



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

Aislamiento y tipificación molecular de flavivirus silvestres
circulantes en el estado de Yucatán

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:
PÉREZ BERNAL MARÍA DE JESÚS EVA

Asesor: Dr. José Bustos Arriaga

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Aislamiento y tipificación molecular de flavivirus silvestres circulantes en el estado de Yucatán.

Que presenta la pasante **María de Jesús Eva Pérez Bernal**
Con número de cuenta: **309295480** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de diciembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Dr. José Bustos Arriaga	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
2do. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Agradecimientos institucionales

El siguiente proyecto fue realizado en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Arbovirus de la Unidad de Investigación en Biomedicina, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, con los siguientes apoyos financieros: UNAM, PAPIIT IA209017; UNAM, PAPIIT IA204119 y CONACYT PROBLEMAS NACIONALES 2029

Índice	Página
Abreviaturas	III
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	IV
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 Definición de virus	2
2.1.1 Estructura básica viral	3
2.1.2 Clasificación viral	3
2.1.3 Propiedades del genoma viral	4
2.1.4 Morfología	5
2.1.5 Replicación viral	6
2.1.6 Sistema taxonómico	6
2.2 Flavivirus	6
2.2.1 Virus dengue	7
2.2.2 Virus Zika	8
2.3 Proteínas flavivirales	8
2.4 Ciclo replicativo de los flavivirus	10
2.4.1 Replicación del genoma viral	11
2.5 Generación de cuasiespecies	12
2.6 Presentaciones clínicas de la infección con DENV y ZIKV	13
2.7 Diagnóstico diferencial de flavivirus	15
2.8 Epidemiología y co-circulación de flavivirus	17
2.8.1 Epidemiología en México	17
3. Antecedentes directos	18
4. Justificación	19
5. Objetivos	19
6. Hipótesis	20
7. Material y Métodos	21
7.1 Líneas celulares	21
7.2 Amplificación de virus	21
7.3 Extracción y cuantificación de RNA	21
7.3.1 Lisis y homogenización	21
7.3.2 Separación de fase	21
7.3.3 Precipitación del RNA	22
7.3.4 Fase de lavado	22
7.3.5 Cuantificación	22
7.4 Síntesis de cDNA	23
7.5 Tipificación	23
7.5.1 PCR	23

Índice	Página
7.5.2 Electroforesis	25
7.6 Criterios de inclusión de resultados	26
8. Resultados	28
9. Análisis y discusión de resultados	31
10. Conclusiones	35
11. Perspectivas	35
12. Referencias	36
13. Anexos	40

Abreviaturas

cDNA	DNA complementario
CHKV	Virus Chikungunya
DENV	Virus Dengue
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
dsDNA	<i>Double-stranded DNA</i>
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
MEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
mRNA	RNA mensajero
NS	Proteína viral no estructural
OMS	Organización mundial de la salud
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RC	Complejo replicativo
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SFB	Suero fetal bovino
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i>
ssRNA	<i>Single-stranded RNA</i>
TAE	Tris-Ácido acético-EDTA
UTR	<i>Untranslated region</i>
ZIKV	Virus Zika

Índice de figuras

	Pagina
Figura 1.- Esquematzación de la clasificación de Baltimore	5
Figura 2.- Estructura general de los flavivirus	7
Figura 3.- Estructura del genoma de los flavivirus	9
Figura 4.- Esquematzación del ciclo replicativo de los flavivirus.	11
Figura 5.- Esquematzación de la replicación del genoma viral	12
Figura 6.- Respuesta inmunológica a la infección de dengue.	14
Figura 7.- Algoritmo de diagnóstico para infección por DENV	16
Figura 8.- Algoritmo de diagnóstico para infección por ZIKV	16
Figura 9.- Incidencia y Serotipos aislados de Dengue en México	18
Figura 10.- Esquematzación de los oligonucleótidos utilizados en la tipificación.	24
Figura 11.- Datos representativos de las electroforesis corridas.	26
Figura 12.- Diagrama de la metodología experimental	27
Figura 13.- Diferencia de la intensidad de banda en una muestra amplificada en dos líneas celulares	34

Índice de tablas

	Pagina
Tabla 1.- Oligonucleótidos utilizados para la tipificación de los aislados	24
Tabla 2.- Condiciones para PCR de acuerdo con los oligonucleótidos utilizados	25
Tabla 3.- Códigos de acceso en GenBank de los virus utilizados como controles positivos	25
Tabla 4.- Tamaño esperado de las bandas, en pares de bases, de los amplicones obtenidos en la PCR	26
Tabla 5.- Características clínicas y demográficas de las muestras utilizadas	28
Tabla 6.- Resultados obtenidos de la tipificación molecular por RT-PCR para determinar virus Zika (ZIKV), dengue por serocomplejo (DENVSCX), dengue por tiempo real (TR).	29
Tabla 7.- Comparación de la tipificación molecular de las muestras analizadas con los resultados serológicos	30
Tabla 8.- Datos condensados de los aislados obtenidos y tipificados	31

1. Introducción

Los virus del género flavivirus pertenecen a la familia *Flaviviridae*, entre los más importantes se encuentran el virus dengue (DENV) y el virus Zika (ZIKV). Estos virus son transmitidos por la hembra hematófaga de los mosquitos del género *Aedes*, principalmente *A. aegypti* y *A. albopictus*, dichos vectores se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales del planeta y México no es la excepción. Ya que estos mosquitos son responsables de la transmisión de otros arbovirus, virus transmitidos por artrópodos, la co-circulación es un fenómeno común en regiones endémicas. Tal es el caso del virus chikungunya (CHKV) que co-circula en las mismas regiones geográficas que DENV y ZIKV (Leta, S. 2018). La mayoría de las infecciones por arbovirus son diagnosticadas clínicamente con la identificación de signos y síntomas, sin embargo, algunos de estos son compartidos en las infecciones por DENV, ZIKV o CHKV por lo que el diagnóstico por esta estrategia no es totalmente diferencial.

La NORMA Oficial Mexicana, NOM-032-SSA2-2014, “Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores” estipula el estudio virológico por RT-PCR en aislados de muestras positivas para DENV por serología, mientras que para el ZIKV el aislamiento no está recomendado en los lineamientos oficiales de diagnóstico y vigilancia (Diario Oficial de la Federación, 2015). Sin embargo, los aislados considerados en la normatividad para la vigilancia del DENV, no están al alcance de los grupos de investigación especializados. Esta problemática tiene como consecuencia que el conocimiento de mecanismos de virulencia y de la interacción hospedero-patógeno en México se genere utilizando aislados históricos, mexicanos o extranjeros, o incluso virus referencia adaptados al laboratorio con limitada relación con los virus circulantes en regiones endémicas.

En el presente proyecto se enfoca en el aislamiento, purificación y tipificación de flavivirus circulantes en México, obtenidos a partir de sueros de pacientes

presuntamente positivos a la infección por flavivirus en etapa febril con diagnóstico clínico y serológico, recolectados en el estado de Yucatán durante el brote del 2016.

Se llevó a cabo la amplificación en cultivo celular de 40 muestras, para posteriormente extraer RNA por el método de la técnica de fenol-cloroformo, retrotranscribirlo con el uso de oligonucleótidos degenerados y la retrotranscriptasa de la leucemia murina de Maloney y tipificarlo por medio de PCR con oligonucleótidos específicos para determinar la presencia de DENV, ZIKV y CHKV. De las 40 muestras analizadas, se obtuvieron 36 aislados; 9 ZIKV, 7 DENV, uno como posible CHKV y los 19 aislados restantes dieron resultados inconclusos por lo que no fue posible tipificarlos.

Se espera que el banco de aislados sea finalizado con las muestras restantes pertenecientes al estado de Yucatán y que en un futuro se extienda a muestras de otros estados. Además, el banco de aislados de flavivirus mexicanos será utilizado para investigaciones futuras para el estudio de la epidemiología molecular de flavivirus en población mexicana.

2. Marco teórico

2.1 Definición de virus

Los virus son parásitos intracelulares obligados, constituidos por proteínas y material genético y algunos poseen envoltura de membranas lipídicas. Su modo de replicación no es binaria, es decir, de un solo virus pueden generarse miles de partículas virales (Taylor M., et al, 2014). Poseen una gran diversidad, varían en gran medida en cuanto a estructura, organización y expresión genómica, así como sus estrategias de replicación y transmisión (Brook G., et al.,2010).

La partícula completa del virus es llamada virión y su principal función es transportar el genoma viral hacia la célula hospedadora para que el genoma pueda ser expresado (transcrito y traducido) y replicado (Baron S., 1996).

2.1.1 Estructura básica viral

Los viriones simples o también conocidos como “desnudos” consisten en dos componentes básicos, ácidos nucleicos y una capa de proteínas, llamada cápside, cuya función es proteger el genoma viral y anclarse a los receptores específicos durante la infección; las proteínas de la cápside son codificadas por el genoma viral. Y está formada por uno o dos tipos de proteínas, las cuales al multiplicarse se ensamblan y generan una estructura tridimensional adquiriendo simetría helicoidal, icosaédrica o compleja (Baron S., 1996).

Los virus denominados “envueltos” poseen una cobertura adicional, llamada envoltura, la cual deriva de las membranas de las células infectadas. Esta consiste en una bicapa lipídica y posee proteínas de membrana o transmembranales, glicosiladas que participan en el reconocimiento de los receptores celulares y en la fusión entre la membrana celular y la membrana viral, además, pueden poseer puntas o protuberancias conocidas como peplómeros. La envoltura puede considerarse como una capa adicional protectora que además funciona como un mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica del hospedero (Baron S., 1996).

2.1.2 Clasificación viral

La clasificación viral depende de distintas propiedades (Brook G., et al., 2010), como lo son:

- Morfología del virión
- Propiedades del genoma viral
- Propiedades fisicoquímicas del virión
- Propiedades de las proteínas virales
- Organización del genoma y la replicación
- Propiedades antigénicas
- Propiedades biológicas

2.1.3 Propiedades del genoma viral

Los virus solo poseen un tipo de ácido nucleico, ya sea DNA o RNA. Su genoma puede ser monocatenario (*single-stranded; ss*) o bicatenario (*double-stranded; ds*), circular o lineal, segmentado o no segmentado (Brook G., et al., 2010). En el caso de los virus de RNA monocatenario, ésta puede ser cadena con sentido positiva (+), la cual funciona como RNA mensajero (mRNA), o cadena antisentido (-), la cual es complementaria a la cadena sentido y no funciona como mRNA, sino que funciona como molde para la síntesis de RNA con sentido positivo (Baron S., 1996).

David Baltimore, propuso una clasificación (Baltimore D., 1971) basada en el tipo de material genético que presentan los virus, agrupándolos en familias (Figura 1).

- Familia I: consiste en virus que poseen dsDNA, los cuales se transcriben para formar mRNA.
- Familia II: consiste en virus que poseen ssDNA de polaridad positiva, los cuales se unen a su cadena complementaria de ssDNA para formar dsDNA y ser transcritos en mRNA.
- Familia III: está constituida por virus de dsRNA el cual se transcribe directamente en mRNA.
- Familia IV: consiste en virus ssRNA de polaridad positiva, los cuales deben sintetizar una cadena molde ssRNA de polaridad negativa para posteriormente sintetizar mRNA.
- Familia V: incluye a los virus ssRNA de polaridad negativa, cadena de donde se parte para sintetizar mRNA.
- Familias VI y VII consisten en virus que retrotranscriben sus genomas y requieren de un intermediario de dsDNA para generar mRNA, están constituidas por ssRNA de polaridad positiva y DNA, respectivamente.

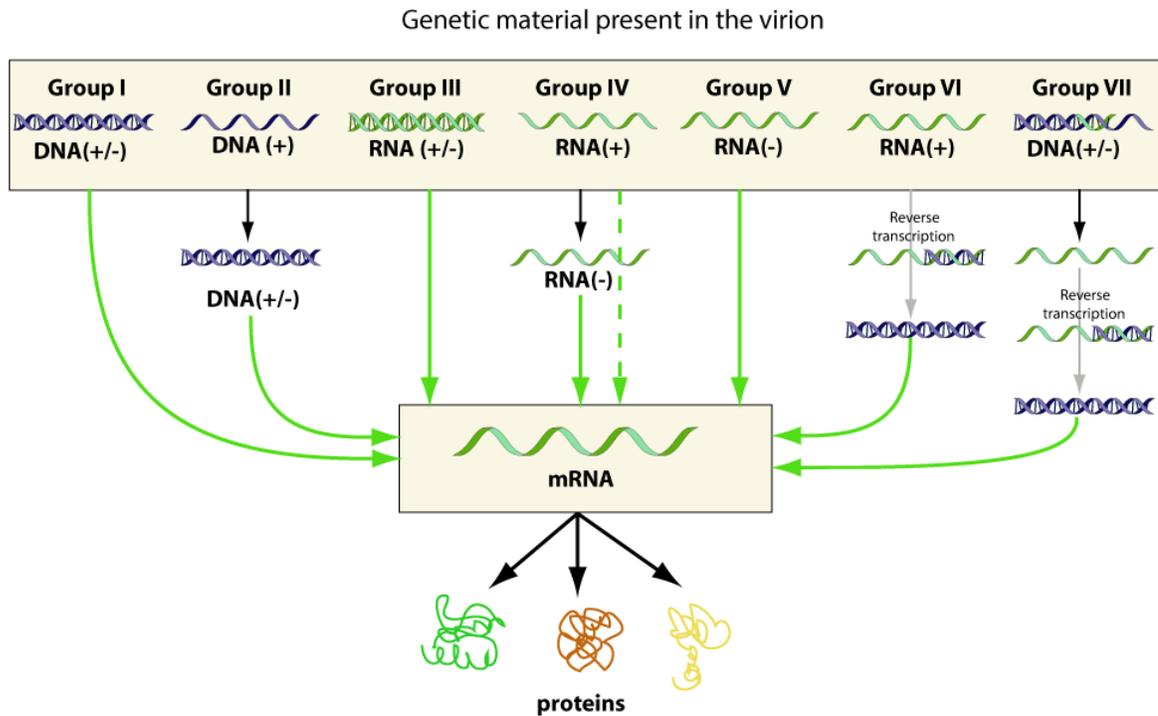


Figura 1.- Esquematzación de la clasificación de Baltimore (ExpASy, 2018)

2.1.4 Morfología

Adicionalmente a la clasificación dependiente de la presencia de envoltura, los virus también son clasificados por la morfología de la cápside. La morfología helicoidal es vista en muchos virus que poseen nucleocápsides pleomórficas y filamentosas. Estas consisten en arreglos de las proteínas de la cápside (protómeros o capsómeros) envueltos alrededor de un filamento helicoidal de ácidos nucleicos. En la morfología icosaédrica, el número y ordenamiento de los capsómeros permite la identificación y clasificación de los virus (Baron S., 1996). Además, existen virus cuya simetría no es helicoidal o icosaédrica y son llamados de simetría compleja, estos usualmente están constituidos por numerosas capas de proteínas y lípidos y suelen tener formas geométricas distintas. Por ejemplo, los virus pertenecientes a la familia *Poxviridae* poseen una forma ovalada y los bacteriófagos de la familia *Myoviridae*, los cuales poseen una cabeza icosaédrica y una cola helicoidal (Cann J. A., 2016).

2.1.5 Replicación viral

Los virus se multiplican solo en células vivas que sean permisivas y susceptibles, de donde toman la energía, maquinaria de síntesis y precursores moleculares. Para que pueda utilizar los recursos de la célula hospedera, este debe ser capaz de producir mRNA traducible por la maquinaria traduccional de la célula, dependiendo del genoma viral, el mecanismo de generación de mRNA viral será dependiente de la maquinaria celular o de proteínas no estructurales (NS). Una vez que el virión entra en contacto con la célula, se libera el genoma e inician los procesos de traducción y replicación, entrando en una fase llamada periodo de eclipse, donde se continúa rápidamente una síntesis exhaustiva de partículas infecciosas. Posterior a la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, inicia el proceso de ensamblaje para dar origen a nuevos viriones infecciosos (Brook G., et al., 2010).

Los virus de RNA poseen una replicación errática, generada por las polimerasas de RNA dependientes de RNA (RdRp) necesarias para la replicación. Estas enzimas usualmente presentan un índice de mutación mucho mayor que los virus de DNA. El rango de mutación es de aproximadamente 10^{-4} permitiendo una continua generación de poblaciones heterogéneas de virus conocidas como cuasiespecies o nubes de mutantes, confiriendo mayor adaptabilidad al nuevo hospedero (Baron S., 1996).

2.1.6 Sistema taxonómico

Con base en la homología de la secuencia del genoma viral, los virus son separados en grupos principales (familias). Los nombres de las familias poseen el sufijo “-viridae”. Cada familia posee subdivisiones, conocidas como género y comúnmente se basan en las diferencias fisicoquímicas o serológicas. Los nombres del género se acompañan del sufijo “-virus” (Brook G., et al., 2010)

2.2 Flavivirus

El género *Flavivirus*, pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, comprende más de 70 virus, entre los cuales se encuentran virus patógenos para el humano como lo son los

virus DENV, ZIKV, el virus de encefalitis japonesa, virus de la fiebre amarilla y virus del Nilo occidental (Kuno G., et al., 1998). Las partículas virales de los flavivirus (Figura 2) poseen un diámetro entre 40 y 60 nm, la partícula madura cuenta con envoltura de membrana lipídica cubierta por 90 homodímeros de la proteína de envoltura, el genoma flaviviral consta de una molécula de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva contenido en una nucleocápside icosaédrica (Romero-Cabello C. 2007).

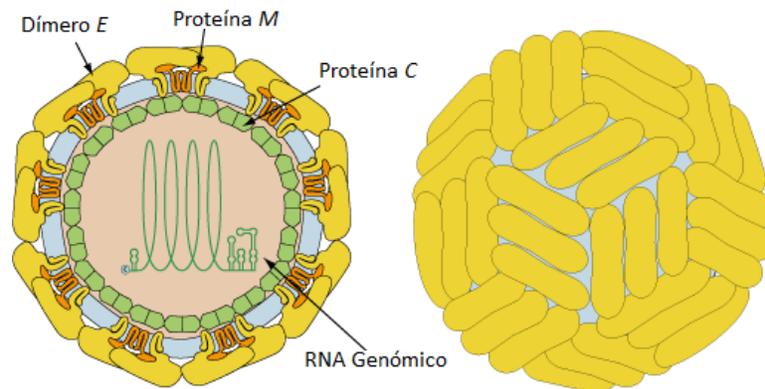


Figura 2.- Estructura general de los flavivirus, donde se encuentran indicadas las proteínas estructurales E, M y C así como su organización. (Modificado de Zhang et al., 2003)

2.2.1 Virus dengue

El virus de dengue es un flavivirus transmitido a humanos durante la alimentación de la hembra hematófaga de los mosquitos del género *Aedes*, principalmente *A. aegypti* y *A. albopictus*. A la fecha se conocen cuatro serotipos genética y antigénicamente diferentes; DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 (Guha-Sapir, D., et al., 2005). El virión es envuelto, con nucleocápside icosaédrica de aproximadamente 50 nm. El genoma viral consiste en una cadena de RNA con polaridad positiva de aproximadamente 10.7 kilobases con un solo marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína la cual es procesada co- y postraduccionalmente en 10 proteínas virales; 7 NS y tres estructurales; cápside (C), membrana (M) y envoltura (E); esta última es el principal blanco antigénico y su reconocimiento por el sistema inmunológico humoral es la base de la clasificación en los cuatro serotipos (Alcaraz-Estrada S., 2013). El genoma esta flanqueado por

regiones no traducidas en los extremos 3' y 5', cuenta con un cap tipo I en el extremo 5' y carece de cola poliA.

2.2.2 *Virus Zika*

El virus Zika es también transmitido por mosquitos del género *Aedes*, el genoma del ZIKV es una molécula de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva que codifica para un solo marco de lectura abierto que es traducido en forma de poliproteína, la cual es procesada postraduccionalmente en 10 proteínas incluyendo proteínas de cápside (C), membrana (M) y envoltura (E). A diferencia del DENV, a la fecha solo se ha identificado un serotipo. Los ZIKV se clasifican genéticamente en tres linajes principales, Africano I, Africano II y Asiático (Gong Z., et al., 2016).

2.3 *Proteínas flavivirales*

Proteínas estructurales

Las proteínas estructurales (Figura 3) incluyen a las proteínas C, M y E, además de un péptido pr en la forma inmadura de la proteína M. Estas juegan un papel importante para la infección del virus ya que permiten su entrada a la célula y la protección del genoma viral. La proteína C consiste en aproximadamente 120 aminoácidos y envuelve al genoma formando una nucleocápside. Las proteínas prM y E son glicoproteínas de 165 y 495 aminoácidos respectivamente, cada una posee dos hélices transmembranales; la forma madura de la proteína M por si sola posee 75 aminoácidos. La proteína prM actúa como chaperona para el ensamble de E. La proteína E posee un sitio de unión a receptores celulares y un péptido fusogénico que permite la fusión de la envoltura con la membrana endosomal de la célula hospedera (Mukhopadhyay S., et al., 2005).

Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales (Figura 3) participan en los procesos infecciosos del virus, su ciclo replicativo y la evasión del sistema inmune. NS1 se encuentra en el lumen del retículo endoplásmico y está involucrada principalmente con la evasión del

sistema inmune, es esencial para la replicación viral, ya que se requiere para la formación del complejo replicativo y el reclutamiento de otras proteínas NS (Westaway EG, et al. 1997; Uniprot. 2018). Poco se sabe al respecto de NS2A, actualmente se conoce que es un componente del complejo replicativo que participa en el ensamblaje y es antagonista de la respuesta inmunológica (Barrows, N. J., et al., 2018). La proteína NS3 posee tres actividades enzimáticas, como proteasa de serina, NTPasa y helicasa de RNA, NS2B es un cofactor requerido por NS3 (Uniprot, 2018). NS4A y NS4B son proteínas de membrana generadas por procesos coordinados postraduccionales generados a partir de proteasas virales y de la célula hospedera (Welsch S, et al., 2009), NS4A se encarga de regular la actividad de ATPasa de la helicasa NS3, además permite que NS3 conserve energía durante el desenrollamiento del genoma viral (Uniprot, 2018). NS4B también es una proteína esencial para la replicación viral (Khromykh A.A., et al., 2000) e induce la formación de membranas derivadas del retículo endoplásmico donde se lleva a cabo la replicación viral (Uniprot, 2018). Y, por último, la proteína NS5, que es la RdRp responsable de la replicación del genoma y adición del cap en el extremo 5'UTR de los genomas en el citoplasma, además previene el estado antiviral de la célula bloqueando la vía de señalización del interferón alfa/beta (Uniprot, 2018).

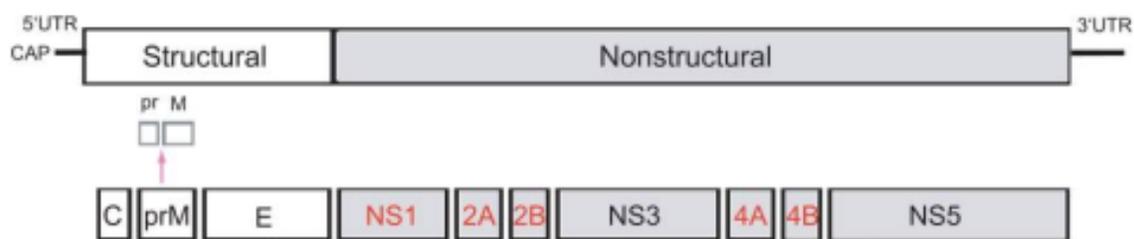


Figura 3. Estructura del genoma de los flavivirus, en la parte superior se encuentra un esquema básico de la proporción de genes que codifican para proteínas estructurales y proteínas no estructurales, en el extremo izquierdo se encuentra un cap 5'. En la parte inferior se encuentra desglosada la organización de los genes que codifican para proteínas estructurales C, M (prM) y E, y proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. (Virus Pathogen Resource Database, 2018)

2.4 Ciclo replicativo de los flavivirus

Al momento de la infección (Figura 4), el virión se ancla a la superficie de la célula susceptible e ingresa por endocitosis mediada por receptores. El ambiente ácido del endosoma, activa una trimerización irreversible de la proteína E que resulta en la exposición del péptido fusogénico y en la fusión de la membrana viral y la membrana celular. Después de la fusión, la nucleocápside es liberada en el citoplasma, la cápside y el RNA se disocian, una vez que el genoma es liberado en el citoplasma la cadena positiva de RNA es traducida en el retículo endoplásmico en una sola poliproteína que es procesada co- y postraduccionalmente por la proteasa viral NS3 y proteasas celulares. Una vez en su forma individual, las proteínas NS y el genoma viral forman el complejo replicativo (RC) en la membrana del retículo endoplásmico para la síntesis de nuevos genomas. El ensamblaje del virus inicia en el lumen del retículo endoplásmico, donde se asocian las proteínas sintetizadas y las nuevas copias de RNA. Las partículas no infecciosas resultantes, virus inmaduros y partículas subvirales, son transportadas a través de la red *trans-Golgi* (TGN). La forma inmadura de la proteína M (prM) en los viriones inmaduros y las partículas subvirales es procesada por la proteasa furina de la célula hospedera, resultando en viriones maduros e infecciosos. Las partículas maduras y subpartículas virales son liberadas por exocitosis (Alcaraz-Estrada S., 2013).

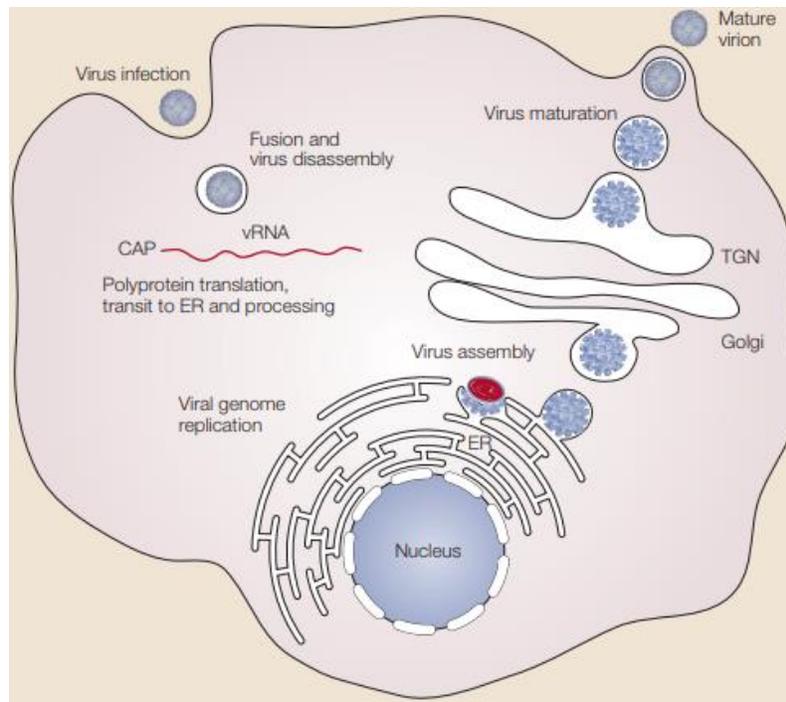


Figura 4 Esquematación del ciclo replicativo de los flavivirus. (Mukhopadhyay S., 2005)

2.4.1 Replicación del genoma viral

La replicación se lleva a cabo en el RC, encargado de la síntesis de RNA, los procesos de metilación y capping del RNA, se llevan a cabo en el extremo 5'-UTR, el proceso de síntesis es semiconservativo y asimétrico. En la Figura 5 se muestra el proceso que se lleva a cabo durante la replicación del genoma. Partiendo de un *ssRNA* (+) se sintetiza una cadena molde mediante la RdRp, esta cadena al ser complementaria es *ssRNA* (-), con la cual se genera la forma replicativa, a partir de la cual se sintetizan las cadenas de RNA (+) y es reciclada para seguir generando más copias del genoma. Esta replicación es asimétrica debido a que a partir de una sola cadena molde se sintetizan múltiples copias. Se realiza el capping y la metilación en las nuevas copias de RNA mediante NS3 y NS5 para formar RNA genómico (Mukhopadhyay S., et al., 2005). Durante el proceso de replicación, pueden encontrarse en la célula hospedera tres formas del RNA viral: una forma replicativa que consiste en un *dsRNA*, un intermediario de replicación que consiste en un *ssRNA* (-) y la progenie viral que consiste en *ssRNA* (+) (Klema V.J., et al., 2015).

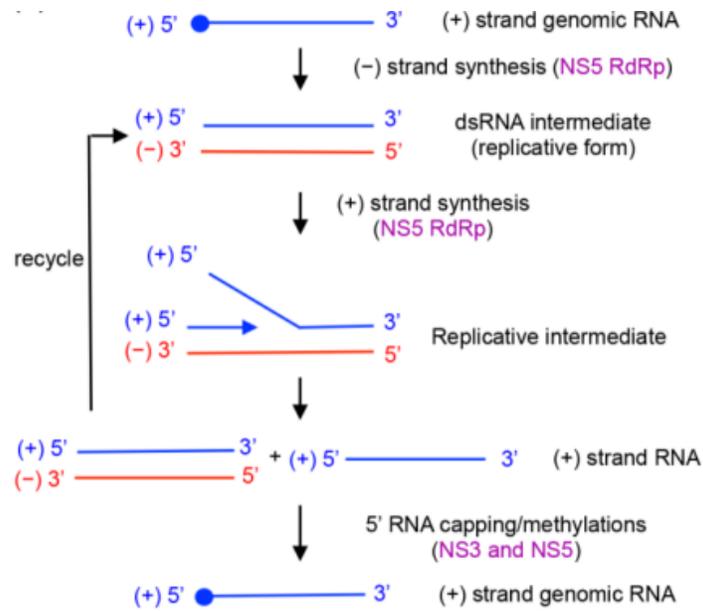


Figura 5.- Esquematzación de la replicación del genoma viral (Klema V.J., et al., 2015)

2.5 Generación de cuasiespecies

Las cuasiespecies virales son poblaciones de RNA viral de espectro mutante, o nubes de mutantes, que comparten un alto porcentaje de la secuencia de nucleótidos con mutaciones puntuales generadas durante la replicación, su evolución está influenciada por altas tasas de mutaciones durante la replicación viral y en algunos casos por recombinación molecular o durante el reordenamiento del genoma. Se estima que la tasa de mutación de la RdRp de flavivirus es de aproximadamente 1/34000 para UTP, 1/59000 para ATP y 1/135000 para la incorporación de CTP, fidelidad comparable a la retrotranscriptasa del virus de inmunodeficiencia humana (Jin, Z., et al., 2011). La selección de estas variantes virales dependerá de su capacidad de establecer infección productiva en cada hospedero, generando poblaciones diferentes en cada ciclo vector-primate, esta capacidad de adaptación en el contexto de la replicación viral es conocida como “fitness” y da como resultado la generación y selección de variantes genéticas con fenotipos variables en su capacidad para replicar, de evadir de la respuesta inmune innata y consecuentemente con la patogénesis y la intensidad de las presentaciones clínicas (R. Andino, E. Domingo, 2015; Vignuzzi, M., et al., 2006) Como consecuencia, un conjunto de mutantes

frecuentemente determina el comportamiento biológico de la población viral (Domingo E., et al., 2012).

2.6 Presentaciones clínicas de la infección con DENV y ZIKV

Presentaciones clínicas de la infección por DENV

Los cuatro serotipos del DENV son capaces de causar las manifestaciones clínicas. La infección con los DENV se manifiesta clínicamente con fiebres de 38.8 a 40.5°C, cefalea, dolor retro-ocular, malestar general, mialgia, artralgia, náusea, vómito, anorexia y exantema. La Organización Mundial de la Salud clasifica las presentaciones clínicas como dengue sin síntomas de alarma, presentando vómito, náusea, salpullido, malestar y dolor general, leucopenia y prueba de torniquete positiva; dengue con síntomas de alarma, presentando dolor abdominal, vómito persistente, acumulación de fluidos, sangrado en mucosas, letargia, hepatomegalia, trombocitopenia; y dengue grave o severo, en donde se presenta acumulación de fluidos con dificultades respiratorias, sangrado severo, falla cardíaca y de otros órganos, y enzimas hepáticas elevadas (Center for Disease Control and Prevention 2013).

La enfermedad se divide en tres fases (Beltrán-Silva S. L., et al., 2016):

- La etapa febril: se presenta el inicio de la sintomatología, existe viremia, la proteína NS1 es detectable en circulación y dura aproximadamente de 2 a 7 días.
- La etapa crítica: el paciente puede evolucionar a las formas severas de la enfermedad, la viremia es prácticamente indetectable, los niveles de NS1 en circulación disminuyen y comienzan a elevarse los niveles de IgM séricos.
- la etapa de convalecencia donde se resuelve el cuadro clínico y son detectables los niveles de IgG en circulación sanguínea.

El diagnóstico depende mucho de estas fases debido a la temporalidad en los niveles de IgG e IgM. De manera complementaria se utiliza la cuantificación de la proteína

NS1, la cual es secretada por las células infectadas por DENV, un antígeno altamente conservado y es detectable en circulación aun cuando la detección del RNA viral sea negativa (Figura 6) (Darwish, N.T., et al., 2015).

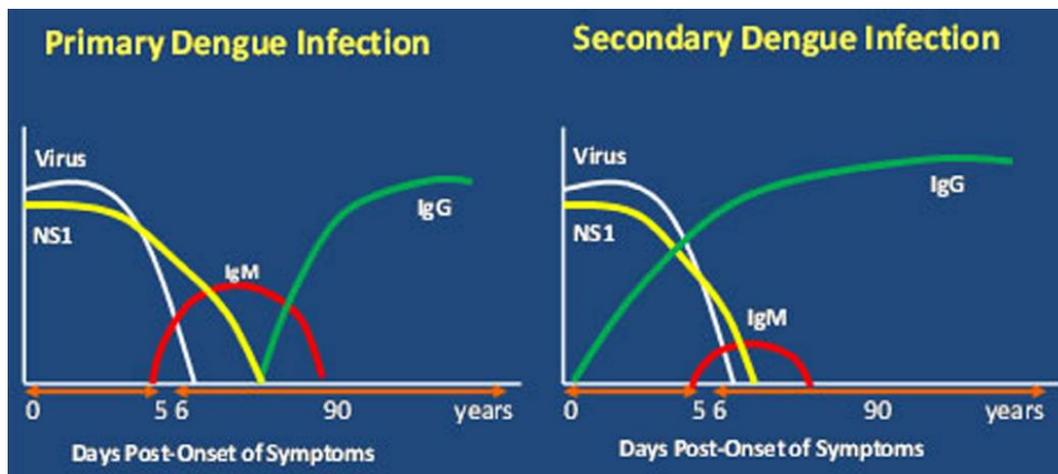


Figura 6. Respuesta inmunológica a la infección de dengue. (Darwish, N.T., et al., 2015)

Presentaciones clínicas de la infección con ZIKV

La infección por ZIKV es asintomática en el 80% de los casos (Duffy M.R., et al., 2009), en promedio, el periodo de incubación es de 6 días y los síntomas se desarrollan en un 95% de los individuos infectados 12 días después de la infección (Lessler J., et al., 2016), Las manifestaciones clínicas van desde fiebre, erupciones cutáneas, conjuntivitis, mialgia y artralgia, mientras que las formas complicadas de la infección con ZIKV se asocian a la generación de microcefalia congénita, ya que existe una transmisión transplacental (Weaver S.C., et al., 2016) y desarrollo del síndrome de Guillian-Barré, debido a que el virus posee neurotropismo (Organización Mundial de la Salud, 2016). Se ha demostrado que ZIKV puede transmitirse entre humanos mediante transmisión sexual, causando mayores implicaciones en la salud pública, principalmente para los residentes de las zonas endémicas, ya que la eliminación del virus puede ser persistente por varios años postinfección (Jacques-Counotte M., et al., 2018). Además, otro riesgo presente en los individuos infectados por ZIKV, es la posible transmisión sanguínea, por lo que se recomienda aceptar una donación

sanguínea de un paciente infectado tras aproximadamente 30 días después de la resolución de los síntomas (Beltrán-Silva S. L., et al., 2016).

2.7 Diagnóstico diferencial de flavivirus

Las técnicas de diagnóstico para flavivirus recomendadas por la CDC (*Center for Disease Control and prevention*) son pruebas inmunológicas mediante ELISA para la identificación de anticuerpos IgM principalmente para ZIKV (Center for Disease Control and prevention, 2017) e IgG y NS1 para DENV, para este último también se recomienda una prueba denominada PRNT (*Plaque reduction neutralization test*), sin embargo, la alta homología y reactividad cruzada entre las proteínas de envoltura de ambos virus, disminuye la especificidad del diagnóstico serológico, por lo que este se complementa con la técnica molecular RT-PCR en tiempo real, para ambos virus, dependiendo de la etapa de la historia natural en la que se tome la muestra para el diagnóstico (Center for Disease Control and prevention, 2017) (Figura 6).

En México, la Secretaría de Salud recomienda como pruebas confirmatorias de infección por DENV, ELISA para IgG y para IgM (Secretaría de Salud, 2016) (Figura 7), mientras que para el diagnóstico de ZIKV se recomienda descartar primero DENV y CHKV, recomendación que también da la organización panamericana de la salud (OPS) (Figura 8). Con base en la presentación clínica se recomienda realizar el diagnóstico mediante RT-PCR en tiempo real o en su defecto, una vez transcurridos 6 días de los síntomas tomar muestra sanguínea para detectar anticuerpos (Secretaría de Salud, 2016).

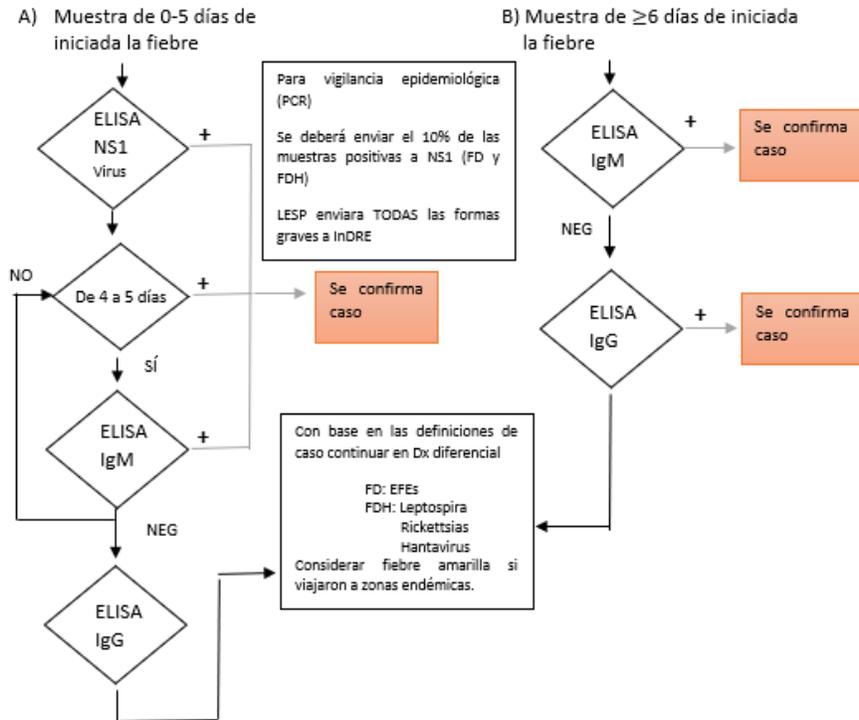


Figura 7. Algoritmo de diagnóstico para infección por DENV, donde se recomienda realizar principalmente pruebas serológicas para la confirmación de la infección por el virus. En caso de que la muestra analizada de negativo a las pruebas serológicas, se recomienda realizar diagnóstico diferencial (InDRE, 2015).

Confirmación virológica de casos sospechosos de infección por ZIKV en áreas dónde circulan otros arbovirus

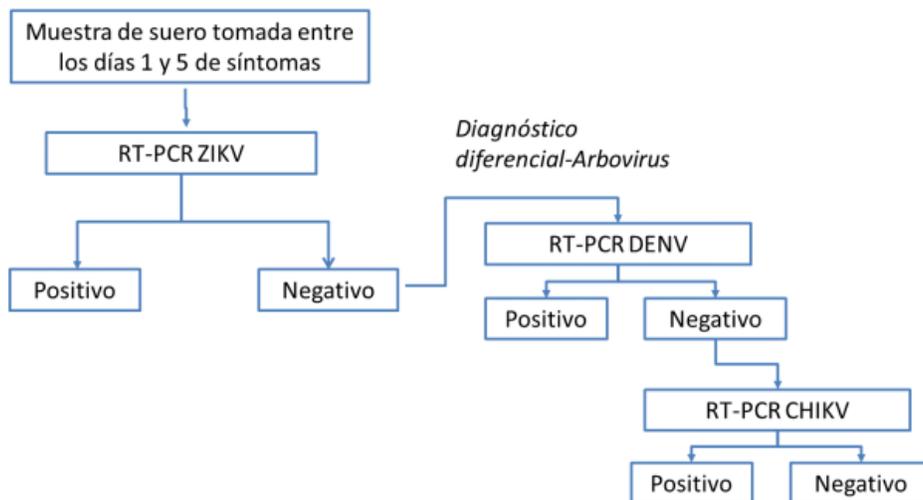


Figura 8. Algoritmo de diagnóstico para infección por ZIKV, donde se recomienda realizar la detección del virus por medio de pruebas de biología molecular (RT-PCR), y en caso de ser negativo, realizar un diagnóstico diferencial con otros arbovirus (OMS, 2016).

2.8 Epidemiología y co-circulación de arbovirus

Dado que estos virus se transmiten por los mosquitos *A. aegypti* y *A. albopictus* y las condiciones de temperatura y humedad favorecen la proliferación de los mosquitos, por lo que las zonas endémicas están limitadas por la distribución geográfica de los vectores; países tropicales y subtropicales. El hecho de que estos virus compartan el mismo vector aumenta el riesgo de co-circulación (Leta S., et al., 2018).

La OMS ha descrito que el número de casos de infección por DENV está subestimado y en gran parte por la dificultad en el diagnóstico diferencial y en la clasificación clínica. Sin embargo, se estima que se producen alrededor de 390 millones de infecciones cada año, de las cuales solo 96 millones son manifestadas clínicamente, es decir que solo cerca del 25% de las personas infectadas desarrollan manifestaciones clínicas (Organización Mundial de la Salud, 2017).

Para el caso de la infección con ZIKV, la OMS reporta que el primer gran brote ocurrió en el 2007, en la isla de Yap. En el 2015, en Brasil, en el que se notificó una asociación entre la infección por ZIKV con el síndrome de Guillian-Barré y microcefalia congénita. A la fecha, se han reportado 84 países donde hay constancia de la transmisión vectorial de ZIKV (Organización Mundial de la Salud, 2017).

2.8.1 Epidemiología en México

La situación actual en México respecto a los casos confirmados con infección de ZIKV, según los datos estadísticos proporcionados por la secretaria de salud, han sido de 12,122 acumulados desde 2015 a septiembre del 2018, siendo Veracruz el estado con la mayor cantidad de casos reportados con 2,102, seguido de Yucatán con 1,307. También han sido considerados los reportes de mujeres embarazadas, con un total de 7,045 casos acumulados desde el 2015 hasta 2018, siendo Yucatán el estado con más brotes, con 925, seguido de Veracruz con 888 (Secretaría de Salud, 2018). Es decir que el 58.11% de los casos reportados provienen de mujeres embarazadas.

Respecto a la epidemiología del DENV, la secretaria de salud ha reportado 29,665 casos probables hasta la semana 36 del 2018, de los cuales se han confirmado 4,421 con dengue no grave y 1,239 con dengue grave + dengue con síntomas de alarma, de los cuales reportan para 2018, 2,125 con dengue no grave, 1,501 con dengue con signos de alarma, 279 con dengue grave y 1,780 con dengue con síntomas de alarma + dengue grave; teniendo un total de 5,685 casos confirmados, correspondiendo a un 19.16% de los casos reportados. El estado que ha reportado más casos acumulados es Chiapas, con 896, seguido de Veracruz con 604. A su vez, el serotipo que más se ha encontrado es el DENV-1, con 1025 casos confirmados (Figura 9) (Secretaria de Salud, 2018).

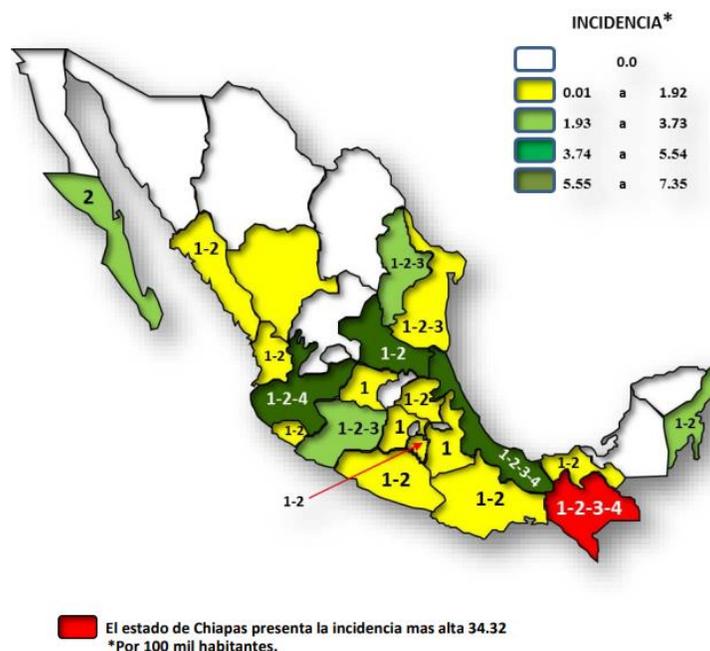


Figura 9. Incidencia y Serotipos aislados de Dengue en México, hasta septiembre 2018 (Secretaria de Salud, 2018).

3. Antecedentes directos

Los virus DENV y ZIKV cuentan con genomas virales de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva, para replicar sus genomas utilizan sus correspondientes RdRp. Es sabido que dichas polimerasas son de baja fidelidad, ya que introducen nucleótidos

no complementarios, esta es una propiedad intrínseca de los virus RNA y han evolucionado para hacer uso del alto grado de variantes genéticas o cuasiespecies generadas durante la replicación para afrontar presiones evolutivas en cada hospedero infectado (Westaway E.G., et al., 1997; Andino R., et al., 2015). Estas variantes son seleccionadas en cada brote, lo que favorece un continuo desplazamiento geográfico de los virus por adquisición de ventajas evolutivas epidemiológicas (Manokaran G., et al., 2015). 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 bancos de aislados de flavivirus circulantes en México purificados y tipificados molecularmente, que eventualmente nos permitirán correlacionar la virulencia de estos con la severidad de los brotes.

4. Justificación

El estudio de la adaptación y selección de virulencia de los flavivirus está limitada a la accesibilidad de aislados silvestres circulantes en regiones endémicas. La NOM-032-SSA2-2014 recomienda el aislamiento en 10% de las muestras de dengue positivas para NS1 y no existe una recomendación similar para los casos de Zika, además, estos aislados no pueden ser utilizados por los grupos de investigación especializados para estudios genéticos y fenotípicos más detallados. 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.

5. Objetivos

Objetivo general

- Generar un banco de aislados de flavivirus mexicanos tipificados mediante el uso de RT-PCR, a partir de muestras sanguíneas obtenidas de pacientes virémicos con diagnóstico clínico y serológico de infección por flavivirus para su posterior uso en la investigación de flavivirus endémicos.

- Validar el diagnóstico clínico y serológico para flavivirus (DENV y ZIKV) con la tipificación molecular de flavivirus en muestras clínicas obtenidas en el estado de Yucatán, comparando los resultados obtenidos con los datos clínicos proporcionados para realizar una comparación con los datos estadísticos oficiales.

Objetivos particulares

- Aislar, amplificar y purificar preparaciones de los flavivirus presentes en muestras de pacientes con diagnóstico serológico y clínico positivo a infección con flavivirus en cultivo celular para la recuperación del virus.
- Tipificar por RT-PCR los flavivirus purificados circulantes en el estado de Yucatán para identificar la especie (ZIKV o DENV) y conocer el serotipo en el caso de muestras con DENV.
- Comparar el diagnóstico obtenido por la evaluación clínica y técnicas serológicas con la tipificación molecular de los flavivirus aislados de las muestras sanguíneas de pacientes virémicos para contrastar con las estadísticas oficiales.

6. Hipótesis

Los flavivirus aislados de muestras sanguíneas de pacientes con diagnóstico clínico positivo, provenientes del estado de Yucatán, permitirán la tipificación molecular de los mismos y la validación del diagnóstico clínico y serológico, así como la comparación con datos epidemiológicos oficiales del estado.

Además, dada la tendencia epidemiológica, se espera obtener una mayor proporción de aislados de DENV, en comparación con los ZIKV, y a su vez, una mayor proporción del serotipo DENV-1.

7. Material y Métodos

7.1 Líneas celulares

Se utilizó la línea celular C6/36, células provenientes del intestino medio del mosquito *Aedes albopictus*, mantenidas con medio MEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) y 10% de SFB (suero fetal bovino) a 34 °C. Y la línea celular Vero, células epiteliales provenientes del epitelio de riñón de mono verde, mantenidas con medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) y 3% de SFB a 37°C con 5% de CO₂.

7.2 Amplificación de virus

Se realizaron pases ciegos de las muestras de suero sanguíneo, provenientes de pacientes presuntamente positivos a infección por flavivirus, inoculando las monocapas de células C6/36 y de células Vero con diluciones 1:40 de los sueros, las inoculaciones se mantuvieron alrededor de 10 días o hasta observar efecto citopático para obtener suficientes partículas virales para su caracterización. Una vez observado el efecto citopático se recolectó el sobrenadante del cultivo celular, se fraccionó en distintos volúmenes en microtubos y se almacenaron a -70°C para su posterior uso.

7.3 Extracción y cuantificación de RNA

La extracción del RNA se hizo mediante el método de fenol cloroformo, de acuerdo con el siguiente protocolo:

7.3.1 Lisis y homogenización

En un microtubo de 1.5 mL, agregar 500 µL de la preparación cosechada y 500 µL de RiboZol™, se agitó en vórtex e incubo a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos, manteniendo el microtubo en posición vertical.

7.3.2 Separación de fase

Se adicionaron 150 µL de cloroformo 99.8%, cerrando perfectamente el microtubo y se agitó en vórtex hasta notar una coloración rosada de apariencia lechosa de manera

homogénea, la mezcla se incubó de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente, manteniendo el microtubo en posición vertical. Los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C. La mezcla se separa en una fase inferior roja, fase orgánica, en una interfase, que puede contener DNA celular, y en una fase incolora superior, fase acuosa, la cual contiene RNA.

7.3.3 Precipitación del RNA

Se transfirió cuidadosamente la fase acuosa a un microtubo de 1.5 mL nuevo, tratando de no llevarse ninguna porción de la interfase o de la fase orgánica, posteriormente se adicionaron 250 µL de isopropanol 99.5% para precipitar el RNA, la mezcla se incubó de 3 a 5 minutos a temperatura ambiente, manteniendo el microtubo en posición vertical. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C, dejando las bisagras de los microtubos hacía un mismo sentido para conocer la ubicación de la pastilla.

7.3.4 Fase de lavado

Se realizó un primer lavado, removiendo primero el sobrenadante, tratando de no tocar las paredes del tubo, se agregaron 200 µL de etanol al 70% para lavar la pastilla, evitando agitar la solución para mantener la integridad del RNA. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se realizó un segundo lavado repitiendo el proceso y centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante tratando de no tocar la pastilla y el RNA se secó a temperatura ambiente durante 20-30 minutos. Finalmente, el RNA se resuspendió en 10 µL de agua inyectable.

7.3.5 Cuantificación

La cuantificación se realizó por espectrofotometría en el equipo IMPLN NanoPhotometer® NP80, utilizando 2 µL de agua inyectable como blanco, y 2 µL de volumen para cada muestra.

7.4 Síntesis de cDNA

La síntesis del cDNA de las muestras de RNA extraídas se realizó bajo el siguiente protocolo: En un microtubo se agregaron 6.1 μL de agua, 0.6 μL de oligonucleótidos degenerados 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1 μL de dNTPs 10 mM y 8 μL de RNA, manteniéndolos en hielo. Agitar en el vórtex y llevar a la microcentrifuga unos segundos. La reacción se incubó a 65 °C durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 4 μL de buffer RT 5X y 0.3 μL de retrotranscriptasa de leucemia murina de Maloney 200U/ μL . Para la síntesis se incubaron las muestras en las siguientes condiciones: 25°C 10 minutos, 42°C 60 minutos y 70°C 10 minutos. Las muestras se almacenan a -20°C hasta su utilización en la tipificación por PCR.

7.5 Tipificación

7.5.1 PCR

Para la identificación de los potenciales virus presentes en las muestras se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada serotipo en el caso de DENV (Tabla 1). reportados por Lanciotti (Lanciotti R., et al., 1992). y los oligonucleotidos denominados ZIKV-ENV y CHKV-LCB diseñados por la Dra. Leticia cedillo Barrón (Cinvestav, IPN, México). Brevemente: en cada reacción de 10 μL se adicionó a cada microtubo: 1 μL de buffer para Taq polimerasa 10 X, 0.5 μL de MgCl_2 , 25 mM 0.2 μL de dNTPs 10 mM, 0.3 μL del respectivo oligonucleótido sentido y antisentido en una concentración de 10 mM cada uno, el volumen del cDNA requerido para 1 μg y el volumen se completó con agua inyectable. Para finalizar se añadieron 0.2 μL de la enzima Taq polimerasa 5U/ μL . Se agitó la reacción en el vórtex y se centrifugó unos segundos. Se llevó la reacción al termociclador a las condiciones (Tabla 2) requeridas.

Tabla 1.- Oligonucleótidos utilizados para la tipificación de los aislados.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición en el genoma
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGAGAAACCG-3'	134-161
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	616-644
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGG-3'	568-586
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	232-252
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	506-527
ZIKVENVF	5'-GCTGGDGCRGACACHGGRAC-3'	1538-1558
ZIKVENVR	5'-RTCYACYGCCATYTGGRCTG-3'	1883-1902
CHKV-LCB-F	5'-TGCTCTAGAATGCCAGCAGAC-3'	-
CHKV-LCB-R	5'-GGGGTACCGCAGCATATTAG-3'	-

D1 y D2 son el par de oligonucleótidos utilizados para determinar el serocomplejo (SCX) de dengue, TS1-TS4 (tipo específico) son oligonucleótidos utilizados para diferenciar los serotipos de dengue. Para la reacción de serotipos se utiliza D1 como oligonucleótido sentido y TS1-TS4 como oligonucleótido antisentido (Lanciotti R., et al., 1992).

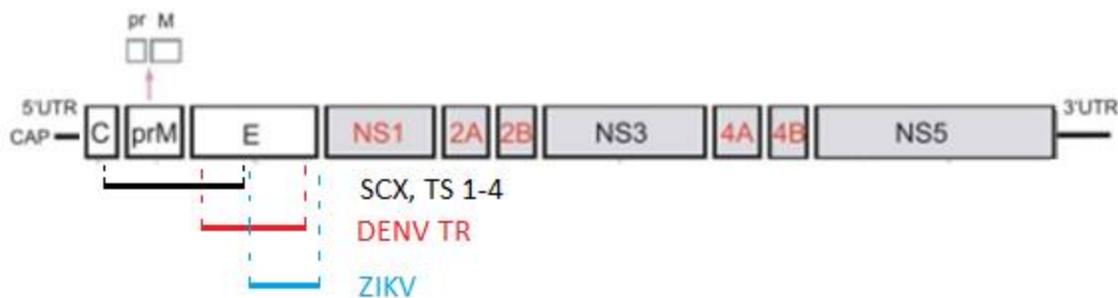


Figura 10.- Esquemización de los oligonucleótidos utilizados en la tipificación. (Modificado de Virus Pathogen Resource Database, 2018).

Para determinar DENV SCX y TS 1-4 amplifican entre el gen que codifica para la proteína C y el gen que codifica para la proteína de envoltura (GenBank, 2018), los oligonucleótidos utilizados para determinar DENV denominados TR amplifican el gen que codifica para la proteína de envoltura. Mientras que los oligonucleótidos para determinar ZIKV amplifican el gen que codifica para la proteína de envoltura (GenBank, 2018).

Tabla 2.- Condiciones para PCR de acuerdo con los oligonucleótidos utilizados.

Dengue SCX/TS			Dengue Tiempo Real		
Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	2 min	1	95°C	2 min
35	94°C	30 sec	35	95°C	30 sec
	52.5 °C	30 sec		60°C	30 sec
	68°C	1,30 min		72°C	30 sec
1	68°C	7 min	1	72°C	7min
	4	∞		4	∞
Zika			Chikungunya		
Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	2 min	1	94°C	5 min
35	95°C	20 sec	35	94°C	30 sec
	58°C	20 sec		52°C	30 sec
	68°C	30 sec		72°C	30 sec
1	68°C	7 min	1	72°C	7 min
	4	∞		4	∞

7.5.2 *Electroforesis*

La electroforesis de los amplicones obtenidos se realizó en un gel de agarosa al 1.5% preparada con TAE 1X y se aplicó una corriente de 50 V durante 1 hora, durante todas las amplificaciones se utilizaron virus referencia como controles positivos (Tabla 3). Los amplicones (Figura 10) fueron evidenciados con 1 µL bromuro de etidio (Tabla 4) y fotodocumentados por transiluminación UV en un equipo Gel Doc™ EZ Documentation System de Bio-Rad.

Tabla 3.- Códigos de acceso en GenBank de los virus utilizados como controles positivos.

Virus referencia utilizado	Código de acceso a GenBank
DENV-1 Western Pacific	AY145121.1
DENV-2 Nueva Guinea	KM204118.1
DENV-4 Dominica	AY648301
ZIKV Puerto Rico	KX377337.1

Tabla 4.- Tamaño esperado de las bandas, en pares de bases, de los amplicones obtenidos en la PCR.

Par de oligonucleótidos	Tamaño de amplicones (pares de bases)
D1, D2	511
D1, TS1	482
D1, TS2	119
D1, TS3	290
D1, TS4	392
ZIKV-ENV-F, ZIKV-ENV-R	364
CHKV-LCB-F, CHKV-LCB-R	1000
D-TR-F, D-TR-R	200

7.6 Criterios de inclusión de resultados

Las bandas obtenidas durante la electroforesis fueron consideradas como positivos siempre y cuando se observará la banda completa (Figura 11), en algunos casos se observó la banda de amplificación, sin embargo, no se aprecia la totalidad de la banda y posee poca intensidad, por lo que no es un resultado positivo contundente. Estos resultados junto a amplicones barridos fueron considerados como no claros.

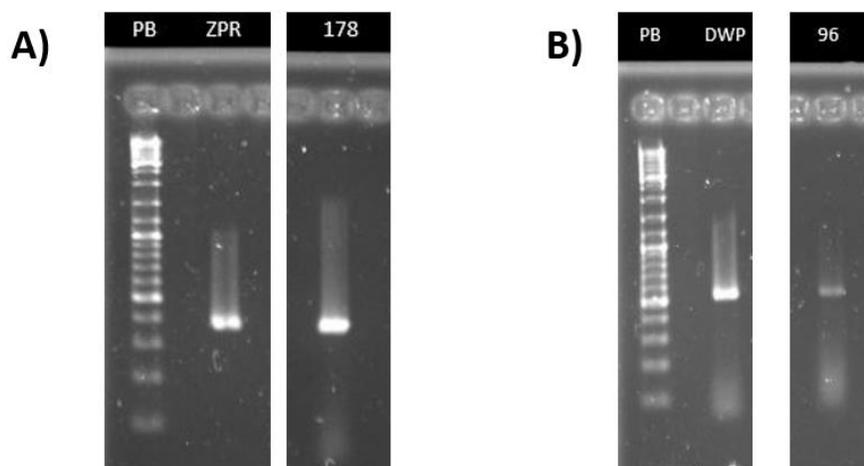


Figura 11.- Datos representativos de las electroforesis corridas. PB indica al marcador de pares de bases, **A)** corresponde a un gel de muestras utilizadas en una PCR con oligonucleótidos para Zika, se observa a Zika Puerto Rico (ZPR) utilizado como control y la muestra 178. **B)** se tiene un gel con muestras utilizadas en una PCR con oligonucleótidos para dengue scx, donde se utilizó como control a dengue western pacific. (DWP) y la muestra 96.

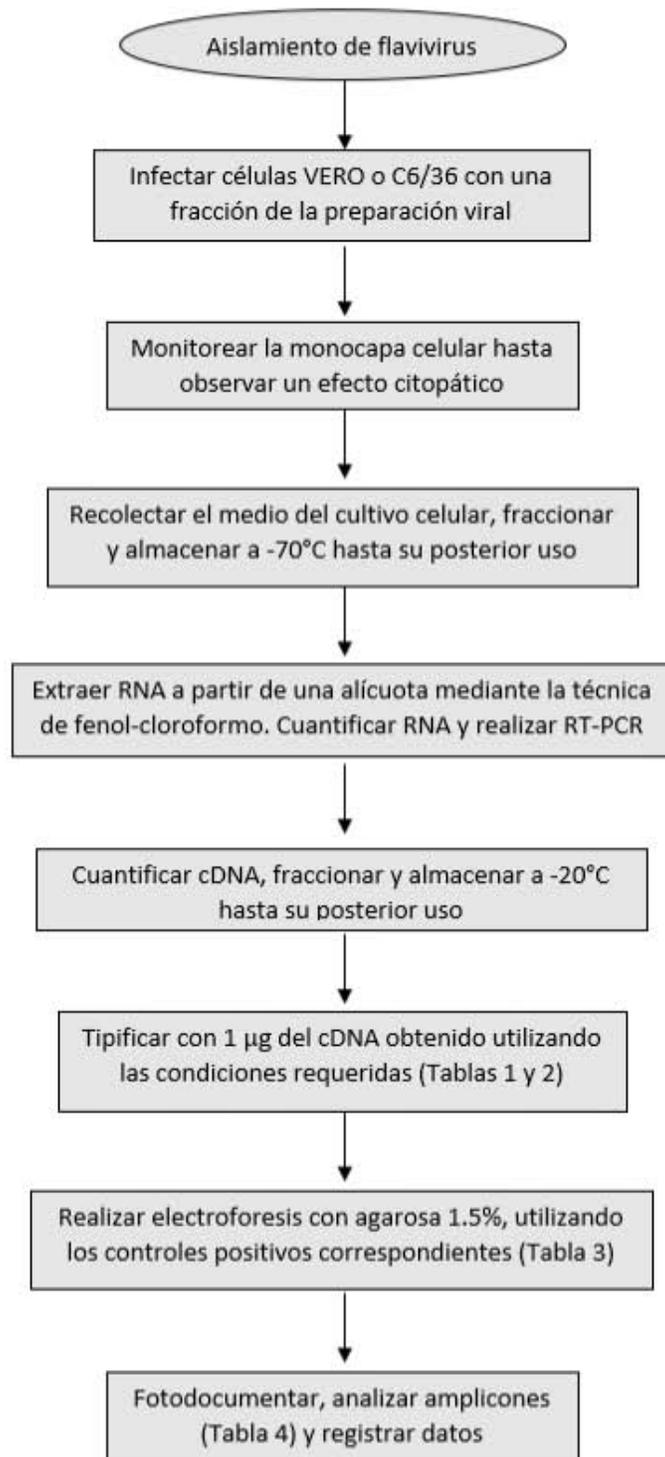


Figura 12.- Diagrama de la metodología experimental

8 Resultados

Tabla 5.- Características clínicas y demográficas de las muestras utilizadas

Muestra	Sexo del paciente	Edad del paciente	Días de fiebre	Observaciones
002	Masculino	23 años	2	-
003	Femenino	3 meses	7	-
004	Femenino	12 años	4	NS1 negativo, urgencia pediátrica
006	Masculino	7 años	3	NS1 negativo
16	Femenino	63 años	5	Urgencia
17	Femenino	36 años	5	-
18	Masculino	7 años	5	Probable Zika
47	Masculino	8 años	4	Urgencia pediátrica
67	Masculino	24 años	2	-
76	Femenino	23 años	4	-
84	Masculino	44 años	Afebril	-
89	Masculino	40 años	5	-
90	Masculino	30 años	3	-
96	Femenino	14 años	2	-
100	Femenino	39 años	4	-
103	Femenino	6 años	7	Urgencia pediátrica
105	Masculino	34 años	2	-
106	Masculino	24 años	2	-
108	Femenino	10 años	Afebril	-
109	Femenino	14 años	3	-
111	Masculino	18 años	2	-
113	Masculino	10 años	3	Urgencia pediátrica
114	Femenino	22 años	3	12 semanas de gestación
115	Femenino	57 años	6	-
116	Femenino	22 años	4	-
123	Femenino	21 años	2	-
125	Femenino	24 años	5	-
131	Femenino	23 años	4	-
132	Femenino	34 años	3	-
133	Femenino	15 años	4	-
134	Femenino	16 años	8	Urgencia
140	Masculino	40 años	3	-
141	Masculino	22 años	1	-
149	Femenino	17 años	5	38 semanas de gestación
153	Femenino	26 años	5	-
156	Femenino	31 años	4	-
164	Masculino	36 años	2	-
173	Femenino	42 años	2	-
178	Masculino	8 años	4	-
189	Femenino	27 años	2	-

De las 40 muestras analizadas 16 fueron provenientes de adultos masculinos, 24 muestras provenían de adultos femeninos y 6 muestras pertenecieron a pacientes de

servicio pediátrico. A su vez, de estas muestras analizadas, 2 pertenecían a adultos en urgencias, 4 a pacientes pediátricos en urgencias, 2 a mujeres embarazadas y 2 a pacientes que no presentaron fiebre. Las muestras restantes no presentaron alguna característica en especial (Tabla 5).

Tabla 6.- Resultados obtenidos de la tipificación molecular por RT-PCR para determinar virus Zika (ZIKV), dengue por serocomplejo (DENVSCX), dengue por tiempo real (TR).

Muestra	ZIKV	DENVSCX	DENVTR
002	-	No claro	
003	No claro	-	
004	-	+ (T)	
006	-	No claro	
16	-	-	
17	-	-	
18	+ (T)	-	
47	No claro	-	
67	-	No claro	
76	No claro	-	
84	+	+ (T)	
89	+ (T)	-	-
90	-	+ (T)	
96	+	+ (T)	-
100	+ (T)	-	
103	No claro	No claro	+
105	-	-	-
106	-	-	
108	No claro		-
109	+ (T)		-
111	No claro		-
113	No claro		-
114	-	-	+
115	-	-	+
116	+ (T)	-	+
123	-	-	+
125	+ (T)	-	+ (T)
131	+ (T)	-	+ (T)
132	No claro		-
133	-	-	+
134	+	No claro	-
140	+ (T)	-	-
141	+ (T)	-	+ (T)
149	No claro	-	+
153	-	-	-
156	+ (T)	-	+ (T)
164	+ (T)		-
173	+ (T)	No claro	+
178	+	No claro	
189	+ (T)	No claro	-

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de la tipificación molecular, donde se observa que algunas muestras obtuvieron una amplificación cruzada durante la RT-PCR, mientras que otros resultados fueron no claros, es decir que se observaba un amplicon, sin embargo, este no poseía la intensidad necesaria para considerarse como resultado positivo o la banda no se mostraba definida. Por otro lado, los resultados marcados con (T), se refieren a los amplicones obtenidos que se observaban definidos, pero con baja intensidad.

Tabla 7.- Comparación de la tipificación molecular de las muestras analizadas con los resultados serológicos.

Muestra	Dengue IgM	Dengue IgG	Tipificación molecular
002	Negativo	Negativo	No claro
003	Negativo	Positivo	No claro
004	Positivo	Positivo	DENV
006	Positivo	Positivo	No claro
16	Positivo	Positivo	-
17	Positivo	Positivo	-
18	Positivo	Negativo	ZIKV
47	Zona gris	Negativo	No claro
67	Negativo	Positivo	No claro
76	Negativo	Positivo	DENV
84	Negativo	Positivo	ZIKV
89	Positivo	Positivo	ZIKV
90	Positivo	Positivo	DENV
96	Negativo	Negativo	No claro
100	Negativo	Positivo	DENV
103	Positivo	Negativo	No claro
105	Zona gris	Positivo	-
106	Negativo	Negativo	Probable CHKV
108	Negativo	Positivo	No claro
109	Zona gris	Negativo	ZIKV
111	Positivo	Positivo	No claro
113	Negativo	Positivo	No claro
114	Zona gris	Positivo	DENV
115	Zona gris	Positivo	DENV
116	Positivo	Positivo	No claro
123	Negativo	Negativo	No claro
125	Positivo	Positivo	No claro
131	Positivo	Positivo	No claro
132	Positivo	Positivo	No claro
133	Positivo	Negativo	DENV
134	Positivo	Positivo	No claro
140	Positivo	Positivo	ZIKV
141	Positivo	Positivo	No claro
149	Zona gris	Positivo	No claro
153	Negativo	Positivo	-
156	Zona gris	Positivo	No claro

164	Zona gris	Positivo	ZIKV
173	Positivo	Positivo	ZIKV
178	No reportado	No reportado	ZIKV
189	No reportado	No reportado	ZIKV

En la tabla 7 se tiene la comparación de los resultados obtenidos en la tipificación molecular contra los resultados reportados del diagnóstico clínico por serología. Donde se observan resultados positivos para serología y negativos en la tipificación molecular y viceversa, sin embargo, dada la problemática experimental, muchos resultados de la tipificación molecular fueron reportados como no claros, sin embargo, son considerados resultados positivos a infección con arbovirus.

Tabla 8.- Datos condensados de los aislados obtenidos y tipificados

Muestras analizadas	40
Aislados obtenidos	36
Aislados tipificados	17
Aislados tipificados como ZIKV	9
Aislados tipificados como DENV	7
Aislados tipificados como CHKV	1

Se obtuvieron 36 aislados de los cuales sólo 17 se pudieron tipificar, 19 dieron reacción cruzada con los oligonucleótidos para DENV y ZIKV y en 4 restantes no dio amplificación para ningún par de oligonucleótidos (Tabla 8).

9 Análisis y discusión de resultados

Las enfermedades generadas por infecciones por DENV y ZIKV son un problema de salud pública en todo el mundo, en la actualidad se han reportado casos en más de 100 países distribuidos entre África, América, Asia y el pacífico (Khromykh A.A., et al., 2000; Organización Mundial de la Salud, 2017). En México, los registros de la infección por DENV datan de 1941 (Narro-Robles J., et al., 1995) y la introducción del ZIKV al país data del 2015 (Secretaría de Salud, 2015), su persistencia radica principalmente en la prevalencia del vector, *A. aegypti*, en zonas costeras y su adaptación a las zonas urbanas, por lo que la transmisión de estos virus se ha visto aumentada en los últimos años. Aunado a esto, se sabe que *A. aegypti*, junto con *A.*

albopictus, no solo transmiten DENV y ZIKV, sino que también pueden transmitir CHKV, virus de la fiebre amarilla (YFV), virus del nilo occidental (WNV) entre otros arbovirus (Domingo E., et al., 2012), por lo que la co-circulación es común. El hecho de que distintos virus compitan por un mismo nicho ecológico los somete a una presión evolutiva, favoreciendo así la generación de cuasiespecies, está característica en la que las subpoblaciones virales desarrollen una mayor adaptabilidad biológica es conocida como *fitness*. Las características de estas variantes evolutivas pueden generar ventajas epidemiológicas de distintas maneras, sin embargo, los brotes epidemiológicos no solo dependen del virus, si no de la genética del hospedero, tanto del artrópodo (vector), como del humano. Se sabe que dentro de la población mexicana existe una gran variabilidad genética (Moreno-Estrada, et al., 2014), por lo que esto podría ser un factor determinante para la preservación de diferentes serotipos y variantes genéticas específicas en la población mexicana.

Durante el año 2016, la secretaria de salud reportó en el estado de Yucatán 267 casos confirmados de DSSA, 123 casos confirmados de DG y DCSA, 820 casos confirmados de infección por el virus Zika y 11 casos confirmados de infección con Chikungunya (Secretaria de Salud, 2016), habiendo una mayor transmisión de ZIKV que de DENV durante este año. De los aislados obtenidos (Tabla 8), se obtuvieron 9 tipificados como ZIKV, 7 tipificados como DENV y se encontró con un posible CHKV. De las muestras restantes 19 amplificaron tanto para los oligonucleótidos específicos para DENV como los oligonucleótidos específicos para ZIKV y 4 de las muestras no amplificaron para ningún par de oligonucleótidos o si lo hacía no se obtuvieron datos concisos, es decir que si amplificaban la banda era muy tenue y no se veía completa.

Pese a que en algunos casos no le logro tipificar al virus con certeza (Tabla 7) y en el caso de los virus tipificados como DENV, donde no se logró la tipificación de su serotipo (Tabla anexa 1), el hecho de que hayan dado amplificación es considerado

como caso positivo en los laboratorios de vigilancia epidemiológica (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”, 2017).

La norma oficial mexicana NOM-032-SSA2-2014 “Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector”, estipula que el diagnóstico para la enfermedad del dengue debe realizarse en personas que presenten manifestaciones clínicas de la enfermedad, personas que tengan antecedentes de residencia o residan en zonas endémicas donde se transmita la enfermedad, o donde habite el vector. Dicho diagnóstico debe realizarse mediante la identificación de NS1 si la muestra del paciente se encuentra dentro de los primeros 5 días de iniciada la fiebre, determinación de IgG para muestras entre 0-3 días de iniciados los síntomas e IgM para muestras que se encuentren entre 4-5 días de iniciada la fiebre. También estipula que deben aislarse el 10% de las muestras positivas a NS1 para identificar los serotipos circulantes (Diario oficial de la federación, 2015). Sin embargo, no existen normas que hagan una recomendación sobre qué hacer con los casos de ZIKV.

La problemática al realizar la prueba ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) en estos casos, es que existe una alta homología de la proteína de envoltura flaviviral, a la cual los anticuerpos para diagnóstico están dirigidos, por lo que puede darse una reacción cruzada, además de que, dada la naturaleza de la enfermedad (Figura 6), los anticuerpos empiezan a generarse a partir de la etapa crítica, IgM e IgG durante la etapa de convalecencia. Para fines de diagnóstico no existe gran problema, ya que están confirmando la existencia de flavivirus, sin embargo, para la tipificación puede ocasionar un falso positivo o falso negativo, ya que a partir de la fase crítica deja de haber virus en circulación sanguínea, por lo que se dificulta su detección por RT-PCR, pese a que el resultado por serología sea positivo.

El seguimiento de la historia natural de la enfermedad (Figura 6) es un punto crítico para el aislamiento del virus, ya que es importante realizar la extracción sanguínea mientras el paciente todavía se encuentre en estado de viremia, es decir,

dentro de los primeros 6 días del inicio de la fiebre. Es posible que esta sea la razón por la que las muestras analizadas no hayan amplificado en ninguna condición. Otra de las posibles razones de la falta de amplificación es que, dados los datos serológicos proporcionados, los pacientes hayan estado infectados por algún flavivirus, no necesariamente DENV o ZIKV. Aunado a esto, hay que considerar que los oligonucleótidos utilizados para determinar DENV y sus serotipos fueron desarrollados principalmente a partir de secuencias de virus extranjeros en 1992 (Weaver S.C., et al. 2016) por lo que es posible que los aislados mexicanos presenten variaciones en la secuencia del genoma que disminuyan la complementariedad de los oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Una observación interesante fue la detección de evidencia de adaptación viral encontradas durante la experimentación, fue el caso de una muestra que inicialmente fue amplificada durante 11 pases en células C6/36 y que posteriormente se amplifico en células Vero. Se puede inferir (Figura 12) que el cambio de hospedero afecta las características del virus, ya que muestra indicios de adaptación inicialmente en células provenientes de mosquito.

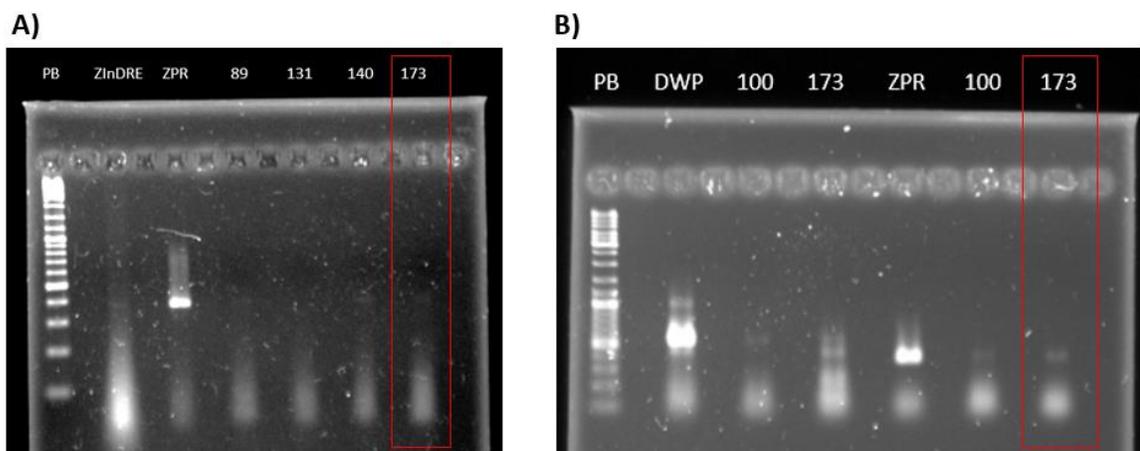


Figura 13. Diferencia de la intensidad de banda en una muestra amplificada en dos líneas celulares. En A se tienen muestras que fueron corridas bajo las condiciones de los oligonucleótidos para ZIKV, ZInDRE y ZPR fueron utilizados como control, la muestra 173 utilizada fue amplificada en células Vero y se cargó $1\mu\text{g}$ de muestra. En B, se tienen muestras corridas bajo las condiciones de los oligonucleótidos scx para DENV (a la izquierda) y muestras corridas bajo las condiciones de los oligonucleótidos para ZIKV (a la derecha), la muestra 173 utilizada fue amplificada en células C6/36 y se cargó $1\mu\text{g}$ de muestra.

10 Conclusiones

Se logró el aislamiento de 36 virus, de las 40 muestras analizadas, y la tipificación de 17 de estos, con una mayor proporción de ZIKV obtenidos, contrastando con los datos epidemiológicos oficiales. No se logró la tipificación de los serotipos en aquellos aislados identificados como DENV. Por otro lado, el uso de técnicas serológicas para el diagnóstico, en este caso, es útil solo para reconocer infección con flavivirus, ya que a pesar de que los datos clínicos indican que la serología se realizó con anticuerpos anti-DENV, se logró tipificar ZIKV, por lo que el diagnóstico pese a ser útil, no es específico.

El tener un banco de virus aislados tipificados permitirá a los grupos de investigación especializados realizar estudios a partir de virus endémicos y no solamente de virus referencia, lo cual es importante debido a que México es un país que posee gran variabilidad genética y se encuentran en co-circulación los cuatro serotipos de DENV junto con ZIKV y otros arbovirus. Se espera que se termine el banco de aislados con todas las muestras pertenecientes al estado de Yucatán y que este se expanda con muestras de otros estados. Además de que los datos de dicho banco puedan refinarse mediante el uso de oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias de aislados mexicanos reportadas por nuestro y otros grupos de investigación o mediante el uso de otros métodos como la secuenciación.

11 Perspectivas

Secuenciar los virus representativos pertenecientes al banco de flavivirus mexicano para que a partir de ellos se puedan generar oligonucleótidos más específicos y se puedan tipificar con mayor precisión virus provenientes de otras regiones del país.

Evaluar y caracterizar las diferencias tanto genotípicas como fenotípicas entre los aislados pertenecientes a una misma región y posteriormente entre aislados de distintas regiones del país.

12 Referencias

- Alcaraz-Estrada S., (2013). Dengue en México. Revista de especialidades médico-quirúrgicas [en línea] 18, Octubre-Diciembre. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47329250001>
- Andino R., Domingo E., (2015) Viral quasispecies. *Virology* 479-480, 46-51
- Baltimore D., (1971). Expression of Animal Virus Genomes. *Bacteriological Reviews*, Sept. 35(3), p 235-241
- Baron S. (1996). *Medical Microbiology* (4th edition). Univ of Texas Medical Branch.
- Barrows, N. J., Campos R. K., Liao K., C., et al. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem. Rev.*, 118 (8). P 4448-4482
- Beltrán-Silva S. L., Chacón-Hernández S.S., Moreno-Palacios E., Pereyra-Molina J.Á., (2016). Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Revista médica del hospital general de México*.
- Brook G., Carroll K., Butel J., et al. (2010). *Jawetz, Melnick y Adelberg: Microbiología Médica* (25ª edición). México: Mc Graw Hill
- Cann J. A., (2016). *Principles of Molecular Virology* (Sixth Edition). United Kingdom: Elsevier. P 28-49
- Center for Disease Control and Prevention. (2013). Dengue: Clinical description for case definitions. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/casedef.html>
- Center for Disease Control and prevention. (2017). Dengue: Guía de Laboratorio y pruebas de diagnóstico. Disponible en <https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/laboratory.html>
- Center for Disease Control and prevention. (2017). Pruebas de diagnóstico para el virus de Zika. Disponible en <https://espanol.cdc.gov/enes/zika/hc-providers/types-of-tests.html>
- Darwish, N.T., Alias, Y.B., Khor, S.M., (2015). An introduction to dengue-disease diagnostics. *Trends in Analytical Chemistry*, 67. P 45-55.
- Diario oficial de la federación (2015). NOM-032-SSA2-2014 Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. Disponible en https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5389045&fecha=16/04/2015
- Domingo E., Sheldon J., Perales C., (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiology and molecular biology reviews*, 76(2). P 159-216.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, et al. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*;360:2536- 2543.

GenBank. (2018). polyprotein precursor [Dengue virus 1]. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAN06981.1?report=graph>

GenBank. (2018). Zika virus strain PRVABC-59, complete genome. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX377337.1?report=graph>

Gong Z., Gao Y., Han G-H. (2016). Spotlight Zika Virus: Two or Three lineages?. *Trends in microbiology*, 24 (7). P 521-522.

Guha-Sapir, D., and B. Schimmer. (2005). Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg. Themes Epidemiol.* 2:1.

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. (2017). Lineamientos para la vigilancia por laboratorio del dengue y otras arboviriosis. Disponible en:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/269560/Actualizados_Lineamientos_Dengue_y_otros_Arb_V2.pdf

Jacques-Counotte M., Rhan-Kim C., Wang J., et al (2018), Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. *PLOS Medicine*. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6057622/pdf/pmed.1002611.pdf>

Jin, Z., Deval, J., Johnson, K. A., & Swinney, D. C. (2011). Characterization of the elongation complex of dengue virus RNA polymerase: Assembly, kinetics of nucleotide incorporation, and fidelity. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.162685>

Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG. (2000). Cis- and Trans-Acting Elements in Flavivirus RNA Replication. *J Virol*; 74:3253–63.

Klema Valerie J., Padmanabhan R., Choi Kyung H., (2015). Flaviviral replication complex; coordination between RNA synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses*, 7. P 4640-4656.

Kuno G., Chang, G. J., Tsuchiya K. R., Karabatsos N., Cropp B., (1998). Phylogeny of the Genus Flavivirus. *Journal of Virology*, Jan. p73-83

Lanciotti R., Calisher C., Gubler D., et. Al. (1992). Rapid detection and typing dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 30(3), 545-551.

Lessler J, Ott C, Carcelen A, Konikoff J, et al (2016). Times to key events in Zika virus infection and their implications for blood donation: a systematic review and pooled analysis. *Bull World Health Organ.* 94: 841.849

Leta S., Jibat Beyene T., De Clercq E., et. al. (2018). Global risks mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *International Journal of Infectious Diseases*, 67. P 25-35.

Manokaran G., et al., (2015). Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science* 350, 217-221

Moreno-Estrada, et. Al. (2014). The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affect biomedical traits. *Science*, 344 (6189), 1280-1285.

Mukhopadhyay S., Kuhn R. J., Rossmann M.G., (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1). P 13-22.

Narro-Robles J., Gómez-Dantés H. (1995). El dengue en México: un problema prioritario de salud pública. *Salud Publica de México*, 37. S12-S20.

Organización Mundial de la Salud. (2016). Enfermedad por el virus de Zika. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/es/>

Organización Mundial de la Salud. (2017). Control de dengue: epidemiología. Disponible en: <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>

Organización Mundial de la Salud. (2017). Dengue y dengue grave. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>

Organización Mundial de la Salud. (2017). Informe sobre la situación: virus Zika, microcefalia, síndrome de Guillian-Barré. Disponible en: <https://goo.gl/LkUCsW>

Romero-Cabello C. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias* (3ra edición). México: Editorial Panamericana. p 463-465

Secretaria de Salud, (2015). Boletín epidemiológico No. 52. Disponible en <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/50233/sem52.pdf>

Secretaria de Salud, (2016). Boletín epidemiológico No. 52. Disponible en <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/179535/sem52.pdf>

Secretaria de Salud, (2018), Panorama Epidemiológico de Dengue, 2018. Disponible en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/389410/Pano_dengue_sem_36_2018.pdf

Secretaria de Salud, (2018). Casos confirmados de enfermedad por el virus del Zika. Disponible en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/390783/Cuadro_Casos_ZIKA_y_Emb_S E36_2018.pdf

Secretaria de Salud. (2016) Información general del virus Zika. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/infeccion-por-virus-zika-21776>

Secretaria de Salud. (2016). Clasificación, diagnóstico y tratamiento integral del dengue. Disponible en <https://goo.gl/yL9giR>

- Taylor M. W., (2014). *Viruses and Man: A History of Interactions*. Springer International.
- Uniprot. (2018). Genome polyprotein Dengue virus type 1. Disponible en <https://www.uniprot.org/uniprot/P17763>
- Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E., & Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature*, 439(7074), 344–348. <https://doi.org/10.1038/nature04388>
- Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, et al (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res* ;130:69-80.
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, et al. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe*; 5:365–75.
- Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, et al. (1997). Ultrastructure of Kunjin Virus-Infected Cells: Colocalization of Ns1 and Ns3 with Double-Stranded Rna, and of Ns2b with Ns3, in Virus-Induced Membrane Structures. *J Virol.*; 71:6650–6661.

13. Anexos

Geles de muestras analizadas con oligonucleótidos para DENV

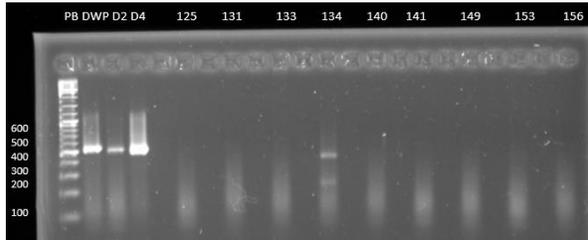


Figura i.- Electroforesis de las muestras 125, 131, 133, 134, 140, 141, 149, 153 y 156 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por serocomplejo (SCX), usando DENV-1 Western Pacific, DENV-2 (D2), y DENV-4 (D4) como controles.

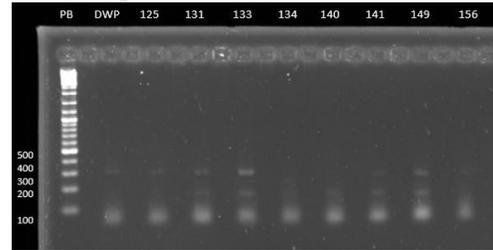


Figura ii.- Electroforesis de las muestras 125, 131, 133, 134, 140, 141, 149, 153 y 156 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por tiempo real (TR), usando DENV-1 Western Pacific (DWP), como control.

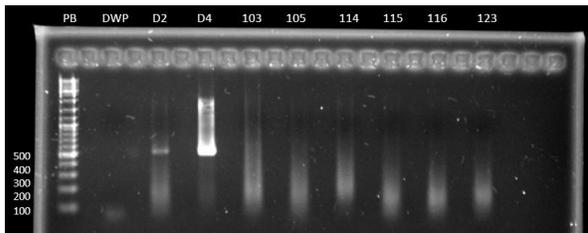


Figura iii Electroforesis de las muestras 103, 105, 114, 115, 116 y 123 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por serocomplejo usando DENV1-Western Pacific (DWP) y DENV-2 (D2) como controles.

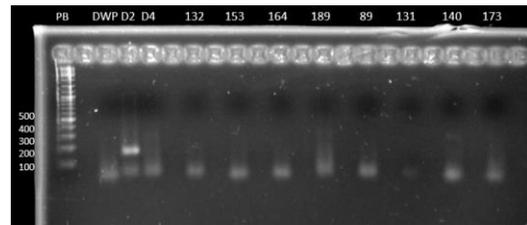


Figura iv Electroforesis de las muestras 132, 153, 164, 189, 89, 131, 140 y 173 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por tiempo real usando DENV1-Western Pacific (DWP) y DENV-2 (D2) y DENV-4 (D4) como controles

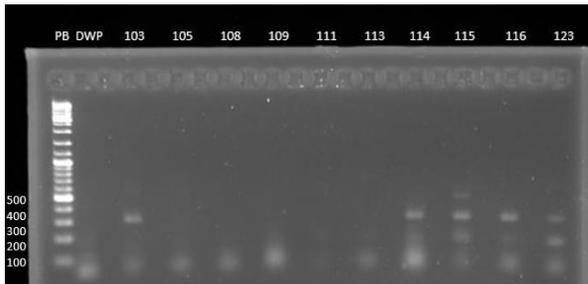


Figura v Electroforesis de las muestras 103, 105, 108, 109, 111, 113, 114, 115, 116 y 123 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por tiempo real (TR), usando DENV-1 Western Pacific (DWP), como control.

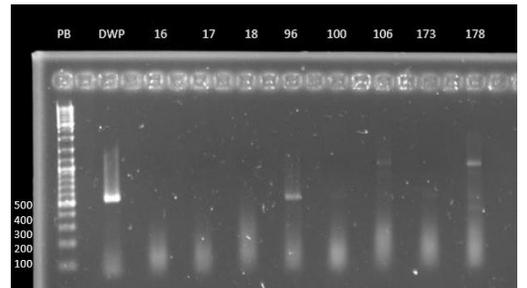


Figura vi Electroforesis de las muestras 16, 17, 18, 96, 100, 106, 173 y 178 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por serocomplejo, usando DENV-1 Western Pacific (DWP), como control.

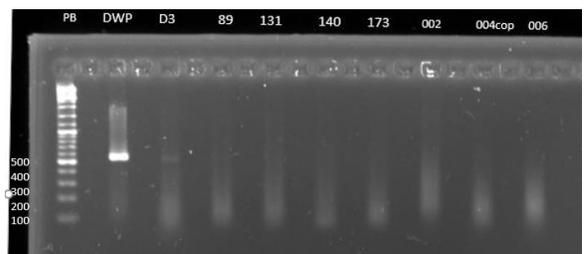


Figura vii Electroforesis de las muestras 89, 131, 140, 173, 002, 004 y 006 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por serocomplejo, usando DENV-1 Western Pacific (DWP), como control.

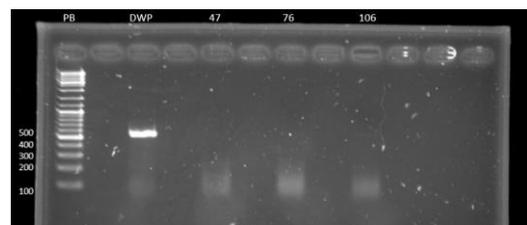


Figura viii Electroforesis de las muestras 47, 76 y 106 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por serocomplejo usando DENV1-Western Pacific (DWP) como control.

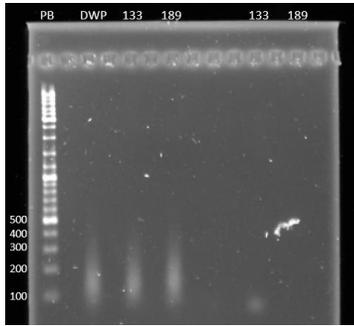


Figura ix Electroforesis de las muestras 133 y 189 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por serocomplejo (a la izquierda), CHKV (a la derecha) usando DENV1-Western Pacific (DWP) como control.

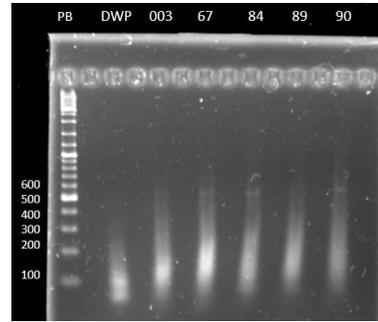


Figura x Electroforesis de las muestras 003, 67, 84 89 y 90 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por serocomplejo, usando DENV-1 Western Pacific (DWP) como control.

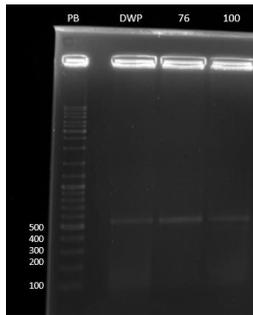


Figura xi Electroforesis de las muestras 76 y 100 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por serocomplejo, usando DENV-1 Western Pacific (DWP) como control.

Gels de muestras analizadas con oligonucleótidos para ZIKV

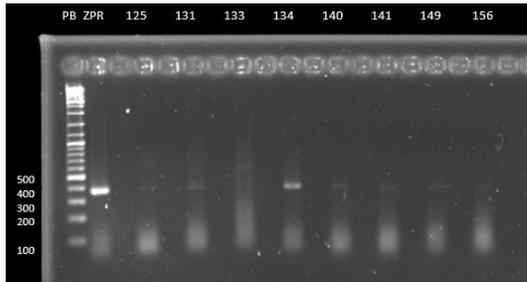


Figura xii.- Electroforesis de las muestras 125, 131, 133, 134, 140, 141, 149 y 156 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar ZIKV, usando Zika Puerto Rico (ZPR) como control.

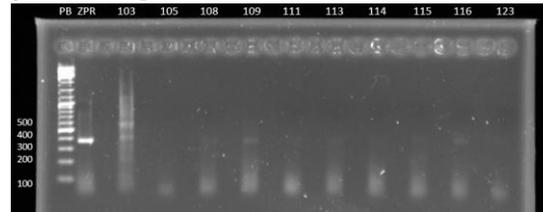


Figura xiii Electroforesis de las muestras 103, 105, 108, 109, 111, 113, 114, 115, 116 y 123 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar ZIKV, usando Zika Puerto Rico (ZPR) como control.

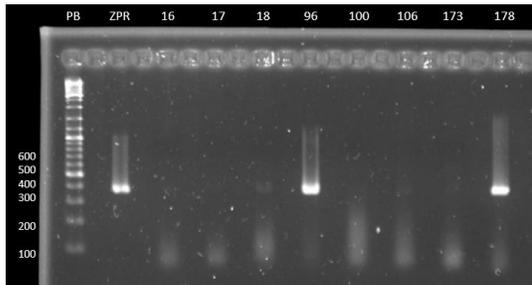


Figura xiv Electroforesis de las muestras 16, 17, 18, 96, 100, 106, 173 y 178 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar ZIKV, usando Zika Puerto Rico (ZPR) como control.

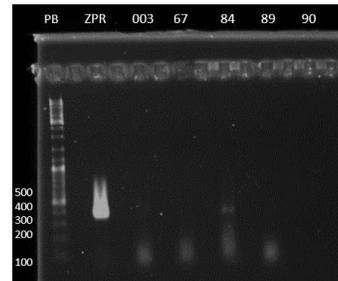


Figura xv Electroforesis de las muestras 003, 67, 84 89 y 90 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar ZIKV, usando Zika Puerto Rico (ZPR) como control.

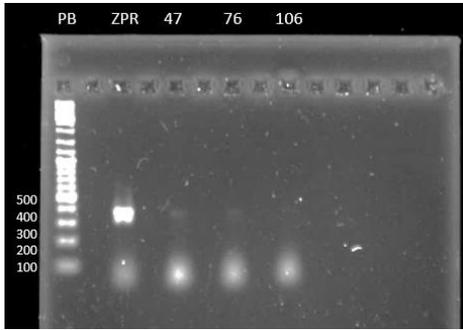


Figura xvi Electroforesis de las muestras 47, 76 y 106 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar ZIKV usando Zika Puerto Rico (ZPR) como control.

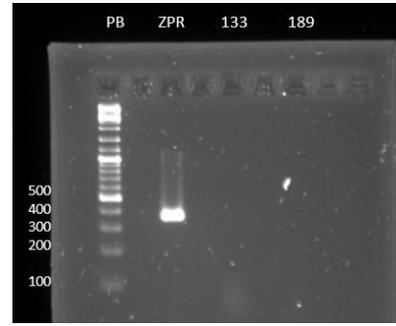


Figura xvii Electroforesis de las muestras 133 y 189 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar ZIKV, usando Zika Puerto Rico (ZPR) como control.

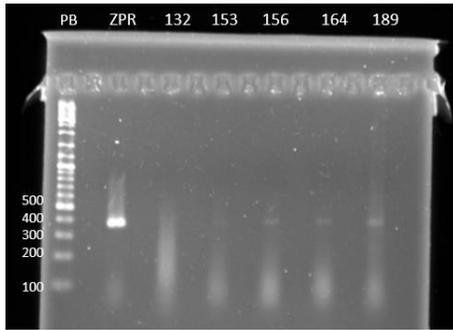


Figura xviii Electroforesis de las muestras 132, 153, 156, 164 y 189 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar ZIKV usando Zika Puerto Rico (ZPR) como control.

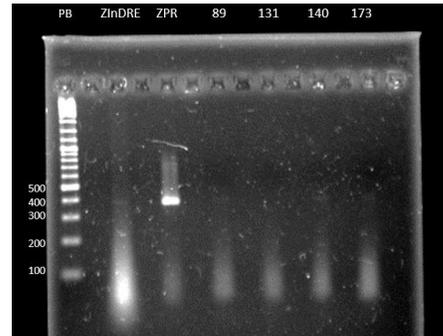


Figura xix Electroforesis de las muestras 89, 131, 140 y 173 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar ZIKV, usando Zika Puerto Rico (ZPR) y Zika InDRE (ZInDRE) como controles.

Geles de muestras analizadas con oligonucleótidos para DENV y ZIKV

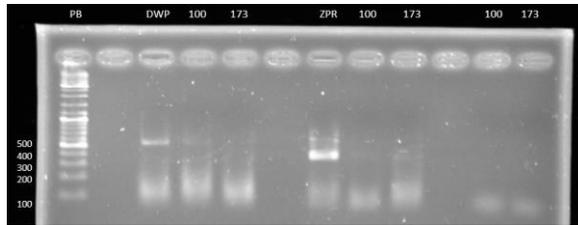


Figura xx Electroforesis de las muestras 100 y 173 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por serocomplejo (a la izquierda), ZIKV (en el centro) y CHKV (a la derecha) usando DENV1-Western Pacific (DWP) y Zika Puerto Rico (ZPR) como controles.

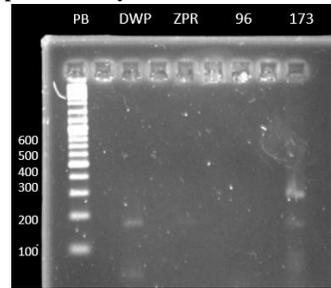


Figura xxi Electroforesis de las muestras 96 y 173 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por tiempo real (TR), usando Zika Puerto Rico (ZPR) y DENV-1 Western Pacific (DWP) como controles.

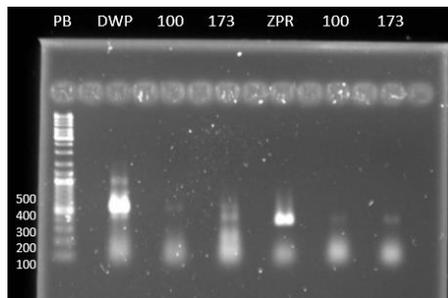


Figura xxii Electroforesis de las muestras 100 y 173 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar DENV por serocomplejo (a la izquierda), ZIKV (a la derecha) usando DENV1-Western Pacific (DWP) y Zika Puerto Rico (ZPR) como controles.

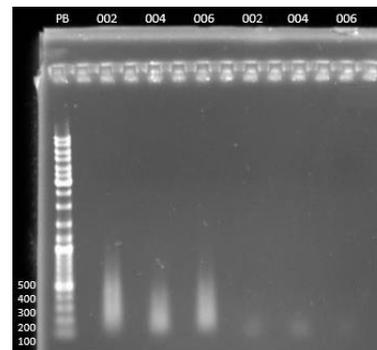


Figura xxiii Electroforesis de las muestras 002, 004 y 006 utilizando los pares de oligonucleótidos para determinar DENV por serocomplejo (a la izquierda) y ZIKV (a la derecha)

Geles de muestras analizadas con oligonucleótidos para DENV TS

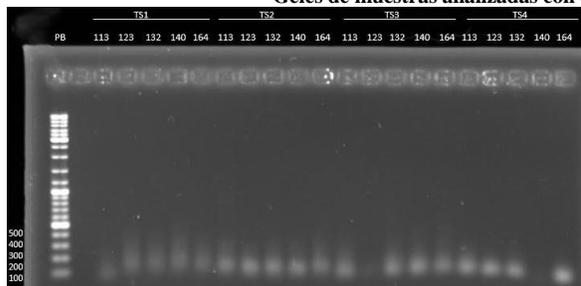


Figura xxiv Electroforesis de las muestras 113, 123, 132, 140 y 160 utilizando los pares de oligonucleótidos para determinar TS 1-4

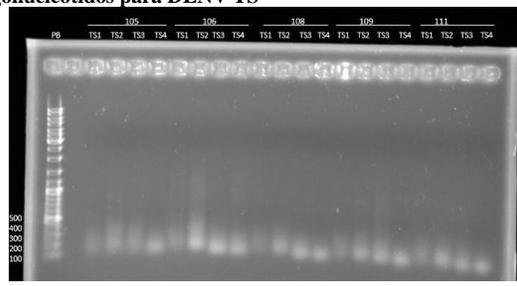


Figura xxv Electroforesis de las muestras 105, 106, 108, 109 y 111 utilizando los pares de oligonucleótidos para determinar TS 1-4

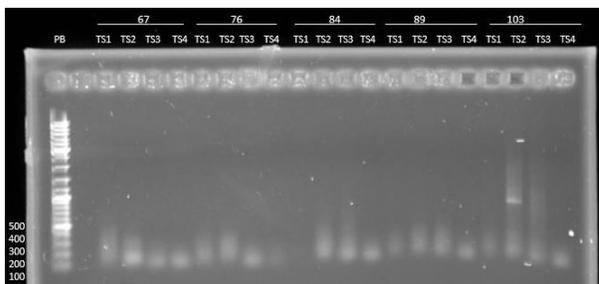


Figura xxvi Electroforesis de las muestras 67, 76, 84, 89 y 103 utilizando los pares de oligonucleótidos para determinar TS 1-4

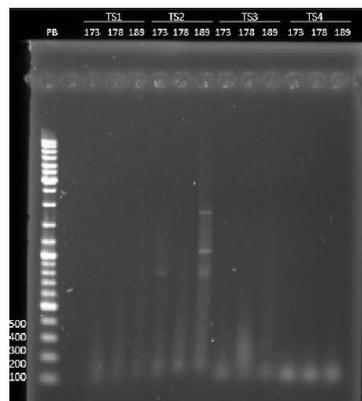


Figura xxvii Electroforesis de las muestras 173, 178 y 189 utilizando los pares de oligonucleótidos para determinar TS 1-4

Geles de muestras analizadas con oligonucleótidos para CHKV

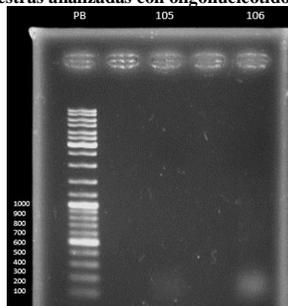


Figura xxviii Electroforesis de las muestras 105 y 106 utilizando el par de oligonucleótidos para determinar CHKV

Tabla anexa 1.- Resultados obtenidos de tipificación con oligonucleótidos para determinar Chikungunya y TS.

Muestra	TS1	TS2	TS3	TS4	CHKV
002	No claro	No claro	No claro	No claro	
004	No claro	No claro	No claro	No claro	
006	No claro	No claro	No claro	No claro	
67	-	-	-	-	
76	-	-	-	-	
84	-	-	-	-	
89	-	-	-	-	
100					-
103	-	Inespecífico	-	-	
105	-	Inespecífico	-	-	-
106	-	-	-	-	Posible
108	-	-	-	-	

109	-	Inespecifico	-	-	
111	-	-	-	-	
113	-	-	-	-	
123	-	-	-	-	
132	-	-	-	-	
133					-
140	-	-	-	-	
164	-	-	-	-	
173	-	Inespecifico	-	-	-
178	-	-	-	-	
189	-	Inespecifico	Inespecifico	-	-