



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA PARA LA
DETECCIÓN DE LOS ALFAVIRUS EMERGENTES CHIKUNGUNYA Y MAYARO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. PÉREZ TEPOS PERLA VIRIDIANA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ROSALÍA LIRA CARMONA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MIGUEL ÁNGEL DE LA CRUZ VILLEGAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA PARA LA
DETECCIÓN DE LOS ALFAVIRUS EMERGENTES CHIKUNGUNYA Y MAYARO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. PÉREZ TEPOS PERLA VIRIDIANA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ROSALÍA LIRA CARMONA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MIGUEL ÁNGEL DE LA CRUZ VILLEGAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/726/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **16 de mayo de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **PÉREZ TEPOS PERLA VIRIDIANA** con número de cuenta **311644661** con la tesis titulada **“DESARROLLO DE UN SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA PARA LA DETECCIÓN DE LOS ALFAVIRUS EMERGENTES CHIKUNGUNYA Y MAYARO”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ROSALÍA LIRA CARMONA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Vocal: DR. EDGAR ENRIQUE SEVILLA REYES
Vocal: DRA. LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ
Secretario: DR. MIGUEL ÁNGEL DE LA CRUZ VILLEGAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de agosto de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de maestría (CVU: 1034661).

Al Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por el financiamiento recibido (FIS-IMSS-PROT-G16-1574).

A mi tutora, la Dra. María Rosalía Lira Carmona por guiarme con paciencia y sabiduría durante mi formación en la maestría.

A los miembros de del Comité Tutorial, la Dra. Ana María Cevallos Gaos y el Dr. Miguel Ángel de la Cruz Villegas por todas las aportaciones y comentarios realizados durante el desarrollo de este proyecto.

Agradecimientos a título personal

A mi familia por siempre estar presente y apoyarme con su amor incondicional en cada etapa y decisión de mi vida, principalmente a mi madre.

A la M. en C. Angélica Maldonado por su paciencia, enseñanzas, escucha y apoyo a lo largo de todo este proyecto.

A Daniela Würsch, Karina Enriquez y Mayra Apolinar por su apoyo, comentarios y aportes en el laboratorio y en los seminarios.

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cazares, a la Dra. Martha Yocupicio Monroy y al Dr. Edgar Enrique Sevilla Reyes por proporcionarme reactivos clave para la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado, la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser, la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, el Dr. Edgar Sevilla Reyes, la Dra. Leonor Huerta Hernández y el Dr. Miguel Ángel de la Cruz Villegas por su tiempo, comentarios y aportaciones durante el proceso de titulación.

A mis amigas del posgrado Zaira, Caro, Silvia, Sofía, Andy y Elenka por su amistad, cariño, apoyo, escucha y retroalimentación durante esta etapa, realizar un posgrado durante una pandemia fue más sencillo gracias a ustedes.

A todas mis amistades por su cariño y compañía.

A mi niña por todo su amor y darme un motivo para levantarme cada mañana.

Índice

Lista de figuras

Lista de tablas

Abreviaturas

1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	5
3.1 Generalidades de los alfavirus	5
3.2 Ciclo de replicación.....	8
3.3 Ciclos de transmisión de los alfavirus.....	12
3.4 Virus chikungunya	14
3.5 Virus Mayaro	20
3.6 Métodos de diagnóstico viral	23
3.7 Sistemas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos.....	24
4. Antecedentes	32
5. Justificación	33
6. Objetivo	34
7. Metodología	35
7.1 Material biológico.....	35
7.2 Diseño de primers para LAMP CHIKV y MAYV	35
7.3 Extracción de RNA	40
7.4 Obtención de controles positivos para LAMP CHIKV y MAYV	40
7.5 Estandarización del LAMP CHIKV y MAYV acoplado a detección de productos por colorimetría	42
7.6 Cálculo de concentración de copias en los ensayos LAMP CHIKV y LAMP MAYV.....	45
7.7 Determinación de la especificidad analítica del LAMP CHIKV y MAYV	45
8. Resultados	46
8.1 Diseño de primers para LAMP CHIKV y LAMP MAYV	46
8.2 Obtención de los controles positivos de CHIKV y MAYV.....	54
8.3 Estandarización del ensayo LAMP CHIKV y LAMP MAYV.....	55
8.4 Especificidad de los ensayos LAMP CHIKV y LAMP MAYV	67
8.5 Amplificación de RNA viral de los sistemas LAMP CHIKV y LAMP MAYV.....	68
8.6 Límite de detección del ensayo LAMP CHIKV y LAMP MAYV	70
9. Discusión	74

10. Conclusiones.....	83
11. Referencias bibliográficas.....	84
12. Anexo: Tabla Suplementaria - Características de los sets de primers generados de CHIKV y MAYV.....	101

Lista de figuras

Figura 1. Virión de los alfavirus	6
Figura 2. Expresión del genoma de los alfavirus	7
Figura 3. Complejo de replicación de los alfavirus	9
Figura 4. Ciclo de replicación de los alfavirus	11
Figura 5. Ciclos de transmisión de los alfavirus.	14
Figura 6. Epidemiología de CHIKV	16
Figura 7. Epidemiología de MAYV.	21
Figura 8. Primers de la reacción de amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP).....	26
Figura 9. Reacción de amplificación del ensayo LAMP	30
Figura 10. Sistemas de detección de productos de LAMP	31
Figura 11. Distancias para el diseño de primers de LAMP	37
Figura 12. Plásmido pUCIDIT-AMP MAY DUO	39
Figura 13. Set 3 de primers del LAMP CHIKV.....	49
Figura 14. Set 1 de primers del LAMP MAYV	53
Figura 15. Controles positivos de los ensayos LAMP CHIKV y MAYV.....	55
Figura 16. Estandarización de la concentración de primers internos en la reacción de LAMP CHIKV.	56
Figura 17. Estandarización de la concentración de primers externos en la reacción de LAMP CHIKV.	57
Figura 18. Estandarización de la temperatura de la reacción de LAMP CHIKV	59
Figura 19. Estandarización del tiempo en la reacción de LAMP CHIKV	60
Figura 20. Estandarización de la concentración de primers internos en la reacción de LAMP MAYV.	62
Figura 21. Estandarización de la concentración de primers externos en la reacción de LAMP MAYV.	63
Figura 22. Estandarización de la concentración de primers loop en la reacción de LAMP MAYV.	64
Figura 23. Estandarización de la temperatura en la reacción de LAMP MAYV.....	65
Figura 24. Estandarización del tiempo en la reacción de LAMP MAYV	66
Figura 25. Especificidad de los sistemas LAMP CHIKV y LAMP MAYV	68
Figura 26. Especificidad de los ensayos LAMP CHIKV y LAMP MAYV con muestras de RNA de arbovirus.	69
Figura 27. Límite de detección del ensayo LAMP CHIKV	71
Figura 28. Límite de detección del ensayo LAMP MAYV.	73

Lista de tablas

Tabla 1. Longitud y Tm considerada para el diseño de primers de LAMP	37
Tabla 2. Concentraciones de primers del ensayo LAMP	43
Tabla 3. Secuencia consenso del fragmento del gen nsP1 de CHIKV.....	46
Tabla 4. Set de primers de LAMP para nsP1 de CHIKV.	48
Tabla 5. Secuencia del fragmento del gen nsP1 de CHIKV	50
Tabla 6. Set de primers de LAMP para nsP1 de MAYV.	52
Tabla 7. Diluciones seriadas del control positivo de CHIKV.....	70
Tabla 8. Diluciones seriadas del control positivo de MAYV.....	72

Abreviaturas

B3	Primer externo en antisentido
BIP	Primer externo en antisentido
BL	Primer del loop en antisentido
cap	Capucha
cDNA	DNA complementario
CHIKV	Virus Chikungunya
D	Genotipo ampliamente distribuido (MAYV)
DENV-2	Virus Dengue serotipo-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de doble cadena
dsRNA	RNA de doble cadena
ECSA	Genotipo Este, Central y Sur de África (CHIKV)
ECSA-IOL	Genotipo Océano Índico (CHIKV)
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
F3	Primer externo en sentido
FIP	Primer interno en sentido
FL	Primer del loop en sentido
gRNA	RNA genómico
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IMDA	Ensayo de amplificación isotérmica de desplazamiento múltiple
L	Genotipo limitado (MAYV)
LAMP	Sistema de amplificación isotérmica mediada por asa

MAYV	Virus Mayaro
N	Genotipo nuevo (MAYV)
NASBA	Ensayo de amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico
ONNV	Virus O'nyong-nyong
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFU	Unidades formadoras de placa
RCA	Ensayo de amplificación de círculo rodante
RNA	Ácido ribonucleico
RRV	Virus Ross River
RT-PCR	PCR con transcriptasa reversa
RT-qPCR	PCR cuantitativo con transcriptasa inversa
ssRNA+	RNA monocatenario en sentido positivo
TMA	Ensayos de amplificación mediada por transcripción
WA	Genotipo Oeste de África (CHIKV)
ZIKV	Virus Zika

1. Resumen

Los alfavirus chikungunya (CHIKV) y Mayaro (MAYV) son arbovirus que provocan enfermedades febriles y artrogénicas de importancia médica, su diagnóstico se lleva a cabo principalmente en laboratorios de referencia los cuales cuentan con infraestructura especializada. Sin embargo, el establecimiento de sistemas de diagnóstico capaces de aplicarse en sitios de atención primaria facilitaría el diagnóstico oportuno y permitiría prevenir brotes con magnitudes epidémicas. El sistema de amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP) consiste en la amplificación de ácidos nucleicos a una temperatura constante debido al diseño especializado de los primers y al uso de la polimerasa *Bst* la cual tiene actividad helicasa. Además, es posible detectar los productos de amplificación de manera cualitativa debido al uso de compuestos colorimétricos sensibles al cambio de pH como el rojo de fenol. Por estas características, el ensayo de LAMP ha sido propuesto para el diagnóstico viral en sitios de atención primaria. El objetivo de este estudio fue establecer dos ensayos de LAMP para la detección de los virus CHIKV y MAYV acoplados a la detección de productos mediante colorimetría usando rojo de fenol. Se diseñaron los sets de primers para los ensayos de LAMP CHIKV y LAMP MAYV dirigidos al gen nsP1. La estandarización de los ensayos se realizó modificando la concentración de los primers, la temperatura y el tiempo de amplificación de los ensayos. Los productos de amplificación se visualizaron mediante gel de agarosa y mediante colorimetría usando rojo de fenol. Se incluyó el RNA de Dengue serotipo 2 (DENV-2) y Zika (ZIKV) como control de

especificidad. Se obtuvieron dos sistemas específicos y sensibles para CHIKV y MAYV ya que no amplificaron DENV-2 ni ZIKV y el límite de detección del LAMP CHIKV fue de 1×10^4 copias/ μL (2.1×10^{-6} ng/ μL), mientras que el del LAMP MAYV fue de 1×10^3 copias/ μL (2.16×10^{-7} ng/ μL). El sistema de detección colorimétrico de productos usando rojo de fenol permitió interpretar los resultados a simple vista. Los sistemas LAMP CHIKV y LAMP MAYV tienen el potencial de ser aplicados en vigilancia epidemiológica y para el diagnóstico en sitios de atención primaria.

2. Abstract

The alphaviruses chikungunya virus (CHIKV) and Mayaro virus (MAYV) are arboviruses that cause febrile and arthrogenic diseases of medical importance, their diagnosis is carried out mainly in reference laboratories which have specialized infrastructure, however, the establishment of diagnostic systems capable of being applied in sites of point of care would facilitate timely diagnosis and prevent outbreaks with epidemic magnitudes. The loop-mediated isothermal amplification system (LAMP) involves in the nucleic acids amplification at constant temperature due to the specialized design of primers and the use of the *Bst* polymerase with helicase activity. In addition, it is capable of qualitative detection of amplification qualitatively due to the use of colorimetric compounds sensitive to pH change such as phenol red. Due to these characteristics, the LAMP assay has been proposed for viral diagnosis in sites of point of care. The aim of this study was to establish respective LAMP assays for the detection of CHIKV and MAYV with detection by colorimetry using phenol red. Primer sets were designed for LAMP CHIKV and LAMP MAYV assays targeting the nsP1 gene. Standardization of the assays was carried out by modifying primers concentration, temperature and amplification time. The amplification products were visualized by agarose gel and by colorimetry using phenol red. RNA from Dengue serotype 2 (DENV-2) and Zika (ZIKV) were included as controls. Two specific and sensitive LAMP systems for CHIKV and MAYV were obtained since they did not amplify DENV-2 or ZIKV and detection limit of LAMP CHIKV was 1×10^4 copies/ μ L (2.1×10^{-6} ng/ μ L), while that of

LAMP MAYV was 1×10^3 copies/ μL (2.16×10^{-7} ng/ μL). The colorimetric product detection system using phenol red allowed the results to be interpreted with naked eye. The LAMP CHIKV and LAMP MAYV systems have the potential to be applied in epidemiological surveillance and for diagnosis in sites of point of care.

3. Introducción

La familia Togaviridae se compone de un único género llamado *Alphavirus*¹ (o alfavirus) al cual pertenecen virus de RNA transmitidos por vector que son causantes de cuadros febriles, artralgia y encefalitis².

3.1 Generalidades de los alfavirus

El género *Alphavirus*¹⁻³, comprende a virus transmitidos por mosquitos, que mantienen un ciclo de transmisión entre vectores y hospederos susceptibles como humanos, aves, primates y otros mamíferos. Estos virus están asociados a sarpullidos, enfermedades artríticas y cuadros de encefalitis^{2,4}. A este género pertenecen virus como chikungunya (CHIKV), O'nyong-nyong (ONNV) Ross River (RRV) y Mayaro (MAYV)^{3,4}.

Los alfavirus son virus envueltos con un diámetro aproximado de 70 nm, se caracterizan por tener una envoltura lipídica derivada de la célula huésped, y en ella están embebidos trímeros de heterodímeros compuestos por las glicoproteínas virales E1 y E2 que permiten al virión unirse a su receptor en la célula blanco²⁻⁴. Dentro de la envoltura se encuentra la nucleocápside icosaédrica con simetría T=4, que resguarda una copia del genoma viral de RNA monocatenario en sentido positivo (ssRNA+), con una longitud aproximada de 11,400 - 12,000 nucleótidos (Figura 1). El genoma tiene un extremo 5' con cap metilguanilato y un extremo 3' de poliadenilato, similar a los RNAs mensajeros celulares eucarióticos²⁻⁵.

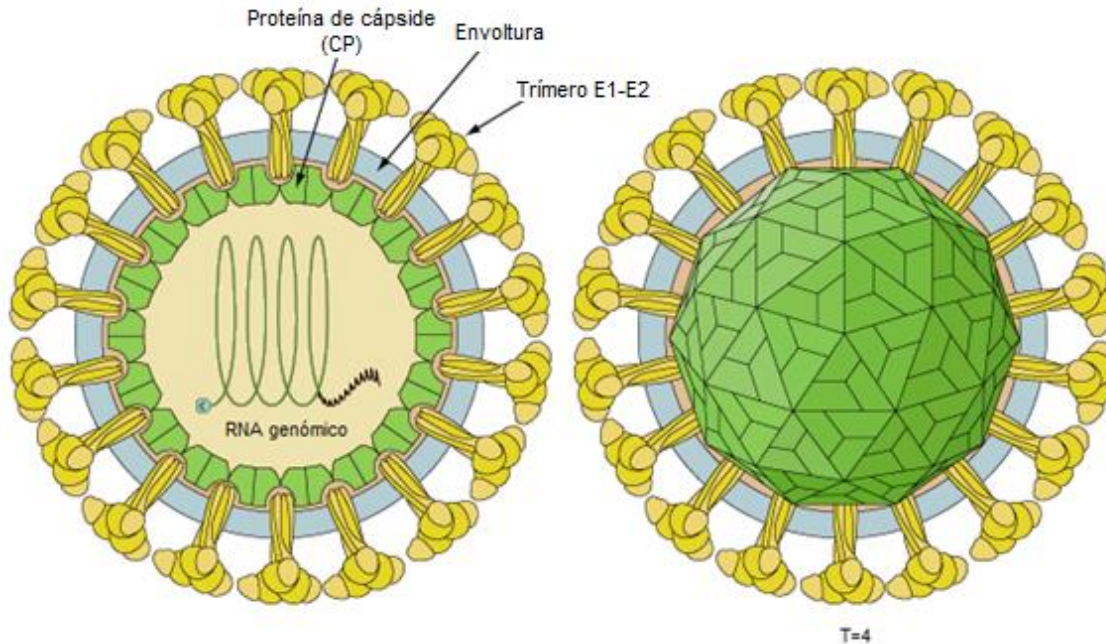


Figura 1 Virión de los alfavirus. Estructura del virión de los alfavirus. Modificado de SIB Instituto Suizo de Bioinformática, 2017.

El genoma viral (Figura 2) codifica para dos tipos de proteínas virales: estructurales y no estructurales. Las proteínas no estructurales, nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4, se traducen a partir del marco abierto de lectura en el extremo 5' ^{2,4}, en las fases iniciales de la infección se generan las poliproteínas P123 y P1234 las cuales posteriormente serán procesadas por la proteasa nsP2 y darán origen a las proteínas no estructurales individuales.

La proteína nsP1 tiene actividad de guanina-7 metiltransferasa y guaniltransferasa, con lo que cataliza la síntesis de la capucha (cap) en el RNA. También nsP1 está involucrada en la unión de los complejos de replicación en las membranas celulares, para la formación de las fábricas virales en la superficie de la membrana de endosomas. La proteína nsP2 tiene actividad helicasa y proteasa ^{2,4}. La

proteína nsP3, es una proteasa ⁶ que además está involucrada en la síntesis del RNA viral y en el transporte nuclear ^{2,4}. Por último, nsP4 es una RNA polimerasa para RNA con sentido positivo y negativo ^{2,4}.

Las proteínas estructurales son codificadas por un RNA subgenómico cercano al extremo 3'; a partir de este se genera un polipéptido compuesto por la proteína de la cápside (C), los precursores de las proteínas de la envoltura (E1, E2 y E3) ^{2,4} y la proteína 6K ⁷, las cuales serán escindidas por proteasas celulares como la furina y por autoproteólisis como es el caso de la cápside ^{4,8} (Figura 2).

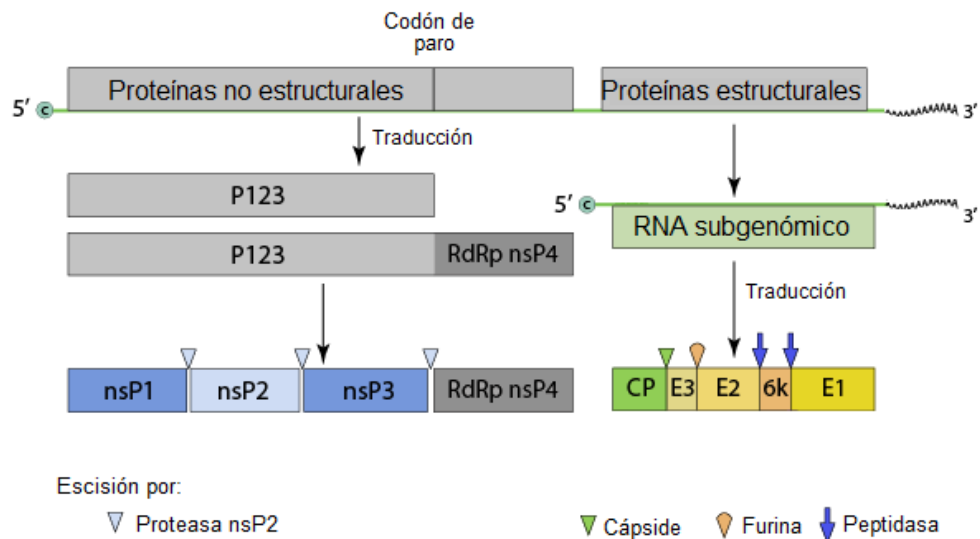


Figura 2. Expresión del genoma de los alfavirus. Expresión de las proteínas estructurales y no estructurales de los alfavirus a partir de los dos marcos abiertos de lectura del genoma viral, en la parte inferior se muestra esquemáticamente las regiones de escisión de las proteasas virales y celulares. Modificado de SIB Instituto Suizo de Bioinformática, 2017.

3.2 Ciclo de replicación

El primer paso en el ciclo de replicación es la unión de los viriones al receptor en la célula hospedera mediante la interacción de éste con las proteínas de envoltura, E1 y E2 (Figura 4) ^{9,10}. Hasta el momento no se ha identificado un receptor común para todos los alfavirus, sin embargo, se han propuesto receptores como la proteína de macrófagos asociada a la resistencia natural (NRAMP), la proteína 8 asociada a la remodelación de la matriz (Mxra8) y el receptor de laminina ⁹. Posteriormente, el virus entra a la célula por endocitosis mediada por clatrina ¹¹. Dentro de los endosomas, los heterodímeros de las proteínas de envoltura son desestabilizados debido a cambios conformacionales provocados por la acidificación del medio ^{10,12}. La proteína E1 en su nueva conformación es capaz de trimerizarse y unirse a la membrana de los endosomas, formando un poro que permite la salida de la nucleocápside hacia el citoplasma ^{9,10,12}. Posteriormente, la nucleocápside se desensambla en el citoplasma debido a la interacción de las proteínas de cápside con ribosomas del citosol, esta interacción desestabiliza la estructura de la nucleocápside y permite la liberación del genoma viral en el citoplasma ¹²⁻¹⁴.

A partir del RNA genómico viral (gRNA) se transcriben las proteínas no estructurales nspP1-nspP4 ⁸, las cuales forman fábricas virales, o complejos de replicación (Figura 3), en la superficie de las membranas de los endosomas ¹⁵; en ellas se sintetiza la cadena negativa del genoma viral, formando un RNA de doble cadena (dsRNA) ¹⁶.

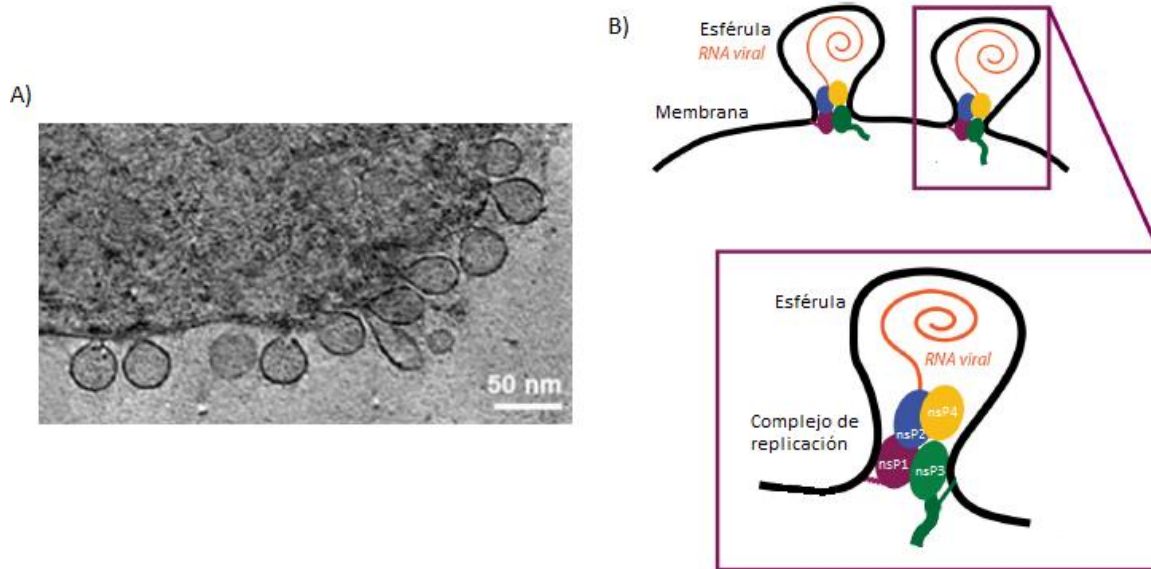


Figura 3. Complejo de replicación de los alfavirus. La replicación de los alfavirus se lleva a cabo en complejos de replicación en la superficie de endosomas. A) Complejos de replicación de CHIKV, imagen obtenida a partir de criotomografía electrónica. Modificada de Tan *et al*, 2022. B) Esquema del complejo de replicación donde se muestran las proteínas no estructurales (nsP1-nsP4), la esférula formada por membrana de endosomas y el genoma viral de RNA. Modificada de Thaa *et al*, 2015.

A partir de la cadena negativa del RNA viral, se replicará el genoma y se sintetizará el mRNA subgenómico, el cual es traducido en una poliproteína precursora de las proteínas estructurales C-E3-E2-6K-E1^{4,15}. La proteína de la cápside (C) es la primera en ser traducida y es escindida de la poliproteína mediante autoproteólisis⁸. Por otra parte, la poliproteína E3-E2-6K-E1 continúa su síntesis en el retículo endoplásmico debido a una señal de translocación presente en el extremo N-terminal de la poliproteína naciente⁸. En el retículo endoplásmico, la poliproteína es procesada por las proteasa endógenas dando origen a las proteínas E3-E2 (poliproteína también llamada pE2 o precursor de la proteína E2), 6K y E1, para posteriormente formar los heterodímeros pE2-E1. Otras

modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas de envoltura en el retículo endoplásmico son la glicosilación y la palmitoilación ⁴.

Mediante el transporte vesicular *trans*-Golgi, las proteínas de envoltura viajan del retículo endoplásmico al aparato de Golgi, en donde la poliproteína pE2 es procesada proteolíticamente por furinas, dando lugar a las proteínas E2 y E3 y permitiendo la activación de la espícula de envoltura E2-E1, la cual es transportada a la membrana plasmática ^{17,18}. Por último, las proteínas de cápside, presentes en el citoplasma, se asocian con el RNA genómico viral y se polimerizan formando la nucleocápside, la cual es reclutada en la membrana plasmática que contiene las proteínas de envoltura ⁸. Para el ensamble y salida por gemación de los viriones, es indispensable la interacción de la nucleocápside con las proteínas E2 de membrana y la interacción lateral de las espículas de las proteínas de envoltura ¹⁹. También se ha reportado que la proteína 6K, la cual es una viroporina con propiedades de canal iónico, está involucrada en la salida de los viriones mediante mecanismos que aún permanecen desconocidos ^{7,20}.

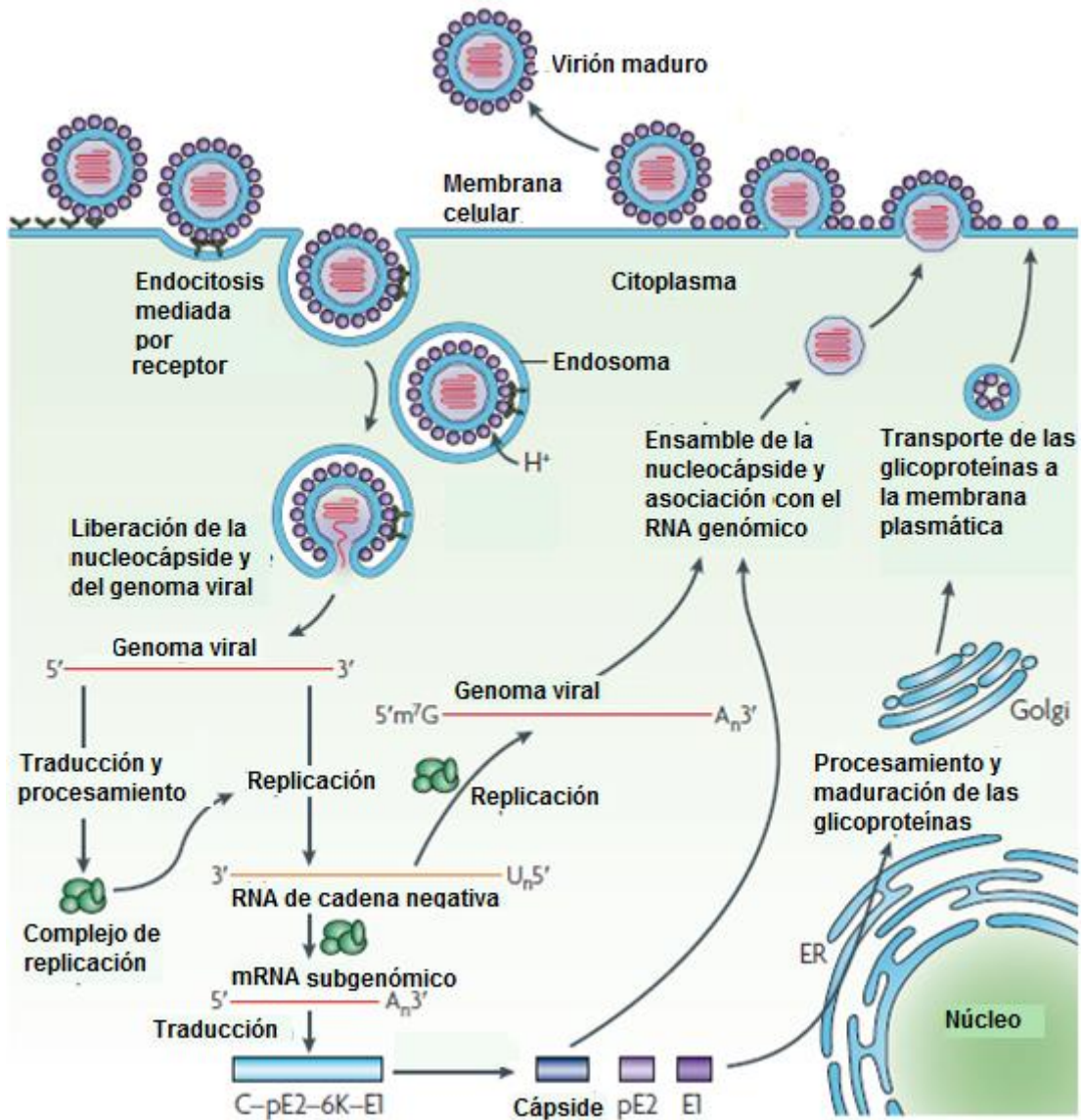


Figura 4. Ciclo de replicaci3n de los alfavirus. Modificado de Schwarts et al, 2010.

3.3 Ciclos de transmisión de los alfavirus

Los alfavirus de importancia médica, al igual que otros arbovirus, son transmitidos por un vector y requieren de un huésped para replicarse ^{21,22}.

La diversidad de los vectores, así como de los animales huésped permiten el establecimiento de tres ciclos de transmisión: ciclo selvático, ciclo rural y ciclo urbano ²³⁻²⁷ (Figura 5). El ciclo principal en el que se transmiten los alfavirus, es el ciclo selvático, este se mantiene debido a la transmisión de los alfavirus entre primates no humanos, pequeños mamíferos, marsupiales, aves ^{21,22,25,28} y los mosquitos de distribución selvática como *Aedes furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. africanus*, *Ae. neoafricanus*, *Haemagogus sp*, *Sabethes sp* y *A. scapularis* ^{21-23,29-31}. Sin embargo, existe el “spill over” o derrame de transmisión de los alfavirus desde el ciclo selvático a los demás ciclos mediante diversos mecanismos ^{21-26,32-35}.

Los mosquitos ocupan nichos ecológicos en los ecosistemas, la especialización de estos a condiciones ambientales y de alimentación permite la contención parcial del ciclo selvático en áreas naturales ^{23,36,37}, a pesar de ello, algunas especies de mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Psorophora*, son artrópodos generalistas capaces de habitar en las zonas periféricas de las áreas naturales y de adaptarse a áreas rurales y urbanas ³¹. Por ejemplo, se ha reportado que algunas poblaciones de mosquitos tienen hábitos selváticos durante el día, y por la noche se trasladan a villas aledañas para alimentarse ²³, por lo que el movimiento y migración de los vectores es un factor importante para el derrame desde el ciclo selvático ^{23,32}.

El ciclo rural se mantiene debido a la transmisión entre humanos, animales domésticos y los mosquitos vectores como: *Opifex sp*, *Culex sp*, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, *Psorophora sp*, *Mansonia uniformis* y *Coquillettidia sp*^{23,30,38,39}. El incremento de las poblaciones humanas, actividades agrícolas, forestales, ganaderas y de turismo que impliquen la exposición de las personas a zonas de distribución de los vectores de los alfavirus, propicia el derrame desde ciclos selváticos y la aparición de brotes en zonas rurales, y ocasionalmente en zonas urbanas^{22,23,25,27,30,34,35,40}.

El ciclo de transmisión urbano se mantiene entre humanos y mosquitos de distribución urbana como *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Anopheles stephensi*,^{22,25,31–33,39} este ciclo se puede establecer debido al traslado de personas infectadas a zonas urbanas y la expansión de la distribución de mosquitos transmisores^{22,24,26,33,35}.

El surgimiento de brotes de importancia epidémica depende de múltiples factores como: nivel de precipitación, temperatura, cambio climático, migraciones de los vectores y huéspedes, aumento de las poblaciones de vectores y huéspedes, crecimiento poblacional humano, cambio de uso de suelo, actividades económicas en las zonas de circulación de los alfavirus, poca infraestructura de las áreas rurales/urbanas, existencia y aplicación de medidas de contención de vectores, entre otros factores bióticos y abióticos^{21,22,26,32,35–37,41}.

Por último, es importante destacar que factores moleculares, intrínsecos de los alfavirus, como la aparición de mutaciones en las proteínas de envoltura (E1 y E2)

propician el cambio de uso de receptores y con ello la expansión a nuevos vectores y huéspedes^{33,34,42-44}.

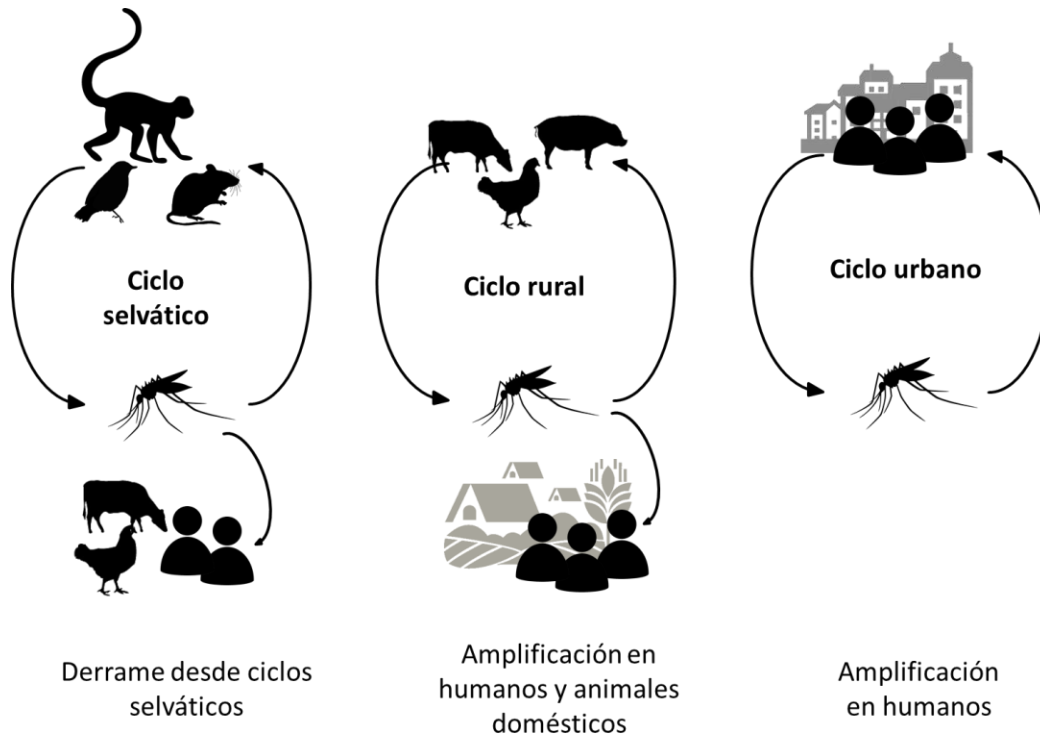


Figura 5. Ciclos de transmisión de los alfavirus. Ciclo de transmisión selvático, rural y urbano con imágenes representativas de los vectores y huéspedes amplificadores.

3.4 Virus chikungunya

El virus CHIKV fue aislado por primera vez en 1952 en Tanzania, su nombre significa "eso que te dobla" en Bantu, lenguaje de Makonde, Tanzania, y hace referencia a la postura que las personas infectadas toman debido al dolor articular^{39,45}.

El genoma de CHIKV es un ssRNA+ y tiene una longitud de 12kb; se han identificado cuatro genotipos con base a la secuencia del gen E1: Este, Central y

Sur de África (East-Central-South-Africa (ECSA), Océano Índico (ECSA-IOL), Oeste de África (West-Africa) y Asiático (Asian) ^{43,46}.

Epidemiología

El CHIKV se ha dispersado a lo largo de cuatro continentes provocando brotes en África, Asia, Europa y América. En el 2004 se reportó una ola de brotes a lo largo del mundo en zonas tropicales y subtropicales. Ejemplos relevantes de estos brotes fueron los ocurridos en las islas del Océano Índico: Comoros, Mayotte, Seychelles, Mauritius y La Reunión con una variante del linaje ECSA (ECSA-IOL). En La Reunión, durante el 2005 y 2007, el 34% de la población fue afectada por la infección de CHIKV^{32,35,45}.

En el 2006 se reportaron casos en Europa, principalmente en Italia, Francia, Suiza, Alemania, Bélgica e Inglaterra ^{32,39,45,47}.

El primer caso autóctono de CHIKV en América fue reportado en el 2013 en la Isla San Martín con una variante del linaje Asiático y el segundo caso autóctono de América fue en Amapá, Brasil, en el 2014. En el 2015 se reportaron casos en Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay y Venezuela. Los genotipos reportados en América son mayoritariamente el Asiático y el ECSA en partes de Brasil ^{25,32,39,45} (Figura 6).

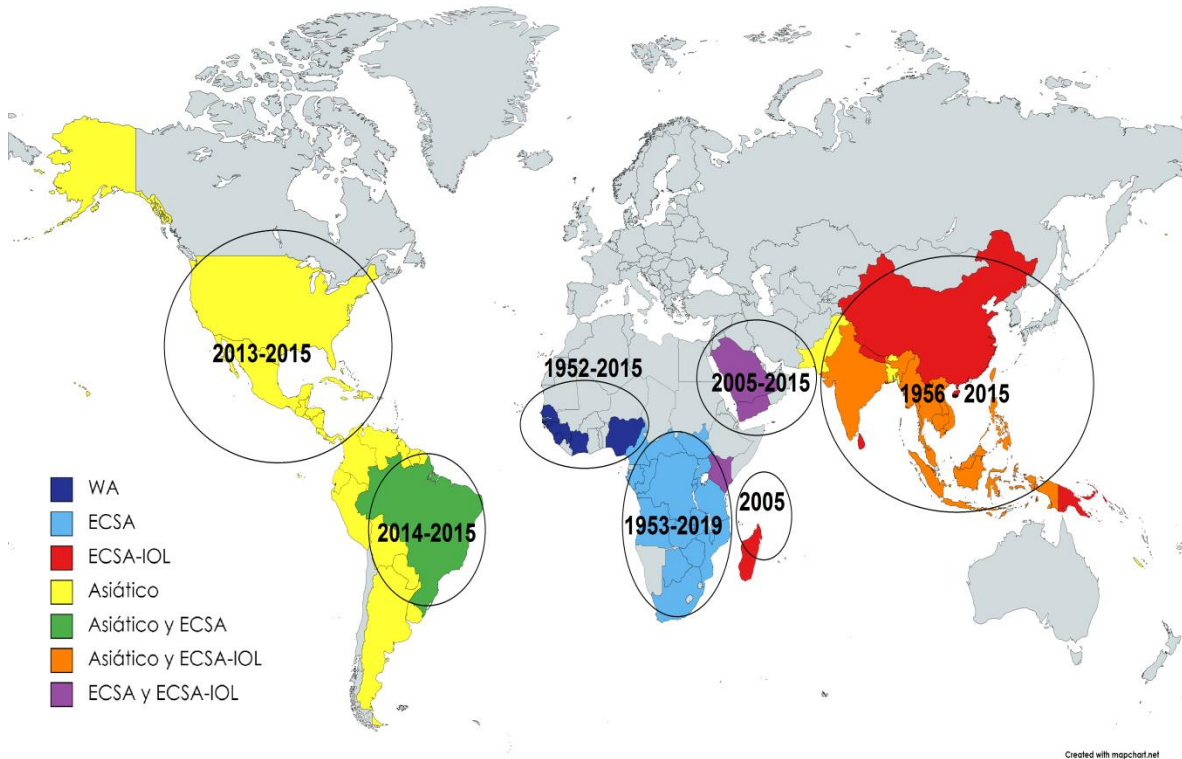


Figura 6. Epidemiología de CHIKV. Mapa de la distribución endémica de los genotipos de CHIKV, en círculos se muestran los periodos en los que se han reportado brotes de importancia epidémica.

Historia Natural

El ciclo selvático de CHIKV se mantiene debido a la transmisión entre primates no humanos y mosquitos de distribución selvática como *Ae. furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. africanus*, and *Ae. neoafricanus*²⁹, mientras que el ciclo urbano se mantiene debido a la transmisión entre humanos y los mosquitos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* principalmente^{23,38,48}. Otras especies de mosquitos vectores de CHIKV son *Eretmapodites chrysogaster*, *Culex annulirostris*, *Mansonia uniformis*, *Anopheles stephensi*, y *Opifex fuscus*³⁹. También se ha reportado transmisión vertical del virus en humanos⁴⁹⁻⁵¹.

Después de la transmisión del virus a través de la picadura del mosquito, el CHIKV se replica en fibroblastos dérmicos, queratinocitos y melanocitos, desde las células de la piel los viriones viajan a través del sistema linfático hasta el bazo y ganglios linfáticos. Posteriormente, debido a la interacción del sistema linfático con el sistema circulatorio, los viriones entran al torrente sanguíneo lo cual permite que éstos lleguen hasta el hígado, músculos, articulaciones, y cerebro ^{29,52-54}.

El CHIKV es capaz de infectar células epiteliales, endoteliales, macrófagos derivados de monocitos, células de la cápsula de la articulación, células progenitoras de músculo (células satélite) y fibroblastos primarios ^{29,52-54}.

En los primeros siete días de la infección, se pueden alcanzar cargas virales de 10^9 copias/ml de sangre ^{39,45,47}. La historia natural de la infección por CHIKV se divide en tres etapas clínicas; fase aguda, fase post-aguda y fase crónica ³⁹.

Fase aguda.

La fase aguda comienza posterior a la picadura del mosquito vector y tiene una duración aproximada de 21 días desde la aparición de las manifestaciones clínicas³⁹.

Después de un periodo de incubación de 2-4 días posteriores a la inoculación del CHIKV, los individuos infectados presentan una viremia de duración corta, 4-10 días, y es a partir de ésta que se presentan las manifestaciones clínicas. como fiebre, poliartralgia/poliartritis, mialgia, dolor de cabeza, sarpullido y fotofobia. La poliartralgia y la poliartritis severos son características de la infección aguda por

CHIKV (72%-98% de los casos). Los síntomas se resuelven posterior 1-3 semanas de la resolución de la viremia ^{39,53,55}. Durante la fase aguda se ha reportado un aumento de mediadores pro-inflamatorios como MCP-1, IFN- α/β , IFN- γ , IL-6, TNF- α , MCP-1, IL-5, IL-7 e IL-15 ^{42,55-57} los cuales se han asociado a la persistencia de síntomas aún después de la resolución de la viremia ^{53,55-57}.

Fase post-aguda

La fase post-aguda comprende desde el día 21 de la infección hasta los 3 meses posteriores a la fase aguda. El 50%-90% de los individuos infectados progresan a esta fase en la cual se presenta polialtralgia y poliartritis, bursitis, entesitis, y tenosinovitis. Algunos factores determinantes en la persistencia de los síntomas son la severidad de la fase aguda ^{39,53,55}, edad (>65 años), viremia alta, la presencia de comorbilidades previas como enfermedades reumáticas, hipertensión, diabetes, enfermedades renales, enfermedades cardíacas y enfermedades autoinmunes ⁵⁸⁻⁶¹.

Fase crónica

La fase crónica inicia a partir del término de la fase post-aguda y puede durar años. El porcentaje de pacientes que progresa a la fase crónica, es del 40-80% ^{39,55}. Esta fase se caracteriza por la presencia de cuadros de artralgia y artritis, además, se han descrito tres tipos de cuadros clínicos que difieren en cuanto a la

gravedad y tiempo en que se presentan los síntomas. En el primer tipo de cuadro clínico, los individuos se curan de forma progresiva y sin secuelas, de forma espontáneamente o posterior a recibir tratamiento. En el segundo tipo, los individuos tienen manifestaciones clínicas persistentes en las articulaciones. En el tercer tipo, los individuos tienen procesos inflamatorios severos y degenerativos de forma persistente ⁶².

Hasta al momento no se ha determinado cual es la razón por la cual un gran porcentaje de las personas que se infectan de CHIKV progresan a la fase crónica⁶³. Se han encontrado algunos posibles factores de predisposición como lo son: edad >45 años, presencia de enfermedades autoinmunes y enfermedades reumáticas previas, y gravedad, alta carga viral ($>10^9$ copias/mL) y respuesta inmunológica exacerbada durante la fase aguda ^{55,63-66}. Sin embargo, durante la fase crónica se ha observado un aumento de los niveles de citocinas pro-inflamatorias como IFN- α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-7, IL-15, IL-17 y TNF- α , las cuales provocan inflamación, apoptosis y reclutamiento de neutrófilos, linfocitos y macrófagos, que en conjunto guían el daño a las articulaciones, exacerbando los cuadros de artralgia ^{55,63-65,67}. Se ha propuesto que la presencia de antígenos virales y la persistencia de la replicación viral en articulaciones podría ser la causa de los síntomas durante la fase crónica, sin embargo, hasta al momento no se ha logrado detectar RNA viral en tejido articular ni en líquido sinovial ^{63,64,66}.

3.5 Virus Mayaro

El MAYV es un virus perteneciente al género Alfavirus que fue aislado por primera vez en 1954 en Trinidad y Tobago ^{24,34}, es un virus perteneciente al género Alfavirus, con genoma ssRNA+ de 11.5 kb del que se han identificado tres genotipos: genotipo D (ampliamente distribuido), L (limitado) y N (nuevo) distribuidos en el continente americano ^{24,27,32,34}.

Epidemiología

Los brotes de MAYV se han reportado en Sudamérica y Centroamérica, particularmente en regiones cercanas a la amazonia. El MAYV ha provocado pequeños brotes en Trinidad y Tobago, Brasil, Bolivia, Ecuador, Venezuela, Perú, Guyana Francesa, Surinam y Haití ^{24,30,32,68}, los cuales están relacionados con las épocas de lluvia donde aumentan las poblaciones de los vectores ^{24,69}. En el caso de México, Panamá, Costa Rica, Guatemala y Honduras se ha encontrado únicamente evidencia serológica que apunta a la circulación de MAYV en estos países ³⁰ (Figura 7).

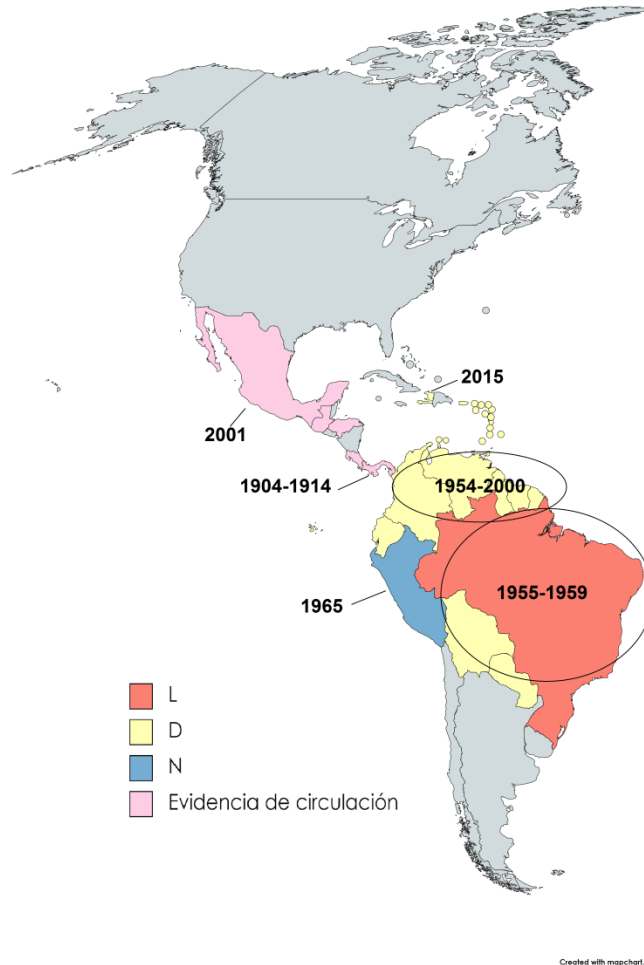


Figura 7. Epidemiología de MAYV. Mapa de la distribución de los genotipos de MAYV, en círculos se muestran los periodos en los que se han reportado brotes de importancia epidémica y evidencia de circulación a partir de análisis serológicos.

Historia Natural

Las infecciones por MAYV son comunes en zonas cercanas a bosques tropicales y tiene un ciclo selvático y uno rural / urbano al igual que CHIKV. El vector principal del MAYV es el mosquito *Haemagogus sp.*, también puede ser transmitido por mosquitos del género *Aedes* como *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, los cuales tienen una distribución urbana. Los primates no humanos que habitan en

las zonas tropicales son considerados el principal reservorio natural del MAYV^{24,30,69}.

El MAYV tiene tropismo hacia macrófagos⁷⁰, pero se desconoce el receptor que usa para entrar a las células blanco²⁴. Posterior a la picadura del mosquito, los virus infectan a los monocitos presentes en sangre, y los viriones viajan por los vasos sanguíneos hacia el bazo, hígado, huesos, músculos y tejidos articulares⁷¹.

El MAYV produce una enfermedad febril aguda con dolor e inflamación articular prolongado. Los síntomas asociados con la infección por MAYV son fiebre, artralgia, sarpullido, mialgia, dolor retroorbital, vómito y diarrea^{30,69,71,72}. Es posible diferenciar dos fases clínicas de la infección por MAYV; aguda y subaguda⁷¹.

Fase aguda

Después de la inoculación del virus MAYV por la picadura del mosquito ocurre un periodo de incubación de 3-12 días^{30,71,72}, seguida de una viremia de corta duración (3-7 días)³⁰, que puede alcanzar valores de 10^5 unidades formadoras de placa (PFU)/ml de sangre²⁴. Durante la fase aguda se presentan signos y síntomas como fiebre, sarpullido en brazos, piernas, tronco y cara, dolor de cabeza, mialgia, dolor retro orbital, fotofobia, linfadenopatía, vómito, diarrea y artralgia^{24,34,69,71}, que persisten por 1-2 semanas⁶⁹.

Fase subaguda

La fase subaguda inicia posterior al cuadro clínico de la fase aguda y se caracteriza por la inflamación de las articulaciones, la cual puede persistir por semanas, incluso meses (5-12 meses), aún en la presencia de anticuerpos neutralizantes. El dolor de cabeza y la artralgia son persistentes hasta por 12 meses después del término de la fase aguda y se presenta entre el 31%- 57% de los casos ^{24,34,71}.

3.6 Métodos de diagnóstico viral

Para el diagnóstico de CHIKV y MAYV se ha hecho uso de técnicas como el aislamiento viral, identificación del genoma viral mediante técnicas como PCR en tiempo real acoplado a transcriptasa reversa (RT-qPCR), detección de inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos específicos como IgM e IgG mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), pruebas de inmunocromatografía y pruebas de inhibición de la hemaglutinación. La técnica utilizada para el diagnóstico depende de la fase de la infección en la que haya sido tomada la muestra. El ensayo RT-qPCR y el aislamiento viral se restringen a la viremia en la fase aguda, mientras que la detección de inmunoglobulinas se restringe a la fase aguda y posteriores ^{30,33,39,40,47,69}.

3.7 Sistemas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos

Los sistemas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos se llevan a cabo a una temperatura constante, y se caracterizan por ser procesos simples, rápidos y que eliminan la necesidad de equipo especializado. Algunos ejemplos de estos ensayos son la amplificación mediada por transcripción (TMA), la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), la amplificación de círculo rodante (RCA), la amplificación isotérmica de desplazamiento múltiple (IMDA) y la amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP) ⁷³⁻⁷⁵. De los métodos anteriormente mencionados el ensayo LAMP destaca por la posibilidad de detectar los productos de amplificación de manera cualitativa a través de colorimetría, fluorescencia y turbidez ^{75,76}.

Ensayo de amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP)

En el 2000 Notomi, *et al.* desarrollaron el método LAMP ⁷⁷ el cual ha sido propuesto ampliamente para su uso en sitios de atención primaria, para pruebas genéticas en lugares con recursos limitados y para pruebas rápidas de muestras medioambientales y alimenticias ⁷⁸⁻⁸². Es un método que ha sido descrito como rápido, ya que es posible obtener resultados en >90 min ^{78,81,83}; de alta sensibilidad y alta especificidad, comparables con las obtenidas por el qPCR ^{81,83-85}; de bajo costo, ya que para su realización se requiere únicamente de una fuente de calor, como una plancha térmica, para llevar a la reacción a una temperatura

isotérmica ^{78,81,83}; y con la cualidad de que no es afectado por inhibidores como sangre, orina y anticoagulantes ^{81,86,87}.

El principio del ensayo de LAMP es la síntesis de una gran cantidad de productos de amplificación de ácidos nucleicos, mediante desplazamiento de cadena y la generación de una asa de amplificación ⁷⁷⁻⁷⁹.

Los primers del LAMP tienen características diferentes a los usados de forma convencional en el PCR: consisten en dos a tres pares de primers diseñados a partir de seis u ocho regiones distintas del genoma de interés, los cuales son llamados primers externos (F3 y B3), primers internos (FIP y BIP) y primers del asa o loop (FL y BL). Estos últimos pueden estar o no presentes durante la reacción de amplificación ya que su uso es principalmente para aumentar la eficiencia de la reacción y disminuir el tiempo de amplificación ⁷⁷⁻⁷⁹.

Los primers externos F3 y B3, en sentido y antisentido respectivamente, son complementarios a la región F3c y B3c. Los primers internos FIP y BIP, en sentido y antisentido respectivamente, son primers con dos dominios compuestos por una región F1c/B1c complementaria a la región F1/B1, un espaciador de timina, y una región F2/B2 complementaria a la región F2c/B2c. Durante la reacción únicamente se alinea en la secuencia blanco la región F2/B2 de los primers (Figura 8) ^{73,79,80}.

Un tercer par de primers llamados FL y BL pueden ser incluidos para aumentar la cantidad de puntos de partida de amplificación, los cuales reconocen secuencias

entre F1/B1 y F2/B2 en el asa que se forma durante la reacción de LAMP (Figura 9) ^{79,88}.

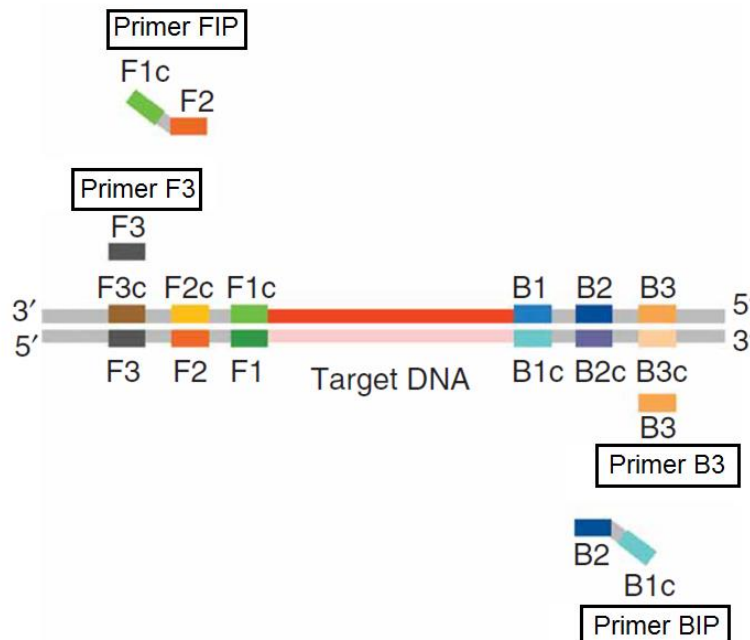


Figura 8. Primers de la reacción de amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP). Regiones sentido y antisentido para el diseño de los primers de LAMP. En recuadros negros se muestra el nombre de los primers, en colores se muestran las regiones de hibridación de los primers internos (FIP y BIP) y primers externos (F3 y B3). Modificado de Tomita et al., 2008.

La DNA polimerasa usada en esta reacción es llamada *Bst* polimerasa (*Bst*), la cual proviene de la bacteria *Bacillus stearothermophilus*, posee actividad helicasa, exonucleasa 5'-3', carece de actividad de corrección 3'-5' y usa como templado DNA. La temperatura óptima en la que trabaja la *Bst* es 60°-65°C y pierde su estabilidad térmica a temperaturas mayores a 70° C ^{77,79,82}. Actualmente existen en el mercado mutantes de la enzima *Bst* las cuales han sido diseñadas con el propósito de aumentar su temperatura óptima de trabajo a 60°C – 70°C ^{89,90} y

también para aumentar su capacidad de transcriptasa reversa, por lo que su uso permite amplificar con eficiencia RNA ^{89,91}.

La reacción de amplificación del ensayo LAMP, se lleva a cabo en tres fases: la fase no cíclica, la fase cíclica y la fase de elongación. En la fase no cíclica se utilizan los primers internos y externos; en la fase cíclica y en la fase de elongación se usan los primers internos y los del loop ^{92,93}. Debido a esto, los primers de externos están en concentraciones menores a comparación de los primers internos y los del loop ⁹⁴. En la fase de elongación se completan las dobles cadenas obteniendo productos largos.

A continuación se describe la reacción de LAMP a partir de una sola hebra de DNA. En la fase no cíclica (Figura 9A), la secuencia F2 de FIP, se alinea con su secuencia blanco mientras que la región F1c de FIP no es capaz de alinearse; a partir de FIP se sintetiza una primera cadena. En el espacio libre entre su secuencia blanco y la secuencia de F1c de FIP, el primer externo F3 puede alinearse y se sintetiza una segunda cadena a partir de F3. La síntesis de la segunda cadena provoca el desplazamiento de la cadena sintetizada a partir de FIP. La cadena desplazada tiene en su extremo 5' la secuencia F1c de FIP por lo que por complementariedad de bases la secuencia de F1c se une a la región F1, formando un primer bucle o asa. En el extremo 3', ocurre el mismo proceso con los primers BIP y B3. Como resultado, la cadena generada es una secuencia con extremos que contienen la secuencia F1 y B1, complementarias a las secuencias internas F1c y B1c, por lo que se forma una estructura de doble asa.

En la segunda fase (Figura 9B), a partir de la estructura de doble asa se producen de forma cíclica estructuras de doble asa con los extremos F1 y B1 complementarios a las regiones internas del templado (F1c y B1c); los primers involucrados en este proceso son FIP y BIP^{80,92,93,95}. Los primers del loop, FL y BL, son capaces de hibridarse en las estructuras de doble asa. Durante esta fase también se forman estructuras intermedias de una asa que son el templado para la fase de elongación^{80,92,93,95}.

En la fase de elongación (Figura 9C), a partir de la hibridación de los primers FIP, BIP, FL y BL en las estructuras intermedias de una asa, se forman estructuras de varios tamaños que consisten en repeticiones invertidas de la secuencia objetivo en la misma hebra^{78,80,95}.

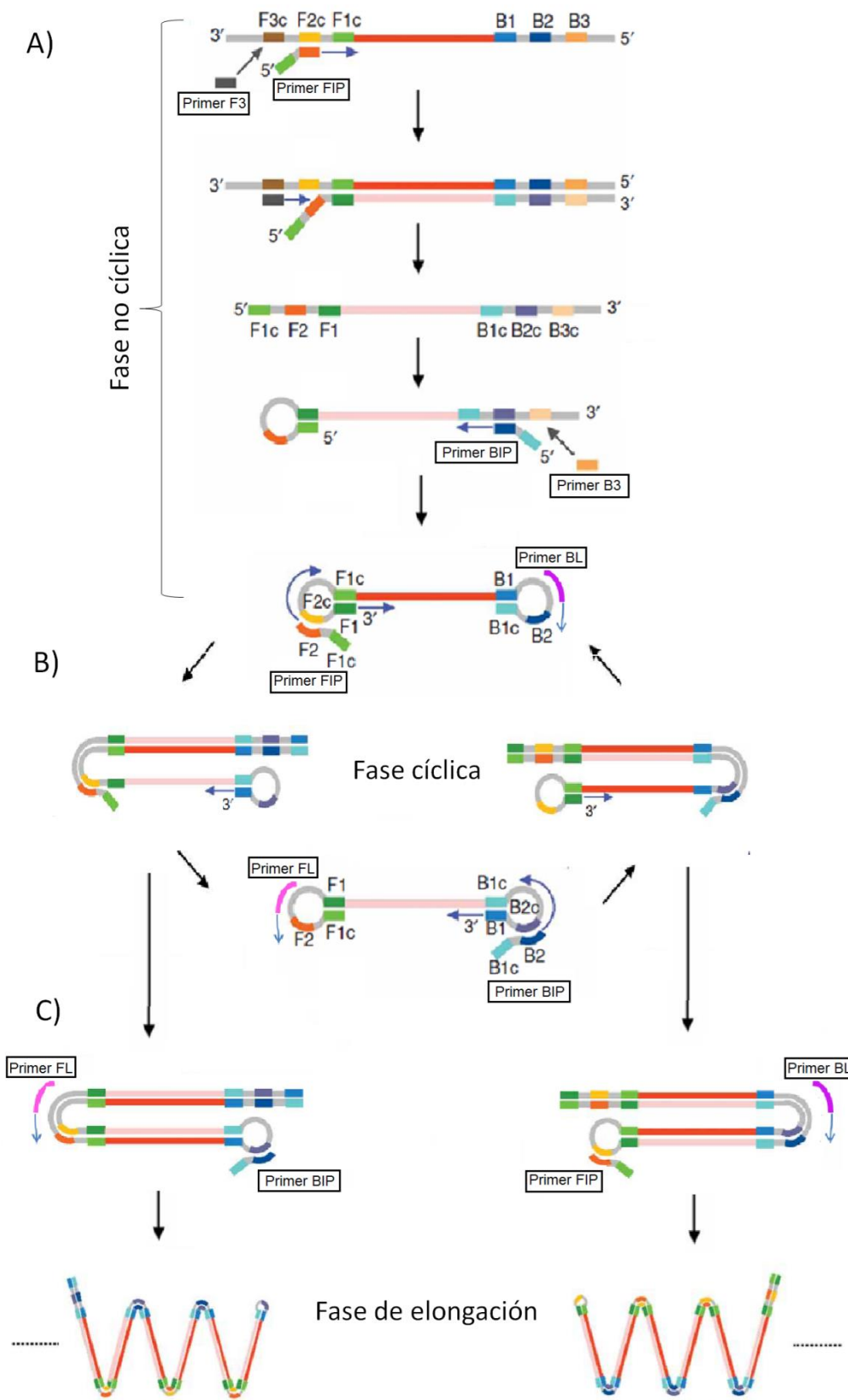


Figura 9. Reacción de amplificación del ensayo LAMP. Fases de la reacción de amplificación del ensayo LAMP. A) Fase no cíclica en la que se produce la estructura de doble asa. B) Fase cíclica de producción de estructuras de doble asa. C) Fase de elongación de LAMP. En recuadros negros se muestra el nombre de los primers, en colores se muestran las regiones de hibridación de los primers internos (FIP y BIP), primers externos (F3 y B3) y primers del loop (FL y BL), y con una flecha azul el extremo 3' de las asas. Modificado de Tomita et al., 2008.

Detección de productos de los ensayos LAMP

El ensayo de LAMP tiene diversos métodos de detección de productos (Figura 10); uno de ellos es por electroforesis en geles de agarosa en el que se observan múltiples bandas formando una escalinata o barrido que corresponde a los productos de tallo y asa con tamaño y complejidad diferente. Otros métodos de detección de productos son por fluorescencia y colorimetría ^{78,79}.

El método por fluorescencia consiste en la detección de productos mediante calceína la cual actúa como quelante de iones de Mg^{2+} . Durante la reacción de polimerización de DNA, los iones de Mg^{2+} del medio de la reacción entran en contacto con el compuesto calceína- Mn^{2+} , sustituyendo a los iones de Mn^{2+} en el compuesto de calceína, aumentando la concentración de iones libres de Mn^{2+} y disminuyendo los iones Mg^{2+} . Como resultado, la calceína emite fluorescencia bajo la luz UV y se observa un viraje de color naranja a verde ⁹⁶⁻⁹⁸.

El método colorimétrico consiste en la determinación de productos mediante el viraje de color de la reacción debido al uso de compuestos sensibles al cambio de pH; por ejemplo, se ha utilizado el rojo de fenol el cual vira de color a pH 6.8. En la reacción de LAMP, durante la polimerización de la cadena nascente de DNA, es

liberado pirofosfato y protones (H^+), provocando la acidificación de la reacción, el rojo de fenol vira de color rojo a amarillo con esta caída del pH ^{97,99}.

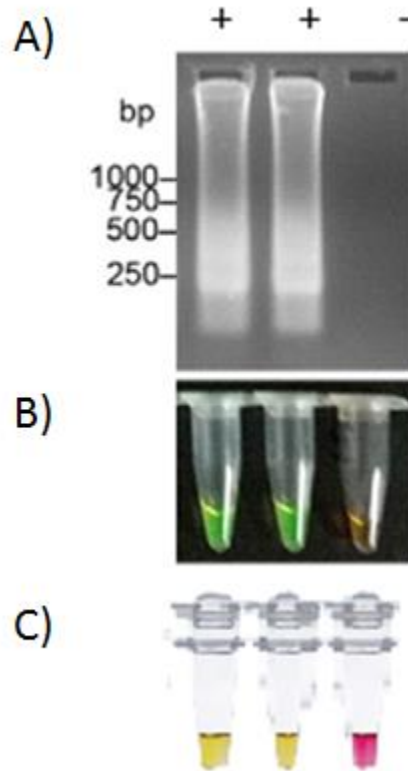


Figura 10. Sistemas de detección de productos de LAMP. A) Visualización de productos por gel de agarosa, B) Visualización de productos por método colorimétrico y de fluorescencia con calceína. Modificado de Wu *et al.*, 2018. C) Visualización de productos por método colorimétrico con rojo de fenol. Modificado de New England BioLabs Inc., 2021.

4. Antecedentes

El CHIKV fue aislado por primera vez en Tanzania en 1952, se ha dispersado a lo largo de cuatro continentes provocando brotes en África, Asia, Europa y América^{39,45}. En México el primer caso importado de CHIKV fue reportado en junio del 2014, mientras que el primer caso autóctono fue reportado en septiembre del mismo año, con un total de 222 casos confirmados al finalizar el 2014. Para el 2015 se registraron 12,588 casos confirmados en 28 estados de México. En el 2016 se reportaron 759 casos, y se observó una tendencia descendente de los casos¹⁰⁰. En el 2018, se confirmaron 39 casos en 11 entidades federativas¹⁰¹.

El virus de MAYV, aislado por primera vez en Trinidad y Tobago en 1954, se ha expandido por América del Sur, sin embargo, hay evidencia que apunta que es un virus circulante desde 1904 y 1914. Posterior al primer caso confirmado se han reportado casos en Brasil, Colombia, Bolivia, Surinam, Perú, Estados Unidos de América (casos importados de Perú y Bolivia), Ecuador, Guayana Francesa, Venezuela, Panamá, México y Haití. El brote más reciente fue en el 2018 en Perú, con 35 casos, sin embargo, se han reportado más casos dispersos a lo largo del país. En el año 2006 en México, Navarrete-Espinosa *et al.*, realizaron un estudio retrospectivo en el cual encontraron anticuerpos específicos a MAYV en dos posibles casos¹⁰². Debido a la amplia distribución de los vectores de MAYV en México, es muy probable que los casos en nuestro país aumenten de forma paulatina, por lo que es de suma importancia el establecimiento de un sistema de diagnóstico adecuado que permita de detectar la circulación del virus, monitoreo de la diseminación geográfica y monitoreo de los linajes circulantes, que en

conjunto con el monitoreo de otros arbovirus, permitirían detectar y prevenir brotes con magnitudes epidemiológicas ⁴⁰.

5. Justificación

CHIKV y MAYV son virus que se mantienen en ciclos de transmisión selváticos, rurales y urbanos debido a la distribución de sus vectores por lo cual potencialmente se puede presentar brotes en sitios que carecen de la infraestructura necesaria para llevar a cabo ensayos de diagnóstico, siendo de vital importancia generar ensayos capaces de realizarse en los sitios de atención primaria.

El ensayo LAMP es una técnica sensible y específica, ampliamente propuesta para la detección de patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* ^{79,103}, Zika ^{104–107}, Dengue ^{108,109} y chikungunya ^{109–111}. Actualmente no se cuenta con un ensayo LAMP CHIKV con detección de productos usando colorimetría que contemple, para el diseño de sus primers, las secuencias de aislados mexicanos. Por otra parte, no se ha reportado la estandarización de ensayos de LAMP para la detección de MAYV.

El ensayo LAMP requiere de poca infraestructura, es sensible, específico y provee resultados fáciles de interpretar como cambio de color ⁷⁹, por lo que podría emplearse para el diagnóstico de CHIKV y MAYV en sitios de atención primaria.

6. Objetivo

Establecer dos sistemas de detección del genoma de los virus chikungunya y Mayaro mediante la técnica de LAMP.

Objetivos particulares

- Establecer un ensayo de LAMP para la detección del virus chikungunya acoplado a la detección de productos mediante colorimetría.
- Establecer un ensayo de LAMP para la detección del virus Mayaro acoplado a la detección de productos mediante colorimetría.

7. Metodología

7.1 Material biológico

Para la obtención del control positivo de CHIKV se hizo uso del RNA del aislado de CHIKV (CHIK033). Para la obtención del control positivo de MAYV se hizo uso del plásmido pUCIDIT-AMP MAY DUO donado por el Dr. Edgar Sevilla del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

Como controles de especificidad se usaron de RNAs de Dengue serotipo 2 (DENV-2) y Zika (ZIKV).

El RNA viral proviene de sobrenadantes de cultivos de células Vero infectadas por 3-5 días con CHIKV, DENV y ZIKV.

7.2 Diseño de primers para LAMP CHIKV y MAYV

CHIKV

Para el diseño de los primers del ensayo de LAMP CHIKV se obtuvo una secuencia consenso de una región conservada del gen nsP1, para ello se descargaron las 635 secuencias disponibles de genomas completos de CHIKV en el Gen Bank de NCBI, de las cuales se tomó una muestra aleatoria de 100 secuencias, haciendo uso del script reformat.sh de BBTools V 38.84 ¹¹² para Ubuntu. Adicionalmente se utilizaron 9 secuencias que corresponden a los aislados mexicanos: KT327167.2, KT327166.2, KT327165.2, KT327163.2, KT327164.1 ¹¹³, KP851710.1, KP851709.1 ¹¹⁴, MG921596.1 ¹¹⁵ y la secuencia de referencia NC_004162.2 (genotipo Africano) ¹¹⁶.

Las 109 secuencias seleccionadas fueron alineadas por MUSCLE en el software MEGA X ¹¹⁷, en conjunto con 10 secuencias parciales del gen nsP1 (LC461588.1, EF538884.1, EU188923.1, AF394212.1, AM396995.1, DQ489788.1, EF538889.1, EF538888.1, HQ225610.1 y KF543374.1) para identificar el gen nsP1 en el genoma viral. A partir del alineamiento de las secuencias del gen de nsP1 de CHIKV, se obtuvo una secuencia consenso con la función “cons” del software EMBOSS ¹¹⁸.

La secuencia consenso se utilizó para el diseño de los sets de primers de LAMP (FIP, BIP, F3, B3, FL, BL) en el software PrimerExplorer V.5 (Eiken Chemical Co. LTD, Tokyo, Japón, <http://primerexplorer.jp/e>).

Se usaron los siguientes parámetros para el diseño de los primers: contenido de GC de 40-60%, longitud de los primers de 15-25 nt, temperatura de alineación (T_m) de 59-66°C, la diferencias entre la T_m de los primers del set <5°C (Tabla 1). También se consideró que los valores de ΔG de la estabilidad del extremo 3' y 5' fueran menores a -4 y que los valores de ΔG para la formación de dímeros fueran mayores a -2.50 ^{80,119}.

Las distancias entre las regiones que reconocen los primers deben de cumplir las características mostradas en la Figura 11.

Tabla 1. Longitud y Tm considerada para el diseño de primers de LAMP

Primer	Longitud (pb)	Tm (°C)
F3/B3	18-20	64-66
F2/B2	18-20	59-61
F1c/B1c	20-22	59-61
FL/BL	15-22	60-66

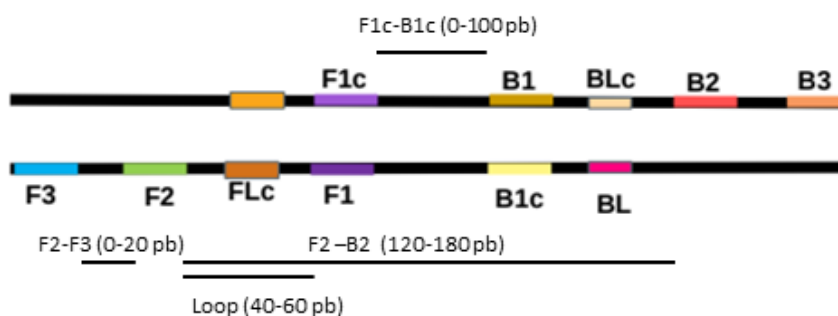


Figura 11. Distancias para el diseño de primers de LAMP.

Para mejorar la formación de la estructura de asa, se agregó un espaciador de cuatro timinas (poly T linker) entre la secuencia F2 y F1c del primer FIP; y entre B2 y B1c del primer BIP ¹¹⁹. Otro parámetro a contemplar para el diseño de los primers es la longitud del asa de amplificación la cual debe ser menor o igual a 280pb^{78,79,119}.

A partir del set de primers generado se diseñaron primer Loop (FL y BL) en el Software PrimerExplorer V5, contemplando las características antes mencionadas.

Por último, se analizó la especificidad *in silico* de los primers mediante su análisis en el software BLAST de NCBI ¹²⁰.

MAYV

Para el diseño de primers de LAMP MAYV se utilizaron las 39 secuencias de genomas completos de MAYV disponibles en GeneBank (NCBI) y la secuencia DQ138320.1 de nsP1 de MAYV para identificar la secuencia de nsP1 en el genoma completo. Las secuencias seleccionadas fueron alineadas por MUSCLE en el software MEGA X ¹¹⁷ y el alineamiento fue editado manualmente para obtener 39 secuencias del gen de nsP1 de MAYV, a partir de ellas se obtuvo una secuencia consenso de nsP1 con la función “cons” del software EMBOSS ¹¹⁸.

Sin embargo, debido a que en México no hay disponibilidad de aislados de MAYV a causa de que no ha sido detectado en circulación, era necesario que se sintetizara la región del gen nsP1 de MAYV a la cual están dirigidos los primers de LAMP. El Dr. Edgar Sevilla del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” amablemente nos proporcionó el plásmido pUCIDIT-AMP MAY DUO el cual tiene insertado una región de 200pb que abarca aproximadamente de la base 535 a la 717 del gen nsP1 de MAYV (Figura 12). La secuencia consenso previamente obtenida tiene una longitud de 381 pb, la cual contiene la misma secuencia de 200pb del plásmido pUCIDIT-AMP MAY DUO, por lo que se optó por diseñar el set de primers del LAMP MAYV a partir de la secuencia de 200pb del gen nsP1 del plásmido. Se tomaron en cuenta las características antes mencionadas para su diseño.

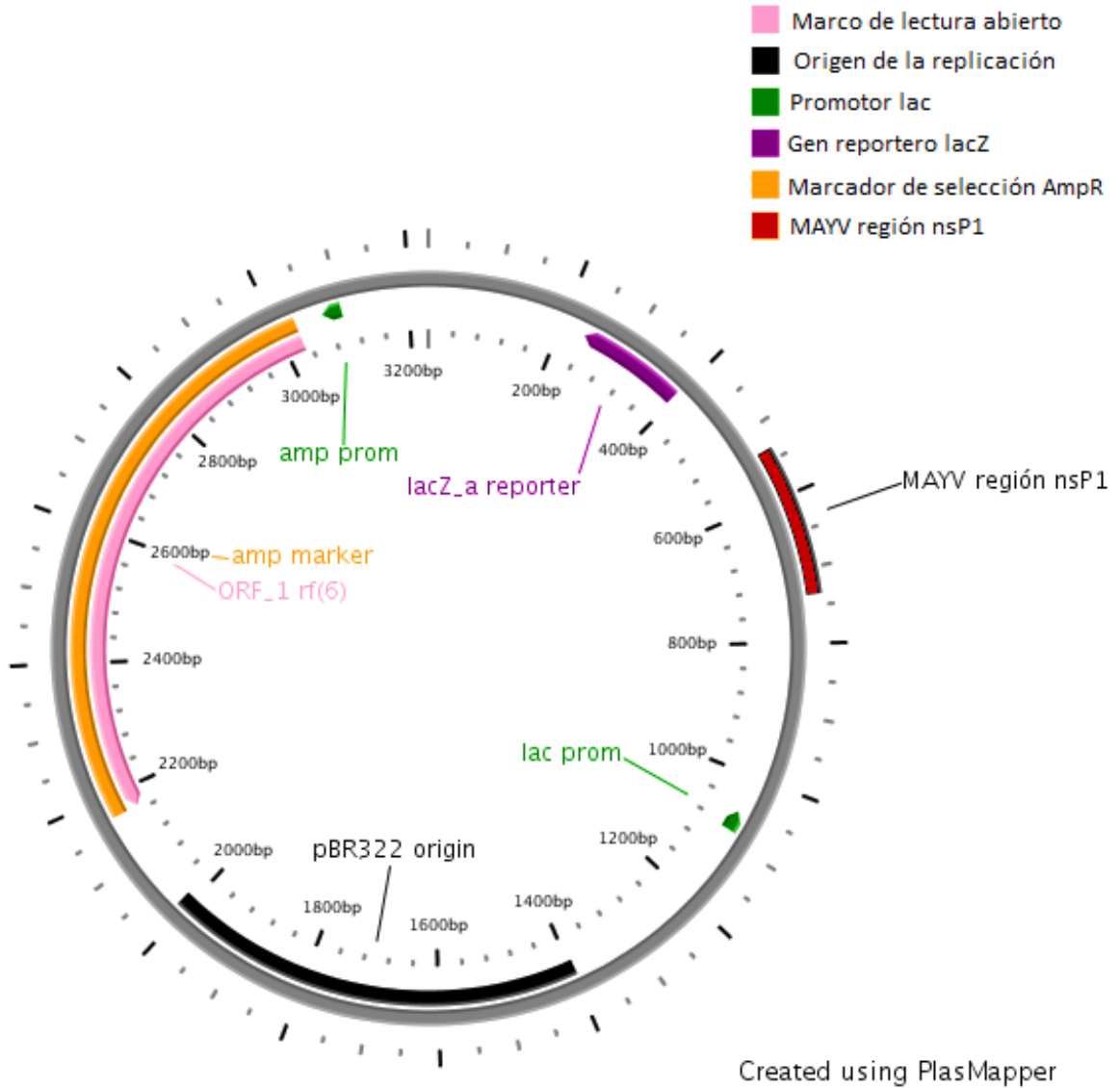


Figura 12. Plásmido pUCIDIT-AMP MAY DUO. Plásmido de clonación con una región de 200 pb del gen nsP1 de MAYV. Graficado en PlasMapper Version 2.0 <http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/>¹²¹.

7.3 Extracción de RNA

La extracción del RNA viral de CHIKV, DENV y ZIKV, se realizó con el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), siguiendo las especificaciones del proveedor. El RNA fue cuantificado mediante espectrometría a 260 nm en NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y alicuotado para su almacenamiento a -80 °C, hasta su uso.

7.4 Obtención de controles positivos para LAMP CHIKV y MAYV

CHIKV

Para evaluar posibles falsos negativos y optimizar el uso del RNA de CHIKV se obtuvieron controles positivos que consistían en cDNA (DNA complementario) producto de reacciones de RT-PCR usando los primers CHIKV-F3, CHIKV-B3 y RNA del aislado CHIK033. Se empleó el kit SuperScript One-Step RT-PCR (Invitrogen™) modificando el protocolo del proveedor. La mezcla de reacción contenía: 3.13 µL Buffer 2X (0.4 mM de cada dNTP y 2.4 mM de MgSO₄), 0.125 µL de SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix y 0.125 µL de los primers CHIKV-F3 y CHIKV-B3 (10 µM), se empleó 0.3 µL del RNA de CHIKV y se llevó a un volumen final 6.25 µL con agua. Como control negativo se usó agua desionizada. Las condiciones en el termociclador (Biometra) fueron las siguientes: un paso de retrotranscripción de 30 minutos a 50°C, un ciclo de pre-desnaturalización de 2 minutos a 94°C, 40 ciclos de (20 segundos a 94°C, 20 segundos a 60°C, 20 segundos a 72°C) y un paso de extensión final de 5 minutos a 72°C. A partir de estas reacciones se obtuvo un fragmento de cDNA de doble cadena de

aproximadamente 196 pb que fue precipitado con etanol (EtOH). Los productos de PCR fueron llevados a un volumen de 36 μL con H_2O y se completó con EtOH 95% hasta un volumen final de 100 μL , se incubó por 15 min a temperatura ambiente, y posteriormente la mezcla fue centrifugada a 10,035 g por 20 minutos, decantando el sobrenadante. En el mismo tubo, se agregaron 250 μL de EtOH 70% y se centrifugó por 10 min a 10,035 g, decantando el sobrenadante. Los productos fueron secados con rotación por 10 minutos a 45°C para ser resuspendidos en 20 μL H_2O e incubados en agitación por 10 min a 60°C. Por último, el control positivo fue cuantificado mediante espectrometría a 260 nm en NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y almacenado a 4°C, hasta su uso.

MAYV

Para la obtención del control positivo de MAYV se utilizó el plásmido pUCIDIT-AMP MAY DUO. Para ello, se realizó la amplificación por PCR de punto final del fragmento del gen nsP1 del plásmido pUCIDIT-AMP MAY DUO haciendo uso de los primers MAYV-F3 y MAYV-B3. La mezcla de reacción de PCR de punto final contenía: 2.5 μL de Ex Taq Buffer 2X (4 mM Mg^{2+}), 0.25 μL TaKaRa Ex Taq HS (1.25 U/25 μL) (Takara Bio USA, Inc.), 2 μL de dNTP Mixture 2X (0.4 mM de cada dNTP) y 0.5 μL de los primers MAYV-F3 y MAYV-B3 (10 μM), se empleó 3 μL del plásmido pUCIDIT-AMP MAY DUO y se llevó la reacción a un volumen final 25 μL con agua. Las condiciones en el termociclador (Biometra) fueron las siguientes: un paso de desnaturalización del anticuerpo unido a la enzima TaKaRa Ex Taq HS (Takara Bio USA, Inc.) de 1 minuto a 98°C, 40 ciclos de (10 segundos a 98°C, 30

segundos a 69°C, 20 segundos a 72°C) y un paso de extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos fueron purificados por gel de agarosa al 2% con el kit de purificación FavorPrep GEL/PCR Purification kit (Favorgen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Por último, los productos fueron cuantificados mediante espectrometría a 260 nm en NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y almacenados a 4 °C, hasta su uso.

7.5 Estandarización del LAMP CHIKV y MAYV acoplado a detección de productos por colorimetría

Para la estandarización de los ensayos LAMP CHIKV y LAMP MAYV, se hizo uso del WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (BioLab) que contiene *Bst* 2.0 WarmStart DNA Polymerase, WarmStart RT, dNTPs, MgSO₄ y rojo de fenol, se realizaron ensayos modificando la concentración de primers, temperatura y tiempo de amplificación. Para la determinación de la concentración de los primers se realizaron reacciones de LAMP con las concentraciones iniciales recomendadas por el proveedor (Biolab)⁹⁴ para los primers externos y del loop (0.2 μM y 0.4 μM, respectivamente) y 1 μM de primers internos. A partir de estas condiciones se realizaron reacciones modificando la concentración de cada uno de los primers como lo muestra la Tabla 2. Las reacciones se realizaron con 1 μL de control positivo (CHIKV, 2.1X10⁻² ng/μL (1x10⁸ copias/ μL); MAYV, 2.16x10⁻⁵ ng/μL (1x10⁵ copias/ μL)), en un volumen final de 6.25 μL a 65°C. El tiempo de la reacción inicial para la estandarización dependió de la presencia o ausencia de primers del loop (FL y BL) en el set de primers; si el set contenía únicamente primers internos (FIP

y BIP) y externos (F3 y B3), el tiempo inicial de la estandarización fue de 1 h, en el caso de que el set de primers contuviera primers internos (FIP y BIP), externos (F3 y B3) y primers del loop (FL y BL) el tiempo inicial de la estandarización fue de 30 minutos. Por último, todas las reacciones se llevaron a 80° C por 5 minutos.

Tabla 2 Concentraciones de primers del ensayo LAMP

Primer	Concentraciones probadas (μM)
Primers externos (F3/B3)	0.2, 0.4, 0.6 y 0.8
Primers internos (FIP/BIP)	0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6 y 1.8
Primers loop (FL/BL)	0.4, 0.6, 0.7, 0.8 y 1

Para determinar la temperatura óptima de la reacción se realizaron gradientes de temperatura entre 60°C – 70°C. Para determinar el tiempo óptimo de la reacción se realizaron reacciones con 15 min, 30 min, 45 min y 60 minutos de amplificación¹²². Todas las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador T-Gradient (Biometra).

Para la detección de los productos de LAMP, se usaron los métodos de electroforesis en gel de agarosa y colorimetría por rojo de fenol. Para la detección de los productos de LAMP por gel de agarosa, los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 2% por 30 minutos a 100 V (Miupid-exU) teñido

con 0.9 μ L HydraGreen™. En el transiluminador de luz UV Benchtop 2UV (UVP) se observó la presencia y/o ausencia de la escalera de productos, característicos de la reacción ¹⁰³.

Debido al uso del reactivo WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (BioLab) que contiene rojo de fenol (además de *Bst* 2.0 WarmStart DNA Polymerase, WarmStart RT, dNTPs, MgSO₄), la detección de los productos de LAMP por colorimetría se observó con el viraje de color rojo a amarillo brillante cuando el resultado fuera positivo ⁹⁹.

A partir de los resultados por ambos métodos de detección de productos se decidieron las condiciones óptimas del ensayo LAMP CHIKV y LAMP MAYV.

Se determinó la condición óptima mediante los siguientes criterios: 1) se seleccionaron las condiciones de la reacción en la que se observara en el gel de agarosa la escalinata de productos más definida e intensa, lo cual es proporcional a una mayor cantidad de productos generados en la reacción; 2) en el gel de agarosa no deben observarse amplificaciones inespecíficas en los controles negativos de las reacciones con las condiciones elegidas y 3) la condición óptima se elegirá cuando el resultado colorimétrico vire a un color amarillo brillante, sobre un amarillo mostaza o naranja ya que estos dos últimos podrían causar confusión al momento de interpretar un resultado cualitativo por colorimetría de rojo de fenol.

7.6 Cálculo de concentración de copias en los ensayos LAMP CHIKV y LAMP MAYV

Mediante la calculadora en línea de copias de dsDNA/ μ L de SciencePrimer ¹²³ se realizó el cálculo del equivalente de copias/ μ L de los controles positivos. A partir de los datos obtenidos se llevó a los controles positivos a la concentración 1×10^{10} copias/ μ L y se realizaron 9 diluciones seriadas con factor 10. Con las diluciones se realizaron reacciones por duplicado de LAMP CHIKV y LAMP MAYV, se determinó si se observaba viraje de color de rojo a amarillo brillante en el formato de detección colorimétrica y los resultados fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa. Se realizó el cálculo de ng/ μ L de cada dilución de los controles positivos así como su equivalencia de copias de DNA.

7.7 Determinación de la especificidad analítica del LAMP CHIKV y MAYV

La especificidad *in vitro* de los ensayos LAMP CHIKV y MAYV, se determinó mediante dos métodos. El primero consistió en reacciones LAMP CHIKV y LAMP MAYV en las que se intercambiaron los controles positivos de CHIKV y MAYV. El segundo mediante reacciones del LAMP CHIKV y LAMP MAYV usando RNA de CHIKV, RNA de DENV-2 y ZIKV.

8. Resultados

8.1 Diseño de primers para LAMP CHIKV y LAMP MAYV

Diseño de primers del ensayo LAMP CHIKV

Para el diseño de los primers de LAMP CHIKV primero se obtuvo la secuencia consenso de un fragmento del gen nsP1 de CHIKV a partir de los alineamientos de 109 genomas completos de CHIKV, (Tabla 3). Como resultado se obtuvo una secuencia consenso con una longitud de 530 pb, con un 51.3% de contenido de GC.

Tabla 3. Secuencia consenso del fragmento del gen nsP1 de CHIKV

Virus	Secuencia
CHIKV	AAATTGATCCCGACTCAACCATCCTGGATATAGGTAGTGCGCCAGCAAGGAGGATG ATGTCGGACAGGAAGTACCACTGCGTTTGCCCGATGCGCAGCGCAGAAGATCCCG AGAGACTCGCTAATTATGCGAGAAAGCTCGCATCTGCCGCAGGAAAAGTCCTGGAC AGAAACATTTCTGGAAAGATCGGGGACTTACAAGAGGTGATGGCCGTGCCAGACAC GGAGACGCCAACATTTTGCTTACACACAGATGTCTCATGTAGACAGAGAGCAGACG TCGCGATATACCAAGACGTCTATGCTGTACATGCACCCACGTCGCTATATCACCAG GCGATTAAGGAGTCCGAGTGGCGTACTGGGTAGGGTTTCGACACAACCCCGTTCAT GTACAACGCTATGGCGGGTGCCTACCCCTCATACTCGACAAATTGGGCGGATGAGC AGGTAAGGCTAAGAACATAGGATTATGTTCAACAGACCTGACAGAAGGTAGA CGAGGCAAATTGTCTATCATGAGAGGG

En el software Primer Explorer se generaron 5 sets de primers para LAMP, dirigidos a la secuencia consenso de nsP1 de CHIKV (Tabla Suplementaria 1)

Para el LAMP CHIKV se eligió el set 3, ya que cumple con las características adecuadas para optimizar la reacción de LAMP, contemplando el tamaño del primer, la Tm, y el valor de ΔG de formación de dímeros y de estabilidad del

extremo 3', de acuerdo con lo establecido en la metodología (Tabla 4). A los primers FIP y BIP se les agregó un espaciador de cuatro timinas, entre la secuencia F2/B2 y F1c/B1c. El software no generó primers Loop para el set 3 de CHIKV (Tabla 4). En la Figura 13 se muestra un diagrama de la unión del set 3 en su secuencia blanco.

La especificidad *in silico* de los primers es LAMP CHIKV fue alta, ya que al analizar los primers de CHIKV en el software BLAST (NCBI) únicamente se alinearon con secuencias de CHIKV. Nos cercioramos de que los primers no se alinearan con genes o regiones cromosómicas de humanos.

Los primers fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies) con purificación por HPLC y PAGE.

Tabla 4. Set de primers de LAMP para nsP1 de CHIKV.

Nombre	Región	5'pos	3'pos	Longitud	Tm	Tasa GC	Secuencia	
CHIKV nsP1	F3	187	205	19	59.16	0.53	TCGGGGACTTACAAGAGGT	
	B3	365	383	19	59.32	0.58	GGTTGTGTCTGAACCCTACC	
	FIP			44			CGCGACGTCTGCTCTCTGTCTA-TTTT-ACACGGAGACGCCAACAT	
	BIP			44			TATGCTGTACATGCACCCACGT-TTTT-AGTACGCCACTCGGACTC	
	F2	220	237	18	60.92	0.56	ACACGGAGACGCCAACAT	
	F1c	263	284	22	65.47	0.59	CGCGACGTCTGCTCTCTGTCTA	
	B2	346	363	18	59.94	0.61	AGTACGCCACTCGGACTC	
	B1c	300	321	22	64.11	0.5	TATGCTGTACATGCACCCACGT	
	Primers							
		Nombre		Longitud	Secuencia			
	F3		19	TCGGGGACTTACAAGAGGT				
	B3		19	GGTTGTGTCTGAACCCTACC				
	FIP		44	CGCGACGTCTGCTCTCTGTCTA-TTTT-ACACGGAGACGCCAACAT				
	BIP		44	TATGCTGTACATGCACCCACGT-TTTT-AGTACGCCACTCGGACTC				

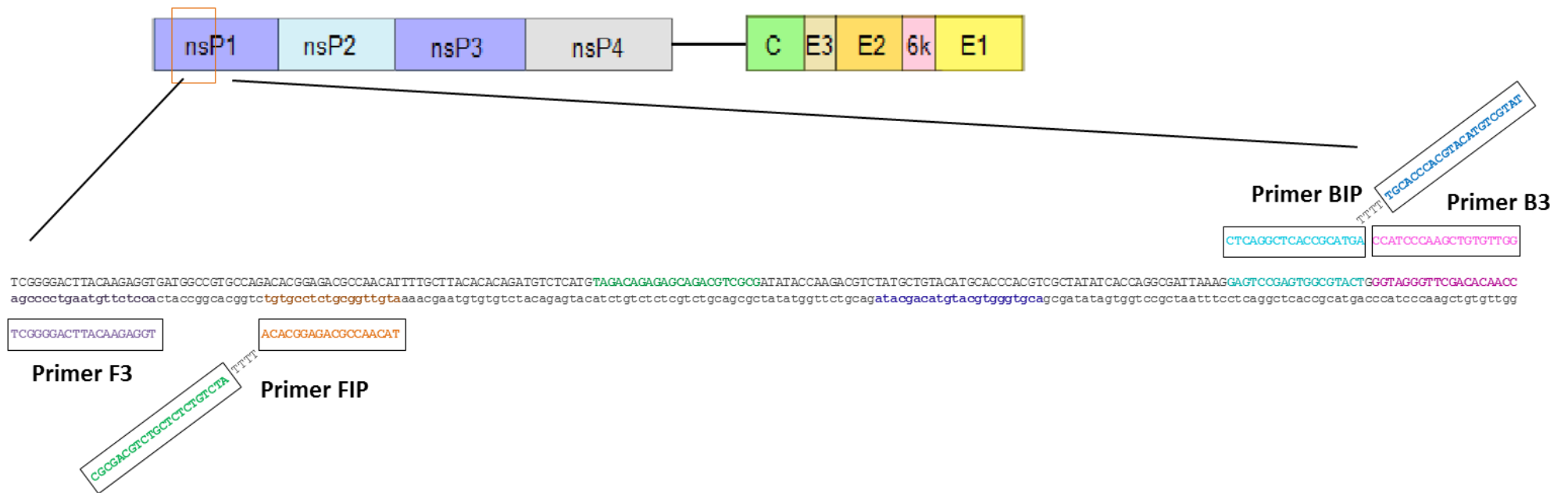


Figura 13. Set 3 de primers del LAMP CHIKV. Se muestra un diagrama donde se observan los primers del set 3 del LAMP CHIKV y el alineamiento de estos en la secuencia blanco. En recuadros se observa la secuencia de los primers internos y externos, en el caso del primer FIP y BIP la región F2/B2 está unida por un separador de timinas (TTTT) a la región F1c/B1c. Primer F3 (morado); Primer FIP región F2 (naranja), región F1c (verde); Primer B3 (rosa); Primer FIP región F2 (turquesa), región F1c (azul rey). Secuencia de los primers (colores claros), secuencia blanco de los primers (colores oscuros).

Diseño de primers del ensayo LAMP MAYV

Para el diseño de los primers de MAYV se hizo uso de la secuencia de la región de nsP1 de MAYV del plásmido pUCIDIT -AMP MAY DUO que tiene una longitud de 200 pb, con 51.5% de contenido GC (Tabla 5).

Tabla 5 Secuencia del fragmento del gen nsP1 de MAYV

Virus	Secuencia
MAYV	CACTCATCCTGGATATCGGCAGTGCGCCTGCCAGGAGAATGCTGTCTGAGCACAC GTACCATTGTGTGTGCCAATGCGCAGCGCTGAGGACCCAGAGCGTCTGCTGTATT ATGCCAGGAAGTTGGCCAAGGCATCAGGCGAAGTCGTTGACAGAAACATTGCAGC GAAGATAGACGACCTGCAGTCAGTGATGGCGACC

En el software Primer Explorer se generaron 3 sets de primers (Tabla Suplementaria 1), de los cuales se eligió el set 1 de MAYV ya que cumple con las características adecuadas para optimizar la reacción de LAMP, contemplando el tamaño del primer, la T_m , y el valor de ΔG de formación de dímeros y de estabilidad del extremo 3'. A los primers FIP y BIP se les agregó un espaciador de cuatro timinas, entre la secuencia F2/B2 y F1c/B1c. Por último, se generó el set de primers de Loop contemplando las características previamente mencionadas (Tabla 6 y Figura 14). Los primers fueron analizados en el software BLAST para determinar su especificidad *in silico*.

La especificidad esperada de los primers es alta, ya que no se alinearon con ninguna secuencia de patógenos virales humanos independientes de MAYV ni con genes o regiones cromosómicas de humanos.

Los primers fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies) con purificación por HPLC y PAGE.

Tabla 6 . Set de primers de LAMP para nsP1 de MAYV.

Nombre	Región	5'pos	3'pos	Longitud	Tm	Tasa GC	Secuencia
MAYV nsP1	F3	1	20	20	59.20	0.55	CACTCATCCTGGATATCGGC
	B3	183	200	18	59.23	0.61	GGTCGCCATCACTGACTG
	FIP			38			GCAGACGCTCTGGGTCCTCA- TTTT- CCTGCCAGGAGAATGCTG
	BIP			42			TATGCCAGGAAGTTGGCCAAG G-TTTT- CAGGTCGTCTATCTTCGCTG
	F2	27	44	18	59.38	0.61	CCTGCCAGGAGAATGCTG
	F1c	86	105	20	65.80	0.65	GCAGACGCTCTGGGTCCTCA
	B2	163	182	20	59.24	0.55	CAGGTCGTCTATCTTCGCTG
	B1c	111	132	22	65.83	0.55	TATGCCAGGAAGTTGGCCAAG G
	FL	46	68	23	63.65	0.52	CACACAATGGTACGTGTGCTCA G
	BL	139	159	21	60.78	0.48	GCGAAGTCGTTGACAGAAACA
	Primers						
	Nombre	Longitud		Secuencia			
	F3	20		CACTCATCCTGGATATCGGC			
	B3	18		GGTCGCCATCACTGACTG			
	FIP	38		GCAGACGCTCTGGGTCCTCA-TTTT-CCTGCCAGGAGAATGCTG			
	BIP	42		TATGCCAGGAAGTTGGCCAAGG-TTTT-AGGTCGTCTATCTTCGCTG			
	FL	23		CACACAATGGTACGTGTGCTCAG			
	BL	21		GCGAAGTCGTTGACAGAAACA			

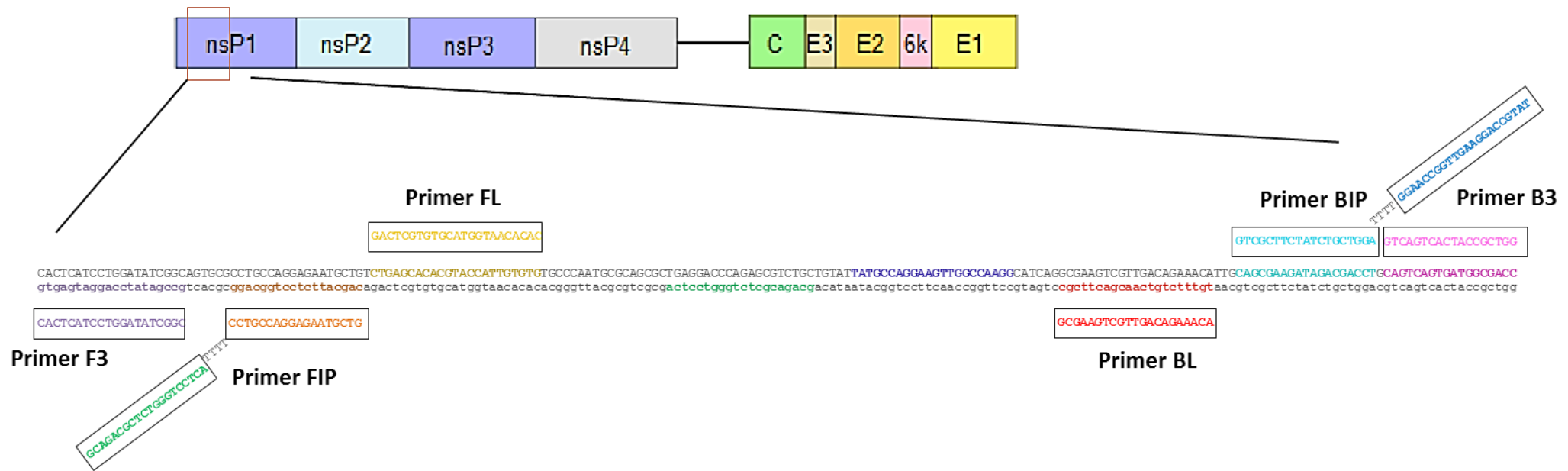


Figura 14. Set 1 de primers del LAMP MAYV. Se muestra un diagrama donde se observan los primers del set 1 del LAMP MAYV y el alineamiento de estos en la secuencia blanco. En recuadros se observa la secuencia de los primers internos y externos, en el caso del primer FIP y BIP la región F2/B2 está unida por un separador de timinas (TTTT) a la región F1c/B1c. Primer F3 (morado); Primer FIP región F2 (naranja), región F1c (verde); Primer FL (amarillo); Primer B3 (rosa); Primer FIP región F2 (turquesa), región F1c (azul rey); Primer BL (rojo). Secuencia de los primers (colores claros), secuencia blanco de los primers (colores oscuros).

8.2 Obtención de los controles positivos de CHIKV y MAYV

Control positivo de CHIKV

Con el objetivo de obtener un control positivo del ensayo de LAMP CHIKV se realizaron reacciones de RT-PCR haciendo uso de los primers CHIKV-F3 y CHIKV-B3, y como templado el RNA del aislado CHIK033. Se obtuvo un fragmento de cDNA de tamaño aproximado de 196 pb (Figura 15A) con una concentración de 5.5 ng/ μ L. Para la estandarización de los ensayos se usó una dilución de 2.1×10^{-2} ng/ μ L (1×10^8 copias/ μ L).

Control positivo MAYV

Para la obtención del control positivo de MAYV, se realizaron reacciones de PCR de punto final con los primers MAYV-F3 y MAYV-B3, y como templado el plásmido pUCIDIT-AMP MAY DUO. Se obtuvo un fragmento de cDNA de aproximadamente 200 pb (Figura 15B) con una concentración de 7.5 ng/ μ L. Para la estandarización de los ensayos se usó una dilución de 2.16×10^{-5} ng/ μ L (1×10^5 copias/ μ L).

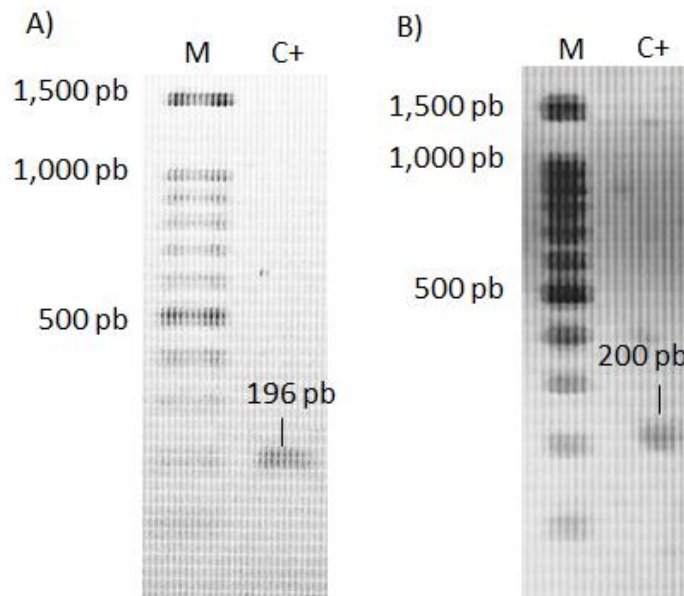


Figura 15. Controles positivos de los ensayos LAMP CHIKV y MAYV. A) Productos de RT-PCR (196 pb) empleando los primers externos de CHIKV (CHIKV-nsP1-F3 y CHIKV-nsP1-B3), el kit SuperScript One-Step RT-PCR (Invitrogen™) y RNA de CHIKV. B) Productos de PCR (200 pb) empleando los primers externos de MAYV (MAYV-nsP1-F3 y MAYV-nsP1-B3) y el plásmido pUCIDIT-AMP MAY DUO. Marcador de peso molecular (M), control positivo (C+).

8.3 Estandarización del ensayo LAMP CHIKV y LAMP MAYV

Ensayo LAMP CHIKV

La estandarización del ensayo LAMP CHIKV se inició con la determinación de la concentración óptima de los primers internos, CHIKV-FIP y CHIKV-BIP, ya que son los que se encuentran en mayor concentración en las reacciones de LAMP, para ello se probaron las concentraciones 0.8 μM , 1 μM , 1.2 μM y 1.4 μM (Figura 16). La concentración usada de los primers externos (CHIKV-F3/CHIKV-B3) fue de 0.2 μM y se usó 1 μL de control positivo (2.1×10^{-2} ng/ μL o 1×10^8 copias/ μL). Mediante la observación

de los productos en gel de agarosa, en la reacción con 1.2 μM de primers internos fue posible observar una mayor intensidad de los productos a comparación de las reacciones con concentraciones menores, sin embargo, la intensidad de los productos en la reacción de 1.4 μM se mantuvo igual que en la reacción con 1.2 μM . Mediante la visualización de los resultados por colorimetría fue posible observar un color amarillo brillante en la reacción con 1.2 μM de primers externos y tomando en consideración los resultados observados en el gel de agarosa, se eligió esta concentración como la óptima.

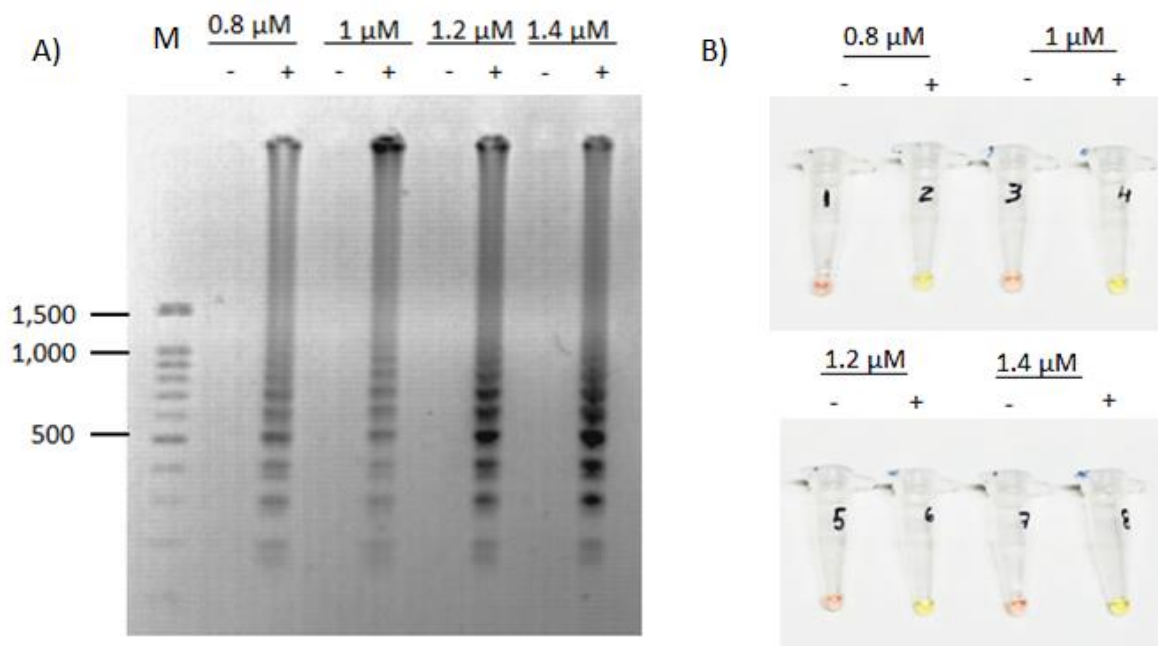


Figura 16. Estandarización de la concentración de primers internos en la reacción de LAMP CHIKV. A) Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. B) Visualización de productos por colorimetría con rojo de fenol, resultado negativo (rojo) y resultado positivo (amarillo). Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+).

Para la determinación de la concentración óptima de primers externos, CHIKV-F3 y CHIKV-B3, se realizaron reacciones usando la concentración 1.2 μM de primers internos, 1 μL de control positivo (2.1×10^{-2} ng/ μL o 1×10^8 copias/ μL) y se probaron las concentraciones 0.2 μM , 0.4 μM , 0.6 μM de primers externos. Se eligió la concentración de 0.4 μM de primers externos debido a que se observa una mayor intensidad en los productos observados en el gel de agarosa con dicha concentración (Figura 17). En la concentración 0.2 μM fue posible observar una menor cantidad de productos mayores a 500 pb a comparación de las concentraciones mayores. De manera interesante, se observó una menor concentración de productos con 0.6 μM de primers externos. El resultado colorimétrico con la concentración 0.4 μM correspondió a un amarillo brillante por lo que se eligió esta concentración de primers externos (Figura 17).

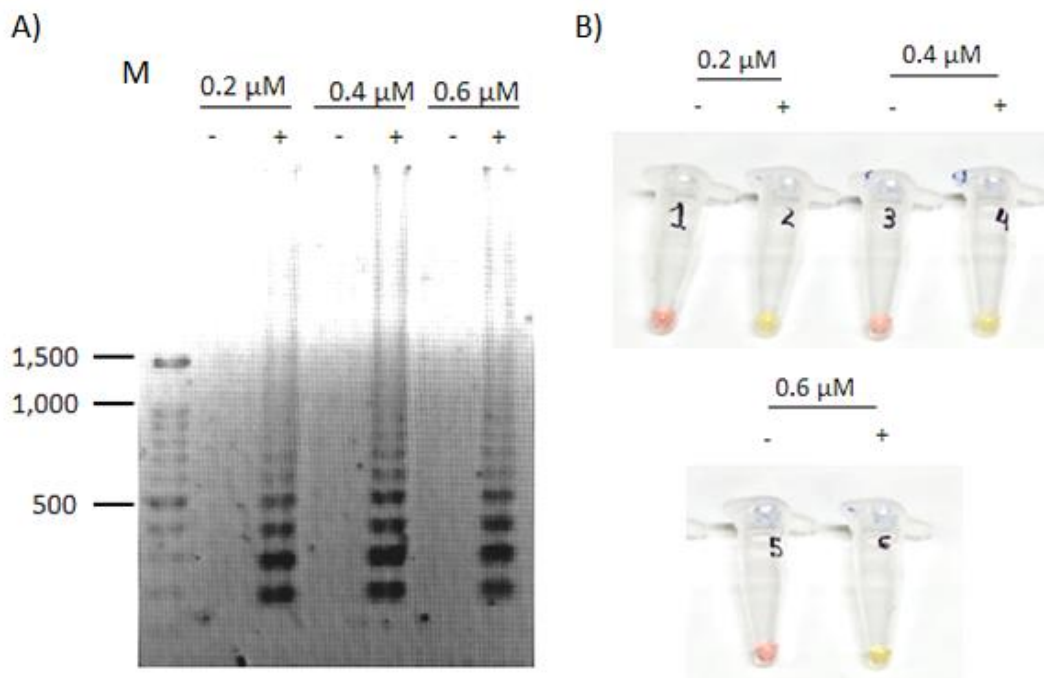


Figura 17. Estandarización de la concentración de primers externos en la reacción de LAMP CHIKV. A) Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante

electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. B) Visualización de productos por colorimetría con rojo de fenol, resultado negativo (rojo) y resultado positivo (amarillo). Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+).

Debido a que el set de primers de LAMP de CHIKV no tiene primers de loop, la estandarización continuó con la determinación de la temperatura y el tiempo óptimos para la reacción. Para el primer caso, se realizaron reacciones ocupando las concentraciones estandarizadas de los primers externos (0.4 μM) e internos (1.2 μM), y se realizó un gradiente de temperatura de 65°C, 67°C, 70°C por 1 h. Como resultado obtuvimos que la amplificación a 67°C generó una escalinata de productos más definida a comparación de las reacciones que se llevaron a cabo a 65°C y 70°C. En estos dos últimos casos, fue posible observar por la intensidad de la escalinata de productos en el gel de agarosa que se obtuvo una menos cantidad de éstos (Figura 18).

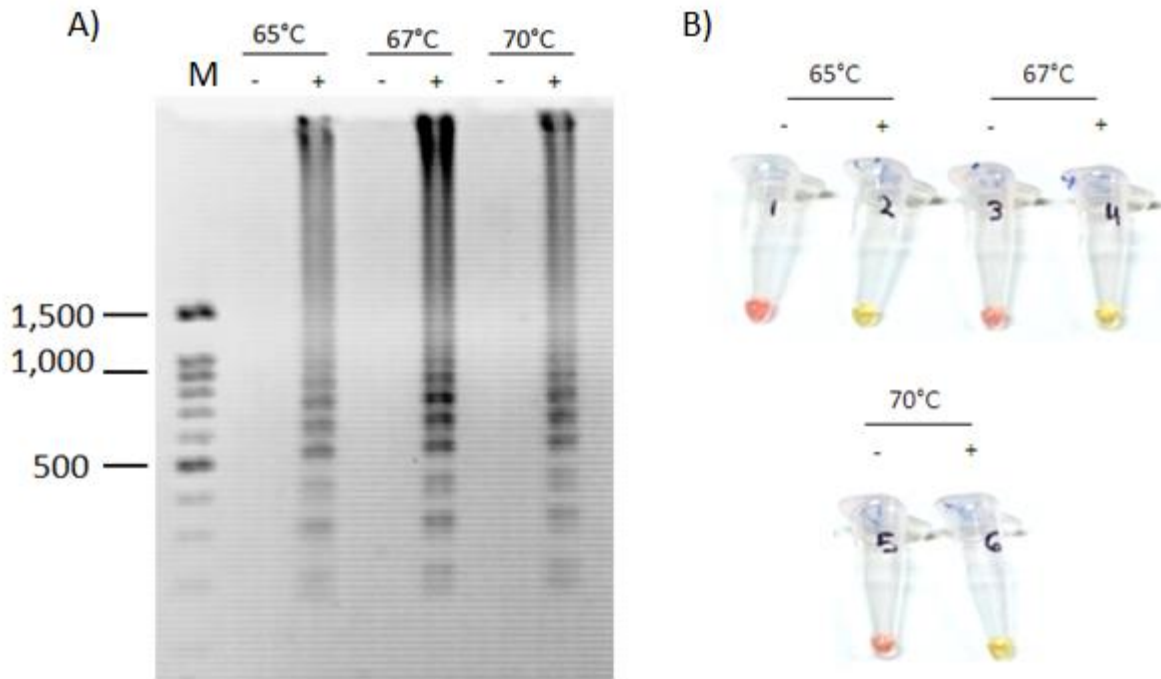


Figura 18. Estandarización de la temperatura de la reacción de LAMP CHIKV. A) Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. B) Visualización de productos por colorimetría con rojo de fenol, resultado negativo (rojo) y resultado positivo (amarillo). Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+).

Por último, se determinó el tiempo óptimo para que se lleve a cabo la reacción de LAMP CHIKV, para ello se realizaron reacciones con las condiciones previamente optimizadas (0.4 μ M de CHIKV-F3 y CHIKV-B3, 1.2 μ M de CHIKV-FIP y CHIKV-BIP a 67° C) variando el tiempo de la reacción: 30 min, 45 min y 60 min. Fue posible observar que a 45 min se obtuvo una intensidad en las bandas igual que a 60 min por lo que se determinó que 45 min es el tiempo óptimo para que se lleve a cabo la reacción de LAMP CHIKV. El resultado colorimétrico a 45 min fue amarillo brillante (Figura 19).

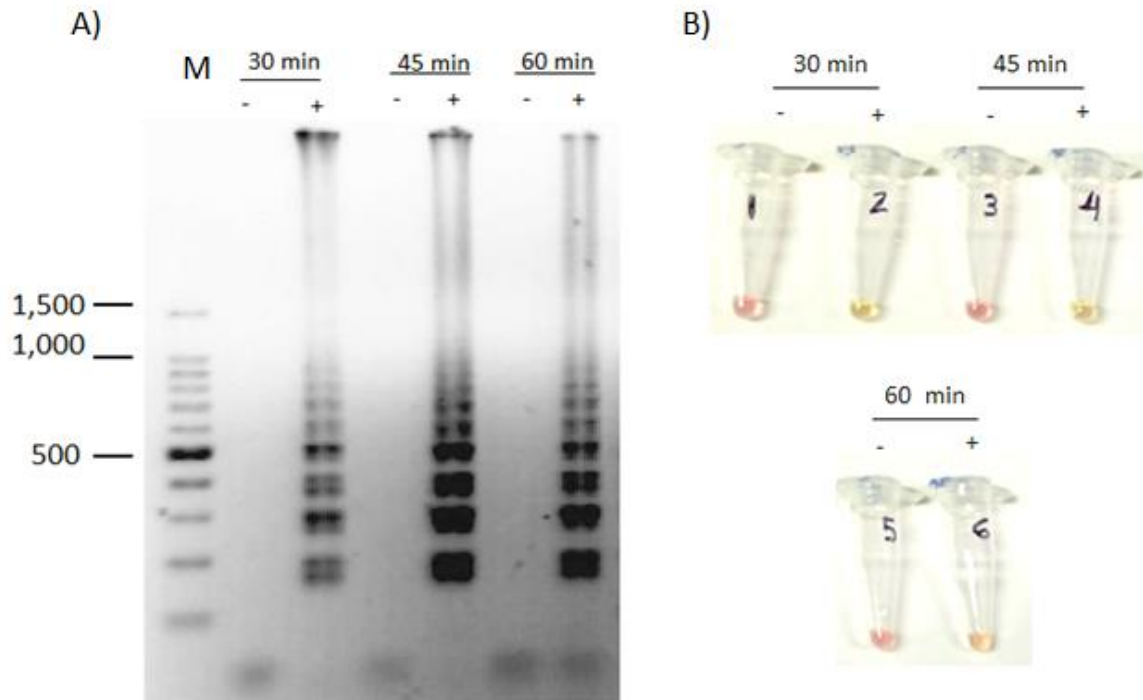


Figura 19. Estandarización del tiempo en la reacción de LAMP CHIKV. A) Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. B) Visualización de productos por colorimetría con rojo de fenol, resultado negativo (rojo) y resultado positivo (amarillo). Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+).

Las condiciones óptimas para el ensayo LAMP CHIKV fueron 0.4 μM de primers externos (CHIKV-F3 y CHIKV-B3), 1.2 μM de los primers internos (CHIKV-FIP y CHIKV-BIP). La reacción se llevó a cabo a 67°C por 45 minutos.

LAMP MAYV

Para la estandarización del LAMP MAYV, se inició con la determinación de la concentración óptima de los primers internos, MAYV-FIP y MAYV-BIP, de los cuales se probaron las concentraciones 0.8 μM , 1 μM , 1.2 μM , 1.4 μM , 1.6 μM , 1.8 μM y 2 μM . La concentración usada de los primers externos (MAYV-F3/MAYV-B3) fue de 0.2 μM y 0.4 μM de primers del loop (MAYV-FL/MAYV-BL), se usó 1 μL de control positivo (2.1×10^{-5} ng/ μL o 1×10^5 copias/ μL). A partir de la visualización de los productos con gel de agarosa fue posible observar una escalinata de productos menos definida en concentraciones menores a 1.4 μM y a través de la detección de productos por colorimetría era posible observar un viraje de rojo a amarillo mostaza-naranja, por lo que se decidió probar con concentraciones mayores de los primers internos. Se observó que a mayor concentración de primers internos se observa una escalinata de productos más definida e intensa, sin embargo, fue posible observar amplicones inespecíficos en el control negativo de las reacciones con 1.6 μM , 1.8 μM y 2 μM de primers internos (Figura 20). En cuanto a la detección de productos por colorimetría, con la concentración de primers internos 1.4 μM fue posible observar un viraje de color de rojo a amarillo brillante, por lo que se eligió dicha concentración de primers internos.

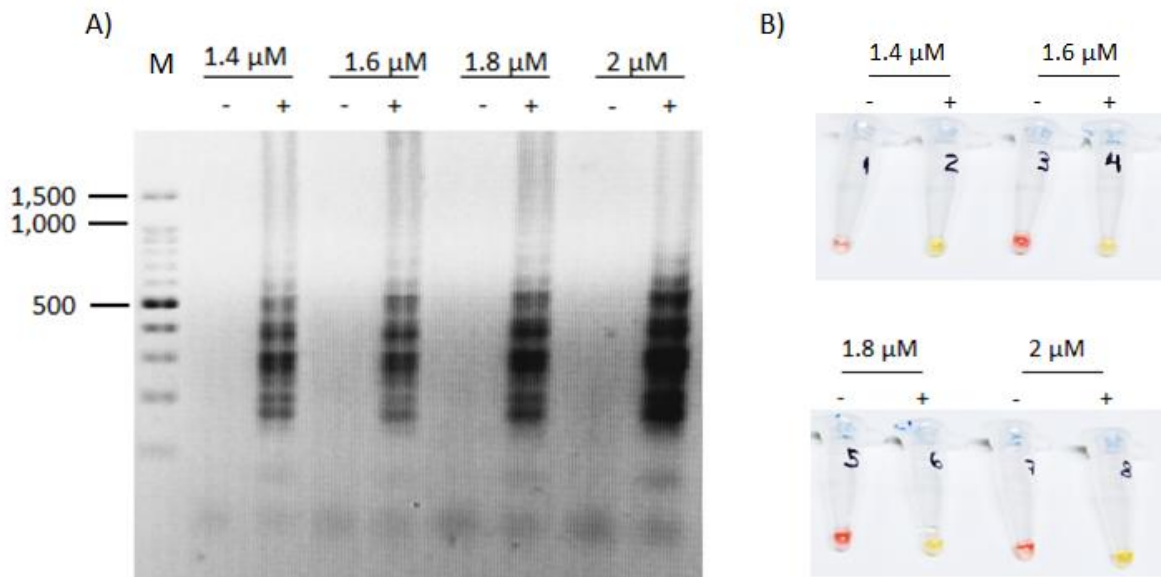


Figura 20. Estandarización de la concentración de primers internos en la reacción de LAMP MAYV. A) Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. B) Visualización de productos por colorimetría con rojo de fenol, resultado negativo (rojo) y resultado positivo (amarillo). Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+).

Tomando en consideración la concentración óptima de los primers internos (1.4 μM), se realizaron ensayos para determinar la concentración óptima de primers externos, MAYV-F3 y MAYV-B3. Se realizaron reacciones con 1.4 μM de primers internos, 0.4 μM de primers de loop y 1 μL de control positivo (2.16×10^{-5} ng/ μL), y se probaron las concentraciones 0.2 μM , 0.4 μM , 0.6 μM , 0.8 μM y 1 μM de los primers externos (MAYV-F3 y MAYV-B3). De la misma forma que con los primers internos, se eligió la concentración en la que se observara la mayor intensidad en la escalinata de productos y que el negativo se mantuviera sin amplificación inespecífica. La concentración óptima de primers externos fue 0.6 μM , la cual coincide también con el resultado esperado en

la detección colorimétrica de los productos, es decir, se observa un color amarillo brillante (Figura 21).

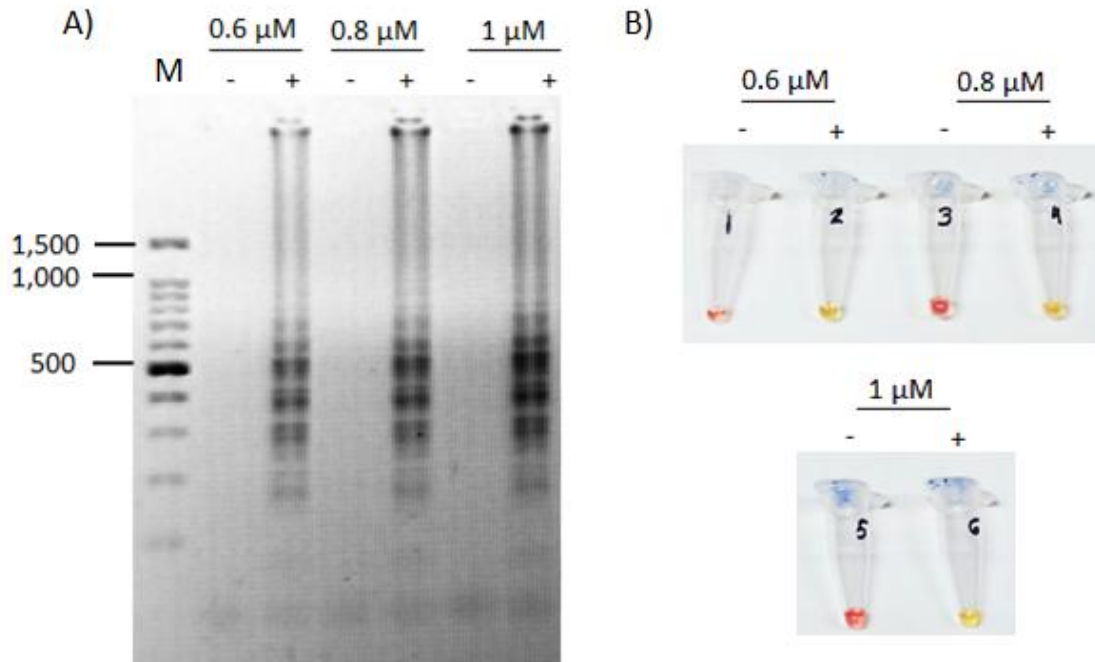


Figura 21. Estandarización de la concentración de primers externos en la reacción de LAMP MAYV. A) Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. B) Visualización de productos por colorimetría con rojo de fenol, resultado negativo (rojo) y resultado positivo (amarillo). Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+).

A continuación se determinó la concentración óptima de los primers del loop, MAYV-FL y MAYV-BL. Se realizaron reacciones con 0.6 μM de primers externos (MAYV-F3/MAYV-B3), 1.4 μM de primers internos (MAYV-FIP/MAYV-BIP) y 1 μL de control positivo 2.16×10^{-5} ng/μL (1×10^5 copias/ μL), y se probaron las concentraciones 0.2 μM, 0.4 μM, 0.6 μM, y 0.8 μM de MAYV-FL y MAYV-BL. De las concentraciones probadas se seleccionó la concentración 0.6 μM ya que fue posible observar la mayor cantidad de

productos amplificados a través de la intensidad de la escalinata de productos en el gel de agarosa y no se observó amplificación inespecífica en los controles negativos (Figura 22). Aunado a esto, los resultados por colorimetría con la concentración de 0.6 μM de primers del loop tuvo una coloración amarillo brillante a diferencia de la coloración de las reacciones con concentraciones menores en las que se observó un color amarillo-naranja (Figura 22).

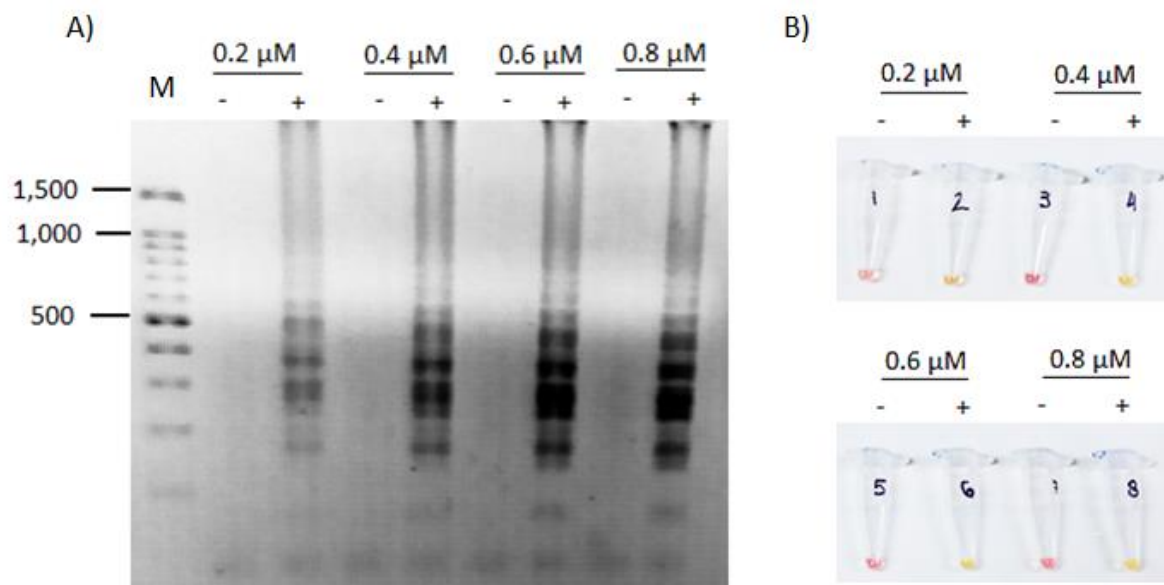


Figura 22. Estandarización de la concentración de primers loop en la reacción de LAMP MAYV. A) Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. B) Visualización de productos por colorimetría con rojo de fenol, resultado negativo (rojo) y resultado positivo (amarillo). Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+).

Para determinar de la temperatura óptima de la reacción LAMP MAYV, se realizaron reacciones ocupando las concentraciones estandarizadas de los primers (0.6 μM de los primers MAYV-F3 y MAYV-B3, 1.4 μM de los primers MAYV-FIP y MAYV-BIP, 0.6 μM

de los primers MAYV-FL y MAYV-BL) y se realizó un gradiente de temperatura de 65°C, 67°C, 69°C. Como resultado obtuvimos que la amplificación a 69°C generó una mayor cantidad de productos a comparación de las reacciones que se llevaron a cabo a temperaturas menores (Figura 23). Los resultados por colorimetría correspondieron a un viraje de color de rojo a amarillo en la reacción a 69° C, por lo que se determinó que fue la temperatura óptima para el ensayo LAMP MAYV.

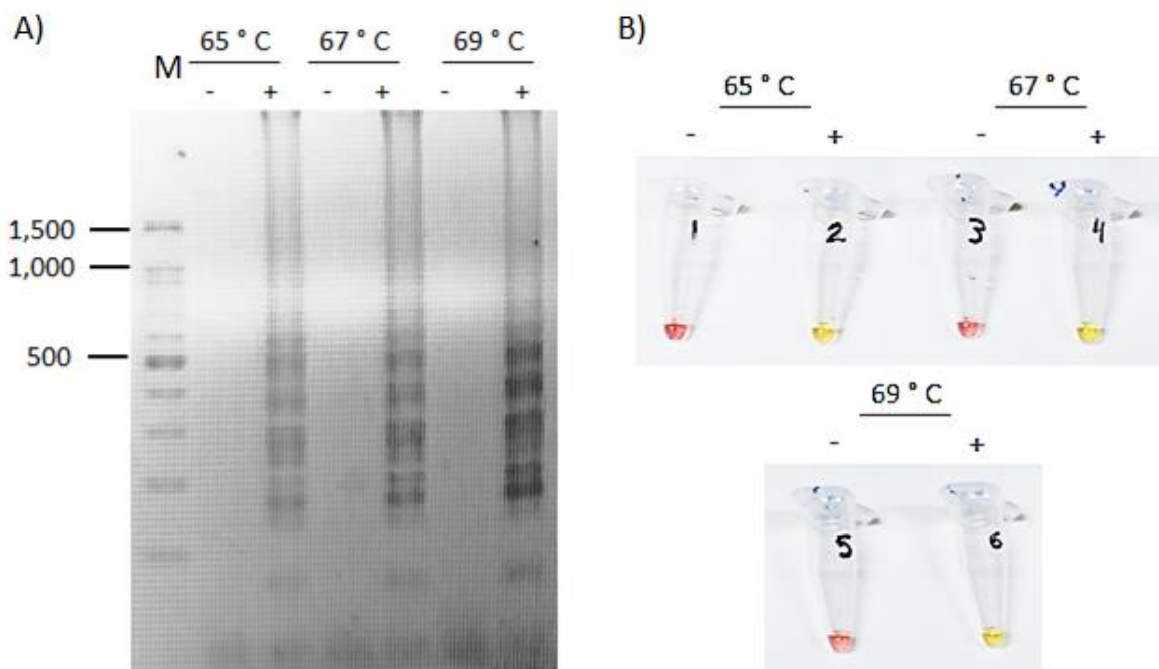


Figura 23. Estandarización de la temperatura en la reacción de LAMP MAYV. A) Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. B) Visualización de productos por colorimetría con rojo de fenol, resultado negativo (rojo) y resultado positivo (amarillo). Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+).

Por último, se determinó el tiempo óptimo de amplificación del ensayo LAMP MAYV, para ello se realizaron reacciones con las condiciones previamente optimizadas (0.6 µM

de los primers MAYV-F3 y MAYV-B3, 1.4 μ M de los primers MAYV-FIP y MAYV-BIP, 0.6 μ M de los primers MAYV-FL y MAYV-BL a 69° C), variando el tiempo de la reacción; 20 min, 30 min y 40 min (Figura 24). Fue posible observar que a 40 min se obtuvo una intensidad en las bandas igual que a 30 min, sin embargo, fue posible apreciar un viraje de color en la detección de productos por colorimetría más notable en la reacción que se llevó a cabo por 40 minutos, por lo que se determinó que este es el tiempo óptimo para que se lleve a cabo el ensayo LAMP MAYV. De forma interesante, en la reacción que se llevó a cabo por 20 min, no fue posible diferenciar a simple vista el viraje de color entre el control positivo y el negativo.

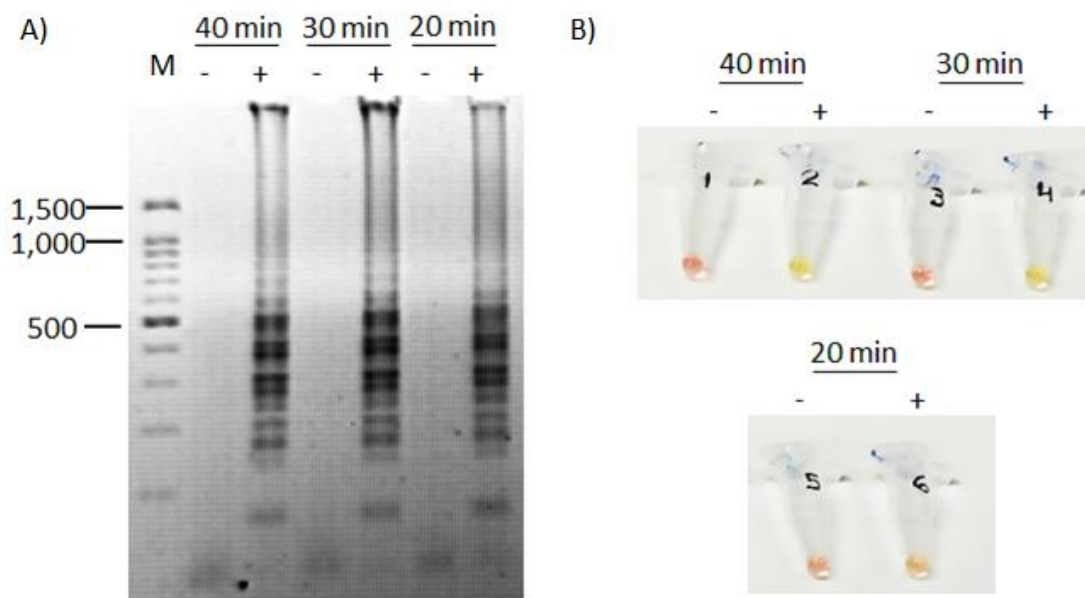


Figura 24. Estandarización del tiempo en la reacción de LAMP MAYV. A) Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. B) Visualización de productos por colorimetría con rojo de fenol, resultado positivo (rojo) y resultado negativo (amarillo). Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+).

Las condiciones óptimas para el ensayo LAMP MAYV fueron 0.6 μM de los primers MAYV-F3 y MAYV-B3, 1.4 μM de los primers MAYV-FIP y MAYV-BIP, 0.6 μM de los primers MAYV-FL y MAYV-BL. La reacción se llevó a cabo a 69°C por 40 minutos.

8.4 Especificidad de los ensayos LAMP CHIKV y LAMP MAYV

Para determinar la especificidad *in vitro* de los primers de los ensayos LAMP se realizaron ensayos LAMP CHIKV y LAMP MAYV intercambiando los controles positivos (2.1×10^{-2} ng/ μL (1×10^8 copias/ μL) del fragmento de 196 pb de CHIKV y 2.16×10^{-5} ng/ μL (1×10^5 copias/ μL) del fragmento de 200 pb de MAYV) de ambos ensayos. No se observó amplificación inespecífica en ambos ensayos, únicamente se observa la escalinata de amplificación cuando se usa el control positivo correspondiente, por lo que los primers LAMP CHIKV y LAMP MAYV son específicos a pesar de que ambos virus pertenecen al género *Alphavirus* (Figura 25).

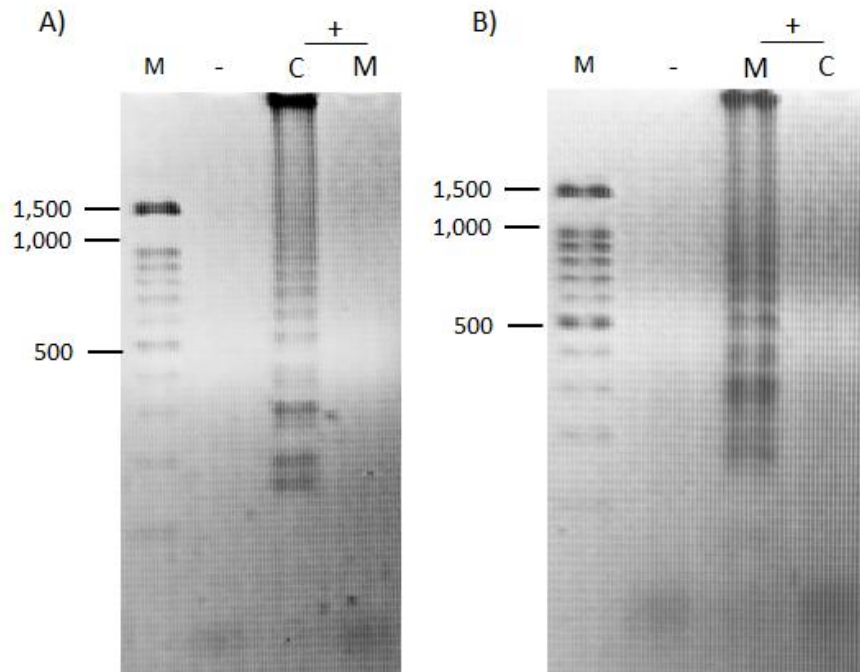


Figura 25. Especificidad de los sistemas LAMP CHIKV y LAMP MAYV. A) Ensayo de especificidad del ensayo LAMP CHIKV. B) Ensayo de especificidad del ensayo LAMP MAYV. Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+) (CHIKV (C), MAYV (M)).

8.5 Amplificación de RNA viral de los sistemas LAMP CHIKV y LAMP MAYV.

Para determinar si nuestros sistemas de LAMP CHIKV y LAMP MAYV eran capaces de mantener su especificidad con muestras de personas con sospecha de infección por arbovirus, se realizaron ensayos haciendo uso de RNA de CHIKV y como controles de especificidad RNA de DENV-2 y RNA de ZIKA, los cuales son arbovirus que circulan en México. En el laboratorio no se cuenta con RNA de MAYV por lo que no se incluyó en estos ensayos (Figura 26).

El LAMP de CHIKV amplificó el RNA de CHIKV y no se observó amplificación del RNA de DENV-2 ni el RNA de ZIKV, por lo cual se consideró que es un sistema específico.

Por otra parte, el sistema LAMP MAYV fue incapaz de amplificar RNA de CHIKV, DENV-2 y ZIKV.

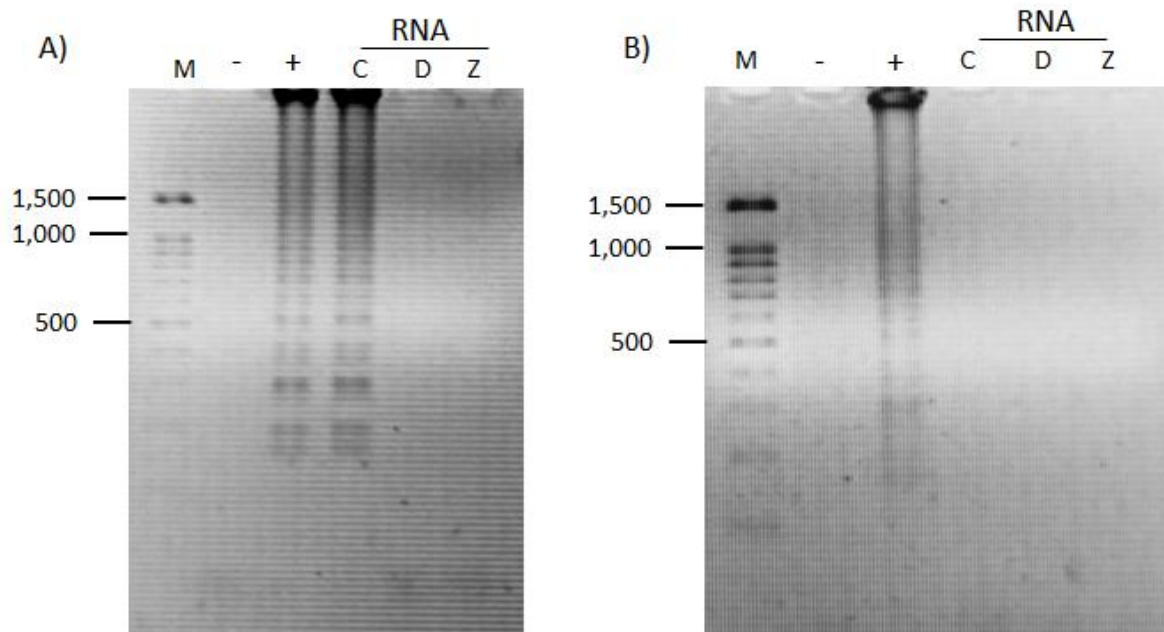


Figura 26. Especificidad de los ensayos LAMP CHIKV y LAMP MAYV con muestras de RNA de arbovirus. A) Especificidad del LAMP CHIKV. B) Especificidad del LAMP MAYV. Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+), RNA de CHIKV (C), RNA de DENV-2 (D), RNA de ZIKV (Z).

8.6 Límite de detección del ensayo LAMP CHIKV y LAMP MAYV

Límite de detección del ensayo LAMP CHIKV

El límite de detección del ensayo LAMP CHIKV se determinó analizando la amplificación de diluciones seriadas del control positivo de acuerdo a lo establecido en la metodología. La concentración inicial del control positivo de CHIKV fue de 2.1 ng / μ L (1×10^{10} copias/ μ L del fragmento de 196 pb) a partir de la cual se realizaron 9 diluciones seriadas con factor 10 (Tabla 7).

Tabla 7. Diluciones seriadas del control positivo de CHIKV.

Dilución	ng/ μ L	copias/ μ L
1	2.1	1×10^{10}
2	2.1×10^{-1}	1×10^9
3	2.1×10^{-2}	1×10^8
4	2.1×10^{-3}	1×10^7
5	2.1×10^{-4}	1×10^6
6	2.1×10^{-5}	1×10^5
7	2.1×10^{-5}	1×10^4
8	2.1×10^{-6}	1×10^3
9	2.1×10^{-7}	1×10^2
10	2.1×10^{-8}	1×10^1

El ensayo LAMP CHIKV tuvo un límite de detección de 2.1×10^{-5} ng/ μ L del control positivo (1×10^4 copias/ μ L del fragmento de 196 pb) con la detección de productos en gel de agarosa y con la detección de productos por colorimetría con rojo de fenol (Figura 27).

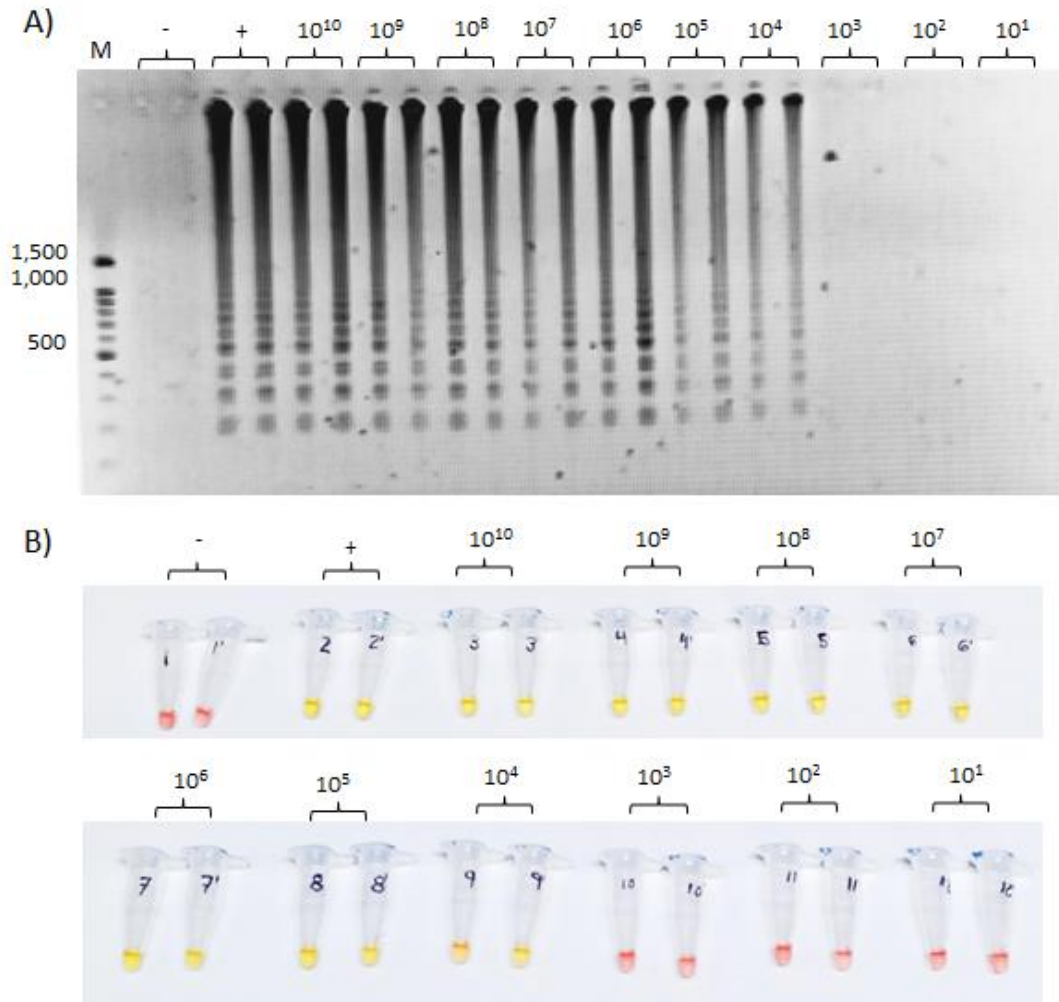


Figura 27. Límite de detección del ensayo LAMP CHIKV. A) Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. B) Visualización de productos por colorimetría con rojo de fenol, resultado negativo (rojo) y resultado positivo (amarillo). Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+), copias de control positivo (10^n).

Límite de detección del ensayo LAMP MAYV

Las concentraciones de las diluciones seriadas del control positivo de MAYV que fueron utilizadas para la determinación del límite de detección del LAMP MAYV se muestran en la Tabla 8. La concentración inicial del control positivo de MAYV fue de 2.16 ng/ μ L (1×10^{10} copias/ μ L del fragmento de 200 pb) a partir de la cual se realizaron 9 diluciones seriadas con factor 10.

Tabla 8. Diluciones seriadas del control positivo de MAYV.

Dilución	ng/μL	copias/μL
1	2.16	1×10^{10}
2	2.16×10^{-1}	1×10^9
3	2.16×10^{-2}	1×10^8
4	2.16×10^{-3}	1×10^7
5	2.16×10^{-4}	1×10^6
6	2.16×10^{-5}	1×10^5
7	2.16×10^{-5}	1×10^4
8	2.16×10^{-6}	1×10^3
9	2.16×10^{-7}	1×10^2
10	2.16×10^{-8}	1×10^1

El ensayo LAMP MAYV tuvo un límite de detección de 2.16×10^{-6} ng/ μ L del control positivo (1×10^3 copias/ μ L del fragmento de 200 pb) con la detección de productos en gel de agarosa y con la detección de productos por colorimetría con rojo de fenol. (Figura 28).

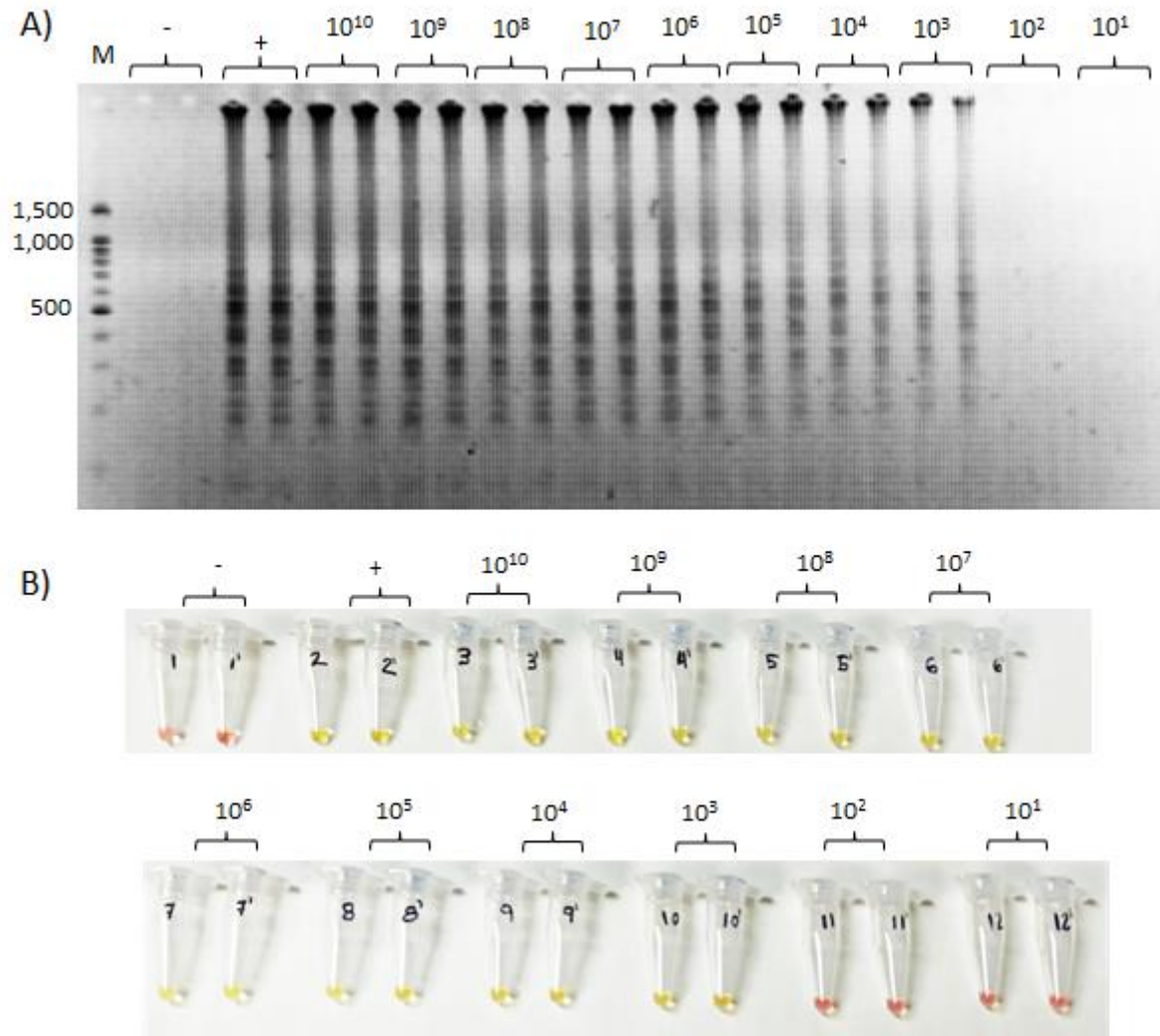


Figura 28. Límite de detección del ensayo LAMP MAYV. A) Visualización de los productos de la reacción de LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), se observa un patrón escalonado de los productos. B) Visualización de productos por colorimetría con rojo de fenol, resultado negativo (rojo) y resultado positivo (amarillo). Marcador de peso molecular (M), control negativo (-), control positivo (+), copias de control positivo (10^n).

9. Discusión

A lo largo del último siglo las infecciones por arbovirus han producido brotes de magnitudes epidémicas que ponen en riesgo el bienestar de la población ^{22,48}. Para poder mitigar los daños que generan, es necesario el establecimiento de sistemas eficientes para la detección y diagnóstico de los arbovirus ²⁸.

Los ensayos de detección directa del genoma de los arbovirus se han implementado para el diagnóstico y vigilancia epidemiológica, siendo el RT-qPCR la prueba estándar de oro ¹²⁴. A pesar de ello, esta técnica requiere de infraestructura especializada, por lo cual no es posible su aplicación en todos los sitios en los que circulan los arbovirus debido a la existencia de ciclos de transmisión selváticos, rurales y urbanos y muchas localidades carecen de los recursos e infraestructura necesaria para su aplicación ¹²⁵.

El sistema de amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP) ha probado ser específico y sensible, además es posible detectar los productos de amplificación de manera cualitativa a través de colorimetría, turbidez y/o fluorescencia, por lo cual ha sido ampliamente propuesto para su uso en sitios de atención primaria ⁷⁹. En este proyecto se estandarizaron ensayos de LAMP para la detección de CHIKV y MAYV con el sistema colorimétrico con rojo de fenol, con el objetivo de contar con sistemas de diagnóstico capaces de aplicarse en sitios de atención primaria.

Previamente diversos grupos de estudio han establecido sistemas de LAMP para la detección de CHIKV, sin embargo, casi en su totalidad han sido diseñados para la detección del gen E1 ^{111,126-129}. Mo y colaboradores, en el 2012, estandarizaron un sistema LAMP en tiempo real para el diagnóstico diferencial de DENV y CHIKV, los

primers para CHIKV fueron dirigidos a una región conservada del gen E1, la detección de productos de amplificación fue mediante turbidez, alcanzando un sensibilidad del 100% y una especificidad del 80% ¹²⁷. Parida y colaboradores, en el 2007, estandarizaron un LAMP en tiempo real para la detección de CHIKV con primers dirigidos al gen E1 con detección de productos mediante turbidez, fluorescencia y geles de agarosa ¹¹¹. Por otra parte, Saechue y colaboradores, en el 2020, estandarizaron un sistema de LAMP con primers dirigidos al E1 de CHIKV con detección de productos mediante fluorescencia y colorimetría haciendo uso de azul de hidroxinaftol ¹²⁹. Por último, Kutsuna y colaboradores, en el 2020, desarrollaron un chip para la detección simultánea de DENV, CHIKV y ZIKV, los primers para la detección de CHIKV fueron dirigidos al gen E1 y obtuvieron un límite de detección de 8 copias/ μ L ¹²⁶; mientras que Priye y colaboradores, en el 2017, desarrollaron un sistema “LAMP Box” acoplado a un teléfono inteligente para la detección de DENV, CHIKV y ZIKV con visualización de productos mediante fluorescencia, los primers para la detección de CHIKV fueron dirigidos al gen E1 ¹²⁸.

En nuestro grupo de trabajo, la M. en C. Jeshermi de la Cruz, durante la realización de su tesis de maestría, estandarizó un sistema de RT-LAMP CHIKV con detección de productos por gel de agarosa con primers dirigidos al gen E1, obteniendo una sensibilidad del 78% y especificidad del 75% ¹³⁰, la cual es menor a la obtenida en los sistemas de LAMP CHIKV existentes ^{111,126,127,129}. El RT-LAMP CHIKV fue validado tomando como referencia los resultados del sistema “Arbochip” (desarrollado por el Dr. Edgar Sevilla Reyes) el cual consiste en ensayos de RT-qPCR multiplexeados para la detección simultánea de arbovirus de importancia médica en América. Debido a que los

primers para la detección de CHIKV del “Arbochip” estaban dirigidos al gen nsP1 y los primers del RT-LAMP al gen E1, se propuso que la discordancia de los resultados podría deberse a las diferencias entre los genes a los que fueron dirigidos los primers. El gen E1 codifica para la proteína de envoltura que está involucrada en la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática ¹², por lo que es una proteína sometida a presiones de selección por parte del sistema inmunológico ¹³¹, y se ha reportado una tasa de sustitución de 8×10^{-4} sustituciones/nucleótido/año ¹³². Las mutaciones presentes en el gen E1 posiblemente evitaron que los primers del RT-LAMP CHIKV hibridaran en la secuencia blanco, impidiendo que amplificaran muestras, que de acuerdo al “Arbochip”, eran positivas a CHIKV. En el presente proyecto se diseñaron primers para LAMP CHIKV y LAMP MAYV dirigidos al gen nsP1. El gen nsP1 tiene una tasa de sustitución de 5×10^{-4} sustituciones/nucleótido/año ¹³², por lo que se podría considerar un gen con menor variabilidad que el gen E1 y por lo tanto es mejor para el diseño de primers.

Para el diseño de primers de CHIKV se descargaron 635 secuencias de genomas completos, debido a que no se contaba con equipo computacional capaz de trabajar con todas las secuencias de forma simultánea se optó por tomar una muestra significativa de ellas. Para ello se seleccionaron de forma aleatoria 100 secuencias de genomas completos de CHIKV, esta muestra fue estadísticamente significativa ya que de acuerdo al cálculo del tamaño de la muestra (nivel de confianza del 95% y un margen de error de 10%) esta debería ser $n=84$, por lo que se capturó la variabilidad suficiente para la creación de la secuencia consenso del gen nsP1 de CHIKV. En el

caso del diseño de primers de MAYV no fue necesario tomar una muestra ya que se trabajó con las 39 secuencias disponibles de genomas completos de MAYV.

Los primers de LAMP CHIKV y LAMP MAYV se diseñaron en el software Primer Explorer el cual genera más de un set de primers a partir de una secuencia consenso, por lo que para la selección del set es importante tomar en cuenta las distancias entre las regiones de los primers, la T_m y el valor de ΔG ¹¹⁹. La energía libre de Gibbs (ΔG) hace referencia a la espontaneidad de la reacción y, en el contexto del diseño de primers, a la energía necesaria para la formación de una estructura secundaria; mientras menor sea el valor de ΔG se requiere menor energía para su formación, lo cual aumenta la probabilidad de que se forme espontáneamente. Por el contrario, mientras mayor sea el valor de ΔG (valor recomendado $\Delta G \geq -2.50$ ¹¹⁹) es necesaria mayor entrada de energía para la formación de una estructura secundaria ¹³³.

Para el LAMP CHIKV se obtuvieron 5 sets de primers (Tabla Suplementaria), de los cuales se eligió el set 3. A pesar de que el set 1 del LAMP CHIKV tenía el valor mayor de ΔG de formación de estructuras secundarias ($\Delta G -1.96$) de todos los sets generados, se descartó su uso debido a que el valor de ΔG de la estabilidad del extremo 5' de la región F2 del primer FIP era de -2.00 , mayor que el máximo recomendado (valor recomendado $\Delta G \leq -4$ ¹¹⁹). El ΔG de la estabilidad del extremo 3' y 5' hace referencia a la estabilidad de la formación del dúplex del templado y las últimas 5 bases de los extremos del primer ^{133,134}, por lo que se sugiere que el ΔG de la estabilidad del extremo 3' y 5' sea valor recomendado $\Delta G \leq -4$ y así prevenir la hibridación inespecífica de los primers ¹³⁵.

El set 3 del LAMP CHIKV cumple con los valores recomendados de ΔG de formación de estructuras secundarias y de estabilidad de los extremos 3' y 5'.

Por otra parte, se generaron 3 sets de primers para MAYV de los cuales se eligió el set 1 ya que cumplía con los valores recomendados de ΔG de formación de estructura secundaria y de estabilidad de los extremos 3' y 5'.

Posteriormente, en el software Primer Explorer se generaron los primers del loop para la reacción de MAYV. Para el set 3 de primers de CHIKV no se generaron ya que la región B1c y B2 están distanciadas por 25 pb y la distancia mínima que requiere para que se generen primers del loop es de 40-60 pb. Sin embargo, este set de primers fue elegido debido a su alta especificidad ya que únicamente se alineó con secuencias de CHIKV durante el análisis de BLAST. Consideramos que esto no tendría repercusión en el ensayo si tomamos en cuenta que el tercer par de primers normalmente se usa para aumentar la eficiencia de la amplificación ⁷⁹.

Los criterios para elegir las condiciones óptimas de los ensayos de LAMP fueron: seleccionar el resultado de la amplificación en geles de agarosa donde se observe una escalinata bien definida y seleccionar un resultado colorimétrico que permitiera discriminar entre un resultado positivo de uno negativo a simple vista. Por lo cual fue de suma importancia realizar un trabajo sistemático en el que se modificaron cada una de las condiciones de interés: la concentración de los primers, la temperatura y el tiempo de amplificación de la reacción. La elección de las condiciones que produjeran como resultado una escalinata más definida e intensa permitió alcanzar un menor límite de detección, lo cual es muy importante para poder capturar casos en los que la carga viral de la muestra sea baja.

El límite de detección es la concentración mínima de un analito que puede ser detectada en una muestra ¹³⁶. El ensayo de LAMP CHIKV, estandarizado en este proyecto, tuvo un límite de detección de 2.1×10^{-6} ng/ μ L del control positivo (1×10^4 copias/ μ L del fragmento de 196 pb) en la detección de productos en gel de agarosa y con la detección de productos por colorimetría usando rojo de fenol, mientras que el ensayo LAMP MAYV tuvo un límite de detección de 2.16×10^{-7} ng/ μ L del control positivo (1×10^3 copias/ μ L del fragmento de 200 pb) con ambos métodos de visualización de productos. Estos valores de límite de detección están en el rango de sensibilidad obtenidos en otros ensayos LAMP para la detección de virus y microorganismos ^{109,137-141}, como lo reportado por López-Jimena *et al* en el 2016, quienes establecieron un sistema LAMP para la detección de CHIKV capaz de detectar hasta 10^5 copias de RNA viral ¹⁰⁹. La presencia o ausencia de los primers del loop podría aumentar la sensibilidad de un ensayo de LAMP de acuerdo a lo reportado por Nagamine *et al.* en el 2002 ⁸⁸, sin embargo, se han estandarizado ensayos con una alta sensibilidad usando únicamente primers internos y externos (F3/B3 y FIP/BIP) ^{103,122,127,142}, un ejemplo de esto, es lo reportado por Mo *et al.*, en el 2017, quienes estandarizaron un RT-LAMP para la detección de CHIKV con un límite de detección de 2.7 copias/reacción ¹²⁷, por lo que la ausencia de los primers de loop en el set LAMP CHIKV podría no está directamente relacionada con el límite de detección alcanzado en este proyecto. Sin embargo, se debe hacer énfasis en que la reacción del RT-LAMP de Mo *et al* fue monitoreada y cuantificada por un turbidímetro, el cual es un equipo especializado capaz de cuantificar la turbidez en tiempo real ¹²⁷, por lo que la sensibilidad de este equipo podría ser un factor importante en la determinación de un menor límite de detección a comparación

del obtenido en el presente proyecto. A pesar de que el uso de un turbidímetro es un método cuantitativo sensible, los resultados obtenidos son gráficos que requieren de preparación para su correcta interpretación por lo que el uso de reactivos sensibles al cambio de pH, como el rojo de fenol, podrían facilitar la interpretación de los resultados ya que estos son observables a simple vista. Por otra parte, el uso de equipos especializados significaría un aumento en los costos y podría dificultar el diagnóstico a gran escala en sitios de circulación de CHIKV.

Es importante destacar que el límite de detección de productos por colorimetría tuvo correspondencia con los resultados observados por visualización de productos en gel de agarosa, por lo que la detección colorimétrica de detección de productos usando rojo de fenol, es un sistema eficaz y confiable para la aplicación en sitios de atención primaria. Determinar el resultado (positivo o negativo) a simple vista, facilitará la interpretación de los resultados para personas con poco entrenamiento ⁹⁷.

El sistema colorimétrico de detección de productos usando rojo de fenol se basa en el cambio de pH en la reacción debido a la liberación de H⁺ durante la polimerización del DNA ¹⁴³. El rango del pH en el que se observa viraje de color del rojo de fenol es de 6.4 (amarillo brillante) a – 8.2 (rosa-rojo) ¹⁴⁴. Debido a la facilidad de diferenciar un resultado positivo de uno negativo a simple vista es un compuesto extensamente usado en los ensayos LAMP propuestos para la aplicación en sitios de atención primaria ^{97,143,145–147}. En el estudio de Scott *et al* en el 2020, se evaluaron diferentes sistemas cualitativos utilizados en los ensayos LAMP, ellos reportaron que el rojo de fenol es el reactivo colorimétrico que permite interpretar los resultados con mayor facilidad a comparación del azul de hidroxinaftol y la calceína ⁹⁷. En el presente trabajo se hizo uso

del WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (BioLab) el cual contiene rojo de fenol, permitiéndonos diferenciar sin dificultad entre un resultado positivo y uno negativo. A pesar de las cualidades de este compuesto, es importante hacer hincapié en que es recomendable trabajar en frío con este reactivo ya que los cambios de temperatura pueden afectar el pH de este y con ello alterar la interpretación del resultado ⁹⁷. Para futuras aplicaciones en muestras biológicas será importante tener en consideración el pH de la muestra, así como el pH y capacidad de amortiguamiento del eluyente de la muestra.

La especificidad de los primers del LAMP CHIKV y LAMP MAYV fue evaluada *in silico* e *in vitro*, esto es de suma importancia ya que el análisis *in silico* podría no reflejar los resultados *in vitro* con muestras biológicas, debido a que el análisis *in silico* se restringe a las secuencias presentes en bases de datos públicas y no reflejan la diversidad de secuencias que pueden ser encontradas en muestras biológicas ¹⁴⁸. Los ensayos LAMP MAYV y LAMP CHIKV que estandarizamos son específicos y no amplificaron los controles positivos ni el RNA de otros arbovirus circulantes para los que no fueron diseñados, por lo que se obtuvo un sistema que permitirá hacer el diagnóstico diferencial de CHIKV y MAYV, incluso con el potencial de detectar co-infecciones de estos virus. La infección por CHIKV y MAYV provoca sintomatologías similares por lo que no es posible el diagnóstico clínico ³², contar con un sistema específico y sensible para la aplicación en sitios de atención primaria permitirá la implementación de medidas de salud pública necesarias para asegurar la salud de la población mexicana.

Hasta el momento no se tiene antecedente de la estandarización de un sistema de LAMP para la detección del virus MAYV, por lo que el ensayo aquí reportado sería el

primero en su tipo. Solo existe evidencia serológica que apunta a la posible circulación de MAYV en México desde el 2001¹⁰² y es probable que no se haya confirmado su presencia en el país debido a la complejidad de aplicar pruebas moleculares en sitios de atención primaria. También es importante destacar que los ensayos de LAMP podrían ser útiles para la detección de arbovirus en los vectores sean de distribución urbana o selvática ¹⁴⁹, así como en animales involucrados en el establecimiento de los distintos ciclos de circulación ¹⁵⁰ de los alfavirus.

Por último, sería de vital importancia la validación de nuestros sistemas de LAMP con muestras clínicas, por lo que este tema queda como perspectiva para futuros proyectos, así como la implementación de estos durante un brote de arbovirus.

10. Conclusiones

- Se establecieron ensayos LAMP CHIKV y LAMP MAYV con detección de productos por colorimetría con rojo de fenol.
- Los ensayos LAMP CHIKV y LAMP MAYV estandarizados fueron específicos ya que no amplifican otros arbovirus circulantes y tienen una sensibilidad similar a la obtenida por algunos grupos de trabajo.
- El sistema colorimétrico con rojo de fenol fue efectivo para la detección de productos de amplificación de LAMP, permitiendo diferenciar a simple vista un resultado positivo de uno negativo.
- Estos sistemas de detección son de bajo costo y requieren menor infraestructura y capacitación que los sistemas tradicionales de RT-qPCR, por lo cual pueden ser empleados en laboratorios menos especializados y en sitios de atención primaria.

11. Referencias bibliográficas

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2020 Release. *Taxonomy* <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (2020).
2. Weaver, S. C. & Smith, D. W. Alphavirus Infections. in *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice* 519–524 (Elsevier, 2011). doi:10.1016/B978-0-7020-3935-5.00078-1.
3. Staples, J. E. & Powers, A. M. Togaviridae. in *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* 1126-1128.e2 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-323-40181-4.00217-6.
4. Jose, J., Snyder, J. E. & Kuhn, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 4, 837–856 (2009).
5. SIB Instituto Suizo de Bioinformatica. Alphavirus. *ViralZone* https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species (2017).
6. Kumar, D., Kumari, K., Jayaraj, A. & Singh, P. Development of a theoretical model for the inhibition of nsP3 protease of Chikungunya virus using pyranooxazoles. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 38, 3018–3034 (2020).
7. Firth, A. E., Chung, B. Y., Fleton, M. N. & Atkins, J. F. Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Viol. J.* 5, 108 (2008).
8. Carrasco, L., Sanz, M. & González-Almela, E. The Regulation of Translation in Alphavirus-Infected Cells. *Viruses* 10, 70 (2018).
9. Holmes, A. C., Basore, K., Fremont, D. H. & Diamond, M. S. A molecular understanding of alphavirus entry. *PLOS Pathog.* 16, e1008876 (2020).

10. Kielian, M., Chanel-Vos, C. & Liao, M. Alphavirus Entry and Membrane Fusion. *Viruses* 2, 796–825 (2010).
11. Schnierle, B. S. Cellular Attachment and Entry Factors for Chikungunya Virus. *Viruses* 11, (2019).
12. Leung, J. Y.-S., Ng, M. M.-L. & Chu, J. J. H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. *Adv. Virol.* 2011, 1–9 (2011).
13. Singh, I. & Helenius, A. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J. Virol.* 66, 7049–7058 (1992).
14. Wengler, G., Gros, C. & Wengler, G. Analyses of the Role of Structural Changes in the Regulation of Uncoating and Assembly of Alphavirus Cores. *Virology* 222, 123–132 (1996).
15. Jose, J., Taylor, A. B. & Kuhn, R. J. Spatial and Temporal Analysis of Alphavirus Replication and Assembly in Mammalian and Mosquito Cells. *mBio* 8, (2017).
16. Pietilä, M. K., Hellström, K. & Ahola, T. Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus Res.* 234, 44–57 (2017).
17. Parrott, M. M. *et al.* Role of Conserved Cysteines in the Alphavirus E3 Protein. *J. Virol.* 83, 2584–2591 (2009).
18. Snyder, A. J. & Mukhopadhyay, S. The Alphavirus E3 Glycoprotein Functions in a Clade-Specific Manner. *J. Virol.* 86, 13609–13620 (2012).
19. Brown, R., Wan, J. & Kielian, M. The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew. *Viruses* 10, 89 (2018).
20. Dey, D. *et al.* The effect of amantadine on an ion channel protein from Chikungunya virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007548 (2019).

21. Azar, S. R., Campos, R. K., Bergren, N. A., Camargos, V. N. & Rossi, S. L. Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks. *Microorganisms* 8, 1167 (2020).
22. Monath, T. P. *Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. (CRC Press, 2019).
23. Diallo, D. *et al.* Landscape Ecology of Sylvatic Chikungunya Virus and Mosquito Vectors in Southeastern Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1649 (2012).
24. Mackay, I. M. & Arden, K. E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? *Microbes Infect.* 18, 724–734 (2016).
25. Navarro, J.-C., Carrera, J.-P., Liria, J., Auguste, A. J. & Weaver, S. C. Alphaviruses in Latin America and the Introduction of Chikungunya Virus. in *Human Virology in Latin America* (eds. Ludert, J. E., Pujol, F. H. & Arbiza, J.) 169–192 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-54567-7_9.
26. Powers, A. M. & Logue, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* 88, 2363–2377 (2007).
27. Tesh, R. B. *et al.* Mayaro Virus Disease: An Emerging Mosquito-Borne Zoonosis in Tropical South America. *Clin. Infect. Dis.* 28, 67–73 (1999).
28. Hall, R. A., Blitvich, B. J., Johansen, C. A. & Blacksell, S. D. Advances in Arbovirus Surveillance, Detection and Diagnosis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1–2 (2012).
29. Cunha, M. S. *et al.* Chikungunya Virus: An Emergent Arbovirus to the South American Continent and a Continuous Threat to the World. *Front. Microbiol.* 11, (2020).
30. Mota, M. T. de O., Ribeiro, M. R., Vedovello, D. & Nogueira, M. L. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. *Future Virol.* 10, 1109–1122 (2015).

31. Smithsonian Institution. Mosquitoes. *The Walter Reed Biosystematics Unit* <https://www.wrbu.si.edu/vectorspecies> (2021).
32. Figueiredo, M. L. G. de & Figueiredo, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47, 677–683 (2014).
33. Levi, L. I. & Vignuzzi, M. Arthritogenic Alphaviruses: A Worldwide Emerging Threat? *Microorganisms* 7, 133 (2019).
34. Muñoz, M. & Navarro, J. C. Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomédica* 32, 286–302 (2012).
35. Rezza, G. Dengue and chikungunya: long-distance spread and outbreaks in naïve areas. *Pathog. Glob. Health* 108, 349–355 (2014).
36. Lyimo, I. N. & Ferguson, H. M. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends Parasitol.* 25, 189–196 (2009).
37. Reeves, W. C. Ecology of Mosquitoes in Relation to Arboviruses. *Annu. Rev. Entomol.* 10, 25–46 (1965).
38. Chevillon, C., Briant, L., Renaud, F. & Devaux, C. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends Microbiol.* 16, 80–88 (2008).
39. da Cunha, R. V. & Trinta, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 523–531 (2017).
40. Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud. Alerta Epidemiológica: Fiebre de Mayaro. *Alerta Epidemiológica* (2019).

41. Neo, J. P. S. & Tan, B. H. The use of animals as a surveillance tool for monitoring environmental health hazards, human health hazards and bioterrorism. *Vet. Microbiol.* 203, 40–48 (2017).
42. Gardner, J. *et al.* Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. *J. Virol.* 84, 8021–8032 (2010).
43. Sharif, N. *et al.* Molecular Epidemiology, Evolution and Reemergence of Chikungunya Virus in South Asia. *Front. Microbiol.* 12, (2021).
44. Weaver, S. C. & Barrett, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 789–801 (2004).
45. Burt, F. J. *et al.* Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect. Dis.* 17, e107–e117 (2017).
46. Spicher, T., Delitz, M., Schneider, A. de B. & Wolfinger, M. T. Dynamic Molecular Epidemiology Reveals Lineage-Associated Single-Nucleotide Variants That Alter RNA Structure in Chikungunya Virus. *Genes* 12, 239 (2021).
47. Vu, D. M., Jungkind, D. & LaBeaud, A. D. Chikungunya virus. *Clin. Lab. Med.* 37, 371–382 (2017).
48. Weaver, S. C. & Forrester, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res.* 120, 32–39 (2015).
49. Ferreira, F. C. P. de A. D. M. *et al.* Vertical transmission of chikungunya virus: A systematic review. *PLOS ONE* 16, e0249166 (2021).
50. Foeller, M. *et al.* Chikungunya infection in pregnancy – reassuring maternal and perinatal outcomes: a retrospective observational study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 128, 1077–1086 (2021).

51. Gérardin, P. *et al.* Neurocognitive Outcome of Children Exposed to Perinatal Mother-to-Child Chikungunya Virus Infection: The CHIMERE Cohort Study on Reunion Island. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2996 (2014).
52. Constant, L. E. C. *et al.* Overview on Chikungunya Virus Infection: From Epidemiology to State-of-the-Art Experimental Models. *Front. Microbiol.* 12, (2021).
53. Schwartz, O. & Albert, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 491–500 (2010).
54. Silva, L. A. & Dermody, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J. Clin. Invest.* 127, 737–749 (2017).
55. Zaid, A. *et al.* Review: Chikungunya Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management. *Arthritis Rheumatol.* 70, 484–495 (2018).
56. Wauquier, N. *et al.* The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. *J. Infect. Dis.* 204, 115–123 (2011).
57. Caglioti, C. *et al.* Chikungunya virus infection: an overview. *New Microbiol.* 36, 211–227 (2013).
58. de Almeida Barreto, F. K. *et al.* Chikungunya and diabetes, what do we know? *Diabetol. Metab. Syndr.* 10, 32 (2018).
59. Badawi, A., Ryoo, S. G., Vasileva, D. & Yaghoubi, S. Prevalence of chronic comorbidities in chikungunya: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 67, 107–113 (2018).

60. Crosby, L. *et al.* Severe manifestations of chikungunya virus in critically ill patients during the 2013–2014 Caribbean outbreak. *Int. J. Infect. Dis.* 48, 78–80 (2016).
61. Suhrbier, A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* 15, 597–611 (2019).
62. Simon, F. *et al.* French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. *Médecine Mal. Infect.* 45, 243–263 (2015).
63. Amaral, J. K., Bilsborrow, J. B. & Schoen, R. T. Chronic Chikungunya Arthritis and Rheumatoid Arthritis: What They Have in Common. *Am. J. Med.* 133, e91–e97 (2020).
64. McCarthy, M. K. & Morrison, T. E. Chronic chikungunya virus musculoskeletal disease: what are the underlying mechanisms? *Future Microbiol.* 11, 331–334 (2016).
65. McCarthy, M. K., Davenport, B. J. J. & Morrison, T. E. Chronic Chikungunya Virus Disease. in (Springer Berlin Heidelberg, 2018). doi:10.1007/82_2018_147.
66. Sales, G. M. P. G. *et al.* Treatment of chikungunya chronic arthritis: A systematic review. *Rev. Assoc. Médica Bras.* 64, 63–70 (2018).
67. Goupil, B. A. & Mores, C. N. A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. *Open Rheumatol. J.* 10, 129–140 (2016).
68. Llagonne-Barets, M. *et al.* A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana. *J. Clin. Virol.* 77, 66–68 (2016).

69. Diagne, C. T. *et al.* Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. *Pathogens* 9, 738 (2020).
70. Cavaleiro, M. G. *et al.* Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 88, 1485–1499 (2016).
71. Acosta-Ampudia, Y. *et al.* Mayaro: an emerging viral threat? *Emerg. Microbes Infect.* 7, 1–11 (2018).
72. Esposito, D. L. A. & Fonseca, B. A. L. da. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *Braz. J. Infect. Dis.* 21, 540–544 (2017).
73. Asadi, R. & Mollasalehi, H. The mechanism and improvements to the isothermal amplification of nucleic acids, at a glance. *Anal. Biochem.* 631, 114260 (2021).
74. Gill, P. & Ghaemi, A. Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies—A Review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27, 224–243 (2008).
75. Zanolli, L. & Spoto, G. Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Devices. *Biosensors* 3, 18–43 (2012).
76. Zaghloul, H. Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis. *World J. Hepatol.* 6, 916 (2014).
77. Notomi, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63–e63 (2000).
78. Li, Y., Fan, P., Zhou, S. & Zhang, L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb. Pathog.* 107, 54–61 (2017).

79. Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. & Kanda, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.* 53, 1–5 (2015).
80. Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H. & Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 3, 877–882 (2008).
81. Wong, Y.-P., Othman, S., Lau, Y.-L., Radu, S. & Chee, H.-Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 124, 626–643 (2018).
82. Zhao, Y., Chen, F., Li, Q., Wang, L. & Fan, C. Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chem. Rev.* 115, 12491–12545 (2015).
83. Silva, S. J. R. da, Pardee, K. & Pena, L. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus: A Review. *Viruses* 12, 19 (2019).
84. Besuschio, S. A. *et al.* Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005779 (2017).
85. Kumvongpin, R. *et al.* High sensitivity, loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric gold-nanoparticle probes for visual detection of high risk human papillomavirus genotypes 16 and 18. *J. Virol. Methods* 234, 90–95 (2016).
86. Francois, P. *et al.* Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62, 41–48 (2011).
87. Wang, Q. *et al.* Real-Time Fluorescence Loop Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE* 8, e66406 (2013).

88. Nagamine, K., Hase, T. & Notomi, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* 16, 223–229 (2002).
89. New England BioLabs Inc. Bst 3.0 DNA Polymerase. *Bst 3.0 DNA Polymerase* <https://international.neb.com/products/m0374-bst-3-0-dna-polymerase#Product%20Information> (2022).
90. New England BioLabs Inc. Bst 2.0 DNA Polymerase. *Bst 2.0 DNA Polymerase* <https://international.neb.com/products/m0537-bst-20-dna-polymerase#FAQs%20&%20Troubleshooting> (2022).
91. Chander, Y. *et al.* A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Front. Microbiol.* 5, (2014).
92. Bruce, K. L., Leterme, S. C., Ellis, A. V. & Lenehan, C. E. Approaches for the detection of harmful algal blooms using oligonucleotide interactions. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 95–116 (2015).
93. Soroka, M., Wasowicz, B. & Rymaszewska, A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells* 10, 1931 (2021).
94. New England BioLabs Inc. Typical LAMP Protocol. *Typical LAMP Protocol* <https://international.neb.com/protocols/2015/08/04/typical-lamp-protocol-m0374> (2022).
95. Eiken Chemical Co. Basic principle. *Eiken Genome Site* <https://loopamp.eiken.co.jp/en/lamp/0203.html> (2021).
96. Fischbach, J., Xander, N. C., Frohme, M. & Glökler, J. F. Shining a light on LAMP assays— A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *BioTechniques* 58, (2015).

97. Scott, A. T., Layne, T. R., O'Connell, K. C., Tanner, N. A. & Landers, J. P. Comparative Evaluation and Quantitative Analysis of Loop-Mediated Isothermal Amplification Indicators. *Anal. Chem.* 92, 13343–13353 (2020).
98. Wastling, S. L., Picozzi, K., Kakembo, A. S. L. & Welburn, S. C. LAMP for Human African Trypanosomiasis: A Comparative Study of Detection Formats. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e865 (2010).
99. González-González, E. *et al.* *Scaling diagnostics in times of COVID-19: Colorimetric Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) assisted by a 3D-printed incubator for cost-effective and scalable detection of SARS-CoV-2.* <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.04.09.20058651> (2020)
doi:10.1101/2020.04.09.20058651.
100. Dirección General de Epidemiología. *Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vector.* (Secretaría de Salud, 2017).
101. Dirección General de Epidemiología. "Casos Confirmados de Fiebre Chikungunya", México, Semana Epidemiológica 33 de 2019. at https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/488181/Cuadro_Casos_y_Def_CHIK_SE33_2019.pdf (2019).
102. Navarrete-Espinosa, J. & Gómez-Dantés, H. Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Rev. Médica Inst. Mex. Seguro Soc.* 44, 347–353 (2006).
103. Wu, D., Kang, J., Li, B. & Sun, D. Evaluation of the RT-LAMP and LAMP methods for detection of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 32, e22326 (2018).

104. Calvert, A. E., Biggerstaff, B. J., Tanner, N. A., Lauterbach, M. & Lanciotti, R. S. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLOS ONE* 12, e0185340 (2017).
105. Estrela, P. F. N. *et al.* Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. *J. Virol. Methods* 271, 113675 (2019).
106. Guo, X.-G. *et al.* Rapid and reliable diagnostic method to detect Zika virus by real-time fluorescence reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *AMB Express* 8, (2018).
107. Kaarj, K., Akarapipad, P. & Yoon, J.-Y. Simpler, Faster, and Sensitive Zika Virus Assay Using Smartphone Detection of Loop-mediated Isothermal Amplification on Paper Microfluidic Chips. *Sci. Rep.* 8, (2018).
108. Kim, J.-G. *et al.* Rapid discriminative detection of dengue viruses via loop mediated isothermal amplification. *Talanta* 190, 391–396 (2018).
109. Lopez-Jimena, B. *et al.* Development of a single-tube one-step RT-LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006448 (2018).
110. Hayashida, K. *et al.* Field diagnosis and genotyping of chikungunya virus using a dried reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and MinION sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007480 (2019).
111. Parida, M. M. *et al.* Rapid and Real-Time Detection of Chikungunya Virus by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* 45, 351–357 (2007).
112. Joint Genoma Institute. *BB Tools Reformat.* (2019).

113. Kautz, T. F. *et al.* Chikungunya Virus as Cause of Febrile Illness Outbreak, Chiapas, Mexico, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 2070–2073 (2015).
114. Díaz-Quíñonez, J. A. *et al.* Complete Genome Sequences of Chikungunya Virus Strains Isolated in Mexico: First Detection of Imported and Autochthonous Cases. *Genome Announc.* 3, (2015).
115. Laredo-Tiscareño, S. V. *et al.* Arbovirus Surveillance near the Mexico–U.S. Border: Isolation and Sequence Analysis of Chikungunya Virus from Patients with Dengue-like Symptoms in Reynosa, Tamaulipas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 99, 191–194 (2018).
116. Khan, A. H. *et al.* Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site The GenBank accession number of the sequence reported in this paper is AF369024. *J. Gen. Virol.* 83, 3075–3084 (2002).
117. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549 (2018).
118. Carver, T., Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16, 276–277 (2000).
119. Rockweiler, T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Primer Design and Assay Optimization. (2018).
120. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410 (1990).

121. Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I. J. & Wishart, D. S. PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res.* 32, W660–W664 (2004).
122. Duan, Y., Ge, C., Zhang, X., Wang, J. & Zhou, M. A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Australas. Plant Pathol.* 43, 61–66 (2014).
123. Staroscik, A. Copy number calculator for realtime PCR. *SciencePrimer* <https://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr> (2020).
124. Mustafa, M. A., AL-Samarraie, M. Q. & Ahmed, M. T. Molecular techniques of viral diagnosis. *Sci. Arch.* 01, (2020).
125. Petralia, S. & Conoci, S. PCR Technologies for Point of Care Testing: Progress and Perspectives. *ACS Sens.* 2, 876–891 (2017).
126. Kutsuna, S., Saito, S. & Ohmagari, N. Simultaneous diagnosis of dengue virus, Chikungunya virus, and Zika virus infection using a new point-of-care testing (POCT) system based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *J. Infect. Chemother.* 26, 1249–1253 (2020).
127. Mo, Z. *et al.* Rapid Identification of Chikungunya and Dengue Virus by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87, 947–953 (2012).
128. Priye, A. *et al.* A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. *Sci. Rep.* 7, (2017).

129. Saechue, B. *et al.* Development of a portable reverse transcription loop-mediated isothermal amplification system to detect the E1 region of Chikungunya virus in a cost-effective manner. *Genes Cells* (2020) doi:10.1111/gtc.12797.
130. De la Cruz Pérez, J. Diagnóstico molecular diferencial del virus Dengue y Chikungunya, utilizando la técnica de amplificación isotérmica mediada por asa (RT-LAMP). (Universidad Autónoma Metropolitana, 2018).
131. Tanabe, I. S. B. *et al.* Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 345 (2018).
132. Sahadeo, N. S. D. *et al.* Understanding the evolution and spread of chikungunya virus in the Americas using complete genome sequences. *Virus Evol.* 3, (2017).
133. Benchling. Primer design. *Primer Design* <https://www.benchling.com/primers/#> (2022).
134. Eiken Chemical Co. Advanced primer design. at https://primerexplorer.jp/e/v3_manual/pdf/PrimerExplorerV3_Manual_3.pdf (2006).
135. Rychlik, W. Primer Selection and Design for Polymerase Chain Reaction. in *The Nucleic Acid Protocols Handbook* vol. 0 581–588 (Humana Press, 2000).
136. Vashist, S. K. & Luong, J. H. T. Bioanalytical Requirements and Regulatory Guidelines for Immunoassays. in *Handbook of Immunoassay Technologies* 81–95 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-811762-0.00004-9.
137. Hatano, B. *et al.* LAMP Using a Disposable Pocket Warmer for Anthrax Detection, a Highly Mobile and Reliable Method for Anti-Bioterrorism. *Jpn J Infect Dis* 63, 36–40 (2010).

138. Oloniniyi, O. K., Kurosaki, Y., Miyamoto, H., Takada, A. & Yasuda, J. Rapid detection of all known ebolavirus species by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods* 246, 8–14 (2017).
139. Pooja, S., Sudesh, D., Poonam, K., Joginder, S. D. & Suresh, K. G. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: A Review. *Afr. J. Biotechnol.* 13, 1920–1928 (2014).
140. Sauce, D. *et al.* PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS* 21, 2005–2013 (2007).
141. Wang, D. *et al.* Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and visual LAMP assay for detection of African swine fever virus (ASFV). *J. Virol. Methods* 276, 113775 (2020).
142. Salazar, A., Ochoa-Corona, F. M., Olson, J. D., Babu, B. & Paret, M. Probing Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) targeting two gene-fragments of rose rosette virus. *PLOS ONE* 16, e0256510 (2021).
143. Wu, S. *et al.* Colorimetric isothermal nucleic acid detection of SARS-CoV-2 with dye combination. *Heliyon* 7, e06886 (2021).
144. Morgan, A. *et al.* Caution for the routine use of phenol red – It is more than just a pH indicator. *Chem. Biol. Interact.* 310, 108739 (2019).
145. Peltzer, D., Tobler, K., Fraefel, C., Maley, M. & Bachofen, C. Rapid and simple colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Bovine alphaherpesvirus 1. *J. Virol. Methods* 289, 114041 (2021).

146. Poole, C. B. *et al.* Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP). *PLOS ONE* 12, e0169011 (2017).
147. Sathish Kumar, T. *et al.* Closed-tube field-deployable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on spore wall protein (SWP) for the visual detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *J. Invertebr. Pathol.* 183, 107624 (2021).
148. Henriques, A., Cereija, T., Machado, A. & Cerca, N. In silico vs in vitro analysis of primer specificity for the detection of *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* and *Lactobacillus* spp. *BMC Res. Notes* 5, 637 (2012).
149. Huang, B. *et al.* A LAMP-based colorimetric assay to expedite field surveillance of the invasive mosquito species *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008130 (2020).
150. Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F. & Morita, K. Real-Time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of West Nile Virus. *J. Clin. Microbiol.* 42, 257–263 (2004).

12. Anexo: Tabla Suplementaria - Características de los sets de primers generados de CHIKV y MAYV.

Características de los sets de primers generados en Primer Explorer V5 para el gen nsP1 de CHIKV y MAYV

Virus	Set	ΔG formación de dímeros	Primer	5'pos	3'pos	long	Tm	5'dG	3'dG	Secuencia
MAYV	1	-1.44	F3	1	20	20	59.20	-4.91	-6.42	CACTCATCCTGGATATCGGC
			B3	183	200	18	59.23	-7.03	-4.91	GGTCGCCATCACTGACTG
			F2	27	44	18	59.38	-6.69	-5.29	CCTGCCAGGAGAATGCTG
			F1c	86	105	20	65.80	-5.75	-5.11	GCAGACGCTCTGGGTCCTCA
			B2	163	182	20	59.24	-5.35	-6.43	CAGGTCGTCTATCTTCGCTG
			B1c	111	132	22	64.83	-4.98	-5.45	TATGCCAGGAAGTTGGCCAAGG
	2	-1.44	F3	1	20	20	59.20	-4.91	-6.42	CACTCATCCTGGATATCGGC
			B3	183	200	18	59.23	-7.03	-4.91	GGTCGCCATCACTGACTG
			F2	37	56	20	60.89	-4.91	-5.99	GAATGCTGTCTGAGCACACG
			F1c	86	105	20	65.80	-5.75	-5.11	GCAGACGCTCTGGGTCCTCA
			B2	163	182	20	59.24	-5.35	-6.43	CAGGTCGTCTATCTTCGCTG
			B1c	111	132	22	64.83	-4.98	-5.45	TATGCCAGGAAGTTGGCCAAGG
	3	-2.33	F3	28	46	19	59.78	-6.25	-5.75	CTGCCAGGAGAATGCTGTC
			B3	183	200	18	59.23	-7.03	-4.91	GGTCGCCATCACTGACTG
			47	66	20	59.99	-5.66	-4.21	47	TGAGCACACGTACCATTGTG

Virus	Set	ΔG formación de dímeros	Primer	5'pos	3'pos	long	Tm	5'dG	3'dG	Secuencia
			87	106	20	65.56	-5.49	-5.20	87	AGCAGACGCTCTGGGTCCTC
			163	182	20	59.24	-5.35	-6.43	163	CAGGTCGTCTATCTTCGCTG
			111	132	22	64.83	-4.98	-5.45	111	TATGCCAGGAAGTTGGCCAAGG
CHIKV	1	-1.96	F3	8	26	19	60.5	-6.39	-4.74	TCCCGACTCAACCATCCTG
			B3	176	195	20	60.01	-5.69	-4.86	AGTCCCCGATCTTTCCAGAA
			F2	27	46	20	59.48	-2.21	-7.09	GATATAGGTAGTGCGCCAGC
			F1c	68	89	22	65.94	-7.53	-3.59	CGGGCAAACGCAGTGGTACTTC
			B2	141	158	18	60.26	-4.13	-5.14	TTTTCTGCGGCAGATGC
			B1c	90	109	20	63.39	-6.97	-4.59	ATGCGCAGCGCAGAAGATCC
	2	-2.24	F3	31	48	18	60.34	-3.66	-5.41	TAGGTAGTGCGCCAGCAA
			B3	197	214	18	60.38	-7.52	-4.41	ACGGCCATCACCTCTTGT
			F2	57	76	20	59.93	-5.23	-4.74	ATGTCCGACAGGAAGTACCA
			F1c	97	117	21	64.35	-4.59	-7.42	GTCTCTCGGGATCTTCTGCGC
			B2	177	195	19	59.26	-5.69	-5.11	AGTCCCCGATCTTTCCAGA
			B1c	129	149	21	65.92	-6.28	-6.1	GCGAGAAAGCTCGCATCTGCC
	3	-2.20	F3	187	205	19	59.16	-6.98	-5.08	TCGGGGACTTACAAGAGGT
			B3	365	383	19	59.32	-5.16	-5.02	GGTTGTGTCTGAACCCTACC

Virus	Set	ΔG formación de dímeros	Primer	5'pos	3'pos	long	Tm	5'dG	3'dG	Secuencia
			F2	220	237	18	60.92	-6.33	-4.21	ACACGGAGACGCCAACAT
			F1c	263	284	22	65.47	-7.36	-3.99	CGCGACGTCTGCTCTCTGTCTA
			B2	346	363	18	59.94	-4.9	-5.2	AGTACGCCACTCGGACTC
			B1c	300	321	22	64.11	-4.37	-6.33	TATGCTGTACATGCACCCACGT
	4	-2.40	F3	105	124	20	60	-5.2	-5.26	GATCCCGAGAGACTCGCTAA
			B3	299	318	20	59.35	-6.01	-4.47	TGGGTGCATGTACAGCATAG
			F2	143	161	19	59.74	-5.14	-4.01	ATCTGCCGCAGGAAAAGTC
			F1c	195	216	22	64.86	-7.18	-3.41	GCACGGCCATCACCTCTTGTA
			B2	270	287	18	59.64	-5.16	-5.49	TATCGCGACGTCTGCTCT
			B1c	217	236	20	64.25	-4.91	-5.17	CAGACACGGAGACGCCAACA
	5	-2.00	F3	144	161	18	59.17	-6.1	-4.01	TCTGCCGCAGGAAAAGTC
			B3	346	363	18	59.94	-4.9	-5.2	AGTACGCCACTCGGACTC
			F2	176	195	20	60.01	-4.86	-5.69	TTCTGGAAAGATCGGGGACT
			F1c	216	235	20	64.85	-6.01	-5.35	GTTGGCGTCTCCGTGTCTGG
			B2	313	332	20	59.61	-3.64	-6.01	GTGATATAGCGACGTGGGTG
			B1c	264	284	21	65.87	-4.74	-7.36	AGACAGAGAGCAGACGTGCGG