>Aislamiento de virus a partir de muestras sanguíneas de pacientes con diagnóstico clínico de infección por flavivirus.....</b>	24

<b>Producción y purificación de los abastos virales</b> .....	24
<b>Extracción de RNA viral</b> .....	25
<b>Síntesis de cDNA</b> .....	25
<b>Tipificación viral por PCR</b> .....	26
RESULTADOS .....	28
<b>Tipificación molecular a partir de virus referencia</b> .....	28
<b>Tipificación molecular de muestras del estado de Oaxaca</b> .....	29
<b>Tipificación molecular de muestras del estado de Yucatán</b> .....	30
DISCUSIÓN .....	36
CONCLUSIÓN.....	40
PERSPECTIVAS.....	40
LITERATURA CITADA .....	41
ANEXO I. GLOSARIO DE TÉRMINOS QUE SE UTILIZAN EN LA TESIS .....	52
ANEXO II. PATRONES DE AMPLIFICACION DE MUESTRAS DEL ESTADO DE YUCATÁN.....	53

## ABREVIATURAS

<b>+ssRNA</b>	RNA monocatenario de polaridad positiva
<b>CDC</b>	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
<b>CHKV</b>	Virus chikungunya
<b>DENV</b>	Virus del dengue
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>IFNs-I</b>	Interferones de tipo I
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina clase G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina clase M
<b>JEV</b>	Virus de la encefalitis japonesa
<b>NSP</b>	Proteínas no estructurales
<b>NTPasa</b>	Nucleósido trifosfatasa
<b>PAHO</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>prM</b>	Glicoproteína precursora de membrana
<b>PtdSer</b>	Fosfatidilserina
<b>RdRp</b>	RNA polimerasa dependiente de RNA
<b>RPMI</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
<b>WHO</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>WNV</b>	Virus del Nilo occidental
<b>YFV</b>	Virus de la fiebre amarilla
<b>ZIKV</b>	Virus del Zika

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Historia natural de la infección por DENV Y ZIKV	9
<b>Figura 2.</b> Mapa global de la presencia estacional y anual de mosquitos Aedes	12
<b>Figura 3.</b> Algoritmo propuesto para los casos sospechosos de infección por arbovirus	18
<b>Figura 4.</b> Esquema de las regiones amplificadas en el genoma viral	27
<b>Figura 5.</b> Patrón de amplificación de virus referencia y aislados históricos.	29
<b>Figura 6.</b> Patrón de amplificación de aislados de Oaxaca.	30
<b>Figura 7.</b> Patrón de amplificación de muestra positiva para DENV-1.	31
<b>Figura 8.</b> Patrón de amplificación de tipificación molecular para ZIKV.	31
<b>Figura 9.</b> Patrón de amplificación de muestra positiva para ZIKV.	32
<b>Figura 10.</b> Diferenciación genética de poblaciones nativas mexicanas.	37

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Métodos para el diagnóstico molecular, antigénico y serológico	16
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de oligonucleótidos usados en PCRs	27
<b>Tabla 3.</b> Virus referencia utilizados como controles positivos	28
<b>Tabla 4.</b> Muestras del estado de Oaxaca tipificadas	29
<b>Tabla 5.</b> Diagnóstico clínico/serológico y resultado de la tipificación molecular de los flavivirus aislados de las muestras de Yucatán.	32
<b>Tabla 6.</b> Lista de muestras del estado de Yucatán tipificadas molecularmente	34

## RESUMEN

La enfermedad causada por el virus del dengue (DENV) es una de las enfermedades virales reemergentes de mayor importancia a nivel mundial y es considerada un grave problema de salud pública. Por otra parte, la infección por virus del Zika (ZIKV) suele ser relativamente leve y no necesita tratamiento específico, sin embargo, es considerado un problema de salud pública debido a las complicaciones clínicas a las que se asocia, como la microcefalia en neonatos y el síndrome de Guillain Barré. La selección de variantes genéticas favorables podría explicar la variabilidad entre la severidad de los brotes tanto en México como en otros países, así como de la distribución cíclica de los cuatro serotipos del virus dengue en nuestro país. Durante este proyecto se realizó la tipificación molecular de aislados clínicos de pacientes con diagnóstico de infección por flavivirus del estado de Oaxaca y Yucatán de la temporada 2016. Se extrajo el RNA de las muestras, se sintetizó DNA complementario y se amplificaron, mediante RT-PCR, regiones conservadas del genoma viral con oligonucleótidos específicos para cada virus, en el caso de DENV también se utilizaron oligonucleótidos tipo específicos. Se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y los resultados obtenidos se fotodocumentaron con Gel Doc EZ System. Como resultado de la tipificación molecular de 4 muestras de Oaxaca se obtuvieron 2 aislados positivos para flavivirus: 1 para DENV1 y 1 para ZIKV. De 49 muestras analizadas de Yucatán, 40 fueron positivas para flavivirus: 32 para DENV1 y 8 para ZIKV. La presencia de DENV y ZIKV en las muestras se debe a su co-circulación en las mismas regiones geográficas, sin embargo la prevalencia de un solo serotipo de DENV puede deberse al desplazamiento de variantes genéticas virales. Por lo tanto el banco de aislados de virus DENV y ZIKV generado y tipificado en este estudio será de gran importancia para la investigación y permitirá el estudio más detallada del nivel de virulencia de las variantes de DENV1 y ZIKV.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores son causadas por parásitos, virus y bacterias. Los vectores más importantes y abundantes son mosquitos, chinches, garrapatas y ácaros, los cuales transmiten patógenos como los virus, entre otros, como dengue (DENV), chikungunya (CHKV), Zika (ZIKV), fiebre amarilla (YFV) y encefalitis japonesa (JEV), así como protozoarios, por ejemplo, *Tripanosoma*, *Leishmania* y *Plasmodium*. En todo el mundo se registran cada año más de 700, 000 decesos como consecuencia de enfermedades transmitidas por vectores. La distribución de dichas enfermedades está determinada por complejos factores demográficos y sociales, como la urbanización no planificada, así como factores ambientales entre ellos el cambio climático. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), un alto porcentaje de la población mundial vive en regiones donde hay un gran riesgo de contraer una o más de las principales enfermedades transmitidas por vectores (WHO, 2017; UANL, 2017).

Se conocen como arbovirus a aquellos virus que son transmitidos por artrópodos hematófagos como mosquitos, chinches, garrapatas, ácaros y moscas de la arena (Kuno y Chang, 2005; Beckham y Tyler, 2015; Agarwal *et al.*, 2017). Las familias de virus que incluyen géneros en el grupo de los arbovirus son *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae* y *Reoviridae* (Kuno y Chang, 2005; Agarwal *et al.*, 2017). Estas familias de virus son en gran parte responsables del reciente crecimiento en el rango geográfico de virus emergentes (Beckham y Tyler, 2015).

Desde 2014, brotes de DENV, CHKV, YFV y ZIKV han afectado a diferentes poblaciones, dejando un considerable número de víctimas y afectando a la economía de cada país, ya que originan altos costos de hospitalización, asistencia a pacientes y campañas para el control de vectores. Adicionalmente DENV y el ZIKV son dos de los arbovirus con mayor importancia médica alrededor del mundo (Bhatt *et al.*, 2013).

El dengue es una de las principales enfermedades reemergentes en el mundo, en la actualidad es endémico en 128 países en las regiones de África, América,

Mediterráneo Oriental, Sudeste Asiático y Pacífico Occidental; las regiones de América, Asia sudoriental y Pacífico (OMS, 2017; Ortega, 2001). Se conocen cuatro serotipos del virus: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, los cuales circulan periódicamente en áreas tropicales y subtropicales (Durbin *et al.*, 2013).

Por otra parte, en los últimos años el ZIKV ha causado un gran número de infecciones debido a su reciente introducción al continente americano y a la adaptación de sus vectores potenciales a nuevas regiones geográficas (Grard, *et al.*, 2014).

Los virus DENV y ZIKV son transmitidos por los mosquitos hembra del género *Aedes*, principalmente de la especie *Aedes aegypti* y, en menor grado *Aedes albopictus* (OPS, 2014; OMS, 2017). La diferenciación de la infección por DENV o ZIKV es complicada ya que los síntomas de ambas enfermedades son similares y pueden variar dependiendo del genotipo del virus, así como del fondo genético poblacional (Jain y Jain, 2014). Generalmente el método diagnóstico diferencial para la infección por DENV o ZIKV es realizado mediante métodos serológicos, mientras que la tipificación molecular se realiza para la generación de información epidemiológica.

En México, la norma oficial mexicana NOM-032-SSA2-2014, para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores considera la vigilancia y el diagnóstico para el DENV por RT-PCR y el aislamiento en el 10% de las muestras positivas para antígeno viral (NS1) en suero (Secretaría de salud, 2015a). Sin embargo, dichas recomendaciones no se aplican en su totalidad en las regiones endémicas para el virus debido a la escasez de recursos y de personal especializado.

Para el ZIKV, el aislamiento no está recomendado en los lineamientos oficiales mexicanos de diagnóstico y vigilancia (Secretaría de Salud, 2016a). Por lo que, el aislamiento y caracterización de virus circulantes en cada brote no son prioridad y los virus aislados no son caracterizados genéticamente, ni fenotípicamente. Por esta razón, se desconocen las características de las variantes genéticas

seleccionadas en nuestro país, así como la virulencia que estas podrían conferirle en cada brote.

La dinámica de vigilancia actual, también limita el alcance de la evidencia científica que se puede generar en el campo de la epidemiología genética de flavivirus en nuestro país, ya que la mayoría de la investigación se genera utilizando aislados históricos o incluso virus de referencia adaptados al laboratorio. La selección de variantes genéticas favorables podrían ser la una explicación de la variabilidad entre la severidad de los brotes tanto en México como en otros países, así como de la distribución cíclica de los cuatro serotipos del virus dengue en nuestro país (Briseño-García *et al.*, 1996; Perez-Ramirez *et al.*, 2009; Carrillo-Valenzo *et al.*, 2010)

Debido a que el problema de salud pública en México causado por flavivirus se ha incrementado de manera significativa en los últimos años con la ya conocida circulación de los cuatro serotipos del DENV y la reciente introducción del ZIKV al continente americano, el objetivo de este proyecto de investigación es generar un banco de aislados de flavivirus circulantes en el estado de Yucatán, purificados y tipificados molecularmente. El banco caracterizado de aislados de flavivirus mexicanos será una herramienta para futuras investigaciones sobre la variabilidad y evolución de flavivirus.

## MARCO TEORICO

### Generalidades de flavivirus

Los arbovirus de mayor importancia médica pertenecen a la familia *Flaviviridae*, la cual incluye tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus* (Bhatt *et al.*, 2013). El género *Flavivirus* comprende más de 70 especies, muchas de ellas patógenos importantes del ser humano que infectan a millones de personas anualmente (Kuno *et al.*, 1998; King *et al.*, 2007; Diamond y Pierson 2015); algunos ejemplos incluyen al virus DENV, el virus JEV, el virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV), el virus de la fiebre amarilla (YFV: yellow fever virus) (Murphy *et al.*, 1995, Kuno *et al.*, 1998), el virus del Nilo occidental (WNV) y el virus ZIKV (Kostyuchenko *et al.*, 2016).

### Estructura y ciclo replicativo

#### *Virión y genoma viral*

La partícula viral madura de los miembros del género *Flavivirus*, tiene un diámetro aproximado de 500 Å, el genoma viral es una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva (+ssRNA) de alrededor de 11 kb, el cual está empaquetado por la proteína de la cápside del virus envuelta en una bicapa lipídica derivada del hospedero y rodeada por 180 copias de la proteína de envoltura (E) y de la proteína de membrana (M) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). El genoma viral cuenta con un Cap de tipo I en su extremo 5' y regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' de alrededor de 100 bases y de entre 400 y 700 bases respectivamente y carece de poliadenilación (Del Ángel *et al.*, 2016; Lindenbach y Rice 2003; Lindenbach *et al.*, 2007; Brand *et al.*, 2017).

El marco de lectura abierto codifica para una poliproteína que incluye a 10 proteínas virales que se procesan proteolíticamente co- y post-traduccionalmente en tres proteínas estructurales que constituyen la partícula viral; cápside (C), membrana (prM) y envoltura (E), y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3,

NS4A, NS4B y NS5, encargadas de la replicación del genoma, ensamblaje viral y evasión de la respuesta inmune innata (Lobo *et al.*, 2009; Schweitzer *et al.*, 2015; Simmonds *et al.*, 2017).

La proteína de cápside está involucrada en el empaquetamiento del genoma viral y en la formación de la nucleocápside (NC) que protege el material genético. La proteína prM, que es madurada por proteasas celulares durante la infección viral tardía, participa en la formación de la envoltura viral y juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura espacial de la proteína E (Zhang *et al.*, 2017). La proteína E es el principal blanco antigénico contra la que se producen anticuerpos, es altamente conservada entre flavivirus con al menos 40% de identidad de aminoácidos, seis puentes disulfuro intramoleculares, el péptido fusogénico que induce la fusión entre la membrana viral y la endosomal de la célula infectada (Rey *et al.*, 1995), así como el sitio de unión al receptor celular (Lindenbach *et al.*, 2007; Mykhopadhyay *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2010).

Las proteínas no estructurales (NSP's) coordinan los aspectos intracelulares tales como la replicación viral, ensamblaje, proteólisis, maduración y regulación de la respuesta inmune innata del hospedero (Roby *et al.*, 2015). Se han descrito algunas funciones de las NSP's durante la infección, algunas de estas incluyen la contribución de la proteína NS1 en la patogénesis de la infección por flavivirus en el hospedero (Liu *et al.*, 2016). NS1 es generalmente conservada entre flavivirus y se encuentra tanto intracelularmente como en forma soluble (sNS1) secretada por las células hospederas, y es liberada en el torrente sanguíneo de individuos infectados. NS1 se usa como marcador viral de infección en pruebas serológicas (Ambrose *et al.*, 2017; Gutsche *et al.*, 2011). La proteína NS3 tiene actividad NTPasa, helicasa y serina-proteasa, la NS5 como RNA polimerasa-dependiente de RNA (RdRp), esta proteína no estructural es la más conservada entre flavivirus. (Yabar, 2003; Velandia y Castellanos, 2011).

### *Ciclo replicativo*

La infección inicia cuando la proteína E es reconocida por receptores celulares, induciendo la adherencia de la partícula viral a la superficie de la célula hospedera, lo que induce la endocitosis mediada por receptor. Los flavivirus pueden infectar varios tipos de células, por lo tanto no utilizan una molécula específica como receptor para entrar a la célula hospedera, lo que sugiere que el virus podría haber evolucionado para no tener una célula u órgano diana específico, sino para ser no específico al aumentar la variedad de sus objetivos (Reyes-del Valle *et al.*, 2014). Algunos de los receptores descritos son: receptores de heparán sulfato, moléculas de adhesión intercelular específicas de células dendríticas no integrinas (DC-SIGN), DC-SIGNR presentes en hepatocitos y L-SIGN en células de ganglios linfáticos, receptores de fosfatidilserina (PtdSer) TIM-1 (dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina) directa e indirectamente a través de ligandos TAM (Tyro3, TAM-Axl y Mer) (Cruz-Oliveira *et al.*, 2015; Gatherer y Kohl, 2016).

Dentro de la vesícula endosomal, la disminución del pH desencadena cambios conformacionales en las glicoproteínas de la superficie viral exponiendo el péptido fusogénico e iniciando el proceso de fusión de la membrana endosomal con la envoltura viral. Una vez que se fusionan la membrana endosomal y la envoltura viral, la nucleocápside y el genoma son liberados al citoplasma y el RNA puede ser traducido directamente en el retículo endoplasmático (RE). Posteriormente la poliproteína es procesada co- y post-traduccionalmente por la proteasa viral NS3 y proteasas del hospedero (Murray *et al.*, 2008). Después de la traducción del genoma viral, el genoma es replicado en el complejo de replicación donde la NS5 sintetiza el intermediario replicativo de RNA complementario con polaridad negativa (-ssRNA), que es posteriormente utilizado como molde para la síntesis del nuevo RNA viral de polaridad positiva que puede ser encapsidado como genoma en la progenie viral o traducido como poliproteína viral (Brinton, 2002).

El ensamblaje de las partículas virales de la progenie viral con el RNA recién sintetizado y proteínas estructurales ocurre en el compartimento luminal del retículo endoplasmático, las partículas virales inmaduras no infecciosas resultantes se

transportan a través de la red trans-Golgi. La proteína prM en las partículas virales inmaduras son procesadas proteolíticamente por la proteasa celular del Golgi, furina, dando como resultado partículas infecciosas maduras que se liberan de la célula por exocitosis (Mykhopadhyay *et al.*, 2005; Gerold *et al.*, 2017).

## **Historia natural de la infección por DENV y ZIKV**

### *DENV*

Dentro del serocomplejo dengue se han descrito cuatro serotipos antigénicamente y genéticamente diversos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (Calisher *et al.*, 1989). Actualmente, los cuatro serotipos DENV se pueden encontrar en casi todas las regiones tropicales y subtropicales (endémicas e hiperendémicas), urbanas y periurbanas donde los vectores están presentes, y en algunos casos circulan simultáneamente (Durbin *et al.*, 2013). Cada serotipo de DENV comparte alrededor del 65-70% de homología de secuencia, que es aproximadamente el mismo grado de relación genética que el virus WNV comparte con el virus JEV. (Halstead, 2008; Azhar *et al.*, 2015; Petersen y Marfin, 2005).

La infección con cualquiera de los serotipos DENV puede ser asintomática en la mayoría de los casos o puede dar lugar a un amplio espectro de síntomas clínicos, que van desde síntomas leves similares a la gripe (previamente conocido como fiebre del dengue [DF]) hasta las formas más graves de la enfermedad, previamente conocidas como fiebre hemorrágica del dengue y síndrome de choque por dengue (FHD/ SSD). En 2009, la OMS reclasificó las presentaciones clínicas de la infección por DENV: dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave (WHO, 2009; Jain y Jain, 2014). Las complicaciones graves de la enfermedad, anteriormente conocidas como fiebre hemorrágica del dengue (FHD), se han correlacionado con infección secundaria con un serotipo heterólogo, sin embargo, se ha sugerido que los factores intrínsecos del hospedero, virulencia del genotipo viral y susceptibilidad del vector deben considerarse como posibles factores de riesgo (Cordeiro *et al.*, 2007).

El período de incubación posterior a la infección con virus DENV es de entre 4-7 días (CDC, 2017). La historia natural de la enfermedad se divide en tres fases: fase febril, fase crítica y fase de convalecencia (Figura 2) (OMS, 2009).

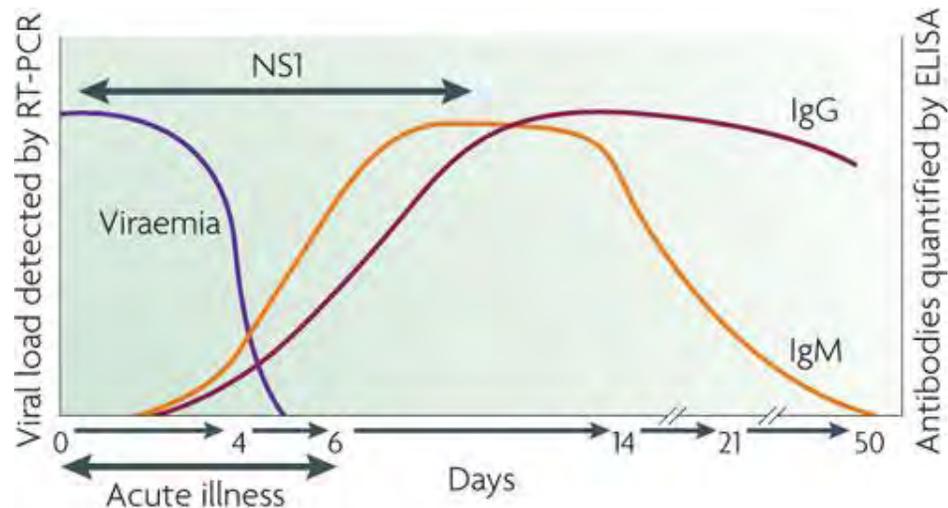
La fase febril tiene una duración aproximada de entre 2 y 7 días, durante este periodo los pacientes desarrollan un cuadro febril agudo, malestar general, mialgias, artralgias, cefalea, dolor retro-orbital, anorexia, náuseas y vómitos (Finizola, 1998), A los pocos días del inicio de la enfermedad pueden presentarse manifestaciones hemorrágicas menores, como petequias y equimosis en la piel. Asimismo puede presentarse hepatomegalia (Rigau-Pérez *et al.*, 1998; OMS 2015).

La fase crítica inicia entre el tercer y séptimo día de evolución de la enfermedad; en este período la fiebre se presenta en menor proporción, con temperaturas de 37.5–38°C, puede ocurrir un aumento de la permeabilidad vascular, vómitos persistentes, acumulación de fluidos, sangrado de mucosas, letargia e irritabilidad, (OMS, 2009). Algunos pacientes con dengue pueden tener varios órganos afectados desde las fases tempranas de la infección por acción directa del virus o por apoptosis como encefalitis, hepatitis, miocarditis y nefritis (Martínez-Torres *et al.*, 2008; OMS 2015).

La etapa final o de convalecencia, el paciente elimina fisiológicamente el exceso de líquidos, mejora el estado general. El hematocrito se estabiliza o puede ser más bajo debido al efecto de dilución causado por el líquido reabsorbido. Normalmente, el número de glóbulos blancos comienza a subir con el aumento de los neutrófilos y la disminución de los linfocitos hasta normalizar todas sus funciones vitales (Oliveira *et al.*, 2009; OMS 2015).

En las infecciones primarias, la inmunoglobulina IgM es detectable en circulación después de aproximadamente 5 días; mientras que IgG es detectable entre 2 y 4 semanas después de la aparición de la sintomatología en la infección primaria y casi inmediatamente en la infección secundaria (Figura 1).

Aunque no existe un tratamiento antiviral específico o preventivo para el dengue, el diagnóstico molecular es de gran utilidad epidemiológica así como para influenciar parcialmente en la selección de las medidas de apoyo en el manejo clínico de las complicaciones durante la enfermedad (Senaka, 2012; CDC, 2017).



**Figura 1.** Historia natural de la infección por DENV Y ZIKV. Indicada con una línea morada se encuentra la carga viral detectable por RT-PCR (viremia) y los anticuerpos cuantificados por ELISA (IgM/IgG) con respecto al tiempo (línea amarilla y roja), así como el período en el que la proteína NS1 es detectada por serología (Guzmán, M. et al., 2010).

## ZIKV

Según la OMS (2017) la enfermedad suele ser relativamente leve y no necesita tratamiento específico, las presentaciones clínicas de las infecciones por el virus ZIKV incluyen enfermedades febriles agudas autolimitantes, dolor de cabeza, mialgia, dolor retro-orbital, artralgia, conjuntivitis y erupción, que se asemejan mucho a las causadas por el DENV y el virus CHIKV (Sun *et al.*, 2017). Se ha observado que el virus ZIKV es neurotrópico y a diferencia de otros flavivirus puede cruzar la barrera placentaria y causar daño neuronal en el producto durante la gestación, lo que resulta en defectos congénitos como la microcefalia, resultados adversos en el parto e incluso aborto espontáneo (Baud *et al.*, 2017). También se ha descrito que ZIKV puede atravesar la barrera hematoencefálica infectando neuronas y células de la glía. En hospederos susceptibles se asocia con complicaciones clínicas como el síndrome Guillain-Barre (GBS), causando

hormigueo, debilidad muscular, parálisis e incluso la muerte (Creange, 2016; Goodfellow y Willison, 2016), así como trombocitopenia grave en adultos (Weaver *et al.*, 2016).

## **Transmisión**

El DENV se mantiene en dos ciclos ecológicos de transmisión distintos evolutivamente, el ciclo selvático y el ciclo urbano. El ciclo selvático involucra a primates no humanos y mosquitos arbóreos del género *Aedes*, y el ciclo urbano a humanos y mosquitos del género *Aedes*, principalmente de la especie *aegypti* (Laredo-Tiscareño *et al.*, 2012). La transmisión del virus ocurre durante la alimentación de mosquitos hembra hematófagos. El mosquito se alimenta de sangre de un individuo en período de viremia, es decir, cuando hay grandes cantidades de virus en la sangre (este período generalmente comienza un poco antes de que la persona se vuelva sintomática, sin embargo algunas personas nunca presentan manifestaciones clínicas significativas, pero aún pueden infectar a los mosquitos), una vez en el mosquito las partículas virales pasan a través del intestino medio, donde el virus se replica en las células epiteliales. Posteriormente los viriones pasan a través de la lámina basal hacia el hemocele donde viajarán para infectar las células epiteliales de las glándulas salivales; después de ingresar al mosquito el virus requerirá una incubación adicional de 8 a 12 días antes de que pueda transmitirse a otro ser humano. El mosquito permanece infectado por el resto de su vida, que puede durar días o algunas semanas (Vogels *et al.*, 2017).

En el caso del ZIKV, el mecanismo de transmisión es similar al del DENV, sin embargo, aunque las picaduras de mosquitos son el principal modo de transmisión de este virus, también existe registro de casos de infección por transmisión perinatal y sexual. El genoma del virus también ha sido detectado en saliva y orina (Bonaldo *et al.*, 2016; Marrs *et al.*, 2016). Hasta marzo de 2017 la OMS ha notificado la transmisión del virus de persona a persona en 13 países de diferentes regiones del mundo (Baud *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017).

## Vectores y su distribución geográfica

Los virus DENV y ZIKV se transmiten por mosquitos hembra hematófagos del género *Aedes* de principalmente la especie *Aedes aegypti* y, en menor grado, de *Aedes albopictus* (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016; OMS 2017; Halstead, 2008). La expansión global del DENV y ZIKV está precedida por la expansión global de sus vectores (Charrel *et al.*, 2014).

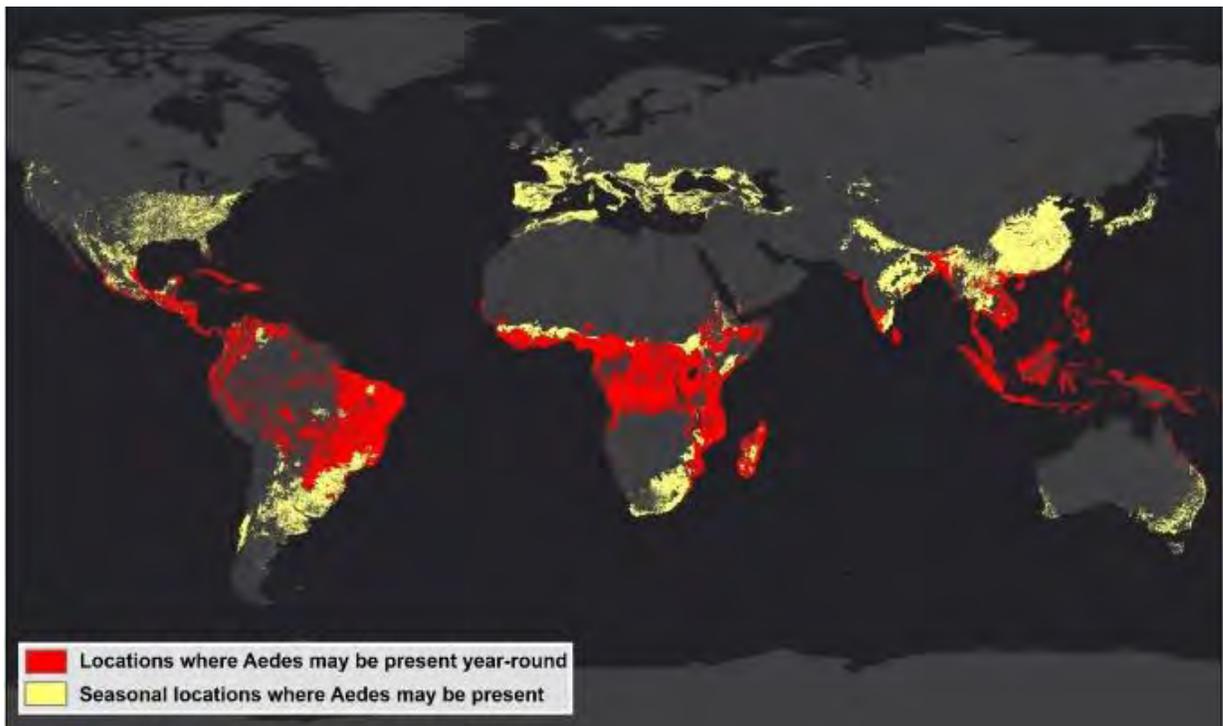
*Aedes aegypti* se introdujo al continente americano desde África, posteriormente se extendió globalmente a las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Brown *et al.*, 2014). *Aedes aegypti* es un vector predominantemente urbano, estrechamente asociado con los humanos y sus viviendas, utiliza la abundancia de contenedores artificiales como sitios larvales y se alimenta casi exclusivamente de humanos (Kraemer *et al.*, 2015; OMS, 2017). *Aedes aegypti* es un vector muy difícil de controlar o eliminar ya que presenta gran capacidad de adaptación, tiene la capacidad de recuperarse rápidamente después de las perturbaciones resultantes de fenómenos naturales o intervenciones humanas. Una de sus adaptaciones es la capacidad de los huevos para resistir la desecación y para sobrevivir sin agua durante varios meses en las paredes internas de los contenedores (CDC 2017).

*Aedes albopictus*, es una especie de bosque originaria de Asia que eventualmente se extendió a las islas en los océanos Índico y Pacífico (Delatte *et al.*, 2009).

*Aedes albopictus*, es el vector secundario del DENV y ZIKV (Paupy *et al.*, 2009; Grard *et al.*, 2014; OMS 2017), se ha extendido por todo el mundo principalmente desde la segunda mitad del siglo XX, y ahora se encuentra en todos los continentes excepto en la Antártida (Kraemer *et al.*, 2015). Se ha propagado debido al comercio internacional de neumáticos usados (que proporcionan criaderos al mosquito) y al movimiento de mercancías. *Aedes albopictus* tiene una gran capacidad de adaptación y gracias a ello puede sobrevivir en las temperaturas más frías de Europa. Su tolerancia a las temperaturas bajo cero, su capacidad de hibernación y

su habilidad para desarrollarse en microhábitats son factores que propician su propagación (Kraemer *et al.*, 2015).

Con base en una técnica de mapeo de correlación Attaway *et al.* estableció que el mosquito *Aedes* está presente durante todo el año en gran parte de América Central, el Caribe y el norte de Sudamérica; África occidental, África central, África oriental costera y Madagascar; partes de la costa de la India y el sudeste de Asia, Indonesia, Malasia y Filipinas, y muchas naciones insulares del Pacífico. La transmisión estacional es posible en un área significativamente más grande, que incluye gran parte del sureste de los Estados Unidos y el norte de México, así como algunas partes del sur de Sudamérica; gran parte del sur de Europa y partes de África del Norte; la costa sureste de África; gran parte de Asia meridional y Asia oriental, incluidas partes importantes de China, Corea y Japón; y partes de Australia y Nueva Zelanda. (Figura 2).



**Figura 2.** Mapa global de la presencia estacional y anual de mosquitos *Aedes*.

## **Epidemiología de los flavivirus**

### *Epidemiología del DENV*

El dengue es la enfermedad transmitida por artrópodos de más rápida propagación mundial y de mayor importancia médica; el primer registro de un caso de probable fiebre del dengue se encuentra en una enciclopedia médica china de la dinastía Jin (265-420 dc). Las primeras epidemias documentadas de dengue ocurrieron casi simultáneamente en Asia, África y América del Norte en la década de 1780. El primer caso confirmado fue el de Benjamin Rush en 1780, se registró en Filadelfia una epidemia de la enfermedad más tarde conocida como dengue (Gluber, 1998; Rigau-Perez, 1998; Rush, 1951). En los últimos 60 años el DENV se ha expandido a 128 países alrededor del mundo, presentando anualmente 390 millones de casos y 25,000 muertes, y se estima que 3,900 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (Shi, 2012; Huang *et al.*, 2014; WHO, 2018).

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (PAHO, por sus siglas en inglés) se cree que las primeras epidemias por dengue en el continente americano ocurrieron en las islas Martinica y Guadalupe en 1635 así como en Panamá en 1699. (Schneider y Droll, 2001). La primera pandemia de dengue registrada se produjo entre 1827 y 1828, y afectó a las Islas Vírgenes, Jamaica, Cuba, Venezuela, Estados Unidos y México. (Gubler, 1997; Schneider y Droll, 2001). Durante la Segunda Guerra Mundial, el dengue se propagó a nuevas regiones. Sin embargo, el surgimiento del DENV hiperendémico en el hemisferio occidental comenzó debido a una campaña parcialmente exitosa dirigida por la Organización Panamericana de la Salud en 1961 para erradicar al mosquito *Aedes aegypti* y controlar la fiebre amarilla. Esta campaña tuvo éxito en la mayoría del continente americano durante los años 50 hasta los 70s, pero fue descontinuada, y para 1980 *Aedes aegypti* no sólo había recuperado su distribución geográfica, sino que amplió su territorio de distribución, recolonizando rápidamente casi todos los neotrópicos y subtrópicos, así el dengue se convirtió en un problema de salud pública mundial. En 1985, *Aedes albopictus* se introdujo a los EE.UU. (Hawley *et al.*, 1987) y a Brasil desde Asia, proporcionando un vector secundario para la

transmisión de DENV en el continente americano. Esta especie fue el principal vector de DENV durante un reciente brote en Hawai (Effler *et al.*, 2005; Weaver y Reisen, 2010; Brathwaite *et al.*, 2012)

### *Epidemiología del ZIKV*

El virus del Zika se identificó por primera vez en Uganda en 1947 en un mono rhesus durante la vigilancia de la fiebre amarilla en el bosque Zika (Hamel *et al.*, 2016; Weaver, 2016). La primera caracterización de la enfermedad humana ocasionada por la infección con ZIKV se produjo en Nigeria durante 1954 (MacNamara, 1954). En 2007 se presentó una gran epidemia en Micronesia y Gabón. Seis años más tarde, en 2013, se presentaron brotes subsecuentes en la Polinesia Francesa y posteriormente en Nueva Caledonia en 2014.

Hasta marzo de 2017 la Organización Mundial de la Salud ha notificado la presencia del ZIKV en 84 países, territorios o zonas subnacionales alrededor del mundo, en el continente americano el ZIKV es endémico en 48 países. El ZIKV fue introducido al continente americano en Brasil entre 2013 y 2015, muy probablemente desde el Pacífico. El primer reporte de ZIKV en el continente ocurrió en mayo de 2015 con casos autóctonos descritos en Brasil, donde causó una gran epidemia que alcanzó su punto máximo en noviembre de ese año, asimismo se notificó una epidemia generalizada de infección por el ZIKV en América central, América del sur y el caribe (Secretaría de salud, 2017a). Esta epidemia se correlacionó con una mayor incidencia de casos de microcefalia en neonatos de madres infectadas con ZIKV, siendo Brasil el país más afectado por ambas epidemias. La infección con ZIKV también se ha correlacionado con complicaciones neurológicas como el síndrome de Guillain-Barré (OMS, 2016; Petersen *et al.*, 2016; Vorou, 2016)

### *Epidemiología de Zika y dengue en México*

En 1941 se registró el primer brote en México de infección por DENV con 6,955 casos en toda la república. Sin embargo las cifras fueron descendiendo a medida que avanzaba la erradicación del vector en 1963, lo que mantuvo el dengue ausente durante 12 años. Sin embargo, en 1978 el virus DENV se reintrodujo en México,

presentándose un aumento en el número de casos lo que lo convirtió en uno de los problemas actuales más importantes de salud pública a nivel nacional (Torres-Galicia, 2014; Narro-Robles, 1995). Las principales epidemias de dengue causadas por DENV-1 ocurrieron en la costa oriental de México durante 1979 y 1980. Se notificaron aproximadamente 17,000 casos de dengue en 1981 (Diaz *et al.*, 2006). En la actualidad, el DENV está presente en 29 estados del país (Secretaría de salud, 2016b), mientras el ZIKV se encuentra en 25 (Secretaria de salud, 2017).

En las últimas dos décadas la incidencia de infecciones por DENV, se mantuvo constante a nivel nacional, sin embargo en algunos estados como Nayarit, Jalisco, Guerrero, Morelos, Yucatán y Quintana Roo la incidencia ha aumentado durante la última década. En contraste, los estados de Baja California Sur, Campeche, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora y Tabasco presentaron una disminución en la tasa de incidencia promedio anual (Torres-Galicia *et al.*, 2014). De acuerdo a la vigilancia epidemiológica realizada por la Secretaria de Salud, en 2015, el acumulado de casos de dengue no grave fue de 21,201, mientras que para dengue con signos de alarma y dengue grave fue de 5,464. Los estados con mayor número de casos confirmados acumulados fueron Guerrero, Jalisco, Michoacán, Sonora y Veracruz (Secretaría de Salud, 2016c). Para 2016 el número de casos acumulados de dengue no grave fue de 14,112, dengue con signos de alarma y dengue grave acumularon un total de 3,683 casos confirmados, siendo Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nuevo León y Veracruz los estados con mayor números de casos (Secretaría de salud, 2016b)

El ZIKV es un virus de reciente introducción en el país, no se tienen registros anteriores al año 2015. Según datos de la Secretaría de Salud en 2015 se reportaron 15 casos autóctonos confirmados de infección por ZIKV en Chiapas, Jalisco y Nuevo León (Secretaría de Salud, 2015b), mientras que en 2016, hasta el registro de la semana 52, se tuvieron un total de 7,560 casos acumulados confirmados, dentro de los estados con mayor números de casos están Chiapas, Guerrero, Nuevo León, Oaxaca, Veracruz y Yucatán (Secretaría de Salud, 2016b). Ya que la presencia de ZIKV en el país es muy reciente, la vigilancia de la

enfermedad se realiza a partir de la vigilancia epidemiológica existente para dengue, teniendo en cuenta las diferencias en la presentación clínica.

### Diagnóstico de DENV y ZIKV

Para el diagnóstico de dengue, la Organización Mundial de la Salud recomienda dos métodos: diagnóstico virológico o directo y diagnóstico serológico o indirecto. Los directos incluyen el aislamiento del DENV, la detección del genoma viral y la detección de antígenos virales. En los indirectos se determinan las inmunoglobulinas específicas contra el virus de clase IgM (infección primaria) e IgG (infección secundaria).

En la tabla 1 se resumen los métodos utilizados en la actualidad para el diagnóstico de flavivirus (OMS, 2015).

Tipo de diagnóstico	Método	Observaciones
Detección del virus, de alguno de sus componentes o producto de la replicación viral		
Aislamiento viral	Cultivo de células de mosquitos <i>Aedes albopictus</i> , C6/36	Para la identificación viral, pueden utilizarse las técnicas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales específicos para cada serotipo viral y la prueba RT-PCR.
Diagnóstico molecular	RT-PCR y RT-PCR en tiempo real	Existen diferentes protocolos que muestran una sensibilidad entre 80% y 90% y una especificidad cercana al 100%.
Diagnóstico antigénico	ELISA y pruebas rápidas para detección de la proteína NS1	NS1 es un marcador de replicación viral presente en el suero del paciente y en la superficie de la célula infectada.
	Técnica de inmunohistoquímica en tejidos	Mediante una combinación de anticuerpos policlonales y monoclonales a dengue pueden detectarse antígenos virales en tejidos.
Diagnóstico serológico		
Detección de anticuerpos IgM	ELISA de captura de IgM (MAC ELISA) y pruebas rápidas	Es el marcador de infección reciente utilizado con mayor frecuencia. Utiliza una sola muestra de suero.
Detección de anticuerpos IgG	ELISA de IgG, inhibición de la hemaglutinación pruebas rápidas.	La presencia de anticuerpos IgG en suero es indicativa de una infección pasada por algún flavivirus.

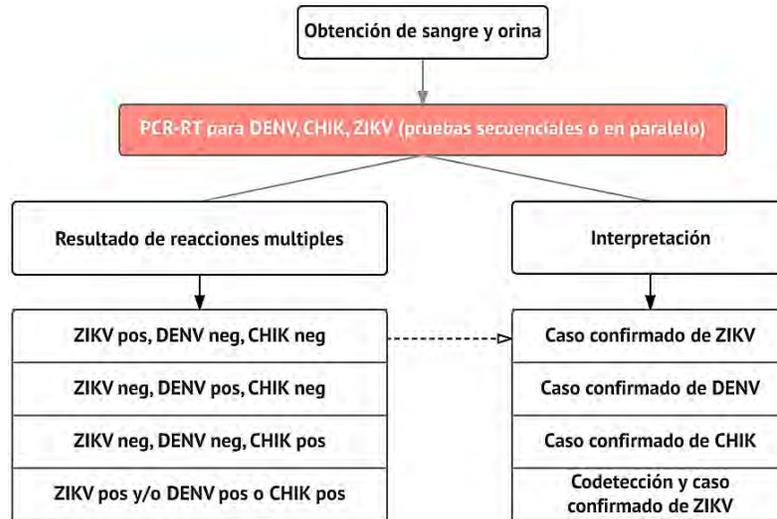
**Tabla 1.** Métodos utilizados para el diagnóstico virológico, molecular, antigénico y serológico según la OMS.

En México, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana-032-SSA2-2014 (NOM-032-SSA2-2014), para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector, para la identificación de DENV que se presenta en muestras positivas, se debe seleccionar el 100% de muestras positivas de Dengue Grave y Dengue con Síntomas de Alarma y el 20% para muestras positivas de Dengue no Grave. En estados donde haya una mayor incidencia, el porcentaje debe ser menor al 10% y en estados con menor incidencia el porcentaje deberá ser respetado. Para los laboratorios estatales de Salud Pública (LESP) que no dispongan de algún kit para la detección de los cuatro serotipos de DENV, la vigilancia virológica de serotipos debe realizarse mediante el uso de RT-PCR en tiempo real, como se describen en el manual de “Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de dengue por laboratorio” publicado en 2017 por Instituto de Diagnóstico y referencia Epidemiológicos (InDRE).

La estrategia para realizar una confiable detección de serotipos está basada en la tipificación durante periodos silenciosos y epidémicos, donde se sugieren que para vigilancia virológica (PCR): se deben enviar 10% de las muestras positivas a NS1 (dengue) y el LESP enviará todas las formas graves al InDRE. que el 10% de las muestras positivas para NS1 por serología de la proteína Se recomienda que la vigilancia para serotipos sea intencionada, ya que durante este periodo se pueden detectar serotipos con muy baja circulación y así evitar que sean enmascarados por la alta circulación de otros.

Para el diagnóstico del virus ZIKV, la Organización Mundial de la Salud estipula que la estrategia adoptada por cada laboratorio debería ser determinada por los recursos disponibles y su flujo de trabajo. Y como estrategias de diagnóstico para enfermedad por el ZIKV en el manual “Pruebas de laboratorio para la infección por el virus de Zika” del 2016, recomienda, el análisis de ácidos nucleicos en pacientes cuyos síntomas hayan empezado hace menos de 7 días, y serología y/o análisis de ácidos nucleicos en pacientes cuyos síntomas hayan empezado hace 7 días o más. La Organización Mundial de la Salud propone el siguiente algoritmo para los casos

sospechosos de infección por arbovirus identificados en los 7 días siguientes al inicio de los síntomas (Figura 3).



**Figura 3.** Algoritmo propuesto para los casos sospechosos de infección por arbovirus (OMS, 2016).

El diagnóstico de infección por ZIKV en mujeres embarazadas puede ser realizado según los criterios descritos previamente y según la fase de la infección. Ya que la infección vertical ha sido descrita para ZIKV, es importante realizar un seguimiento estricto tanto a la madre como al recién nacido. Por otro lado, una muestra de líquido amniótico recolectada bajo una indicación médica para el diagnóstico de otros síndromes, puede utilizarse para detección molecular por RT-PCR (PAHO, 2017).

El diagnóstico indirecto es el más usado en la clínica, debido a que la presencia de partículas virales en circulación ocurre en los primeros días post infección y disminuye en la etapa crítica, mientras que las inmunoglobulinas se encuentran en el organismo a partir de aproximadamente el día 7 post-infección y permanecen en títulos residuales por el resto de la vida del paciente. Sin embargo, este método es poco confiable pues el antígeno utilizado es la proteína de envoltura. Dicha proteína, como se mencionó anteriormente, es altamente conservada en la familia *Flaviviridae* incluyendo a los virus DENV y ZIKV.

Por otra parte el uso de la RT-PCR convencional en el diagnóstico de los casos sospechosos de infecciones por los virus DENV y ZIKV y el monitoreo de la

circulación viral ha demostrado ser una valiosa herramienta diagnóstica, con la ventaja de no proporcionar diferencias significativas en la sensibilidad, tanto primaria como secundaria, así como la capacidad de diferenciar serotipo y entre flavivirus, con la desventaja de estar limitada a la ventana de tiempo de la etapa aguda de la historia natural de la infección en la que existe viremia (Cordeiro *et al.*, 2007; Niu *et al.*, 2015).

### **Variabilidad genética de los virus RNA**

A diferencia de las polimerasas de DNA, las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp) virales carecen de mecanismos de corrección, lo que da como resultado una tasa de error durante la replicación que se estima entre  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  mutaciones por nucleótido, por ciclo de replicación (Kurosu, 2011). Aunque la mayoría de la progenie viral mutante no es viable, la progenie viral consta de diversas variantes genéticas o “cuasiespecies virales”, dependiendo de la fidelidad de la polimerasa. Cuando la población de cuasiespecies son sometidas a una presión evolutiva como el sistema inmune del hospedero, presentan un gran potencial de adaptación, seleccionando mutantes de escape. (Sauder *et al.*, 2006). Se ha observado que los virus que replican en el ciclo vertebrado-invertebrado presentan tasas evolutivas más bajas en comparación con los virus relacionados con un solo hospedero. La replicación alternante entre hospederos impone presiones de selección contrastantes, donde el aumento de la aptitud en un determinado tipo de célula hospedera conduce a una disminución de la aptitud en el otro (Weaver, 1999).

Los virus de RNA, como los flavivirus, causan infecciones agudas y crónicas, que pueden deberse a la presencia de cuasiespecies virales, donde es probable que desempeñan un papel importante en las enfermedades infecciosas.

## **Evidencia de la variabilidad genética del virus DENV y ZIKV en México**

En México, la introducción de nuevos genotipos del virus dengue ha sido considerado como uno de los principales factores de riesgo epidemiológico para esta enfermedad, incluso se considera la vigilancia genética de estos genotipos como crítica para el control de brotes severos (Diaz *et al.*, 2006). En las regiones endémicas de nuestro país, se ha documentado la circulación histórica de los 4 serotipos del dengue en México, información disponible muestra una variación cíclica del serotipo dominante circulante, siendo el serotipo 1 el más representado (Diaz *et al.*, 2006; Gómez-Dantés *et al.*, 2014).

Se han observado incrementos en la incidencia de casos confirmados particularmente en 2002, 2007 y 2009, y se ha reportado que el grupo de edad con mayor incidencia de infección por virus dengue es de entre 10-20 años de edad, disminuyendo con respecto a la adultez, sin embargo, estos datos pueden estar influenciados por el reducido número de individuos mayores a los 20 años afectados que no acuden a los centros de atención primaria. Hasta la semana epidemiológica 11 de 2017, la Dirección General de Epidemiología reporta una disminución del número de casos confirmados en comparación a la misma fecha de corte del año 2016 (Secretaría de Salud, 2017b). Sin embargo, esta comparación debe realizarse considerando la variable del incremento en los casos autóctonos de infección por virus ZIKV, para el que se inició la vigilancia en 2015, ya que ambos virus comparten el mismo nicho ecológico.

En 2006 se realizó un estudio filogenético de la circulación y evolución del virus dengue en México entre 1980-2002, en este estudio se utilizaron secuencias parciales del genoma viral correspondientes a la región de la proteína de envoltura. Con las herramientas disponibles se logró inferir el origen de algunos de los virus circulantes en regiones endémicas de nuestro país. Se correlacionó el incremento de incidencia y severidad con la introducción y circulación de nuevos genotipos y serotipos, sin embargo, los reemplazos de linaje fueron atribuidos a eventos aleatorios y la evolución in situ observada no se consideró asociada a selección

natural (Diaz *et al.*, 2006). Un estudio posterior realizó la comparación de la secuencia correspondiente a la región C91-prM-E-NS12400 de 6 aislados de DENV2 circulantes en el estado de Oaxaca (Perez-Ramirez, *et al.*, 2009). Los resultados de este trabajo sugieren potenciales eventos de recombinación intra-serotipo en probables eventos de co-infección, sin embargo, la recombinación de los virus dengue aún requiere estudios extensos que confirmen este mecanismo.

En México, la norma oficial mexicana NOM-032-SSA2-2014, para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores considera el aislamiento del DENV 10% de las muestras positivas para NS1 mientras que para el ZIKV el aislamiento no está recomendado en los lineamientos oficiales de diagnóstico y vigilancia. Por lo que aislamiento y caracterización de virus circulantes en cada brote no son prioridad y los virus aislados no son caracterizados genéticamente ni fenotípicamente. Por esta razón se desconoce las características de las variantes genéticas seleccionadas en nuestro país, así como la virulencia que estas podrían conferirle en cada brote.

La dinámica de vigilancia actual, también limita el alcance de la evidencia científica que se puede generar en el campo de la epidemiología genética de los virus DENV y ZIKV en nuestro país, ya que la mayoría se genera utilizando aislados históricos o incluso virus referencia adaptados al laboratorio. La selección de variantes genéticas favorables podrían ser la una explicación de la variabilidad entre la severidad de los brotes tanto en México como en otros países, así como de la distribución cíclica de los cuatro serotipos del virus dengue en nuestro país.

## **JUSTIFICACIÓN**

A pesar que en México se aíslan algunos de los virus circulantes en los brotes anuales por infecciones por flavivirus, estos aislados no son expandidos ni caracterizados genética ni fenotípicamente para compararlos con virus de referencia a nivel de virulencia. Además, estos aislados no pueden ser utilizados por los grupos de investigación especializados. Por lo que en este proyecto proponemos aislar, expandir y analizar variantes genéticas en aislados provenientes de donadores infectados con los flavivirus dengue y Zika del estado de Yucatán, para posteriormente estudiar su variabilidad genotípica y fenotípica.

## **HIPÓTESIS**

- A partir de una cohorte de muestras de pacientes con diagnóstico clínico de infección por flavivirus, se logrará el aislamiento de virus en las muestras sanguíneas recolectadas en la etapa febril.
- Con base en los datos epidemiológicos del estado de Yucatán en 2016, la mayoría de los aislados serán virus dengue del serotipo 1 y virus Zika.
- Con base en los datos epidemiológicos del estado de Yucatán en 2016, el número de aislados de virus Zika será menor al de virus dengue.

## **OBJETIVO GENERAL**

Generar un banco de aislados de flavivirus purificados y tipificados molecularmente a partir de muestras de pacientes del estado de Yucatán con diagnóstico clínico o serológico de infección por flavivirus.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Amplificar los virus DENV y ZIKV presentes en muestras de pacientes con diagnóstico clínico o serológico de infección por flavivirus en cultivo celular.
2. Extraer, purificar, cuantificar y retrotranscribir RNA de preparaciones purificadas de los flavivirus del banco de aislados mexicanos.
3. Identificar los flavivirus presentes en muestras de pacientes con diagnóstico clínico o serológico de infección por flavivirus, amplificando regiones específicas del genoma viral por PCR para cada virus/serotipo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras**

En la presente investigación se incluyeron 49 muestras de pacientes de ambos sexos y sin limitante de edad, recolectadas al momento en que se presentaron al Hospital General Agustín O'Horán ubicado en Mérida Yucatán, durante la temporada 2016 con sintomatología característica de infección flaviviral según la OMS (2009). Algunos de estos pacientes fueron diagnosticados en el laboratorio del hospital por ELISA para la presencia de anticuerpos contra flavivirus.

### **Virus**

Como controles positivos, se usaron virus referencia disponibles en el laboratorio: DENV1 (GenBank AY145121.1), DENV2 (GenBank KM204118.1), DENV4 (GenBank AY648301), ZIKV Puerto Rico (GenBank KX377337.1) (donados por el Dr. Stephen Whitehead, LID, NIAID, NIH, Bethesda MD, USA), y aislados mexicanos históricos (donados por la Dra. Leticia Cedillo Barrón, CINVESTAV IPN, México): DENV-2-H y ZIKV-H.

### **Aislamiento de virus a partir de muestras sanguíneas de pacientes con diagnóstico clínico de infección por flavivirus**

Diluciones de los sueros provenientes de los donadores fueron expandidos en células de mosquito C6/36 (*Aedes albopictus*) y células VERO (*Chlorocebus aethiops*). Se utilizaron diluciones no tóxicas de los sueros y se inocularon monocapas confluentes. Los sobrenadantes se cosecharon entre el pase 3 al pase 5 para su posterior tipificación por RT-PCR.

### **Producción y purificación de los abastos virales**

Se cultivaron células VERO y C6/36 en botellas de cultivo, en el caso de las células VERO, se mantuvieron con medio base (RPMI) suplementado con 5% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de antibiótico-antimicótico a 37°C

con 5% de CO<sub>2</sub> durante un día; las células C6/36 se cultivaron con medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales y antibiótico-antimicótico a 34°C. Una vez obtenidas las monocapas confluentes de cultivos celulares, se infectaron con el virus correspondiente, virus referencia, aislados históricos o muestras de pacientes con diagnóstico clínico de flavivirus, y se incubaron de 5 a 7 días, dependiendo del virus y pase. Una vez concluido el tiempo post-infección, se extrajo el sobrenadante de la botella y se purificó por centrifugación (2000 rpm, 5 minutos a 4°C) y por filtración con una unidad de tamaño de poro de 0.22 micras. Se agregó el crio-protector, Sacarosa-fosfato-glutamato (SPG), la preparación purificada se fraccionó en volúmenes de 100-150 µL en micro-tubos y se almacenó a -70°C para posterior uso.

### **Extracción de RNA viral**

La extracción de RNA fue realizada por la técnica de fenol-cloroformo, brevemente; a una fracción de la preparación viral (200 µL) se le agregaron 200µL de solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (TRIzol, Thermo), la suspensión resultante se colocó en un microtubo y se añadieron 50µL de cloroformo, se centrifugó (13,000 rpm, 4°C por 15 minutos), y se conservó la fase acuosa. El RNA se precipitó con isopropanol (100 µL) y se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm a 4°C. Finalmente el RNA se lavó dos veces con 200 µL de etanol al 70%. El etanol se evaporó y el RNA se resuspendió en 10 µL de agua libre de nucleasas. El RNA total se cuantificó por espectrofotometría.

### **Síntesis de cDNA**

Para la síntesis del DNA complementario se utilizaron de 5 a 8 µL de RNA, 0.6 µL de oligonucleótidos aleatorios, 1 µL de desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTP's) a una concentración de 10 milimolar (mM) y agua libre de nucleasas hasta completar 15 µL, esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente se agregó una segunda mezcla de reacción que incluía 1 µL de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV RT- Thermo) con una concentración de 200 unidades por microlitro (U/µL) y 4 µL de Buffer 5X, dando un volumen final de

20  $\mu\text{L}$ . Finalmente, se incubó en el termociclador a 25°C por 10 minutos, 42°C por 1 hora y 70°C durante 10 minutos.

### **Tipificación viral por PCR**

Una vez obtenido el cDNA, se amplificaron regiones específicas del genoma viral mediante una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos para cada serotipo y/o un serocomplejo (Tabla 2) (Lanciotti *et al.*, 1992). Se presenta un esquema de las regiones que amplifican cada par de oligonucleótidos (Figura 4).

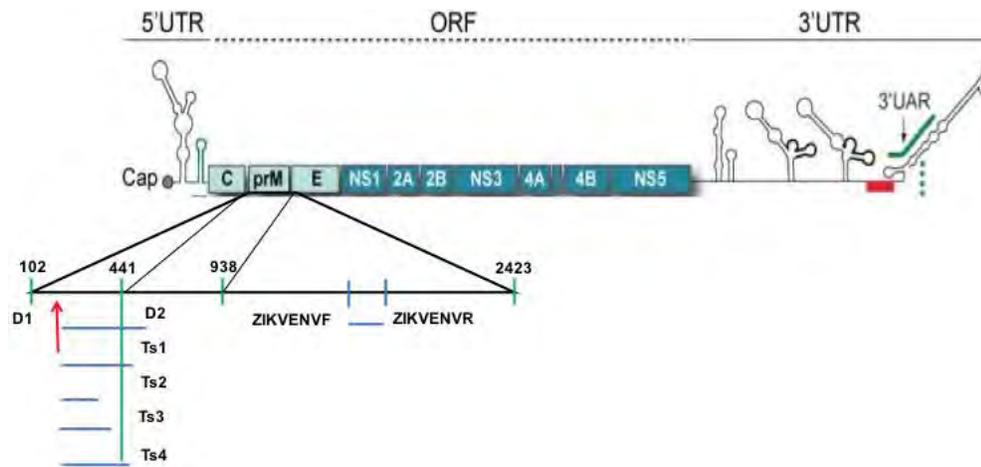
Se utilizaron oligonucleótidos para el virus chikungunya (CHKV) para descartar la posible presencia del virus en las muestras de los pacientes virémicos ya que co-circula en las mismas regiones geográficas que DENV y ZIKV.

Para la PCR, brevemente, se agregaron a un microtubo 0.2  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido sentido, 0.2  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido contra sentido (en el caso de las muestras, las PCRs se realizaron con cada par de oligonucleótidos enlistados en la tabla 2), 0.2  $\mu\text{L}$  de dNTP's 10 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  a una concentración de 25 mM, 1  $\mu\text{L}$  de Buffer 10X, 0.2  $\mu\text{L}$  de DNA Taq polimerasa con una concentración de 5 U/  $\mu\text{L}$ , 500 ng de cDNA obtenido de la retrotranscripción, y por último se añadió agua libre de ribonucleasas hasta alcanzar un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ .

Finalmente los productos amplificados se resolvieron, por electroforesis, en geles de agarosa al 1.2% y fueron teñidos en una solución de TAE 1X y bromuro de etidio concentrado durante 15 minutos. Los resultados obtenidos se fotodocumentaron con Gel Doc EZ System.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición en el genoma	Tamaño, en pb, producto de la amplificación de DNA
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'	134-161	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-3'	616-644	511
Ts1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	568-586	482 (D1 y Ts1)
Ts2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	232-252	119 (D1 y Ts2)
Ts3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421	290 (D1 y Ts3)
Ts4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	506-527	392 (D1 y Ts4)
ZIKVENVF	5'-GCTGGDGCRGACACHGGRACT-3'	1538-1558	364
ZIKVENVR	5'-RTCYACYGCCATYTGGRCTG-3'	1902-1883	364
CHKV-LCB-F	5'-TGCTCTAGAATGCCAGCAGAC-3'	-	1000
CHKV-LCB-R	5'-GGGGTACCGCAGCATATTAG-3'	-	1000

**Tabla 2.** Secuencia de oligonucleótidos usados en PCRs . Se muestra la clave de identificación para cada oligonucleótido, secuencia, tamaño del amplicón esperado y posición en el genoma viral para la amplificación del serocomplejo (Scx) DENV (D1 y D2), DENV serotipo1 (D1-Ts1), DENV serotipo 2 (D1-Ts2), DENV serotipo 3 (D1-Ts3), DENV serotipo 4 (D1-Ts4), ZIKV (ZIKVENVF- ZIKVENVR) y Chikungunya (CHKV-LCB-F- CHKV-LCB-F).



**Figura 4.** Esquema representativo de las regiones amplificadas en el genoma viral por cada par de oligonucleótidos.

## RESULTADOS

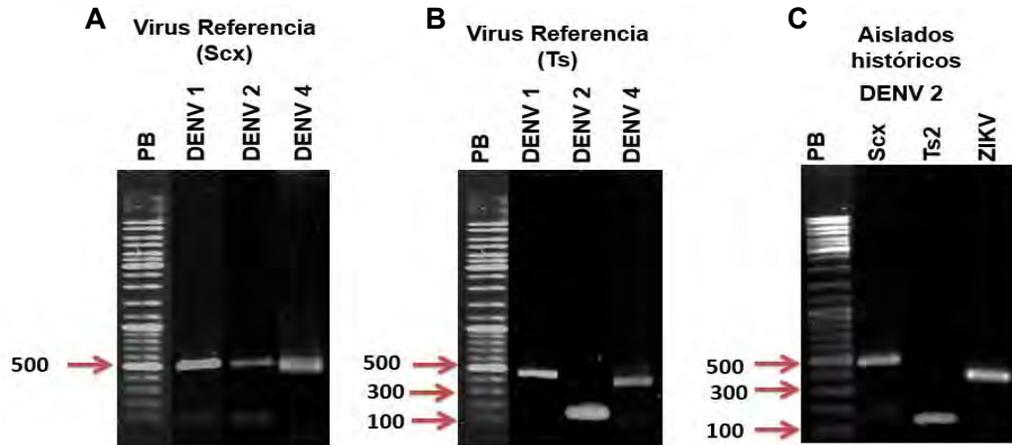
### Tipificación molecular a partir de virus referencia

Con el objetivo de lograr la estandarización de la técnica de tipificación molecular se realizaron las técnicas de cultivo celular para la amplificación y purificación de virus DENV y ZIKV referencia (Tabla 3), aislados históricos (DENV 2 y ZIKV, donados por la Dra. Leticia Cedillo Barrón, CINVESTAV IPN, México) y aislados del estado de Oaxaca de la temporada 2016, de los cuales se extrajo, purificó, cuantificó y retrotranscribió RNA viral para la amplificación por PCR. Los virus referencia y los aislados históricos se usaron como controles positivos.

Virus referencia	No. de acceso GenBank	Año de aislamiento
DENV 1 Western Pacific	AY145121.1	1974
DENV 2 Nueva Guinea	KM204118.1	1944
DENV 4 Dominica	AY648301	1981
ZIKV Puerto Rico	KX377337.1	2015

**Tabla 3.** Virus referencia utilizados como controles positivos. En la primer columna se especifica el virus y/o serotipo, en la comuna dos y tres se localiza el número de acceso a GenBank y el año de aislamiento del virus, respectivamente.

A continuación se muestra el resultado del patrón de amplificación de regiones específicas del genoma viral de los virus referencia (Figura 5 A y B) y aislados históricos (Figura 5 C). En cada carril se observa el tamaño del amplicón esperado para cada virus y serotipo.



**Figura 5.** Patrón de amplificación en gels de agarosa al 1.2% de virus referencia y aislados históricos. A) virus referencia, amplificación con oligonucleótidos del serocomplejo (scx); B) virus referencia, amplificación con oligonucleótidos tipo específicos (Ts); C) aislados históricos, carril 1: marcador molecular en pares de bases (PB), carril 2 y 3: DENV- 2 utilizando oligonucleótidos del serocomplejo (Scx) y oligonucleótidos específicos para serotipo 2 (Ts2), carril 4: ZIKVH con oligonucleótidos específicos para ZIKV.

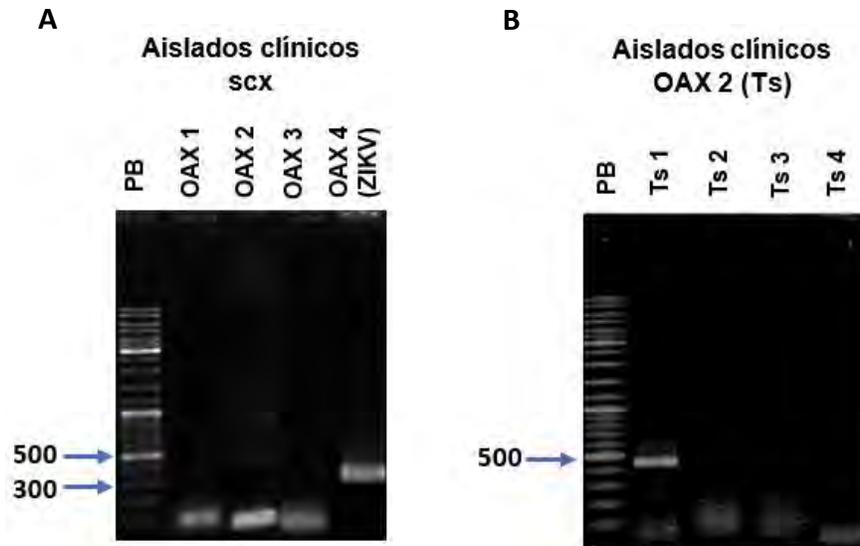
### Tipificación molecular de muestras del estado de Oaxaca

En la siguiente tabla se presentan los resultados de la estandarización de la técnica de tipificación molecular para muestras del estado de Oaxaca, de las cuatro muestras analizadas sólo dos fueron positivas para flavivirus, 2016.OAX2: DENV 1 y 2016.OAX4: ZIKV, de las dos muestras restantes no fue posible aislar virus (Tabla 4).

Código de la muestra	Género y edad del paciente	Diagnóstico clínico	Tipificación molecular
2016.OAX1	M-23	DCSA	-
2016.OAX2	M-26	ZIKV	DENV 1
2016.OAX3	M-22	ZIKV	-
2016.OAX4	F-28	ND	ZIKV

**Tabla 4.** Muestras del estado de Oaxaca analizadas en la estandarización de la técnica de tipificación. Se especifica el género del paciente (M= Masculino y F=Femenino) y la edad, así como el diagnóstico clínico (DCSA: Dengue con Signos de Alarma, ND: No determinado) y el resultado de la tipificación molecular de los aislados.

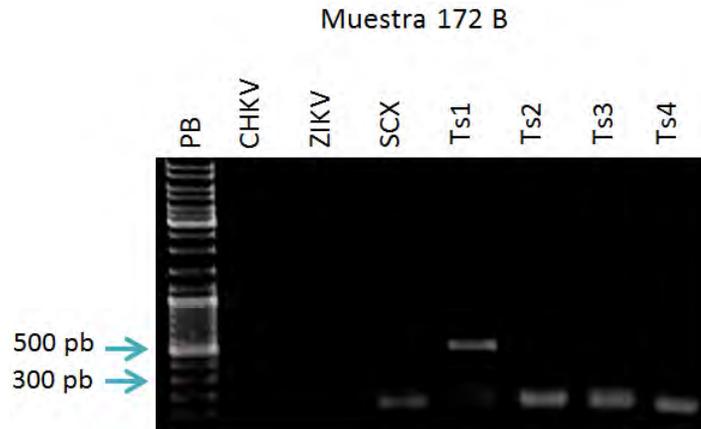
Se utilizó la técnica de tipificación estandarizada anteriormente para las preparaciones de las muestras del estado de Oaxaca, amplificadas y purificadas en cultivo celular, los resultados se muestran en la Figura 6. El aislado 2016.OAX2 positivo para DENV1 pudo tipificarse con oligonucleótidos del serocomplejo (Figura 6A) y tipo específicos Ts1 (figura 6B). Mientras que el aislado 2016.OAX4 resultó positivo para la amplificación con los oligonucleótidos para ZIKV (Figura 6A).



**Figura 6.** Patrón de amplificación en geles de agarosa al 1.2% de aislados de Oaxaca. A) carril 1: marcador molecular en pb, carril 2-4 amplificación con oligonucleótidos del serocomplejo (scx), carril 5: amplificación con oligonucleótidos específicos para ZIKV. B) Aislado de Oaxaca positivo para DENV 1 usando oligonucleótidos tipo específicos de DENV (Ts).

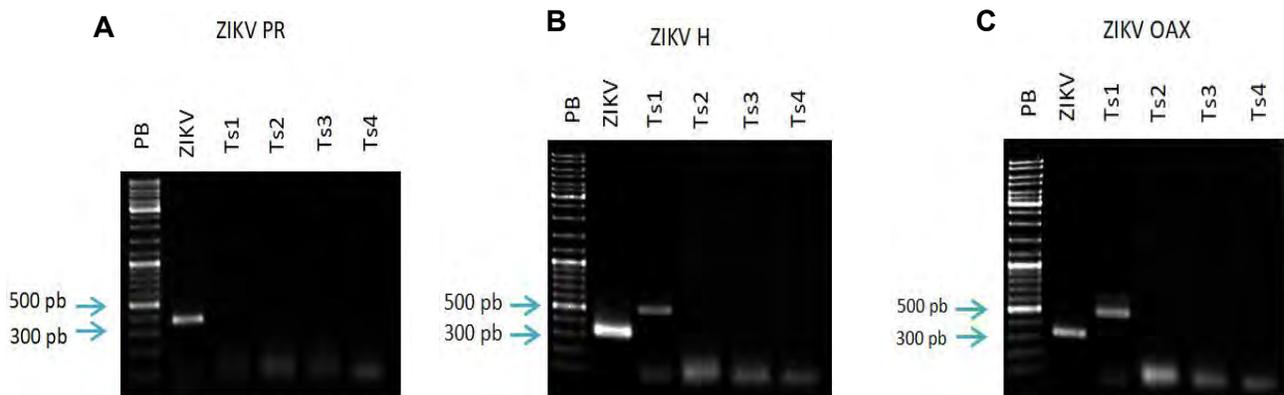
### Tipificación molecular de muestras del estado de Yucatán

A continuación, se muestran resultados representativos del patrón de amplificación de regiones específicas del genoma viral de los flavivirus de algunas de las muestras de Yucatán que se procesaron durante este trabajo. Se muestra el patrón característico de amplificación del aislado proveniente de la muestra 172 B positiva para DENV serotipo 1 con tamaño de 482pb y negativo para las reacciones con oligonucleótidos de otros serotipos y virus (Figura 7).



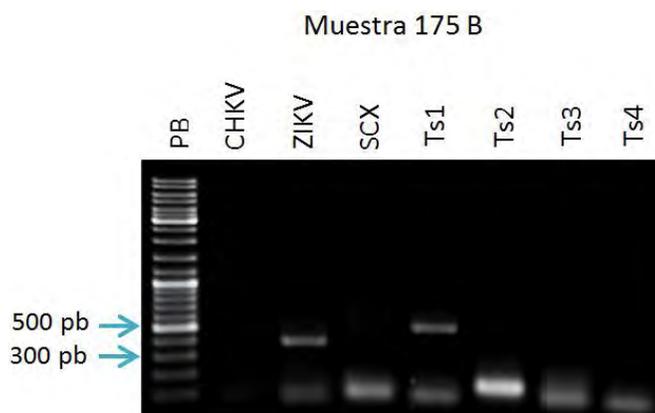
**Figura 7.** Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos por amplificación de la región específica del genoma viral de la muestra 172B, positiva para DENV-1.

Durante la estandarización de la técnica de tipificación para ZIKV, en el aislado histórico y el aislado de Oaxaca observamos amplificación cruzada con los oligonucleótidos Ts1 (Figura 8B y 8C), no así para el ZIKV Puerto Rico referencia (Figura 8A). Este mismo patrón de amplificación se observó en algunas muestras positivas para ZIKV.



**Figura 8.** Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1.2%, realizada en la estandarización de la técnica de tipificación molecular para ZIKV. Productos obtenidos por amplificación de la región específicas del genoma viral de ZIKV. Carril 1: marcador molecular en pares de bases (PB), carril 2: ZIKV (A: ZIKV referencia, B: ZIKV aislado histórico, C: ZIKV aislado de Oaxaca) con oligonucleótidos específicos del ZIKV, carril 3-6: ZIKV con oligonucleótidos Ts.

En la figura 9 se muestra el patrón de amplificación de una muestra positiva representativa para ZIKV con un amplicón con tamaño de 364pb en la reacción con oligonucleótidos específicos para este virus. Ya que el virus referencia DENV1 utilizado en este estudio no muestra amplificación con los oligonucleótidos de ZIKV, se consideró el patrón de amplificación ZIKV+ Ts1+ como muestra ZIKV positiva.



**Figura 9.** Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos por amplificación de la región específicas del genoma viral de la muestra 175B, positiva para ZIKV.

En la tabla 5 se muestran el número de muestras totales, diagnóstico serológico y los resultados obtenidos en el análisis molecular que se realizó a las 49 preparaciones purificadas en cultivo celular provenientes de muestras de pacientes con sospecha de infección por flavivirus. Las muestras se tabulan por género, edad y, en el caso de las mujeres, se indica el estado de gestación. De las 49 muestras analizadas, 40 fueron positivas para flavivirus: 32 para DENV1 y 8 para ZIKV (tabla 5), y 9 fueron negativas. En este estudio no se obtuvo ningún resultado que indicara coinfección en alguna de las muestras.

Género	Edad	Total de muestras	Diagnóstico serológico				Aislados obtenidos				
			DENV+	ZIKV +	Negativas	No analizadas	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	ZIKV
Masculino	ADULTOS	14	8	2	2	2	11				1
	PEDIATRICOS	6	4	0	0	2	6				
Femenino	ADULTOS	21	14	0	1	6	10				5
	EMBARAZADAS	4	3	0	0	1	3				
	PEDIATRICOS	4	3	0	1	0	2				2
	TOTAL	49	32	2	4	11	32	0	0	0	8

**Tabla 5.** Diagnóstico clínico/serológico y resultado de la tipificación molecular de los flavivirus aislados de las muestras de Yucatán.

En la tabla 6 se listan cada una de las muestras analizadas por RT-PCR, se especifica el código de la muestra, la edad y el género del paciente, así como las manifestaciones clínicas (días de fiebre), el diagnóstico serológico (IgM e IgG) y el resultado de la tipificación molecular.

Todas las muestras analizadas molecularmente en este trabajo de investigación fueron diagnosticadas en clínica como infección por flavivirus. Sin embargo, 11 muestras no se analizaron por serología y 4 resultaron negativas para dicho análisis.

Código de la Muestra	Edad	Género	Manifestación clínica (días de fiebre)/ Observaciones	Diagnóstico serológico		Aislado obtenido
				Dengue IgM	Dengue IgG	
001B	13 AÑOS	FEMENINO	2	NEGATIVO	NEGATIVO	DENV 1
002B	23 AÑOS	MASCULINO	3	NEGATIVO	NEGATIVO	DENV 1
003B	3 MESES	FEMENINO	7	NEGATIVO	POSITIVO	ZIKV
137B	25 AÑOS	FEMENINO	3	POSITIVO	NEGATIVO	ZIKV
138B	11 AÑOS	FEMENINO	3	POSITIVO	POSITIVO	ZIKV
139B	10 AÑOS	MASCULINO	2	NEGATIVO	POSITIVO	DENV 1
140B	24 AÑOS	MASCULINO	3	POSITIVO	POSITIVO	DENV 1
141B	22 AÑOS	MASCULINO	1	POSITIVO	POSITIVO	DENV 1
142B	28 AÑOS	MASCULINO	2	POSITIVO	POSITIVO	DENV 1
143B	29 AÑOS	FEMENINO	4 DIAS ( 4 SEM. GESTACION)	NEGATIVO	POSITIVO	DENV 1
146B	35 AÑOS	MASCULINO	1	NEGATIVO	POSITIVO	-
147B	35 AÑOS	MASCULINO	A FEBRIL	ZONA GRIS	POSITIVO	DENV 1
148B	46 AÑOS	MASCULINO	1	NEGATIVO	NEGATIVO	DENV 1
149B	17 AÑOS	FEMENINO	5 DIAS ( 38 SEM. GESTACION)	ZONA GRIS	POSITIVO	-
150B	54 AÑOS	MASCULINO	2	ZONA GRIS	POSITIVO	DENV 1
151B	21 AÑOS	FEMENINO	2 DIAS. (EMBARAZADA 1ER. TRIMESTRE)	POSITIVO	ZONA GRIS	DENV 1
152B	62 AÑOS	FEMENINO	5	NEGATIVO	POSITIVO	DENV 1
153B	26 AÑOS	FEMENINO	5	NEGATIVO	POSITIVO	-
155B	41 AÑOS	FEMENINO	1	NEGATIVO	POSITIVO	-
156B	31 AÑOS	FEMENINO	4	ZONA GRIS	POSITIVO	-
158B	22 AÑOS	FEMENINO	2	NEGATIVO	NEGATIVO	DENV 1
160B	21 AÑOS	FEMENINO	6	POSITIVO	NEGATIVO	DENV 1
161B	50 AÑOS	FEMENINO	A FEBRIL ( INICIO DEL CUADRO)	ZONA GRIS	POSITIVO	DENV 1

**Tabla 6.** Lista de muestras tipificadas molecularmente. Datos clínicos y epidemiológicos de los aislados utilizados en este estudio. (continua en la siguiente página)

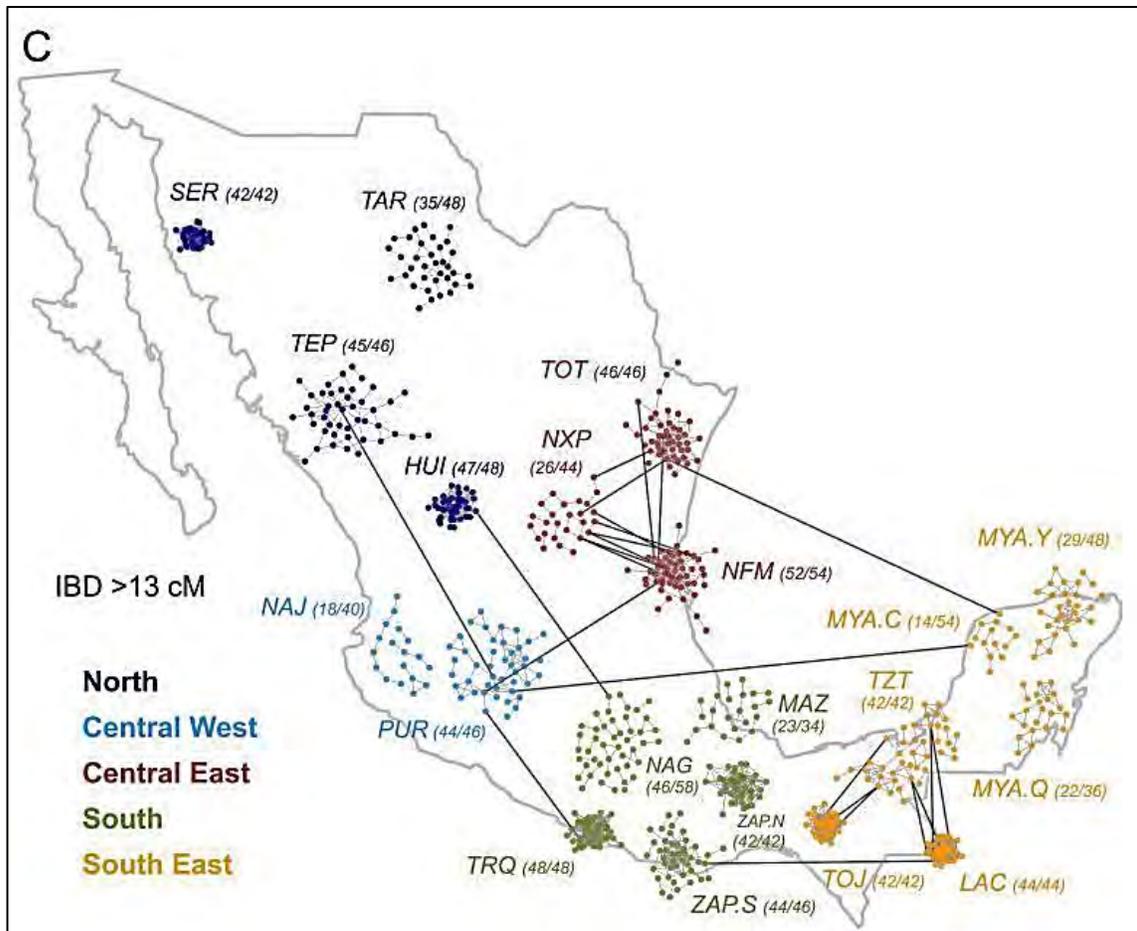
Código de la Muestra	Edad	Género	Manifestación clínica (días de fiebre)/ Observaciones	Diagnóstico serológico		Aislado obtenido
				Dengue IgM	Dengue IgG	
162B	36 AÑOS	FEMENINO	6	POSITIVO	POSITIVO	DENV 1
163B	28 AÑOS	FEMENINO	3	POSITIVO	POSITIVO	DENV 1
164B	36 AÑOS	MASCULINO	2	ZONA GRIS	POSITIVO	DENV 1
165B	7 AÑOS	MASCULINO	1	NEGATIVO	POSITIVO	DENV 1
166B	12 AÑOS	MASCULINO	3	NEGATIVO	POSITIVO	DENV 1
167B	10 AÑOS	FEMENINO	3	POSITIVO	POSITIVO	DENV 1
169B	5 MESES	MASCULINO	4	NEGATIVO	ZONA GRIS	DENV 1
170B	36 AÑOS	MASCULINO	15 DIAS ( GUILLIAN BARRE POR ZIKA)	NEGATIVO	POSITIVO	ZIKV
171B	39 AÑOS	FEMENINO	5	POSITIVO	POSITIVO	DENV 1
172B	15 AÑOS	MASCULINO	4	POSITIVO	POSITIVO	DENV 1
173B	42 AÑOS	FEMENINO	2	POSITIVO	POSITIVO	ZIKV
174B	24 AÑOS	FEMENINO	A FEBRIL CON 4 DIAS DE SINTOMAS			DENV 1
175B	35 AÑOS	FEMENINO	2			ZIKV
176B	43 AÑOS	FEMENINO	3			-
177B	27 AÑOS	MASCULINO	7			DENV 1
178B	8 AÑOS	MASCULINO	4			DENV 1
179B	11 AÑOS	MASCULINO	3			DENV 1
180B	25 AÑOS	FEMENINO	2			DENV1
181B	23 AÑOS	FEMENINO	4			-
182B	21 AÑOS	FEMENINO	5 DIAS ( 27.2 SEM. GESTACION)			DENV 1
183B	34 AÑOS	MASCULINO	11 DIAS. PROB. GUILLIAN BARRE/ZIKA			DENV 1
184B	25 AÑOS	MASCULINO	2			-
185B	25 AÑOS	FEMENINO	2			DENV 1
187B	40 AÑOS	FEMENINO	6			-
189B	27 AÑOS	FEMENINO	2			ZIKV
190B	20 AÑOS	FEMENINO	A FEBRIL			ZIKV

**Tabla 6** (cont). Lista de muestras tipificadas molecularmente. Datos clínicos y epidemiológicos de los aislados utilizados en este estudio.

## DISCUSIÓN

La enfermedad del dengue es uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad. En las últimas dos décadas la incidencia de dengue en México ha aumentado en la mayoría de los estados endémicos, donde se encuentran en circulación simultánea dos o más serotipos. La severidad de los casos por infección por DENV se ha asociado con el aumento de la co-circulación de diferentes serotipos de DENV en el país. Recientemente se reportó que el proceso de replicación en flavivirus, particularmente del virus dengue, puede generar variantes genéticas con capacidad de evasión de la respuesta de interferones de tipo I y que esta selección de variantes genéticas eventualmente desplazan geográficamente al virus parental confiriéndole ventaja evolutiva epidemiológica (Manokaran *et al.*, 2015). Es muy probable que la selección de variantes con diferentes fenotipos de virulencia, estén ocurriendo en México, sin embargo, ausencia de aislados disponibles para su estudio, limitan el alcance de la investigación de la virulencia de los flavivirus en nuestro país.

Cabe mencionar que a diferencia de otros países, en México existe una gran diversidad poblacional consecuencia de la subestructura genética precolombina, la cual se conserva en los grupos étnicos del país y en la población actual que descende de dichos grupos (Figura 10). Los nativos mexicanos poseen una diversidad genética baja debido al alto grado de aislamiento geográfico de las poblaciones, por lo que estas pueden albergar alelos locales raros que no se presentan en otros lugares, y con ello las variantes funcionales y médicas importantes en cada población (Moreno-Estada *et al.* 2014). Esta variabilidad genética implica diversidad en los fenotipos de cada población, es decir, que los individuos presentan diferencias en la respuesta inmune contra el virus, lo que impone presiones de selección que favorecen la presencia de variantes genéticas más o menos virulentas.



**Figura 10.** Diferenciación genética de poblaciones nativas mexicanas.

En este estudio realizamos el protocolo para el aislamiento de flavivirus en cultivo celular de 49 muestras de pacientes con diagnóstico clínico o serológico de infección por flavivirus, de las cuales se lograron aislar 40 flavivirus (81.63% de éxito de aislamiento de las muestras procesadas). Aunque este porcentaje es elevado, está influenciado por el diseño del proyecto, ya que se utilizaron muestras obtenidas a la llegada del paciente a la clínica con el objetivo de obtener sangre periférica en el periodo de viremia en un rango no mayor a 5 días.

La presencia de muestras negativas para el aislamiento y la tipificación molecular al igual que la presencia de muestras negativas en el diagnóstico serológico, es una observación común en la clínica. Como se sabe, el incremento en la concentración

de los anticuerpos IgM ocurre después del cuarto días de iniciada la fiebre, estos anticuerpos son característicos de la infección primaria y participan en la neutralización de partículas virales en el hospedero infectado, disminuyendo y llevando la carga viral a niveles por debajo de la dosis infectiva mínima en cultivo celular así como por debajo del límite de detección por RT-PCR.

A pesar de que algunas muestras contaban con el diagnóstico serológico positivas para IgG o IgM, esta estrategia de diagnóstico es útil sólo para confirmar infección primaria o secundaria, pero no para la tipificación del virus presente en la muestra, debido a que el antígeno utilizado para dichas pruebas es la proteína de envoltura del virus DENV la cual es muy conservada entre flavivirus teniendo una homología del 40%, haciendo prácticamente indiferenciable a los flavivirus por esta estrategia.

Por otra parte, se ha demostrado que los cuatro serotipos de DENV co-circulan en México creando diferentes escenarios epidémicos, endémicos e hiperendémicos, con una dinámica variable en el predominio de serotipo (Gómez-Dantés *et al.*, 2014). La Secretaria de Salud reporta que desde la re-emergencia del dengue en 1978 el serotipo con mayor prevalencia en el país es el DENV1 (Díaz *et al.*, 2006). Estos datos concuerdan con la tipificación de los aislados obtenidos en este trabajo, donde la mayoría de los flavivirus aislados son DENV1.

Aunque el predominio en circulación del DENV1 se ha mantenido en los últimos años, es probable que existan sustituciones intraserotipo de variantes con fenotipo de virulencia diferencial, las cuales están siendo seleccionadas de manera activa en la población mexicana. Este fenómeno se ha descrito en otras regiones endémicas del mundo. Tal es el caso del desplazamiento ocurrido a principios de la década de 1990 del DENV serotipo 2 proveniente del sureste de Asia al DENV2 del continente americano responsable de brotes con presentaciones clínicas más severas en países de América latina (Rico-Hesse *et al.*, 1997). De igual manera, se han documentado ampliamente desplazamientos locales (Drumond *et al.*, 2013; Lambrechts *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2012; Yamanaka *et al.*, 2011;), tal es el caso del cambio en circulación en Sri Lanka, donde desplazamiento de diferentes

variantes del virus DENV3 correlacionaron con el incremento en el número de casos de dengue severo en la región (Andrade *et al.*, 2016; Messer *et al.*, 2002; Messer *et al.*, 2003; Sirisena y Noordeen, 2014).

El virus ZIKV llegó a México en 2015 diseminándose por todo el país en zonas donde se encuentran los vectores y co-circulando en las mismas regiones geográficas que el virus DENV, ya que comparten el mismo nicho ecológico. La vigilancia epidemiológica de la diversidad genética y selección de variantes para el virus ZIKV es aún más precaria. La vigilancia epidemiológica en México inició formalmente en 2015 y los aislados disponibles para la evaluación de la virulencia es por el momento inaccesible. Sin embargo, hay evidencia de que el virus ZIKV también presenta variabilidad genética que impacta en la virulencia; recientemente se describió que un aislado brasileño del virus ZIKV, también tiene la capacidad de inhibir la respuesta de IFNs-I a diferencia de los aislados pre-epidémicos africanos, aunque el mecanismo no fue descrito (Donald *et al.*, 2016).

En el presente estudio, ocho aislados fueron tipificados molecularmente como ZIKV, de las cuales sólo una coincide con el diagnóstico clínico, ya que el resto de las muestras fueron diagnosticadas como infección por DENV. La problemática en el diagnóstico clínico surge debido a que la sintomatología de ambas enfermedades es similar. En algunos casos los pacientes con infección por ZIKV pueden o no presentar conjuntivitis y las técnicas serológicas no son suficientes para la tipificación.

## **CONCLUSIÓN**

En conjunto, estas evidencias demuestran que el estudio epidemiológico de selección de variantes genéticas de flavivirus circulantes en regiones endémicas, así como los mecanismos que les confieren ventajas evolutivas, es más valioso utilizando aislados vigentes ya que permiten la correlación con la severidad de brotes, así como de las presiones evolutivas características de la población afectada en dichas regiones. El estudio de los potenciales cuellos de botella en México es prácticamente inexistente ya que la disponibilidad de los aislados clínicos es muy limitada. El banco de aislados de virus DENV y ZIKV generado y tipificado en este estudio es una herramienta invaluable para la investigación y permitirá el estudio más detallada del nivel de virulencia de las variantes de DENV1 y ZIKV influenciada por la presión evolutiva de la respuesta inmune de la población mexicana.

## **PERSPECTIVAS**

Tipificar los virus que forman parte de la iniciativa de banco de aislados de flavivirus mexicanos provenientes de pacientes con diagnóstico de flavivirus en regiones endémicas de México.

Secuenciar el genoma completo de los aislados con fenotipo evasor de la respuesta inmunológica innata, para identificar las variantes genéticas asociadas a virulencia seleccionadas en población mexicana.

Caracterizar productos de degradación del genoma flaviviral de los aislados, los cuales se han asociado con virulencia en flavivirus.

Escalar y adaptar la información obtenida para su aplicación en el sistema de vigilancia epidemiológica del sistema de salud mexicano.

## LITERATURA CITADA

- Agarwal, A., Parida, M. y Kumar, D. P. 2017. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. *Revista médica de virología*. 27:e1941.
- Ambrose, J. H., Sekaran, S. D. y Azizan, A. 2017. Dengue Virus NS1 Protein as a Diagnostic Marker: Commercially Available ELISA and Comparison to qRT-PCR and Serological Diagnostic Assays Currently Used by the State of Florida. *J Trop Med*: 8072491.
- Andrade, C. C., Young, K. I., Johnson, W. L., Villa, M. E., Buraczyk, C. A., Messer, W. B. *et al.* 2016. Rise and fall of vector infectivity during sequential strain displacements by mosquito-borne dengue virus. *J Evol Biol*, 29(11): 2205-2218.
- Attaway, D. F., Waters, N. M., Geraghty, E. M. y Jacobsend, K. H. 2017. Zika virus: Endemic and epidemic ranges of *Aedes* mosquito transmission. *Journal of Infection and Public Health*. 10 (1): 120-123.
- Azhar, E. I., Hashem, A. M., El-Kafrawy, S. A., Abol-Ela, S., Abd-Alla, A. M., SohraB, S. S., *et al.* 2015. Complete genome sequencing and phylogenetic analysis of dengue type 1 virus isolated from Jeddah, Saudi Arabia. *Virology journal*. 12:1.
- Baud, D., Gubler, D. J., Schaub, B., Lanteri, M. C., Musso, D. 2017. An update on Zika virus infection. *Lancet*. 390: 2099-109.
- Beckham, J. D y Tyler, K. L. 2015. Arbovirus Infections. *Continuum (Minneapolis Minn)*. 21: 1599-1611.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., *et al.* 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 496(7446): 504-507.
- Bonaldo, M. C., Ribeiro, I. P., Lima, N. S., dos Santos, A. A. C., Menezes, L. S. R., da Cruz, S. O. D., *et al.* 2016. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 10(6): 1-17.

- Brand, C., Bisailon, M. y Geiss, B. J. 2017. Organization of the flavivirus RNA replicase complex. *WIREs RNA*, 8: 1-14.
- Brathwaite, D. O., San Martín, J N., Montoya, R. H., del Diego, J., Zambrano, B. y Dayan, G. H. 2012. Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87(4): 584–593.
- Briseño-García, B., Gómez-Dantés, H., Argott-Ramírez, E., Montesano, R., Vázquez-Martínez, A. L. e Ibáñez-Bernal, S. 1996. Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue-3 in Mexico. *Emerg Infect Dis.*, 2(2): 133–135.
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, Z. R. E., Porterfield, J. S., Westaway, S. E. G. y Brandt, W. E. 1989. Antigenic Relationships between *flaviviruses* as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. *J. gen. Virol.* 70: 37-43.
- Carrillo-Valenzo, E., Danis-Lozano, R., Velasco-Hernández, J. X., Sánchez-Burgos, G., Alpuche, C., López, I. *et al.* 2010. Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. *Springer, Arch Virol* 155:1401–1412.
- Charrel, R., Leparç-Goffart, I., Gallian, P. y de Lamballerie, X. 2014. Globalization of chikungunya: 10 years to invade the world. *Clinical Microbiology and Infection*, 20:662–663.
- Centers for Disease Control and Prevention. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever. [Consultado Agosto 6, 2017]. Disponible en: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/dengue-fever-and-dengue-hemorrhagic-fever.htm>.
- Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D. *et al.* 2016. Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis* 10(3):1-11.
- Cordeiro, M. T., Silva, A. M., Brito, C. A., Nascimento, E. J., Magalhães, M. C., Guimarães, G. F. *et al.* 2007. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 77:3328-34.

- Creange, A. 2016. Guillain–Barre syndrome: 100 years on. *Rev. Neurol.* 172, 770–774.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J.M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. *et al.* 2015. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews* (39)2: 155-170.
- Del Ángel, R. M. 2006. Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral. *Cinvestav*, p. 38-43.
- Diamond, M. S. y Pierson, T. C. 2015. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *J Elsevier. Cell* 162: 488-492.
- Díaz, F. J., Black IV, W. C., Farfan-Ale, J. A., Loroño-Pino., M. A., Olson, K. L. y Beatya, B. J. 2006. Dengue Virus Circulation and Evolution in Mexico: A Phylogenetic Perspective. *Archives of Medical Research* 37: 760–773.
- Donald, C. L., Brennan, B., Cumberworth, S. L., Rezelj, V. V., Clark, J. J., Cordeiro, M. T. *et al.* 2016. Full genome sequence and sfRNA interferon antagonist activity of Zika virus from recife, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(10): e0005048.
- Drumond, B. P., Mondini, A., Schmidt, D., Bronzoni, R. V. de M., Bosch, I. y Nogueira, M. L. 2013. Circulation of Different Lineages of Dengue Virus 2, Genotype American/Asian in Brazil: Dynamics and Molecular and Phylogenetic Characterization. *PLoS ONE* 8(3): e59422.
- Durbin, A. P., Mayer, S. V., Rossi, S. L., Amaya-Larios, I. Y., Ramos-Castaneda, J., Ooi, E. E. *et al.* 2013. Emergence potential of sylvatic dengue virus type 4 in the urban transmission cycle is restrained by vaccination and homotypic immunity. *Virology*, 439: 34–41.
- Finizola, F. 1998. Normas básicas en el manejo del paciente con fiebre dengue, dengue hemorrágico y dengue shock. *Acta Científica Venezolana*. 49(1): 18-24.
- Gerold, G., Bruening, J., Weigel, B. y Pietschmann, T. 2017. Protein Interactions during the flavivirus and Hepacivirus Life Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics* 16 Supplement 4, S75-S91.

- Goodfellow, J.A., Willison, H.J., 2016. Guillain–Barre syndrome: a century of progress. *Nat.Rev. Neurol.* 12, 723–731.
- Grard, G., Caron, M., Mombo, I. M., Nkoghe, D., Ondo, S. M., Jiolle, D. *et al.* 2014. Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*?. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 8(2): e2681.
- Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J. E., Salmon, J., d'Alayer, J., Ermonval, M. *et al.* 2011. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108 (19): 8003-8008.
- Guzmán, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J. y Gubler, D. J. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews, microbiology,* S7-S16.
- Halstead, S. B. 2008. Dengue Virus–Mosquito Interactions. *Annu. Rev. Entomol,* 53:273–91.
- Hamel, R., Liégeois, F., Wichit, S., Pompon, J., Diop, F., Talignani, L. *et al.* 2016. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Elsevier Masson,* 18: 441-449.
- Huang, Y. J. S., Higgs, S., Horne, K. M., Vanlandingham, D. L. 2014. flavivirus-Mosquito Interactions. *Viruses* 6: 4703-4730.
- Jain, B. y Jain, A. 2014. Dengue: A water-related mosquito-borne disease. *Water and Health.* Springer India. 404-412.
- King, N. J. K., Getts, D. R., Getts, M. T., Rana, S. Shrestha, B. y Kesson, A. M. 2007. Immunopathology of flavivirus infections. *Immunology and Cell Biology,* 85:33–42.
- Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X. Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T. S., Ooi, J. S. *et al.* 2016. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature Letter* 00: 1-12.
- Kouri, G., Pelegrino, J. L., Munster, B. M., Guzmán, M. G. 2007. Sociedad, economía, inequidades y dengue. *Rev. Cubana Med. Trop.* 59: 177-185.
- Kraemer, M. U. J., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A., Sheares, F. M. y Brady, O. J. 2015. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* occurrence. *Nature.* 2:150035, 1-8.

- Kuno, G. y Chang, F. J. J. 2005. Biological transmission of arboviruses: Reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4): 608–637.
- Kuno, G., Chang, J. G. J., Tsuchiya, K. R., Karabastos, N., Cropp, C. B. 1998. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol* 72(1): 73-83.
- Kurosu, T. 2011. Quasispecies of dengue virus. *Tropical Medicine and Health*, 39(4): 29-36.
- Lambrechts, L., Fansiri, T., Pongsiri, A., Thaisomboonsuk, B., Klungthong, C., Richardson, J. H. *et al.* 2012. Dengue-1 virus clade replacement in Thailand associated with enhanced mosquito transmission. *J Virol*, 86(3):1853-61.
- Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., Vorndam, A. V. 1992. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30(3): 545-551.
- Laredo-Tiscareño, S. V., Xianwu, G. y Bocanegra-García, V. 2012. Virus del dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular. *Ciencias UAT*, 6 (3):27-33.
- Lindenbach, B. D., Rice, C. M. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 59, 23–61.
- Lindenbach, B., Thiel H., y Rice, C. 2007. Flavivirus: The virus and their replication. In: Knipe D, Howley Peter. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 1101-52.
- Liu, J., Liu, Y., Nie, K., Du, D., Qiu, J. y Pang, X. *et al.* 2016. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nature microbiology*, 1:1-11.
- Lobo, F. P., Mota, B. E. F., Pena, S. D. J., Azevedo, V., Macedo, A. M., Tauch, A. *et al.* 2009. Virus-host coevolution: Common patterns of nucleotide motif usage in *Flaviviridae* and their hosts. *PLoS One*, 4(7): e6282.

- Manokaran, G., Finol, E., Wang, C., Gunaratne, J., Bahl, J., Ong, E. Z., *et al.* 2015. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*, 350(6257): 217–221.
- Marrs, C., Olson, G., Saade, G., Hankins, G., Wen, T., Patel, J. y Weaver, S. 2016. Zika Virus and Pregnancy: A Review of the Literature and Clinical Considerations. *Am J Perinatol*, 33(7): 625–639.
- Messer, W. B., Vitarana, U. T., Sivananthan, K., Elvtigala, J., Preethimala, L. D., Ramesh, R. *et al.* 2002. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, 66(6): 765-73.
- Messer, W. B., Gubler, D. J., Harris, E., Sivananthan, K. y de Silva, A. M. 2003. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis*, 9(7): 800-9.
- Moreno-Estrada, A., Gignoux, C. R., Fernández-López, J. C., Zakharia, F., Sikora, M., Contreras, A. V. *et al.* 2014. The Genetics of Mexico Recapitulates Native American Substructure and Affects Biomedical Traits. *Science*, 344(6189): 1280–1285. doi:10.1126/science.1251688.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J. y Rossmann, M J. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews*, 3: 13-22.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., Summers, M. D. 1995. Virus taxonomy: classification and nomenclature of virus. New York, Spring-Verlag. p. 415–421.
- Murray, C. L., Jones, C. T. y Rice, C. M. 2008. Architects of assembly: roles of *Flaviviridae* non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nature reviews*. 6: 699-708.
- Narro-Robles, J. y Gómez-Dantés, H. 1995. El dengue en México: un problema prioritario de salud pública. *Salud pública de México*, p. S12-S20.
- Organización Mundial de la Salud. 2009. Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Programa especial para la investigación y capacitación de enfermedades tropicales, pp. 34-36. [Consultado Agosto 6, 2017]. Disponible en:

[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44504/9789995479213\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44504/9789995479213_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Organización Mundial de la Salud. 2015. Dengue: guías para la atención de enfermos en la región de las américas. Washington DC, pp. 82-85.
- Pan American Health Organization. 2017. Zika virus. [Consultado marzo 6, 2018]. Disponible en: [www.paho.org](http://www.paho.org).
- Ortega, G. L. M. 2001. Dengue: un problema siempre emergente. RESUMED. 14(2): 41-52.
- Perez-Ramirez, G., Diaz-Badillo, A., Camacho-Nuez, M., Cisneros, A. y Munoz, M. de L. 2009. Multiple recombinants in two dengue virus, serotype-2 isolates from patients from Oaxaca, Mexico. BMC Microbiology, (9)260: 1-12.
- Petersen, L. R. y Marfin, A. A. 2005. Shifting epidemiology of *Flaviviridae*. J. Travel Med 12 (Suppl. 1), S3–S11.
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., y Honein, M. A. 2016. Zika Virus. The New England journal of medicine, pp. 1-12.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandi, C., Kunz, C. y Harrison, S. C. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 resolución. Nature, 375: 291-298.
- Reyes-del Valle, J., Salas-Benito, J., Soto-Acosta, R. y del Angel, R. M. 2014. Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism. Medicina Tropical Viral. 1(1): 36- 44.
- Rico-Hesse, R., Harrison, L. M., Salas, R. A., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C. *et al.* 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. Virology, 230(2): 244-51.
- Rigau-Pérez, J. G. 1998. The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 59, 272–274.
- Roby, J. A., Setoh, Y. X., Hall, R. A. y Khromykh, A. A. 2015. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. J. Gen. Virol. 96 (7): 1551.

- Rush, B. 1951. An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. *The American journal of medicine*. Vol. 11, 5: 546-550.
- Santiago, G. A., McElroy-Horne, K., Lennon, N. J., Santiago, L. M., Birren, B. W., Henn, M. R. *et al.* 2012. Reemergence and decline of dengue virus serotype 3 in Puerto Rico. *J Infect Dis*, 206(6): p. 893-901.
- Sauder, C. J., Vandeburgh, K. M., Iskow, R. C., Malik, T., Carbone, K. M. y Rubin, S. A. 2006. Changes in mumps virus neurovirulence phenotype associated with quasispecies heterogeneity. *Virology*. 350: 48–57.
- Schweitzer, K. B., Chapman, M. N. y Iwen, C. P. 2015. Overview of the *Flaviviridae* With an Emphasis on the Japanese Encephalitis Group Viruses. *Laboratory Medicine*, 40(8):493–499.
- Secretaria de salud. 2015b. Boletín epidemiológico: Sistema nacional de vigilancia epidemiológica, Generalidades y panorama actual de la infección por virus Zika (34): 9, 31. [Consultado Mayo 13, 2018]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/50233/sem52.pdf>
- Secretaría de Salud. 2015a. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. [Consultado febrero 13, 2018]. Disponible en: [http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/NOM\\_032\\_SSA2\\_2014.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/NOM_032_SSA2_2014.pdf)
- Secretaría de Salud. 2016b. Boletín epidemiológico: Sistema nacional de vigilancia epidemiológica, Vigilancia Epidemiológica Semana 52(33): 9, 31. [Consultado Mayo 13, 2018]. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/179535/sem52.pdf>
- Secretaría de Salud. 2016a. Lineamientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico por Laboratorio de Infección por Virus Zika. Dirección general de epidemiología. [Consultado mayo 27, 2018]. Disponible en:

[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/207354/lineamientos\\_ve\\_y\\_lab\\_virus\\_zika.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/207354/lineamientos_ve_y_lab_virus_zika.pdf)

- Secretaría de salud. 2016c. Panorama epidemiológico de dengue México. Sistema especial de vigilancia epidemiológica de dengue. [Consultado marzo 6, 2017]. Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/panodengue/intd\\_dengue.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/panodengue/intd_dengue.html)
- Secretaría de Salud. 2017b. Boletín epidemiológico. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica, 11(34): 8.
- Secretaría de Salud. 2017a. Lineamientos para la vigilancia por laboratorio del dengue y otras arbovirosis. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. [Consultado abril 7, 2017]. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/269560/Actualizados\\_Lineamientos\\_Dengue\\_y\\_otros\\_Arb\\_V2.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/269560/Actualizados_Lineamientos_Dengue_y_otros_Arb_V2.pdf)
- Senaka R., Chaturaka R. y Anoja R. 2012. Treatment of dengue fever. *Infection and Drug Resistance* 5: 103–112.
- Shi Pei-Yong. 2012. Molecular virology and control of flaviviruses. Gran Bretaña. Caister Academic. pp. 2-5.
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T. *et al.* 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Flaviviridae*. *Journal of General Virology*, 98: 2–3.
- Sirisena, P.D. y Noordeen, F. 2014. Evolution of dengue in Sri Lanka-changes in the virus, vector, and climate. *International Journal of Infectious Diseases*, 19: 6-12.
- Schneider, J. y Droll, D. 2001. A time line for dengue in the Americas to december 31, 2000 and noted first occurrences. Organización panamericana de la salud. [Consultado enero 24, 2018]. Disponible en: [www.paho.org/English/HCP/HCT/VBD/dengue\\_finaltime.doc](http://www.paho.org/English/HCP/HCT/VBD/dengue_finaltime.doc)
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M. y Lee, Y. M. 2017. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology* 308: 50–64.

- Torres-Galicia, I., Cortés-Poza, D. y Becker, I. Dengue en México: análisis de dos décadas. 2014. Gaceta Médica de México. México. 150-122.
- Universidad Autónoma de Nuevo León. 2017. Enfermedades transmitidas por vectores. Centro de investigación y desarrollo en ciencias de la salud. [Consultado septiembre 23, 2017]. Disponible en: <http://cidics.uanl.mx/index.php/2017/11/27/nota-44/>
- Velandia, M. L. y Castellanos, J. E. 2011. Virus del dengue; estructura y ciclo viral. Asociación colombiana de infectología, 15(1), 33-43.
- Vogels, C. B. F., Göertz, G. P., Pijlman, G. P. y Koenraadt, C. J . M. 2017. Vector competence of European mosquitoes for West Nile virus. Nature, 6: e96.
- Vorou, R. 2016. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. International Journal of Infectious Diseases 48: 85–90.
- Weaver, S. C., Brault, A. C., Kang, W. y Holland, J.J. 1999. Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. J Virol 73: 4316–4326.
- Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., Shi, P. Y., Vasilakis, N. 2016. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. Antiviral Res 130: 69-80.
- Weaver, S. C. y Reisen, W. K. 2010. Present and future arboviral threats. Antiviral Research 85: 328–345.
- World Health Organization. 2018. Dengue y dengue grave: datos y cifras. [Consultado mayo 27, 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- World Health Organization. 2017. Respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030. pp.477
- Yabar, V. C. 2003. Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus dengue: propuesta de un modelo de replicación de ARN. Rev Peru Med Exp Salus Pública. 20(1): 51-57.

- Yamanaka , A., Mulyatno, K. C., Susilowati, H., Hendrianto, E., Ginting, A. P., Sary, D. D. *et al.* 2011. Displacement of the predominant dengue virus from type 2 to type 1 with a subsequent genotype shift from IV to I in Surabaya, Indonesia 2008-2010. PLoS One, 6(11): p. e27322.
- Zahng, G., Asad, S., Khromykh, A. y Asgari, S. 2017. Cell fusing agent virus and dengue virus mutually interact in *Aedes aegypti* cell lines. Nature, 7: 6935.

## **ANEXO I. GLOSARIO DE TÉRMINOS QUE SE UTILIZAN EN LA TESIS**

Artralgia	Dolor en las articulaciones.
Endémico	Propio y exclusivo de determinadas localidades o regiones.
Equimosis	Lesión subcutánea caracterizada por depósitos de sangre extravasada.
Fenotipo	Características físicas y bioquímicas de un organismo según lo determinado por la interacción sus genes y el medio ambiente.
Genotipo	Composición genética de un organismo.
Hematocrito	Volumen de glóbulos rojos en comparación con el volumen total de sangre
Mialgia	Dolor musculoesquelético generalizado.
Neurotrópico	Que es capaz de infectar células nerviosas.
Petequia	Lesiones pequeñas de color rojo, formadas por extravasación de un número pequeño de eritrocitos cuando se daña un capilar.
Serología	Identificación diagnóstica de anticuerpos en el suero.
Serotipo	Variación dentro de una especie de bacteria o virus que tienen un conjunto de antígenos en común.

## ANEXO II. PATRONES DE AMPLIFICACION DE MUESTRAS DEL ESTADO DE YUCATÁN

Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los productos obtenidos por amplificación de la región específicas del genoma viral de las muestras positivas para DENV o ZIKV. Cada imagen presenta el número de la muestra, en el primer carril el marcador molecular y del segundo al séptimo carril los oligonucleótidos usados para la amplificación del flavivirus.

