



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA DE DETECCIÓN DIFERENCIAL DEL VIRUS ZIKA, Y SU
VALIDACIÓN COMO UNA HERRAMIENTA PARA EL DIAGNÓSTICO DE *FLAVIVIRUS* EN
MÉXICO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. EN C. MAURA DANIELA WÜRSCH MOLINA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARÍA ROSALÍA LIRA CARMONA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
COMITÉ TUTOR
DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. EDGAR ENRIQUE SEVILLA REYES
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSIO VILLEGAS"

MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en su programa y por haber aportado sustancialmente a mi formación académica.

A la doctora Rosalía Lira, tutora principal de este proyecto por todo su apoyo, dedicación y paciencia durante mi posgrado, por haberme aportado muchísimo a mi formación académica y personal. Muchas Gracias.

Al personal del laboratorio de virología de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría en Centro Médico Siglo XXI, en especial a la M. en C. Angelica Maldonado y al biólogo Othón Rojas por sus enseñanzas, consejos y compañía. También a mis compañeras de laboratorio, la doctora Karina Enríquez y la M. en C. Perla Pérez.

Al doctor Edgar Sevilla Reyes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), por su constante apoyo como miembro del comité tutor, por aportar muestras y otros materiales al proyecto, por enseñarme técnicas de laboratorio y análisis de datos y por fortalecer mi formación académica.

A la doctora Ana María Cevallos Gaos del Instituto de Investigaciones Biomédicas en la UNAM, por su constante apoyo como miembro del comité tutor, por ayudarme antes y después de cada evaluación importante y por fortalecer mi formación académica.

A la doctora Martha Yocupicio Monroy por su capacitación en varias técnicas de laboratorio, por invitarme a impartir una clase dentro de su curso de dinámica celular en el posgrado de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) y participar en algunas de mis evaluaciones. También a los alumnos de su laboratorio, el M. en C. Gabriel Pérez, Vanessa Iglesias y Karina Arias por su apoyo y acompañamiento.

A la doctora Beatriz Xoconostle y los miembros de su laboratorio del departamento de biotecnología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), principalmente al doctor Gabriel Marcelino, el doctor José Ramírez-Pool y al M. en C. Leandro Núñez por su capacitación y apoyo para realizar la producción del multi-péptido recombinante y por sus grandes aportaciones a mi formación académica.

Al doctor Jesús Torres Flores del Instituto Politécnico Nacional (IPN), por ayudarme a mejorar algunas técnicas de laboratorio y por participar en mi formación académica.

A la doctora Vanessa López Guerrero de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), por apoyar con ideas, revisar y sugerir modificaciones a los métodos utilizados en este proyecto.

Al doctor Adolfo Chávez Negrete de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, y a la doctora Edith Guillen, coordinadora de planeación y enlace institucional del Instituto Mexicano del Seguro Social en Veracruz, por su apoyo para organizar y autorizar las colectas de suero en el estado de Veracruz.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que se me brindo durante el posgrado.

Finalmente, a mi familia, mi mamá, Cecilia Molina, mi papá, Stephan Wursch y a mi hermana Silvana Wursch por su apoyo incondicional y paciencia infinita. Los quiero mucho. Y a todos los gatitos que han estado presentes en la realización de este proyecto.

Índice

Resumen	8
Abstract.....	9
Marco Teórico.....	10
Genoma y estructura de los <i>Flavivirus</i>	10
Ciclo de replicación de los <i>Flavivirus</i>	12
Evasión de la respuesta inmune	15
Características clínicas y epidemiológicas de la infección por ZIKV	17
Características clínicas y epidemiológicas de la infección por DENV	19
Implicaciones de los anticuerpos con reactividad cruzada en el contexto de la cocirculación de DENV y ZIKV	20
Estrategias para el diagnóstico de la infección por <i>Flavivirus</i>	21
Estrategias para el diagnóstico serológico diferencial de la infección por ZIKV	23
Muestras secas: una alternativa para el diagnóstico de la infección por <i>Flavivirus</i> en regiones de bajos recursos	24
Justificación	26
Objetivos.....	27
Materiales y Métodos	28
descripción de las muestras de suero de sujetos con sospecha de infección por arbovirus utilizadas en este estudio.....	28
Elución de las DSS	30
Determinación de anticuerpos en muestras pareadas de suero y DSS.....	30
Análisis de la identidad en la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV y de los 4 serotipos de DENV, provenientes de cepas aisladas en América	30
Selección de las secuencias peptídicas a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV y DENV 2.....	31
Obtención el fragmento de DNA codificante para el multi-péptido de ZIKV mediante PCR de ensamblaje.....	31
Clonación del producto de PCA en el vector pTrcHis-TOPO.....	32
Subclonación en los vectores pCri.....	34
Transformación en bacterias competentes BL21	34
Inducción de la expresión del multi-péptido de ZIKV en células BL21	34
Extracción de proteínas.....	35

Purificación del multi-péptido de ZIKV	35
Titulación de la concentración de una mezcla de los péptidos de ZIKV en placa	36
Titulación del tiempo de incubación y la concentración de los sueros	36
Evaluación de las condiciones del ensayo de ELISA	36
Análisis estadísticos.....	37
Resultados.....	38
Evaluación de muestras pareadas de suero y DSS	38
Identidad de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 entre ZIKV y DENV	42
Síntesis del multi-péptido de ZIKV en <i>Escherichia coli</i>	45
Estandarización de un ensayo de ELISA utilizando los péptidos de NS1 de ZIKV con muestras de suero de sujetos con infección previa por DENV y ZIKV	49
Discusión	53
Conclusiones	58
Referencias:	59
Anexo 1: Preparación de DSS	79
Anexo 2: Elución de DSS	80
Anexo 3: Artículo publicado	81
Figura 1: Estructura viral de los <i>Flavivirus</i>.....	12
Figura 2: Ciclo de replicación viral	14
Figura 3: Inhibición de la vía de interferones tipo I por las proteínas virales.....	17
Figura 4: Historia natural de la infección por ZIKV y DENV.....	23
Figura 5: Diagrama de flujo de la obtención y manejo de muestras de suero.....	30
Figura 6: Vector pTrCHis TOPO circularizado con el inserto de los péptidos de NS1 de ZIKV.....	34
Figura 7: Vectores pCri 1a, 4a, 6a y 8a.....	34
Figura 8: Diagrama de la construcción de la proteína MBP unido al multi-péptido de ZIKV	36
Figura 9: Correlación la IgM anti-CHIKV en muestras pareadas de suero y DSS.....	39
Figura 10: Correlación entre la IgM anti-DENV en muestras pareadas de suero y DSS.....	40
Figura 11: Correlación entre la IgG anti-DENV en muestras pareadas de suero y DSS.....	41
Figura 12: Correlación entre la IgG anti-ZIKV en muestras pareadas de suero y DSS.....	42
Figura 13: Gráfica de la determinación de IgG anti-ZIKV en muestras colectadas en Veracruz durante 2013 y 2015.....	43
Figura 14: Identidad entre cada aminoácido de la proteína NS1 de ZIKV en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 de los 4 serotipos de DENV.....	45

Figura 15: . Alineamiento de las secuencias consenso de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV y los 4 serotipos de DENV.....	46
Figura 16: Multi-péptido diseñado a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV	47
Figura 17: Evaluación de la expresión de los péptidos recombinantes utilizando los vectores pCri 1a, 4a, 6a y 8a, mediante SDS-PAGE.....	48
Figura 18: Purificación del multi-péptido de ZIKV a partir de la fracción soluble del cultivo celular.....	49
Figura 19: Estandarización de concentración de péptidos en placa y de condiciones de incubación de las diluciones de suero.....	51
Figura 20: Comparación entre las diluciones del anticuerpo secundario.....	52
Figura 21: Comparación entre muestras de suero de sujetos negativos para IgG anti-ZIKV y sujetos positivos para IgG anti-ZIKV.....	53
Tabla 1: Identidad de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 entre ZIKV y DENV	44

Resumen

El virus Zika (ZIKV) es un arbovirus (del inglés, arthropod-borne virus) ya que es transmitido por mosquitos del género *Aedes*. El ZIKV forma parte de la familia *Flaviviridae* y del género *Flavivirus*, que se refiere a virus envueltos y con un genoma de RNA de sentido positivo. El género *Flavivirus* incluye a otros virus relevantes para la salud pública, como el virus del dengue (DENV), el virus de fiebre amarilla (YFV) y el virus del Oeste del Nilo (WNV).

El brote epidemiológico más importante del ZIKV ocurrió en América, donde se reportaron más de 200 mil casos entre 2015 y 2016, en el cual se comenzó a observar un incremento de casos de malformaciones congénitas, como microcefalia, y también de padecimientos neurológicos, como el síndrome de Guillain Barré, las cuales fueron atribuidas a la infección por ZIKV.

El diagnóstico serológico de la infección por ZIKV es complejo debido a que los anticuerpos generados durante una infección por *Flavivirus* pueden presentar reactividad cruzada hacia otros *Flavivirus*, debido a la alta similitud entre su estructura y secuencias de aminoácidos. Consideramos que el mejoramiento de las pruebas de diagnóstico serológico es importante debido a que la reactividad cruzada de los anticuerpos generados por la infección por *Flavivirus* ocasiona que estas pruebas sean poco específicas. En regiones donde circula DENV y ZIKV es importante contar con pruebas diferenciales debido a las complicaciones que pudiera generar la infección por ZIKV, y, además, están en riesgo de presentar nuevas epidemias por otros *Flavivirus*. Por lo cual este proyecto estuvo enfocado en la identificación de péptidos poco conservados entre ZIKV y DENV, que puedan ser utilizados para el desarrollo de ensayos de ELISA para la detección diferencial de anticuerpos.

Se seleccionaron tres péptidos antigénicos de ZIKV, los cuales también fueron poco conservación con DENV, estos fueron sintetizados y utilizados como antígenos para estandarizar un ensayo de ELISA, y así identificar si utilizando estos, es posible discriminar entre muestras de suero provenientes de pacientes con infección reciente por ZIKV o DENV. Las muestras de suero utilizadas fueron colectadas en distintos brotes de ZIKV y DENV en dos regiones endémicas a ambos virus, además, se evaluaron muestras de suero secas, almacenadas en papel filtro.

Bajo las condiciones probadas en este trabajo, los tres péptidos de ZIKV seleccionados no permitieron diferenciar entre muestras de suero provenientes de sujetos con previa exposición a ZIKV y sueros provenientes de sujetos sin exposición previa a *Flavivirus*, sin embargo, en este trabajo se demostró que las muestras de suero seco en papel filtro son una buena alternativa al uso de muestras de suero convencionales, para la determinación de anticuerpos específicos.

Abstract

The Zika Virus (ZIKV) is an arbovirus (arthropod-borne virus) because is transmitted by mosquitos from the genus *Aedes*. ZIKV belongs to the *Flaviviridae* family and *Flavivirus* genus, which includes enveloped viruses with a single-stranded positive RNA genome. The genus *Flavivirus* includes public health relevant viruses such as Dengue virus (DENV), Yellow Fever virus (YFV), and West Nile virus (WNV).

The most relevant ZIKV outbreak happened in America in 2015 and 2016, with more than 200 thousand cases, and an in increase in congenital malformations, such as microcephalia, and neurological disorders, such as Gillain Barré syndrome were reported to be associated with ZIKV infection.

The ZIKV serological diagnosis can be difficult because of the cross reactivity of the antibodies generated during a *Flavivirus* infection, towards other *Flavivirus* antigens, due to the high structural and amino acid sequence similitude between them. We considered that the development of assays to improve the serological diagnosis is important, because the serological tests are not so specific. In areas where ZIKV cocirculates with DENV is important to have specific tests due to the complications that can be generated during ZIKV infection, besides, these regions are at risk of having new outbreaks caused by other *Flavivirus*. The aim of this project is the selection of non-conserved peptides ZIKV that can be useful for the development of an ELISA test for differential detection of anti-DENV and anti-ZIKV antibodies.

We selected three antigenic ZIKV peptides, which had low identity compared to DENV. This were synthetized and used as antigens for the standardization of an ELISA test. In this way we could evaluate if it is possible to discriminate between serum samples from patients with ZIKV or DENV recent infection. In this study we used serum samples collected during three different ZIKV or DENV outbreaks happened in two endemic regions. Besides this, we also evaluated dried serum samples, stored in filter paper.

In this work, the three selected ZIKV peptides were not useful for discriminate between serum samples from serum samples from subjects with previous ZIKV exposure and serum samples from subjects without any *Flavivirus* exposure. Nonetheless, in this work we demonstrated the usefulness of dried serum samples as an alternative for conventional serum samples during antibody determinations.

Marco Teórico

Los *Flavivirus* es un género de virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, los cuales son virus de RNA de cadena simple positiva y con envoltura. Este género incluye a varios virus de importancia en salud pública como el virus del dengue (DENV), virus Zika (ZIKV), virus del Oeste del Nilo (WNV), virus de la fiebre amarilla (YFV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), entre otros [1–3]. Dentro del DENV se identifican 4 serotipos, y todos ellos circulan actualmente en México. El DENV fue identificado por primera vez en México en 1978 [4], y la circulación de ZIKV se reportó en 2015 [5]. Ambos virus pertenecen al mismo género, por lo cual tienen una alta similitud en su estructura antigénica y genómica, por lo que el diagnóstico diferencial es un reto. Ese trabajo estará enfocado en el diagnóstico de ambos virus en México.

Genoma y estructura de los *Flavivirus*

Los *Flavivirus* son virus de aproximadamente 50 nm con envoltura y con una simetría de la nucleocápside icosaédrica. El material genético consiste en una única cadena de ARN de polaridad positiva que varía en tamaño de 9.3 a 12.6 kb (Fig. 1).

El virión está conformado por tres proteínas estructurales: la proteína cápside (C) que va a recubrir el genoma viral, la proteína de membrana (prM), y la proteína de envoltura (E), que son las que recubren al virión [6–8] (Fig. 1A). La cápside es una proteína altamente conservada, de 100 a 103 aminoácidos en los diferentes miembros de los *Flavivirus*. Tiene dominios con carga positiva, los cuales facilitan la interacción con el RNA viral, y dominios hidrofóbicos que favorecen la formación de homodímeros para la oligomerización de la nucleocápside, y juega un papel importante en el ensamblaje del virión [9–11]. La proteína prM tiene 166 aminoácidos; al ser sintetizada se encuentra en una forma inmadura, y una vez que el virión se ensamble en la red trans-Golgi, la proteasa celular furina escinde la parte “pr” de 91 aminoácidos, dando lugar a un reacomodo de las proteínas de la envoltura viral para la maduración del virión [6,12]. La proteína E tiene 502-504 aminoácidos y tiene tres dominios: EDI, EDII y EDIII. Cada virión tiene 180 copias de la proteína E acomodadas en dímeros cuando el virión está maduro. La proteína E es la que induce la respuesta neutralizante de anticuerpos, principalmente a los dominios EDII y EDIII [7,13–16].

El genoma de los *Flavivirus* está formado por RNA de cadena sencilla, de sentido positivo de alrededor de 11 kb; tiene un solo marco abierto de lectura y dos regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5' y 3' [6,17]. El genoma viral codifica a una poliproteína que es escindida por proteasas celulares y la proteasa viral NS3, en tres proteínas estructurales: la proteína E, la proteína prM y la cápside. También codifica siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b,

NS3, NS4a, NS4b y NS5) [6–8] (Fig. 1B). Las proteínas no estructurales tienen varias funciones, como la replicación del genoma viral, el procesamiento de la poliproteína y la evasión de la respuesta inmune, las cuales serán descritas más adelante.

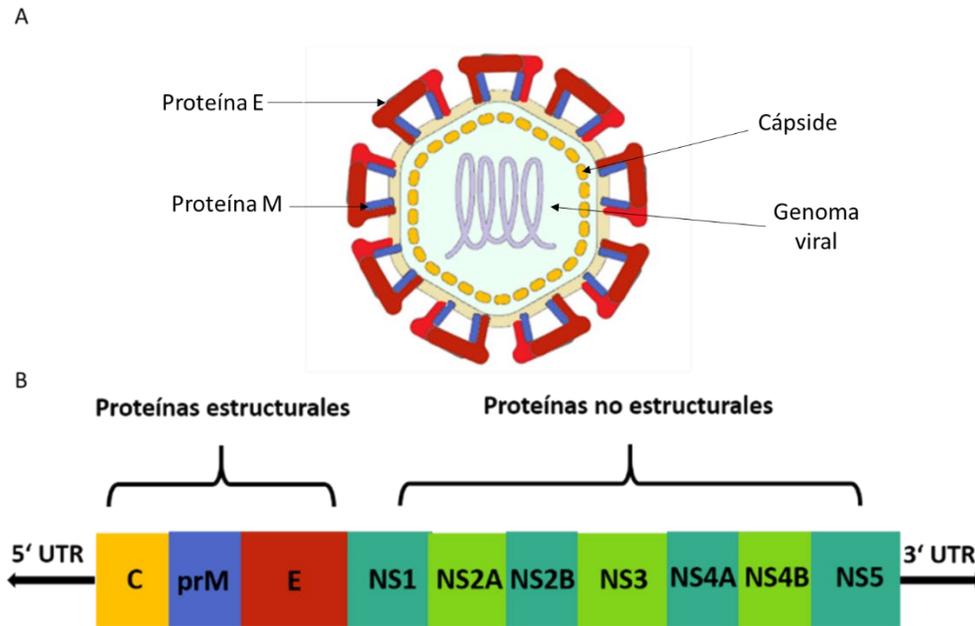


Figura 1. Estructura viral de los *Flavivirus*. A) La partícula viral está formada por tres proteínas estructurales: la proteína de membrana, la proteína de envoltura (E) y la proteína de cápside, y posee un genoma de RNA de cadena simple, sentido positivo. B) el genoma viral consta de dos regiones no codificantes (UTR) en los extremos, y la región codificante, la cual se traduce en una poliproteína que da lugar a tres proteínas estructurales y 7 no estructurales.

Los UTR 5' y 3' tienen funciones importantes para la replicación y traducción del genoma viral, para el ensamblaje del virión y la inhibición de la respuesta inmune. La región UTR 5' tiene aproximadamente 100 nucleótidos y tiene dos estructuras de tallo-asa (SL del inglés, stem-loops). Estas son necesarias para la replicación del genoma ya que permiten la unión de la proteína NS5 y su dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA [18,19], además, poseen una región complementaria a un SL del UTR 3', y al unirse ambos extremos, se genera la circularización del RNA viral, y así, la proteína NS5 puede iniciar la replicación del genoma [20,21]. El UTR 3' tiene 400-450 nucleótidos, en esta región se encuentra el promotor para el inicio de la traducción [22], y también participa uniéndose a la proteína viral NS2a para dirigir el RNA viral al sitio ensamblaje del virión [23]. La región UTR 3' también tiene un dominio de doble asa (DB del inglés, dumbbell), del cual se genera un RNA subgenómico por la acción de exonucleasas celulares, el cual tiene la capacidad de actuar como RNA de interferencia para evitar la producción de factores antivirales como interferones tipo I y RIG-I [24–26].

Ciclo de replicación de los *Flavivirus*

Los *Flavivirus* son depositados por el mosquito en la dermis, donde infectan a queratinocitos, fibroblastos y células dendríticas de la piel, estas últimas van a migrar a los órganos linfoides, donde los nuevos viriones infectan a otras células, principalmente monocitos y macrófagos. El proceso de entrada de los *Flavivirus* a la célula hospedera involucra la interacción de las proteínas del virión con varios receptores específicos y moléculas chaperonas que facilitan la entrada del virus a la célula [27].

Dentro de los factores que facilitan la interacción del virus con la célula se encuentran los glicosaminoglicanos como el heparán sulfato, que favorecen las interacciones electrostáticas entre la proteína E del virión [27–32]; las integrinas $\alpha\beta3$ favorecen la interacción entre el virión y la célula [27,30], y también moléculas lipídicas como esfingolípidos, fosfatidilserina y el colesterol, que ayudan a concentrar receptores virales en balsas lipídicas de la membrana celular [27,28,33–35].

Los receptores específicos de los *Flavivirus* son varios, y la mayoría de estos son comunes entre los *Flavivirus* debido a su alta similitud estructural. Los receptores más descritos son los receptores de lectina tipo C como DC-SIGN, L-SIGN, CLEC5 y receptores de manosa, los cuales están presentes en células dendríticas y monocitos [27,28,36], receptores tirosin-kinasas como TIM (del inglés, T cell immunoglobulin and mucin domain) y aquellos de la familia TAM (Tyro3, Axl y Mer) [32,36–40]. Axl es uno de los receptores más estudiados; los *Flavivirus* se unen al ligando de Axl, Gas6, y entran junto con él a la célula. Entre los *Flavivirus*, ZIKV es el que tiene mayor afinidad hacia Gas6 [37,38], lo cual parece facilitar su la entrada a progenitores neurales, astrocitos y células gliales [41,42], trofoblastos, líneas celulares placentarias [43,44], y a células de gónadas como células de Sertoli y espermatogonias [39,45]. En los últimos años se han identificado otros receptores celulares como la proteína prohibitina, expresada en microglía, y que permite la entrada de DENV *in vitro* [46] y, la proteína NCAM1 (del inglés, neural cell adhesion molecule 1), que permite la entrada de ZIKV en líneas celulares de glioblastoma [47].

Una vez que el virus se ha unido al receptor, el virión se endocita por una vía dependiente de clatrina (Fig. 2). También se han identificado algunas moléculas chaperonas como las proteínas de la familia HSP70 y HSP90 [48–51]. Después de ser endocitado en endosomas primarios, el virus pasa a endosomas tardíos, donde el pH disminuye, induciendo un cambio conformacional en la envoltura del virus, produciendo que los dímeros de la proteína E se separen, y la membrana viral se fusione con la membrana del endosoma, liberándose la cápside con el genoma viral al citoplasma de la célula (Fig. 2) [33,45].

Ya que el genoma viral es un RNA de cadena simple y polaridad positiva, éste puede ser directamente traducido por los ribosomas en una poliproteína. Esta poliproteína va a ser escindida en las tres proteínas estructurales (C, prM y E) y las 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b NS5). La escisión la lleva a cabo la proteína NS3 que tiene la función de proteasa en el dominio C-terminal y utiliza como cofactor a la proteína NS2b; esta proteasa viral escinde la mayoría de las proteínas virales, a excepción de la proteína de prM y E, que son escindidas por la proteasa celular signalasa [52–54].

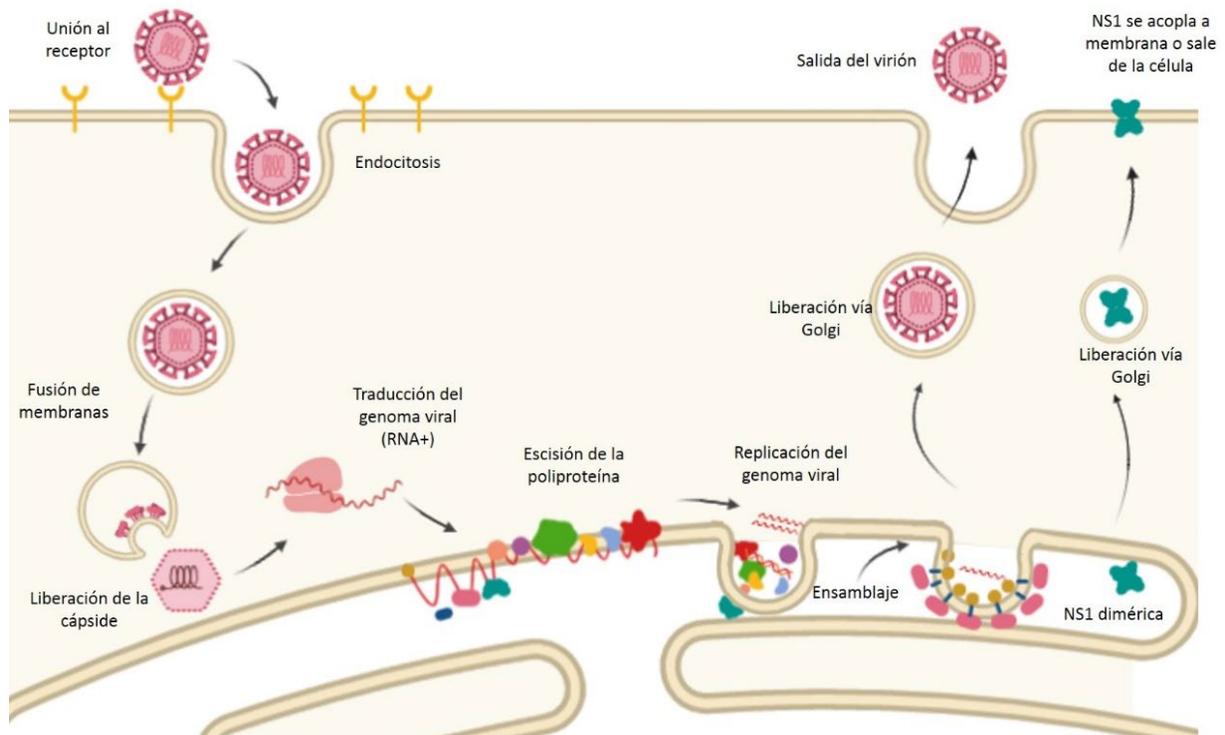


Figura 2. Ciclo de replicación viral. El virus se une a los receptores de la célula, entrando por endocitosis. En el endosoma ocurre una fusión de membranas, ocasionando que el RNA sea liberado al citoplasma y traducido, obteniendo la poliproteína viral, la cual es escindida en el retículo endoplásmico. Las proteínas escindidas formaran los paquetes vesiculares donde ocurre la replicación del genoma viral y los complejos de membranas donde las proteínas estructurales comenzaran a ensamblarse para formar la partícula viral, los cuales serán liberados posteriormente mediante endosomas. La proteína viral NS1 también es liberada mediante endosomas o es acoplada a la membrana celular.

Después de que las proteínas son escindidas, se forman pliegues en la membrana del retículo endoplásmico: los complejos de membrana (convoluted membranes), y los paquetes vesiculares (vesicle packets). En los complejos de membrana va a ocurrir el ensamblaje de las partículas virales, y en los paquetes vesiculares la replicación del RNA [55–57]. La función de estas vesículas es proteger al complejo de replicación del RNA de la respuesta inmune celular.

Los paquetes vesiculares tienen un poro que va hacia el citoplasma, el cual va a servir para intercambio de moléculas y para la salida del RNA hacia los ribosomas [55]. La poliproteína viral tiene varios dominios transmembranales, y al ser escindida, las proteínas NS3, NS5 y cápside se localizarán del lado citoplasmático, prM, E y NS1 del lado luminal del retículo endoplásmico, y las proteínas NS2a, NS2b, NS4a y NS4b se encuentran embebidas en la membrana del retículo[30]. Estas últimas inducen la formación de los pliegues, principalmente NS4a y NS4b, las cuales forman homodímeros para estabilizar estas estructuras vesiculares y reclutar factores celulares que contribuyen a la curvatura, como la vimentina, TMEM41B, y atlastinas [55,56,58–61]. Dentro de estos paquetes vesiculares se lleva la replicación de RNA, en el cual el dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA de la proteína NS5 va a sintetizar una hebra de RNA sentido negativo que va a servir de molde para sintetizar más hebras positivas [62–64]. Durante la replicación del RNA participa el dominio de helicasa de la proteína NS3 asociada a NS4b como cofactor [52,56,65]. Después de la replicación del RNA se lleva a cabo el proceso de *capping*, en el que participa el dominio de metiltransferasa de la proteína NS5 y el dominio helicasa de NS3 que también tiene función de trifosfatasa [62,65].

Los complejos de membrana son estructuras similares a los paquetes vesiculares. En ellos se lleva a cabo parte del procesamiento de la poliproteína y el ensamblaje del virión (Fig. 2). Después del procesamiento de la poliproteína, se ha identificado que la proteína NS2a se asocia al UTR 3' del RNA viral y lo relocaliza en los complejos de membrana donde éste se acopla con la proteína de cápside [23,66], por las interacciones inespecíficas entre la carga positiva del dominio N-terminal de la cápside y la carga negativa del RNA viral [10,11,67]. Posteriormente se forma la envoltura viral por la heterodimerización de prM y E, estos heterodímeros se van a acoplar en trímeros, formando la unidad de ensamblaje del virión, la cual tiene dominios transmembranales que interactúan con la cápside, y de esta forma se ensambla el virión inmaduro [6]. En este proceso participan los factores celulares ESCRT (del inglés, endosomal sorting complexes required for transport), los cuales llevan a cabo la remodelación de membranas para envolver la nucleocápside [6,68].

El virión inmaduro pasa por la red del complejo de Golgi, siguiendo la vía de secreción clásica. En la red trans-Golgi ocurren dos modificaciones postraduccionales, la glicosilación de la proteína E y una escisión del precursor de la proteína de membrana M (prM), eliminando 90 aminoácidos por acción de la proteasa celular furina, para dar lugar a la proteína madura M. Además, ocurre un cambio de pH que induce que la estructura de heterodímeros de la envoltura se reacomode a dímeros de proteína E. Posteriormente la partícula viral madura va a ser liberada por exocitosis (Fig. 2) [69,70].

Además de los viriones maduros, las células infectadas por *Flavivirus* también secretar a la proteína NS1 (Fig. 2) [71,72]. Esta proteína se asocia en homodímeros desde el retículo endoplásmico, y de ahí puede migrar a la membrana plasmática de la célula acoplada a glicosidilfosfatidilinositol (GPI) o ser transportada a la red del complejo de Golgi, donde se va a glicosilar en dos sitios (Asn 130 y Asn 207) [73]. Mediante puentes disulfuro se unen 3 dímeros para formar una estructura de barril hexamérico, el cual tiene la parte hidrofóbica de la proteína en medio, asociada a moléculas lipídicas que incluyen triglicéridos, fosfolípidos, y esterios de colesterol [74–76]. Además de la forma dimérica y hexamérica, se ha descrito una forma tetramérica que también es secretada [76]. Esta proteína va a tener varias funciones en la inhibición de la respuesta inmune y la patogénesis de los *Flavivirus* que serán descritas más adelante.

Evasión de la respuesta inmune

La primera línea de respuesta frente una infección por *Flavivirus* es la respuesta inmune innata mediada por los PRR (del inglés: pattern recognition receptors), principalmente por TLR3 y TLR7 (del inglés: Toll-Like receptor), RIG-1 (del inglés, retinoic acid-inducible gene 1), MDA5 (del inglés, melanoma differentiation-associated gene 5) y por receptores tipo NOD (del inglés, Nucleotide-binding and oligomerization domain) que reconocen RNA de doble cadena y RNA viral de cadena simple en el citoplasma [77,78]. Se ha reportado la activación de otros TLR's como TLR4 por la proteína NS1 [79,80]. La activación de TLR3, TLR7, RIG-1, MDA5 y NOD tiene la finalidad de activar la transcripción de interferones tipo I (IFN α e IFN β) y los ISG (del inglés, Interferon-stimulated genes), los cuales participan en la restricción de la replicación viral, tanto en la célula infectada como en las células cercanas.

La activación de TLR3 trae consigo la activación de TRIF, que recluta a las cinasas TBK1 e IKK ϵ , las cuales se fosforilan y al activarse fosforilaran a IRF3 (del inglés, Interferon regulatory factor), un factor de transcripción que transloca al núcleo y activa la transcripción de IFN α y β y de ISG [77]. La vía de activación de TLR3 converge con la vía de activación de RIG-1 y MDA5, los cuales, al activarse, producen la activación de cinasas que fosforilan a otros factores de transcripción como a IRF3, IRF7 y NF κ B (Fig. 3A) [77].

Hay varias proteínas virales que intervienen en estas vías: NS2b interrumpe la vía de RIG-1/MDA5 ya que interactúa e inactiva MAVS e IKK ϵ [81]; NS4a se une a los dominios CARD del factor MAVS y los bloquea para su interacción con las cinasas [82]; NS1 se une al factor CDK1, y evita que MAVS se fosforile [83]; NS1 se une a TBK1, inhibiendo su fosforilación [84]; NS2a, NS4a y NS4b inhiben la fosforilación de IRF3 [84,85], NS5 tiene la capacidad de translocarse al núcleo de la célula, donde se ha observado que puede inactivar a IRF3 (Fig. 3A) [86].

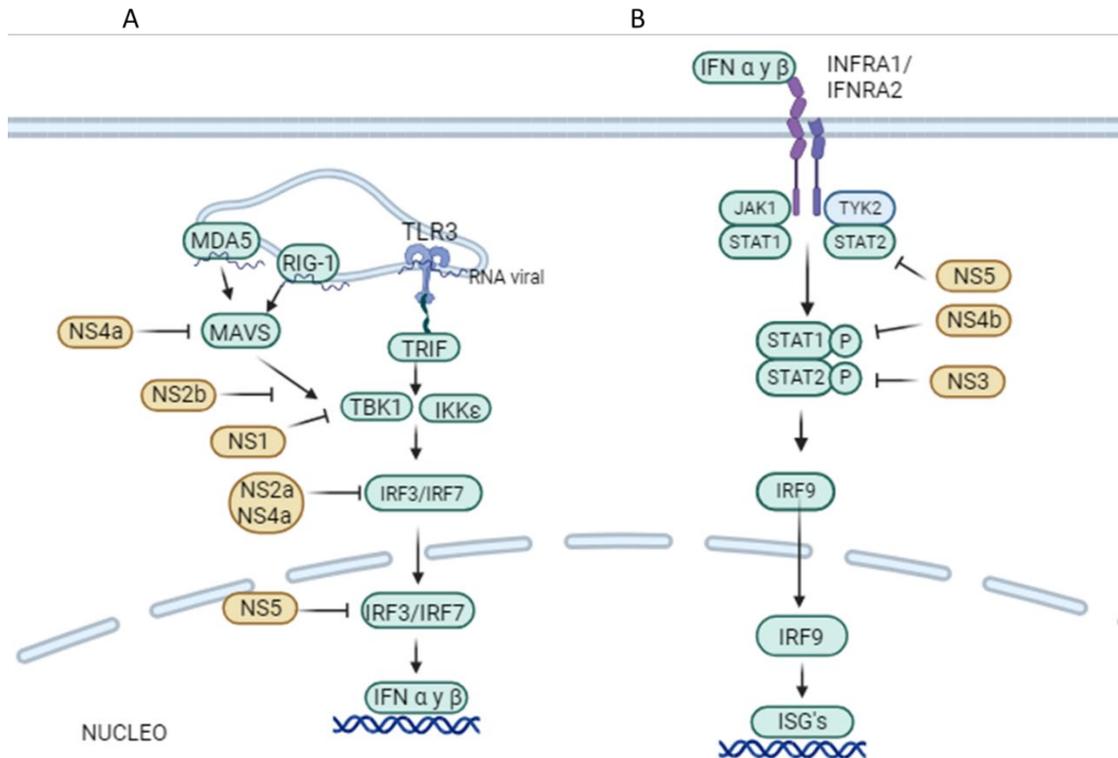


Figura 3. Inhibición de la vía de interferones tipo I por las proteínas virales. A) vías de señalización de TLR3, MDA5 y RIG-1, para la transcripción de IFN α y β en azul, la intervención de las proteínas virales (anaranjado) se muestra con el símbolo de inhibición (⊘). B) vía de señalización de los IFN tipo I para la transcripción de los genes asociados a IFN (ISG's) en azul, y la intervención de las proteínas virales (anaranjado) se muestra con el símbolo de inhibición (⊘).

Los interferones tipo I son secretados y estimulan autocrinamente y paracrinamente a las células mediante los receptores de interferón IFNRA1 e IFNRA2 para la estimulación de ISG's. Esta estimulación está mediada por la vía de JAK/STAT, en la cual se reclutan los factores STAT1 y STAT2, los cuales se fosforilan y reclutan a los factores de transcripción IRF9 e ISGF3, que estimulan de la transcripción de ISG's, los cuales incluyen a múltiples exonucleasas, PRR's, e inhibidores de la traducción de proteínas (Fig. 3B) [77]. En esta parte de la vía, se ha identificado que la proteína NS5 se une a STAT2 promoviendo su degradación [64,87,88], NS3 puede reclutar a una ubiquitin-protein-ligasa (UBR4) que degrada a STAT2 [87], NS4b suprime la fosforilación de STAT1 (Fig. 3B) [58,89].

Otra de las vías utilizadas para la evasión de la respuesta inmune durante la infección por *Flavivirus* es la inhibición de la vía del complemento por la proteína NS1. NS1 se une al factor inhibidor H, que se activa y escinde a C3b; también se une al factor inhibidor C4BP que inactiva a C4b, e inhibe la formación del complejo de ataque a membrana al activar a proteínas como clusterina y vitronectina [73,90,91].

Características clínicas y epidemiológicas de la infección por ZIKV

La transmisión del ZIKV se da principalmente por medio de vectores mosquito del género *Aedes*, siendo *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* los más comunes en el ciclo de vida urbano [92–94]. El ZIKV también se ha identificado que puede ser transmitido sexualmente, ya que se ha encontrado RNA viral en espermatozoides [95,96], secreciones vaginales y mucosa endocervical [97,98]. Además, se han reportado varios casos de turistas que visitaron una región endémica a ZIKV y a su regreso transmitieron la infección de ZIKV a sus parejas en regiones no endémicas a ZIKV [99,100]. Se ha reportado que el RNA viral se mantiene por un tiempo más prolongado en estos fluidos en comparación con sangre, durando incluso hasta 6 meses [96,98,101]. La infección por ZIKV también se puede transmitir a través de la lactancia; se ha encontrado RNA viral en la leche materna y se han confirmado algunos casos de transmisión por esta vía [102,103]. Sin embargo, uno de los problemas más graves que causa la infección por ZIKV es la transmisión congénita [104,105], que en algunos casos trae consecuencias como malformaciones, como microcefalia y anomalías en sistema nervioso central del feto [106,107].

El ZIKV se identificó por primera vez en Uganda en 1947 en una población de macacos *Rhesus* del bosque de Zika, y el primer reporte de infección en humanos se dió en Nigeria en 1954 [108,109]. En los años 2007 y 2013 ocurrieron epidemias importantes en la Isla de Yap y la Polinesia Francesa respectivamente. Durante éstas la incidencia de la infección fue de tres cuartos de la población de la Isla de Yap y cerca del 11% de la población de la Polinesia Francesa tuvo contacto con el virus [110,111].

En el año 2015 el ZIKV fue identificado por primera vez en América, donde los primeros casos fueron reportados en las Islas de Pascua en Chile. Uno de los retos que se presentó en esta pandemia fue la poca información genómica que se tenía del ZIKV, a pesar de que este había sido identificado casi 70 años atrás [112]. Los primeros trabajos de aislamiento y secuenciación del virus indican que la circulación de ZIKV en Brasil pudo haber comenzado en 2014, y que el virus identificado en la región provenía del linaje asiático, siendo la secuencia identificada en la Polinesia Francesa en 2014, con la que se tiene mayor similitud. Por esta razón se hipotetiza que fue introducido en América a partir de las epidemias de ZIKV ocurridas en Polinesia Francesa, Tahití, Islas de Yap y Nueva Caledonia entre 2012-2014 [112–115]. Para finales de 2015 el ZIKV se había expandido a 33 países del continente americano [115]. En diciembre de 2015 la OMS emitió una alerta epidemiológica debido al incremento de casos de la infección por ZIKV y su asociación a un incremento de casos de malformaciones congénitas y síndromes neuronales como Guillain-Barré [116].

Para finales de 2015 se estimaba que en Brasil la incidencia de malformaciones congénitas, principalmente microcefalia, era de 99.7 por cada 100 mil habitantes, en comparación con la incidencia en años previos, de aproximadamente 5.7 casos por cada 100 mil habitantes [116]. El incremento de casos de malformaciones congénitas también se observó en otras regiones de América, como en Argentina, donde antes de la introducción de ZIKV, la incidencia era de 4.1 por cada 100 mil habitantes y después de la introducción de ZIKV en el país la incidencia de microcefalia aumento a 6.9 casos por cada 100 mil habitantes [117], y en México, donde la incidencia previa de la epidemia de ZIKV era de 3.7 casos por cada 100 mil habitantes y durante la epidemia de ZIKV aumento significativamente a 11.5 casos por cada 100 mil habitantes [118]. Además, para finales de 2015 se tenía el reporte de dos muertes por complicaciones neurológicas de síndrome de Guillain-Barré asociado a ZIKV [116].

La OMS emitió una alerta epidemiológica con el fin de informar las medidas y recomendaciones a las autoridades sanitarias, la comunidad médica y a la población en general. Éstas estuvieron principalmente enfocadas en aumentar la vigilancia epidemiológica en regiones donde circulan los vectores mosquito; aumentar la vigilancia a las mujeres embarazadas que se encuentren en regiones de probable circulación de ZIKV; la caracterización de los casos sospechosos de acuerdo a los síntomas comunes como rash, fiebre, conjuntivitis, artralgia, mialgia y dolor de cabeza; favorecer el diagnóstico con pruebas moleculares como la RT-PCR o serológicas como ensayos de seroneutralización, y evitar el uso de ensayos para la detección de anticuerpos como ensayos de ELISA, ya que se identificó que los anticuerpos generados por DENV tienen reactividad cruzada hacia antígenos de ZIKV; el uso de paracetamol o acetaminofen para tratar la fiebre y de antihistamínicos para el rash; prevención del contacto con mosquitos utilizando insecticidas, repelentes y mosquiteros [116].

En 2015-2016 se reportaron más de 700 mil casos de ZIKV en el continente americano, sin embargo, estos disminuyeron drásticamente a partir de 2017. No obstante, en América se continúan reportando aproximadamente 30 mil casos anuales de infección por ZIKV [119]. Además, las secuelas que dejó la epidemia de ZIKV en América continúan, principalmente en los infantes cuyas madres estuvieron expuestas a ZIKV durante el embarazo. De acuerdo con un estudio realizado en una comunidad del Amazonas en Brasil, el 5.2% de los infantes afectados tuvieron microcefalia, además, se identificó que el 32% presento al menos una anomalía ósea, muscular o en el cráneo, y 33.8% presentaron anomalías en el desarrollo neuropsicomotor, un 7.8% desarrollaron epilepsia, 9.1% presentaron disfagia y 5.2% autismo [120]. También se reportó que un 25% tiene una velocidad de crecimiento lento principalmente en ganancia de peso y altura en comparación con niños no expuestos a ZIKV [121]. Otro trabajo realizado en Río de Janeiro, Brasil, identificó en una cohorte de niños cuyas madres estuvieron expuestas a ZIKV durante el embarazo, que 94% de los niños tuvieron algún tipo de anomalía en cabeza o cuello,

65% en cadera, 60% en los ojos, 93% tuvieron alguna función urinaria dañada, y un 4% desarrollaron algún problema gastrointestinal [122]. La mayoría de los reportes de anomalías y malformaciones severas viene de casos donde la exposición a ZIKV fue en el primer trimestre del embarazo. En niños que no desarrollaron microcefalia o alguna otra malformación severa, sólo se ha reportado que el 46.7% tiene alguna anomalía neurológica y un ligero retraso en el desarrollo neurocognitivo, sin embargo, no se consideró que fuera severo [123].

Características clínicas y epidemiológicas de la infección por DENV

La investigación de la infección por el ZIKV debe llevarse a cabo dentro del contexto de la circulación del DENV, ya que en las regiones donde existe la presencia de ZIKV, también se encuentra DENV, debido a que ambos virus son transmitidos por el mismo vector, mosquitos del género *Aedes* [94]. Además, entre ambos virus hay varias semejanzas, la infección genera síntomas similares [93,124], y debido a que ambos virus forman parte del género *Flavivirus*, tienen un promedio de 56% de similitud en la secuencia de aminoácidos de la poliproteína viral [125].

El DENV se clasifica en 4 serotipos (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4), que son antigénicamente distintos [126,127]. Entre los 4 serotipos de DENV la identidad promedio de la secuencia de aminoácidos de la poliproteína de los 4 serotipos de DENV es del 71.8% [125]. Se cree que los 4 serotipos se originaron en Asia; fueron aislados y caracterizados en la década de 1950 principalmente en Japón. La circulación de los 4 serotipos de DENV en las décadas de 1940 a 1960 fue identificada en varios países del sur de Asia y algunas islas del Pacífico. En África y en América se identificó la circulación de DENV en la década de 1960 [92]. La circulación de más de un serotipo, e incluso los 4 serotipos en una misma región al mismo tiempo es común, sin embargo, en cada brote epidemiológico alguno de ellos predomina [127].

Como en otros *Flavivirus*, la infección por DENV es asintomática en un 80% de los casos y solo alrededor de un 20% de la población infectada presenta síntomas [127–129]. Los síntomas que se presentan en la infección por DENV pueden variar de leves a severos, por lo que la OMS los ha clasificado en tres categorías: dengue no grave, dengue con signos de alarma y dengue severo [130].

La infección no grave está caracterizada por fiebre y alguno de los siguientes síntomas: vómito, náusea dolor muscular y articular, sarpullido y leucopenia. La infección por DENV con signos de alarma está caracterizada por vómito persistente, sangrado de mucosas, leucopenia, valores de hematocrito elevados y trombocitopenia. El dengue severo se caracteriza por hemorragias

graves, filtración de plasma a espacios extravasculares, y también se puede generar síndrome de choque y falla de algunos órganos [129–131].

El riesgo de padecer dengue severo no va a depender de algún serotipo específico, se ha identificado que el factor de riesgo principal es tener una infección secundaria de DENV por un serotipo distinto al de la infección primaria [132,133], particularmente cuando la respuesta primaria va reduciéndose o fue mediocre [134], en estos casos el riesgo de tener dengue severo es 7.6 veces más, al cursar una infección secundaria que durante una infección primaria [135]. Esto se debe a que la respuesta inmune de anticuerpos que se genera frente a un serotipo sólo es parcialmente reactiva hacia los otros serotipos y no confiere protección. La protección parcial se debe a que hay anticuerpos serotipo-específicos y anticuerpos con reactividad cruzada hacia otros serotipos, los cuales en ocasiones no se encuentran en concentraciones óptimas para neutralizar una infección secundaria [135].

Ante la presencia de concentraciones no neutralizantes de anticuerpos se puede favorecer la progresión de la enfermedad a dengue severo, mediante un mecanismo llamado ADE (del inglés, antibody-dependent enhancement), en el cual, se favorece la entrada del virus a la célula a través de la unión del virus con los anticuerpos y la unión de estos a los receptores Fc, y su posterior liberación y replicación en la célula [135,136]. El ADE puede incrementar la carga viral durante una infección secundaria [137,138], sin embargo, su mayor consecuencia es que genera una reducción de mecanismos antivirales como la inhibición de IFN tipo I [139], se induce una producción de mediadores inmunosupresores como IL-10 [139,140], y también se incrementa la producción de algunas citocinas que aumentan la permeabilidad del endotelio vascular como IL-6 y IL-8 y TNF- α [139,141,142].

Actualmente el DENV es el patógeno más transmitido por vector, y se estima que ocurren de 100 a 400 millones de casos anualmente, con un promedio de 36 mil muertes anuales [143,144].

Implicaciones de los anticuerpos con reactividad cruzada en el contexto de la cocirculación de DENV y ZIKV

La reactividad cruzada en anticuerpos ocurre cuando un anticuerpo generado por un antígeno específico reconoce dos o más antígenos con una estructura similar [145]. Se ha caracterizado que, durante la infección por *Flavivirus*, se generan anticuerpos con reactividad cruzada debido a que el porcentaje de similitud que se comparte entre la secuencia de aminoácidos de la poliproteína entre ZIKV y los 4 serotipos de DENV es de un 55% [125], por lo que se tienen epítomos compartidos hacia los cuales se producen anticuerpos con reactividad cruzada [13,146,147].

A partir del brote de ZIKV ocurrido en 2015 y su asociación con síndromes congénitos y neurológicos, se cuestionó si la preexistencia de anticuerpos anti-DENV participan en el aumento de complicaciones por la infección por ZIKV, al igual que en infecciones secundarias por DENV. Algunas observaciones han encontrado que los anticuerpos anti-DENV se reactivan durante la infección por ZIKV [134,148,149], y en estudios *in vitro* se pueden inducir ADE [149]. Sin embargo, en estudios *in vivo* en macacos *Rhesus* y ratones, no se observó ADE [150]. En estudios longitudinales o transversales, de cohortes con sujetos expuestos a ambos virus no se ha observado ningún cambio en la carga viral entre sujetos con infección por ZIKV y DENV previo, en comparación con sujetos con infección por ZIKV sin DENV previo [151,152]. Tampoco se observaron cambios en el perfil de citocinas [151], ni se ha encontrado asociación con la generación de síndrome congénito [153]. Incluso se ha observado que la previa exposición a DENV podría proteger de la infección sintomática por ZIKV [154], incluso incrementando la magnitud de la respuesta de células T para la pronta eliminación del virus [155].

También se ha cuestionado si la preexistencia de anticuerpos anti-ZIKV tiene algún efecto en una infección posterior por DENV. Han sido pocos trabajos que han estudiado esta condición, pero lo que se ha observado es que en trabajos *in vitro* si puede ocurrir ADE [156]. En estudios *in vivo* con macacos *Rhesus* se ha observado que hay un incremento de la carga viral en una infección por DENV-2 posterior a una exposición a ZIKV, se induce neutropenia y también activa citocinas proinflamatorias como IL-8 y MCP1 (del inglés, monocyte chemoattractant protein 1) [157].

Estrategias para el diagnóstico de la infección por *Flavivirus*

El brote de ZIKV en el continente americano en 2015 vino a cambiar las estrategias para el diagnóstico de la infección por DENV, las cuales se realizaban principalmente por la evaluación de las manifestaciones clínicas de los pacientes, como la presencia de fiebre, artralgias, mialgias o manifestaciones hemorrágicas [130,158], ya que algunas de estas pueden presentarse también durante la infección por ZIKV.

Debido a esto se ha incrementado el uso de técnicas serológicas y moleculares para el diagnóstico diferencial de ZIKV y DENV en regiones donde cocirculan ambos. El diagnóstico se puede realizar mediante varias pruebas para la detección en sangre de ácidos nucleicos del virus, proteínas virales o anticuerpos. La utilidad de cada prueba dependerá de la fase de la infección en la que se encuentra el paciente, dentro del curso natural de la infección (Fig. 4).

La fase aguda de la infección corresponde con la aparición de los síntomas y tiene una duración de 2 a 7 días (Fig. 4). Durante esta fase, se alcanza la máxima replicación del virus, por lo que el

diagnóstico de la infección se puede realizar por ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, principalmente por RT-PCR. Adicionalmente, durante la fase aguda de la infección las células infectadas secretan la proteína viral NS1, la cual es detectable en sangre por la utilización de ensayos de ELISA [130].

La Fase convaleciente de la infección inicia cuando la viremia ya no es detectable en sangre, por lo que se opta por utilizar ensayos serológicos para la detección de inmunoglobulinas tipo IgM o IgG (Fig. 4). La detección de anticuerpos se realiza principalmente por ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos dirigidos hacia la proteína de envoltura viral o a la proteína NS1. Además de los ensayos de ELISA, también se pueden utilizar pruebas de neutralización por reducción de placas (PRNT, del inglés, plaque reduction neutralization test). Sin embargo, la aplicación del PRNT es limitada ya que se requiere el cultivo del virus en un laboratorio con un nivel mínimo de bioseguridad 2 [130].

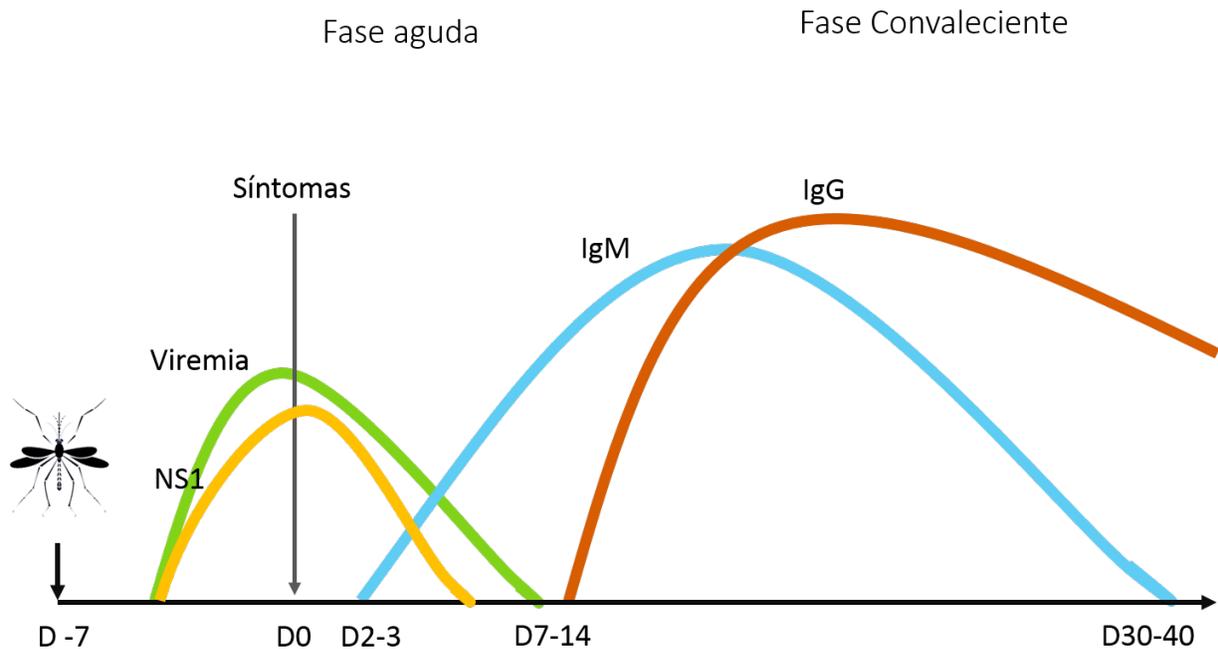


Figura 4. Historia natural de la infección por ZIKV y DENV. Dinámicas de la aparición del antígeno NS1, viremia durante la fase aguda de la infección, y la aparición de IgM e IgG en la fase convaleciente. D = días después de la exposición a DENV.

Durante el brote epidémico de ZIKV en 2007 en la Isla de Yap, el diagnóstico de la infección por ZIKV fue complejo debido a que los pacientes presentaron un cuadro similar a la infección por DENV sin signos de alarma y al utilizar la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos, algunos pacientes dieron positivo para IgM anti-DENV, debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-ZIKV hacia epítopes de DENV. Sin embargo, al analizar las muestras por técnicas

moleculares para la detección de RNA viral, se identificó que ZIKV era el agente causal de la epidemia [111,159].

A partir de este periodo se identificó que la prueba de diagnóstico más específica para diferenciar entre la infección por ZIKV y DENV es la RT-PCR, la cual detecta el genoma viral en sangre. Sin embargo, los ensayos serológicos continúan incluyéndose dentro de los algoritmos de diagnóstico para aquellos casos donde, por el tiempo transcurrido después de la aparición de los síntomas, la viremia ya no es detectable [131,160]. A pesar de la implementación de nuevas técnicas y algoritmos de diagnóstico, en América Latina el diagnóstico por pruebas de laboratorio se realiza en menos del 50% de los casos reportados [161].

Estrategias para el diagnóstico serológico diferencial de la infección por ZIKV

La reactividad cruzada de los anticuerpos que se generan durante la infección por *Flavivirus*, aunado a que existe una reactivación de estos cuando hay una segunda exposición [162,163], genera que los ensayos para la detección de anticuerpos que utilicen las partículas virales completas o alguna proteína viral sean poco específicos, y se encuentren resultados falsos positivos [164–166].

Algunos de los ensayos comerciales actuales, como los de la compañía Euroimmun (Lübeck, Germany), utilizan como antígeno a la proteína NS1 de ZIKV y de DENV, las cuales determinan IgM anti-ZIKV o anti-DENV y alcanzan una especificidad mayor a un 85% en muestras provenientes de pacientes expuestos a ZIKV o DENV respectivamente o con infecciones secundarias por DENV, sin embargo, se ha reportado una sensibilidad menor al 30% [164,165]. Mientras que para la detección de IgG anti-ZIKV la especificidad es menor al 45%, y la sensibilidad puede ser mayor al 70% [164,165], ambos estudios realizados con muestras de suero provenientes de sujetos que habitan en regiones endémicas a DENV y ZIKV como Brasil y Venezuela.

Algunos de los ensayos que se han desarrollado para mejorar la especificidad sin disminuir la sensibilidad son el ensayo ZIKV Detect™ 2.0 IgM Capture ELISA de la compañía InBios (Seattle, WA, USA) y el ensayo NS1 ZIKA-BOB ELISA (del inglés, Blockade of binding). El ensayo ZIKV Detect™ 2.0 el cual utiliza tres antígenos VLP's (del inglés, Virus-like particles), uno de ZIKV, otro de DENV/WNV y otro que es un antígeno celular [167], y compara la magnitud de la detección de cada antígeno por las muestras de suero de pacientes. Este ensayo tiene una sensibilidad reportada mayor al 90% y una especificidad mayor al 79% al analizar muestras de suero provenientes de sujetos que habitan en regiones endémicas a DENV y ZIKV y muestras de sujetos que no habitan en regiones endémicas [168]. Otro ensayo que ha tenido reportes de sensibilidad

y especificidad, mayores a 70% y 90% respectivamente, es el ensayo NS1 ZIKA-BOB ELISA, el cual consiste en la incubación del suero de pacientes, junto con la proteína NS1 de ZIKV, posteriormente se va a adicionar un anticuerpo recombinante altamente específico hacia NS1 de ZIKV, el cual no se unirá a NS1 de ZIKV si el suero del paciente bloquea su unión [169]. Ambos ensayos son altamente específicos y sensibles, sin embargo, su metodología es más compleja que la de un ELISA directo.

Otras metodologías propuestas y poco exploradas implican la identificación de epítomos lineales o conformacionales que sean virus-específicos, y su utilización como antígenos en un ensayo de ELISA directo, con el fin de evitar la unión de anticuerpos con reactividad cruzada entre ZIKV y DENV [170].

Muestras secas: una alternativa para el diagnóstico de la infección por *Flavivirus* en regiones de bajos recursos

Los brotes de virus emergentes o reemergentes afectan más a los países de bajos y medianos recursos, donde, debido a la falta de infraestructura local, el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica son complejos [171,172], generándose la necesidad de transportar las muestras biológicas colectadas en una red fría hacia laboratorios centrales, lo cual limita la cantidad de muestras que pueden enviarse, hay riesgo de perder el control de la temperatura, con ello la integridad de la muestra, y en casos de muestras líquidas pueden ocurrir derrames o filtraciones [173,174].

Una de las alternativas para mejorar el protocolo de transporte de muestras biológicas ha sido el almacenamiento de estas en papel filtro, de forma seca. De esta forma se pueden almacenar varios tipos de muestras, como muestras de sangre [175], suero [176], saliva [177], heces fecales [178], entre otros. Al estar secas se facilita el transporte y almacenamiento, ya que son estables por a temperatura ambiente hasta 12 semanas y hasta 200 días si se almacenan en refrigeración a 4°C [179,180] o congelación a -20°C y a -70°C [181], sin perder la integridad de la muestra. Además de que no se consideran artículos peligrosos de acuerdo con las regulaciones de transporte de sustancias infecciosas, pudiendo incluso ser enviadas por correo convencional [174,182,183].

Las muestras secas se han utilizado para el diagnóstico de infecciones virales o para estudios de seroprevalencia, ya que en ellas se puede hacer la detección de ácidos nucleicos [184,185], antígenos [186,187] y anticuerpos [188,189]. Se han establecido múltiples condiciones para la

hidratación y diluciones, con el fin de que la detección de anticuerpos en muestras de suero secas (DSS) o muestras de sangre secas (del inglés, dried serum samples y dried blood samples) sea equivalente al uso de suero, sin embargo, se considera que para utilizarlas se debe evaluar esta equivalencia con cada ensayo comercial o casero. Dentro de los ensayos comerciales que se han evaluado con muestras DSS o DBS han sido principalmente para el diagnóstico por medio de la detección de anticuerpos o antígenos de virus de la hepatitis B y C [186,187], virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [190], el virus del sarampión [191], DENV [188] y recientemente para SARS-CoV-2 [189,192].

Justificación

La introducción del ZIKV en América y su diseminación en México hizo evidente la facilidad con la que emergen nuevos *Flavivirus* que causan graves problemas de salud pública.

Actualmente, las técnicas de detección molecular son muy específicas al ser aplicadas durante la fase aguda de la infección. Sin embargo, el uso de ensayos serológicos para el diagnóstico sigue siendo necesario para la evaluación de aquellos casos en los que no fue posible un diagnóstico temprano, y más aún cuando se requiere caracterizar muestras de mujeres embarazadas que estén en riesgo de haber estado expuestas al ZIKV durante su embarazo.

Las pruebas serológicas son importantes para su aplicación durante estudios retrospectivos para conocer el serostatus de una población. Como por ejemplo los estudios retrospectivos realizados en la Polinesia Francesa, donde se identificó que la exposición a ZIKV durante la epidemia de 2013 había estado asociada con la generación de síndrome de Guillain-Barré [193] y también con la generación de anomalías congénitas, posteriormente definidas como síndrome congénito asociado a Zika [106,110].

Consideramos que la utilización de pruebas serológicas es importante para el diagnóstico y para la determinación de la prevalencia de anticuerpos en una población. Sin embargo, las pruebas serológicas para la determinación de la infección por DENV o ZIKV son poco específicas debido a la reactividad cruzada que presentan los anticuerpos generados durante la infección por *Flavivirus*. Por lo cual consideramos que es importante el mejoramiento de las pruebas de diagnóstico serológico, además de contar con estrategias para mejorar el manejo y análisis de muestras de suero en regiones endémicas a DENV y ZIKV, como el uso de muestras secas.

Objetivos

Objetivo general:

Desarrollar un ensayo de detección serológico específico del ZIKV y evaluar su desempeño con muestras de suero de pacientes provenientes de regiones endémicas a DENV y ZIKV en México.

Objetivos específicos:

1. Comparar el uso de muestras de suero secas y muestras de suero convencionales provenientes de sujetos con exposición previa a DENV y/o CHIKV con ensayos de ELISA comerciales para la detección de anticuerpos anti-DENV, anti-CHIKV y anti-ZIKV.
2. Identificar aquellas secuencias peptídicas antigénicas de NS1 de ZIKV que presenten menos del 50% de identidad con las secuencias peptídicas de DENV.
3. Expresar y purificar los péptidos seleccionados para NS1 de ZIKV en un modelo de expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.
4. Estandarizar un ensayo de ELISA utilizando los péptidos de NS1 de ZIKV con muestras de suero de sujetos con infección previa por DENV y ZIKV.

Materiales y Métodos

Objetivo 1: Comparar el uso de muestras de suero secas y muestras de suero convencionales provenientes de sujetos con exposición previa a DENV y/o CHIKV con ensayos de ELISA comerciales para la detección de anticuerpos anti-DENV, anti-CHIKV y anti-ZIKV.

descripción de las muestras de suero de sujetos con sospecha de infección por arbovirus utilizadas en este estudio

Se colectaron muestras de suero durante dos brotes de arbovirus en la región de Veracruz, Veracruz (Fig. 5A y B), con la aprobación del comité de ética del IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) con número de protocolo R-2011-785-051. El primer brote ocurrió en los meses de septiembre a noviembre del 2013 (Fig. 5A) y se reportó únicamente la circulación de DENV en la región [194]. El segundo brote ocurrió en septiembre-noviembre del 2015 en la misma región (Fig. 5B), sin embargo, durante este brote se reportó la circulación de DENV y CHIKV [195]. Las muestras fueron colectadas en la Unidad Médica Familiar (UMF) no. 61 del IMSS en Veracruz, Veracruz. Estas colectas se realizaron con apoyo del departamento de epidemiología de la UFM 61, encargándose de canalizar a sujetos con sospecha de infección reciente por DENV o CHIKV para el proceso de la firma de la carta de consentimiento informado y también para la toma de muestra de sangre. En la colecta realizada en 2013 se obtuvieron 50 muestras de suero y en la colecta de 2015 se colectaron 131 muestras de suero.

Además de las muestras colectadas en Veracruz, el grupo de investigación del Dr. Edgar Sevilla Reyes del INER (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas) realizó una colecta de muestras de suero en la comunidad de Santa María Mixtequilla Oaxaca, durante los meses de marzo y abril del 2016, y en marzo de 2017 (Fig. 5C), fechas donde el brote reportado ocasionado por ZIKV en una región endémica a DENV [196,197], esta colecta fue aprobada por los comités de ética, investigación y bioseguridad del INER con número de protocolo C16-16. De esta colecta, el grupo del Dr. Edgar Sevilla Reyes donó varias muestras al laboratorio de Virología de la UIMEIP (Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, de las cuales se usaron 22 muestras para determinación serológica de arbovirus, que estaba aprobada en el protocolo inicial (Fig. 5C).

Inmediatamente después de la toma de muestra de sangre a aquellos sujetos que firmaron el consentimiento informado, se centrifugaron las muestras de sangre y se separó el suero. A partir del suero colectado se prepararon alícuotas de aproximadamente 100 µl. Simultáneamente se prepararon las DSS, dispensando 30 µl de suero en cada uno de los círculos de tarjetas de papel filtro Schleicher & Schell #903 (Keene NH, USA), y se dejaron secar a temperatura ambiente por

dos horas o hasta que estuvieran completamente secas. Las tarjetas de papel filtro fueron marcadas con la clave que se le asignó a cada sujeto y la fecha de colecta y se almacenaron dentro de un sobre de papel, que se guardó en una bolsa de plástico resellable con paquetes de sílica como desecante. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Virología de la UIMEIP del Hospital de Pediatría en Centro Médico Siglo XXI del IMSS en Ciudad de México. Las alícuotas de suero fueron enviadas en red fría y las muestras DSS a temperatura ambiente. Posteriormente el suero fue almacenado a -70°C y las DSS a -20°C , hasta su uso (Anexo 1).

Las muestras de suero colectadas en Santa María Mixtequilla, Oaxaca en 2016, fueron transportadas en red fría (4°C) a la Ciudad de México. Estas fueron congeladas a -80°C hasta su uso. la preparación de DSS se realizó aproximadamente dos meses después de la colecta de las muestras y su envío al laboratorio.

Las muestras de DSS y de suero colectadas durante estos dos brotes forman parte del banco histórico de muestras del Laboratorio de Virología del UIMEIP del Hospital de Pediatría en Centro Médico Siglo XXI del IMSS.

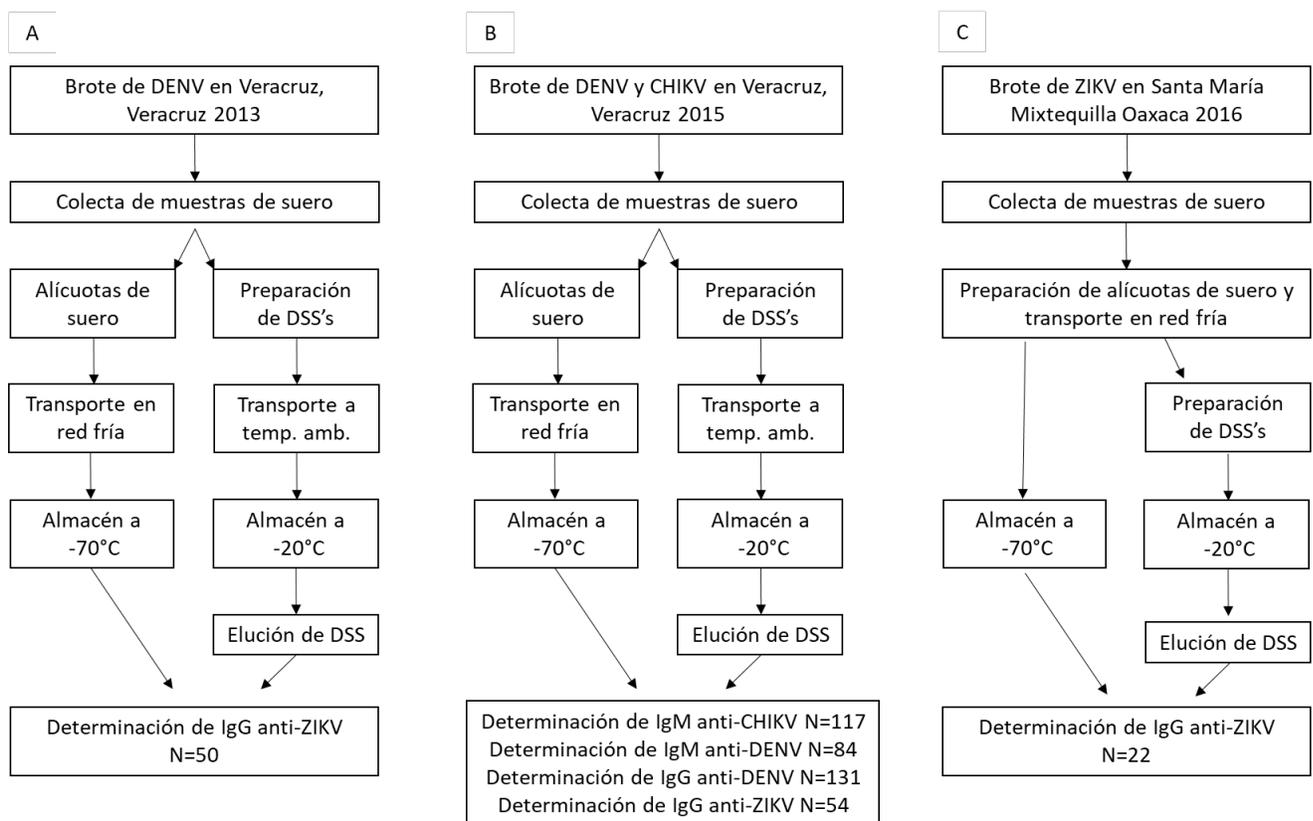


Figura 5. Diagrama de flujo de la obtención y manejo de muestras de suero. la colecta de muestras de suero, la preparación de DSS, transporte, almacenamiento y su posterior uso para la determinación de anticuerpos.

Elución de las DSS

Cada círculo de la tarjeta de papel filtro se cortó en pedazos pequeños con tijeras estériles y se colocó en un microtubo de 1.5 ml con 200 μ l de PBS 1x estéril pH 7.4 (FisherBioReagents, BP-2438-4) y se incubó por 1 hora a 4°C en un shaker orbital a 1500 rpm (OS-100, Allsheng Instruments). El sobrenadante se centrifugó para sedimentar el papel filtro y se transfirió a un microtubo estéril, el cual fue almacenado a -20°C hasta su uso (Anexo 2) [198].

Determinación de anticuerpos en muestras pareadas de suero y DSS

La determinación de anticuerpos en las muestras de suero y DSS se realizó utilizando los siguientes ensayos comerciales: kit Anti-Chikungunya Virus ELISA (IgM) Euroimmun (Lubeck, Germany), Anti-Dengue NS1 Virus ELISA (IgM) de Euroimmun (Lubeck, Germany), DRG® Dengue Virus IgG (DRG International, Inc., USA) y Anti-ZIKV NS1 IgG Euroimmun (Lubeck, Germany). Para las muestras de suero se siguieron las instrucciones del fabricante, diluyendo 10 μ l de suero en 1000 μ l de buffer de muestra del kit, y para la determinación de anticuerpos en los eluidos de DSS se utilizaron 40 μ l del eluido que fueron diluidos en 960 μ l de buffer de muestra del kit, (factor de dilución 1:25), previamente evaluado por Maldonado-Rodríguez et al. 2017, con para la detección de anti-DENV IgG[198]. En cada prueba se ocuparon 100 μ l de la dilución de muestra. El resto del ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La determinación de la densidad óptica se realizó en un lector de placas Thermo Multiskan Ascent (Thermo Fischer Scientific) a 450 nm, ya que todos los kits comerciales utilizan como enzima a una peroxidasa y como sustrato tetrametilbenzidina (TMB). Para los análisis estadísticos y las gráficas se utilizaron la prueba de correlación lineal de Pearson en el programa Graph Pad Prism versión 8 (GraphPad Software, La Jolla CA), comparando los resultados obtenidos en DSS con los obtenidos analizando las muestras de suero convencionales, que en este trabajo serán usadas como el estándar de oro.

Objetivo 2: Identificar aquellas secuencias peptídicas antigénicas de NS1 de ZIKV que presenten menos del 50% de identidad con las secuencias peptídicas de DENV.

Análisis de la identidad en la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV y de los 4 serotipos de DENV, provenientes de cepas aisladas en América

Las secuencias de nucleótidos disponibles de ZIKV y de los 4 serotipos de DENV se obtuvieron en la base de datos NIAID Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) [199], de aquellas

cepas aisladas que cumplieran las siguientes características: haber sido colectadas en América entre 2015 y 2019 para ZIKV, y de 2010 a 2019 para DENV, aisladas a partir de muestras humanas y que contaran con el genoma completo disponible. Se obtuvieron 604 secuencias en total para ZIKV, obteniendo 226 secuencias para DENV1, 291 de DENV2, 67 de DENV3 y 73 de DENV4.

Las secuencias de nucleótidos se alinearon usando la herramienta MUSCLE en el programa MEGA 7.0.26 [200] y la región codificante para la proteína NS1 fue seleccionada, a partir de la cual se dedujo la secuencia de aminoácidos para cada cepa, y mediante el programa Jalview 2.10 [201]. Aquellas secuencias redundantes se removieron, y también se obtuvo la secuencia consenso de aminoácidos. Posteriormente se obtuvo una matriz de identidad entre las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 provenientes de cepas de ZIKV y los 4 serotipos de DENV aisladas en América, mediante el cálculo de la distancia entre pares utilizando el programa MEGA 7.0.26 [200]. Finalmente se calculó la identidad entre cada una de las secuencias aisladas, restando a 100% el porcentaje obtenido en la distancia entre pares.

Selección de las secuencias peptídicas a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV y DENV 2

A partir de la secuencia consenso de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV y DENV 1 y 2 (por ser las cepas con mayor prevalencia en México) [202], se calculó el porcentaje de identidad, identificando los aminoácidos que sean iguales entre ZIKV y DENV. Esto se realizó con la herramienta en línea Blast protein de NCBI [203].

Las regiones antigénicas de 7 a 10 aminoácidos fueron identificadas, con herramientas de predicción de antigenicidad humoral disponibles en la red: EMBOSS bioinformatics [204], Predicting Antigenic Peptides de la Universidad Complutense de Madrid [205] y SVMTriP [206]. Posteriormente se realizaron comparaciones de los resultados de estos programas, seleccionando aquellos que coincidan en 2 o más programas y se identificaron aquellas regiones antigénicas de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV y DENV que tengan la más baja identidad entre ambos virus. Se seleccionaron de 3 a 4 péptidos de la proteína NS1 de cada virus para su síntesis en sistemas biológicos de expresión de proteínas.

Objetivo 3: Expresar y purificar los péptidos seleccionados para NS1 de ZIKV en un modelo de expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.

Obtención el fragmento de DNA codificante para el multi-péptido de ZIKV mediante PCR de ensamblaje

Dos oligonucleótidos fueron diseñados, con el fin de realizar una reacción de PCR de ensamblaje (PCA, del inglés, polymerase cycling assembly) en la cual se van a ensamblar dos oligonucleótidos que sean complementarios en al menos 30 nucleótidos y que juntos codifiquen la secuencia completa aminoácidos del multi-péptido, el cual contiene 3 péptidos de la secuencia de NS1 de ZIKV separados por espaciadores de adeninas. También se revisó la disponibilidad de codones para la expresión en *E. coli*, para su optimización.

Para la reacción de ensamblaje los oligonucleótidos se resuspendieron a concentraciones equimolares, posteriormente se hibridaron los pares de oligonucleótidos en una reacción de rampa de temperatura comenzando por 96°C y disminuyendo hasta 16°C durante 25 minutos en el termociclador (Biometra TProfessional Basic Ltd). La hibridación ocurre en los sitios complementarios entre cada oligonucleótido. Posteriormente se realizó una reacción de relleno de secuencia de los oligonucleótidos hibridados, por una reacción de PCA. Se adicionaron dNTPs y enzima *Taq* polimerasa (AmpliTaq DNA polymerase, ThermoFisher Scientific). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Biometra TProfessional Basic Ltd) a 72°C por 20 minutos. Se verificó el producto de PCA por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Clonación del producto de PCA en el vector pTrcHis-TOPO

Se llevó a cabo una reacción de ligación TA gracias a que la polimerasa utilizada en la reacción de PCA deja una adenina en el extremo 3' y el vector pTRCHis-TOPO tiene una timina en su extremo 5'. Para la reacción se utilizó ligasa ADN T4 (Invitrogen™ ExpressLink™) por 1 h a temperatura ambiente (Fig. 6). Este vector fue transformado en bacterias competentes Top10, sin embargo, al inducir la expresión del vector, no se observó la producción del multi-péptido, por lo que se realizó una subclonación en varios vectores de expresión de la familia pCri (Fig. 7).

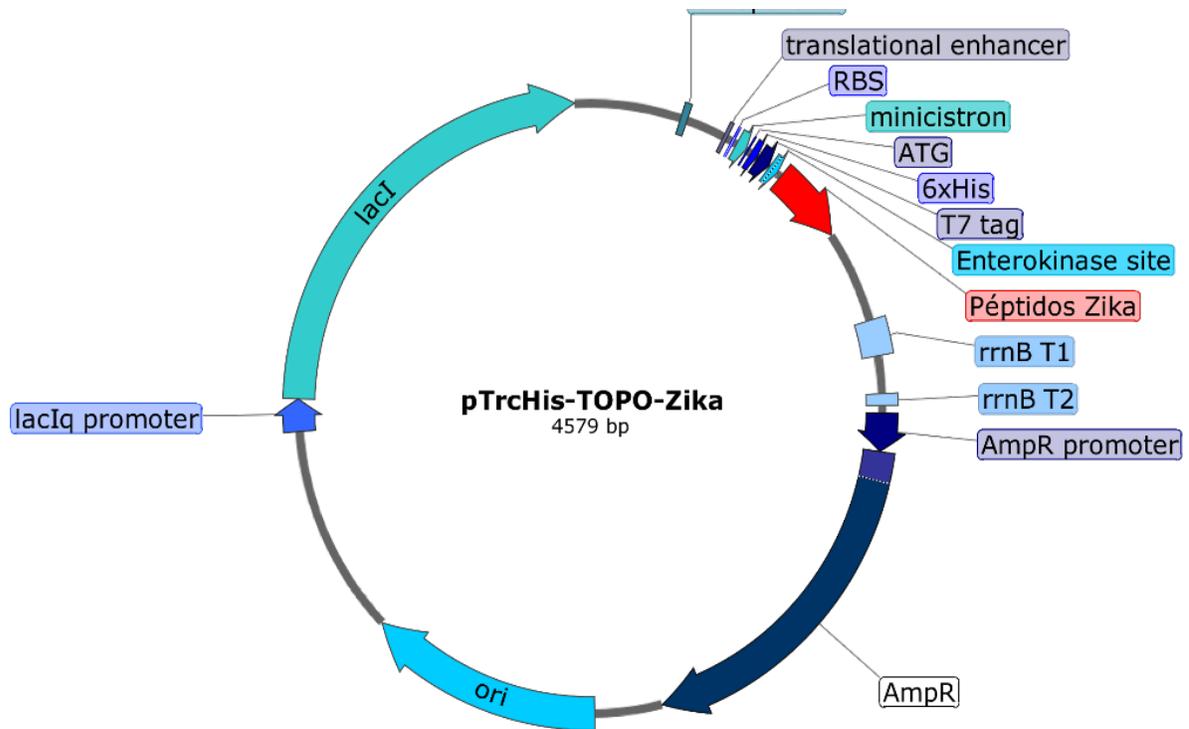


Figura 6. Vector pTrcHis TOPO circularizado con el inserto de los péptidos de NS1 de ZIKV (en rojo).

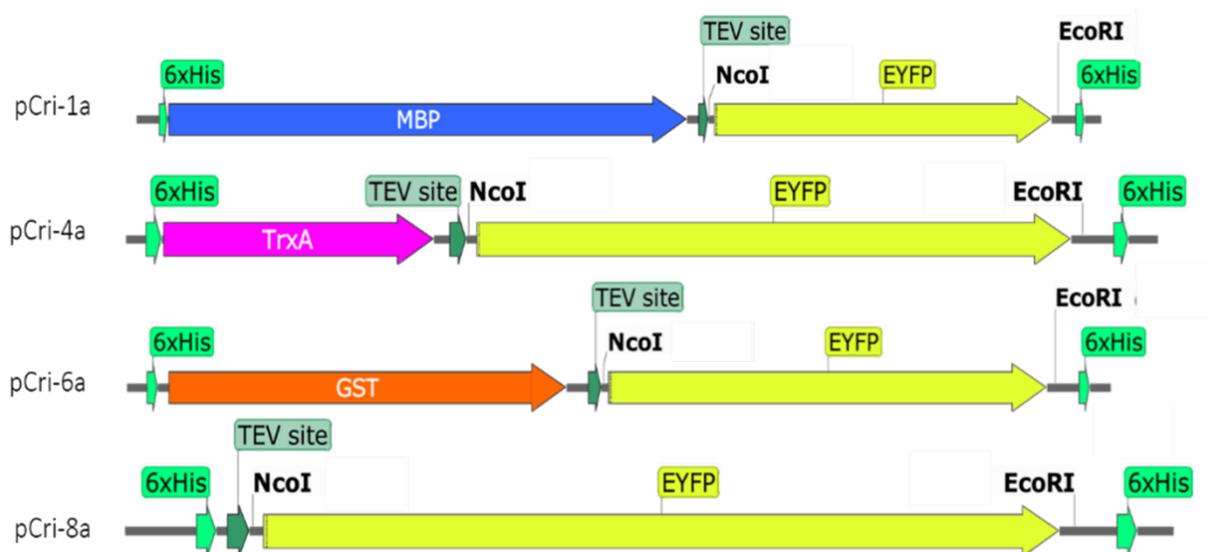


Figura 7. Vectores pCri 1a, 4a, 6a y 8a. Cada vector tiene una proteína de fusión distinta, proteína de unión a maltosa (MBP) en el 1a, Tioredoxina (TRX) en el 4a, Glutation S-transferasa (GST) en el 6a, y por último el 8a que no tiene proteína de fusión. Cada vector tiene un His-Tag para su purificación y el gen que codifica para EYFP, el cual puede ser extraído por digestión enzimática con NcoI y EcoRI y en su lugar, ligar otros insertos, además incluye un sitio de corte para la proteasa TEV para separar a la proteína de fusión.

Subclonación en los vectores pCri

Una reacción de digestión enzimática de los vectores pCri y del vector pTRCHis-TOPO se realizó con las enzimas de restricción EcoRI y NcoI (New England BiolLabs Inc.). Esta reacción se realizó incubando los vectores con las enzimas de restricción por 2 horas a 37°C. Posteriormente, se purificaron los productos mediante una electroforesis de gel de agarosa 1% con el Agarose gel DNA extraction kit (SigmaAldrich). Posteriormente se llevó a cabo una reacción de ligación por 1hr a temperatura ambiente con ligasa ADN T4 (Invitrogen™ EspressLink™) de los vectores pCri1a, pCri4a, pCri6a y pCri8a digeridos y purificados, con el fragmento codificante para el multi-péptido de ZIKV.

Transformación en bacterias competentes BL21

Los vectores de expresión pCri1a, pCri4a, pCri6a y pCri8a que fueron ligados con el fragmento codificante para el multi-péptido de ZIKV fueron transformados por choque térmico en bacterias Mach-1, con el fin de obtener colonias y purificar los plásmidos. Esta transformación se llevó a cabo por choque térmico, se dejó un vial de 50 µl de bacterias competentes BL21 en hielo hasta que se descongelara, se agregaron 5 µl de los vectores purificados y se incubó por 20 minutos en hielo, posteriormente se incubaron a 42°C en un thermoblock Thermostart C (Eppendorf) por 45 segundos, se incubaron inmediatamente 2 minutos en hielo y se les agregaron 250 µl de medio SOC y se dejó incubando el vial por 1 hora a 37°C.

Posteriormente se sembraron en placas de agar LB con kanamicina y se dejaron incubando overnight a 37°C. Para identificar aquellas colonias que tuvieran el inserto se realizó una PCR de colonia, y aquellas que tuvieran el inserto se incubaron toda la noche a 37°C en medio líquido LB con kanamicina.

Los vectores se purificaron con el kit PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (ThermoFischer Scientific) y se transformaron en bacterias competentes BL21, que es una cepa de expresión. Esta transformación se llevó a cabo por choque térmico.

Inducción de la expresión del multi-péptido de ZIKV en células BL21

Las células transformadas con los vectores pCri se cultivaron en medio 2xYT y kanamicina hasta que se lograra una densidad óptica de 0.6. Posteriormente se adicionó IPTG para inducir la expresión de los vectores, a una concentración de 0.1 mM y se dejó en cultivo en agitación a 17°C por 16 horas. La biomasa se obtuvo mediante centrifugación por 10 minutos a velocidad máxima.

Extracción de proteínas

El extracto de proteínas se obtuvo a partir de la biomasa mediante sonicación con un sonicador UP400St (Hielscher ultrasound technology) y buffer de lisis (Fosfato de sodio 20 mM, Cloruro de sodio 0.5 M, Imidazol al 500 mM a un pH de 7.4, inhibidor de proteasas PMST 1 mM). La sonicación se realizó en hielo a una amplitud del 100% por 20 segundos, descansando 40 segundos, se realizaron 5 ciclos. Para separar la fracción soluble de la insoluble, se centrifugó a 10 mil rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente se realizó un SDS-page por 2 horas de las fracciones solubles, insolubles y totales y el gel se tiñó con azul de coomasie para observar las bandas.

Purificación del multi-péptido de ZIKV

La expresión del multi-péptido en el vector pCri1a fue aquella en donde se observó mayor expresión y en la fracción soluble. El multi-péptido de ZIKV está unido a la proteína de unión a maltosa MBP (del inglés maltose binding protein), y en conjunto tienen un peso de 54 kDa, este se separó en una columna de níquel HISTRAP FF (GE-HEALTHCARE) por su afinidad al tag de Histidinas presente en la construcción. Este proceso se llevó a cabo en un equipo para FPLC (del inglés Fast Protein Liquid Chromatography) AKTA PURE 25M (GE-HEALTHCARE).

El producto purificado fue puesto en una reacción de digestión con la proteasa TEV (New England BioLabs Inc.), ya que la construcción tiene un sitio de corte para separar la MBP (Fig. 8). Sin embargo, este corte no fue realizado con éxito, probablemente debido a que el sitio de corte no estaba estructuralmente disponible. Debido a que en estas fechas inició la pandemia del virus SARS-CoV-2 en 2019, ocurrió un paro de actividades en el laboratorio, por lo que el corte con enteroquinasa (presente desde el inserto en el plásmido pTrcHis-TOPO-ZIKA) quedó pendiente, y posteriormente, debido a la falta de tiempo restante en el programa de posgrado, se optó por comprar los péptidos sintéticos y con ellos estandarizar el ensayo de ELISA.

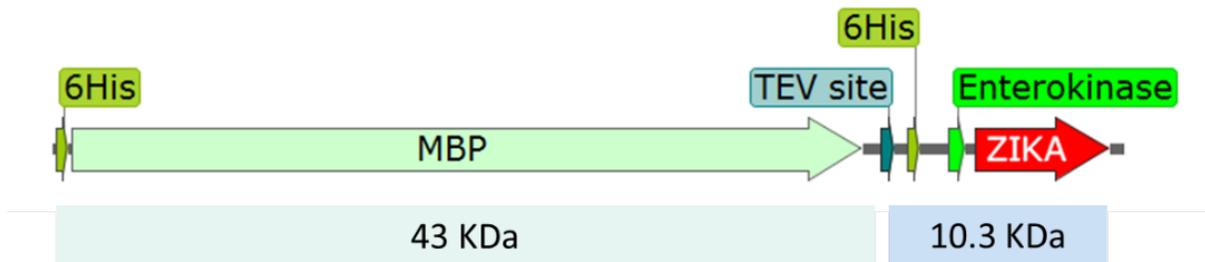


Figura 8. Diagrama de la construcción de la proteína MBP unido al multi-péptido de ZIKV, entre ambos se observa un sitio de corte por la proteasa TEV.

Objetivo 4: Estandarizar un ensayo de ELISA utilizando los péptidos de NS1 de ZIKV con muestras de suero de sujetos con infección previa por DENV y ZIKV.

Titulación de la concentración de una mezcla de los péptidos de ZIKV en placa

Los péptidos NS1-A (GVQLTVVVGs), NS1-B (GSKYFVRAAKTNNsFVVDGDTLKECPLK) y NS1-C (PAVIGTAVKGKEAVHSLDGY) fueron sintetizados por la compañía Genscript. Estos péptidos fueron diluidos en H₂O estéril hasta una concentración final de 1 µg/µl, únicamente el péptido NS1-A se diluyó en 50% H₂O y 50% DMSO, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los péptidos fueron mezclados a concentraciones iguales, y se evaluaron tres mezclas con distintas concentraciones distintas. Se evaluaron 200 ng (67 ng de cada péptido por pozo), 400 ng (134 ng de cada péptido por pozo) y 1 µg (334 ng de cada péptido por pozo). La dilución se preparó con PBS y se incubaron 100 µl de esta dilución por pozo toda la noche a 4°C.

Titulación del tiempo de incubación y la concentración de los sueros

Los sueros utilizados como controles positivos para esta etapa fueron principalmente aquellos colectados en Mixtequilla, Oaxaca durante el brote de ZIKV en 2016, se utilizó un total de 31. Como controles negativos se utilizaron sueros del banco histórico de muestras del laboratorio de Virología de Centro Médico Siglo XXI, principalmente de personal que trabajaba ahí y por ensayos de ELISA comerciales se descartó la presencia de anticuerpos anti-DENV y anti-ZIKV.

Dos tiempos de incubación fueron evaluados, 2 horas a temperatura ambiente y también se incubaron overnight a 4°C. Se probaron dos diluciones de suero para el ensayo de ELISA, 1:100 y 1:150.

Evaluación de las condiciones del ensayo de ELISA

Para realizar los lavados de la placa se utilizó PBS-tween 20 al 0.5% y se realizaron pruebas de 3 y 4 lavados entre cada paso del ensayo de ELISA.

Para el bloqueo de la placa se probaron varios buffers de bloqueo como: BSA 5% (del inglés, Bovine Serum Albumine), leche en polvo descremada 0.5% y suero fetal bovino al 10%. Se evaluó el bloqueo por 1 y 2 horas a temperatura ambiente.

Dos concentraciones del anticuerpo secundario con peroxidasa (Peroxidase AffinityPure Goat

Anti-Human-IgG-HRP Jackson Immunoresearch) fueron probadas, 1:20,000 y 1:40,000, incubándolas en oscuridad por media hora, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

El sustrato que se agregó para revelar la reacción en placa fue el sustrato para peroxidasa Single Component TMB Peroxidase ELISA Substrate Kit (Bio-Rad), del cual se agregaron 50 μ l y se dejó incubando por 10 minutos cubierto de la luz. Posteriormente se agregaron 50 μ l de la solución de paro, que de acuerdo con las instrucciones del fabricante se puede utilizar HCl al 0.12 M.

La densidad óptica se midió en un lector de placas Thermo Multiskan Ascent (Thermo Fischer Scientific) a 450 nm.

Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos y las gráficas se utilizó la prueba de ANOVA de medidas repetidas, la prueba de T de student para las muestras no pareadas y también se obtuvieron los datos de la estadística descriptiva de cada evaluación en el programa Graph Pad Prism versión 8 (GraphPad Software, La Jolla CA).

Resultados

Evaluación de muestras pareadas de suero y DSS

Con el fin de determinar si existe concordancia entre los resultados de muestras de suero y muestras DSS, se evaluaron muestras colectadas en 2015 durante un brote de DENV y CHIKV en Veracruz, Veracruz, y también muestras colectadas en 2016 durante un brote de ZIKV en Santa María Mixtequilla, Oaxaca. Esta evaluación se realizó utilizando ensayos de ELISA comerciales para la detección de anticuerpos IgM anti-CHIKV, IgM anti-DENV, IgG anti-DENV e IgG anti-ZIKV.

Para la determinación de IgM anti-CHIKV, 117 muestras pareadas de suero y DSS fueron analizadas con la prueba comercial de ELISA de la marca Euroimmun que sirve para la detección de anticuerpos dirigidos hacia un extracto de las partículas virales de CHIKV. Se obtuvo la densidad óptica y ésta se transformó en valores del cociente, dividiendo la densidad óptica de la muestra entre la densidad óptica del control de valor de corte de la prueba, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se encontró concordancia entre 105 muestras pareadas (89.74%), de las cuales 37 muestras fueron positivas y 68 muestras fueron negativas. De las 12 muestras discordantes (10.26%), 7 muestras de suero fueron positivas, pero tuvieron un resultado negativo en DSS, tres muestras de suero fueron positivas, pero tuvieron resultado indeterminado en DSS, y dos muestras de suero con resultado indeterminado tuvieron resultado negativo en DSS. Se encontró una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los resultados de ambas muestras ($R^2= 0.804$, $p<0.0001$) (Fig. 9).

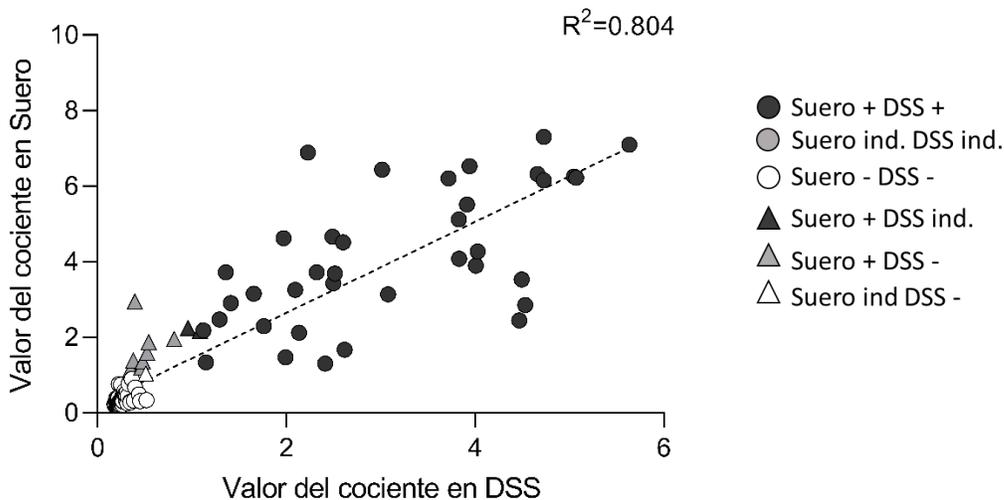


Figura 9. Correlación entre las unidades del cociente de la determinación de IgM anti-CHIKV en muestras pareadas de suero y DSS. Se determinó la presencia de anticuerpos IgM anti-CHIKV en 117 muestras.

Para la determinación de IgM anti-DENV, 84 muestras pareadas de suero y DSS fueron analizadas con el ensayo comercial de la marca Euroimmun, el cual detecta anticuerpos dirigidos hacia la proteína NS1 de los 4 serotipos de DENV. Se obtuvo la densidad óptica y ésta se transformó en valores del cociente, dividiendo la densidad óptica de la muestra entre la densidad óptica del control de valor de corte de la prueba, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se encontró concordancia entre 79 muestras pareadas (94.05%), de las cuales solo una muestra fue positiva, y 78 muestras fueron negativas. De las 5 muestras discordantes (5.95%), 4 muestras de suero fueron positivas, pero tuvieron un resultado negativo en DSS, y 1 muestra de suero fue positiva, pero tuvo un resultado indeterminado en DSS. Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los resultados de ambas muestras ($R^2= 0.525$, $p<0.0001$) (Fig. 10).

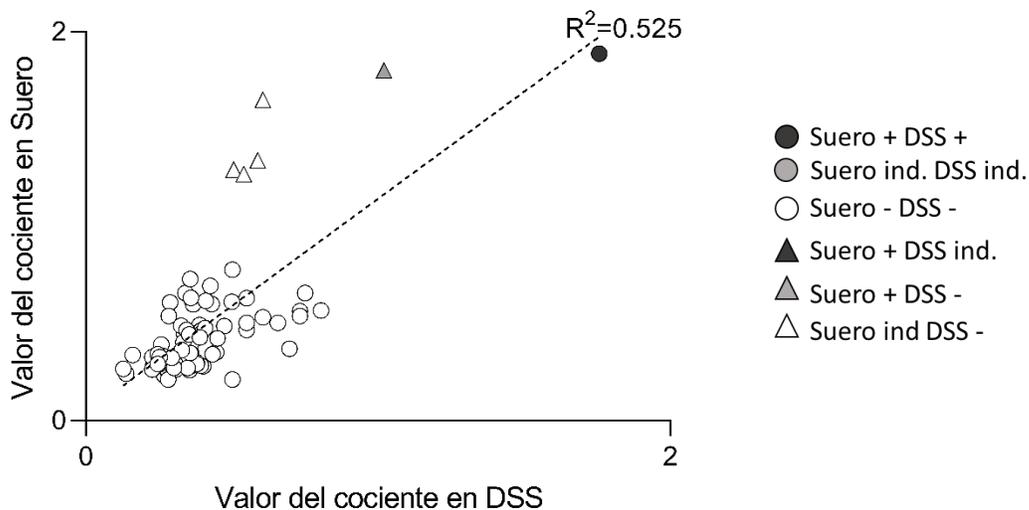


Figura 10. Correlación entre los valores del cociente de la determinación de IgM anti-DENV en muestras pareadas de suero y DSS. Se determinó la presencia de anticuerpos IgM anti-DENV en 84 muestras.

Para la determinación de IgG anti-DENV, 131 muestras pareadas de suero y DSS fueron analizadas con el ensayo de ELISA de la marca DRG Instruments, el cual sirve para la detección de anticuerpos dirigidos hacia un extracto de partículas virales de los 4 serotipos de DENV. Se obtuvo la densidad óptica y esta se transformó en Unidades DRG (DRG-U) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se encontró concordancia entre 120 muestras pareadas (91.60%), de las cuales 88 muestras fueron positivas, 2 muestras pareadas fueron indeterminadas y 30 muestras fueron negativas. De las 11 muestras discordantes (8.40%), 4 muestras de suero fueron positivas, pero tuvieron un resultado negativo en DSS, 4 muestras de suero fueron positivas, pero tuvieron resultado indeterminado en DSS, y tres muestras de suero con resultado indeterminado tuvieron resultado negativo en DSS. Se encontró una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los resultados de ambas muestras ($R^2= 0.755$, $p<0.0001$) (Fig. 11).

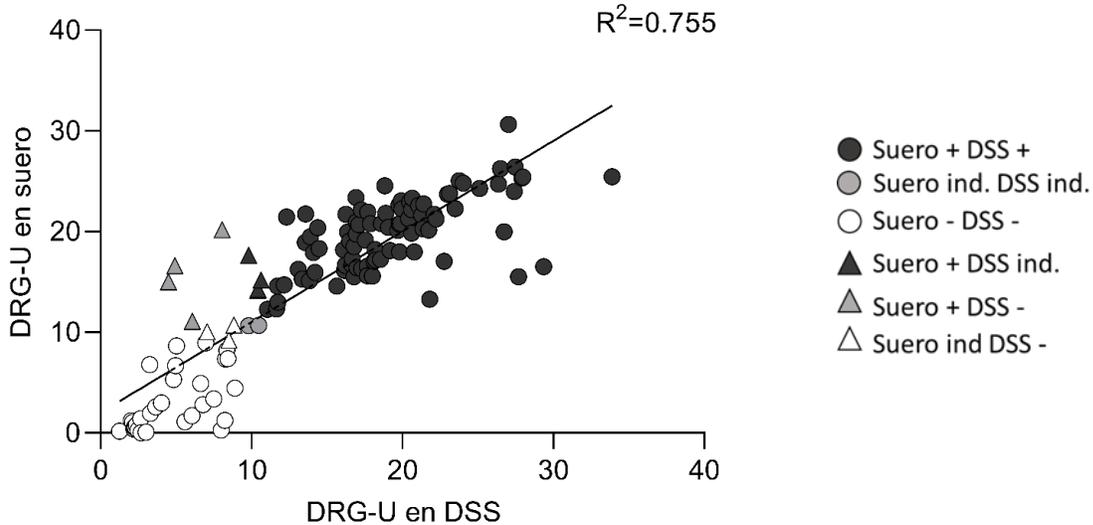


Figura 11. Correlación entre las DRG-U de la determinación de IgG anti-DENV en muestras pareadas de suero y DSS. Se determinó la presencia de anticuerpos IgG anti-DENV en 131 muestras.

Para la determinación de IgG anti-ZIKV, 22 muestras pareadas de suero y DSS, colectadas en 2016 en Oaxaca, fueron analizadas con el ensayo comercial de la marca Euroimmun, el cual sirve para la detección de anticuerpos dirigidos hacia la proteína NS1 de ZIKV. Se obtuvo la densidad óptica y ésta se transformó en valores del cociente, dividiendo la densidad óptica de la muestra entre la densidad óptica del control de valor de corte de la prueba, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Como resultado se obtuvo que las 22 muestras de suero (100%) y 21 DSS (95.50%) fueron positivas para IgG Anti-ZIKV, y solo una muestra tuvo resultado discordante entre suero y DSS, siendo positiva al analizar la muestra de suero, y negativa en DSS. El valor de R^2 obtenido fue = 0.19 con un valor $p= 0.039$ (Fig. 12).

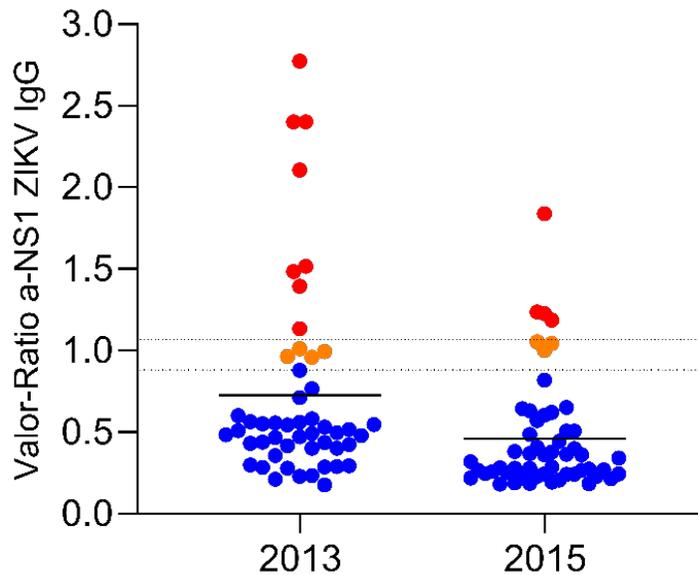


Figura 13. Gráfica de la determinación de IgG anti-ZIKV en muestras colectadas en Veracruz durante 2013 y 2015. Los valores están expresados en valores del cociente, obtenidos de acuerdo con el ensayo de ELISA de Euroimmun. Se indican en azul los valores negativos, en anaranjado los valores clasificados como indeterminados y en rojo los valores positivos.

Identidad de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 entre ZIKV y DENV

El siguiente objetivo del proyecto consistió en realizar un análisis de las regiones antigénicas de la proteína NS1 de ZIKV y DENV para identificar secuencias peptídicas de ZIKV que presenten el menor porcentaje de identidad con las secuencias correspondientes de DENV.

Para el análisis de identidad se utilizaron 604 secuencias genómicas de ZIKV, 226 secuencias de DENV-1, 291 de DENV-2, 67 de DENV-3 y 73 de DENV-4 que fueron obtenidas de la base de datos ViRP. Estas fueron alineadas utilizando MUSCLE en el programa Mega 7.0 [200]. Posteriormente, se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína NS1, a partir de la secuencia de nucleótidos de cada secuencia, utilizando el programa Mega 7.0.

El porcentaje de identidad entre todas las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV con las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 de cada serotipo de DENV, fue calculado utilizando la herramienta en línea Blast [203]. El porcentaje de identidad promedio que se comparte entre la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV con la proteína NS1 de DENV 1 es de 54.1%, con la proteína NS1 de DENV 2 la identidad promedio es de 54.5%, con NS1 de DENV 3 la identidad promedio es de 55.4%, y con la proteína NS1 de DENV 4 la identidad promedio es de 53.9% (Tabla 1 y Fig. 14). Estos resultados son consistentes a lo que se ha observado en otros trabajos [125,170].

Tabla 1. Identidad de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 entre ZIKV y DENV.

	ZIKV	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4
ZIKV	100	54.1	54.5	55.4	53.9
DENV 1		100	74.1	79.3	69.2
DENV 2			100	74.4	71.9
DENV 3				100	73.3
DENV 4					100

A partir de las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV y los 4 serotipos de DENV se calculó la secuencia consenso de aminoácidos para cada virus, utilizando el programa Jalview [201]. Las secuencias peptídicas potencialmente antigénicas fueron identificadas en la secuencia consenso de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV (Fig. 14). Esta identificación se realizó utilizando herramientas en línea para la predicción de epítopes lineales de células B (Predicting Antigenic Peptides [205], Emboss Bioinformatics [204], y SVMTrip [206]). La predicción de antígenos que utilizan las herramientas Predicting Antigenic Peptides y Emboss Bioinformatics se basan en el método de Kolaskar y Tongaonkar [207]. Este método identifica residuos de cisteína, valina y leucina, en las regiones que están expuestas en la estructura tridimensional de la proteína, ya que, de acuerdo con un análisis de la secuencia de múltiples antígenos, la presencia de estos aminoácidos es más frecuente en epítopes de células B. La herramienta SVMTrip se basa en la identificación de residuos de prolina o ácido glutámico en la superficie de la proteína, este método fue determinado a partir de un análisis de la similitud entre antígenos previamente identificados y la frecuencia de expresión de aminoácidos en estos [208].

Los resultados obtenidos por los tres programas de predicción antigénica fueron comparados. Aquellos péptidos de la secuencia de aminoácidos de NS1 de ZIKV, que fueron identificados por los tres programas se muestran marcados en rojo en la figura 15. En las secuencias consenso de cada serotipo de DENV se marcaron en rosa las secuencias peptídicas que tienen la misma posición que los péptidos antigénicos de NS1 de ZIKV (Fig. 15).

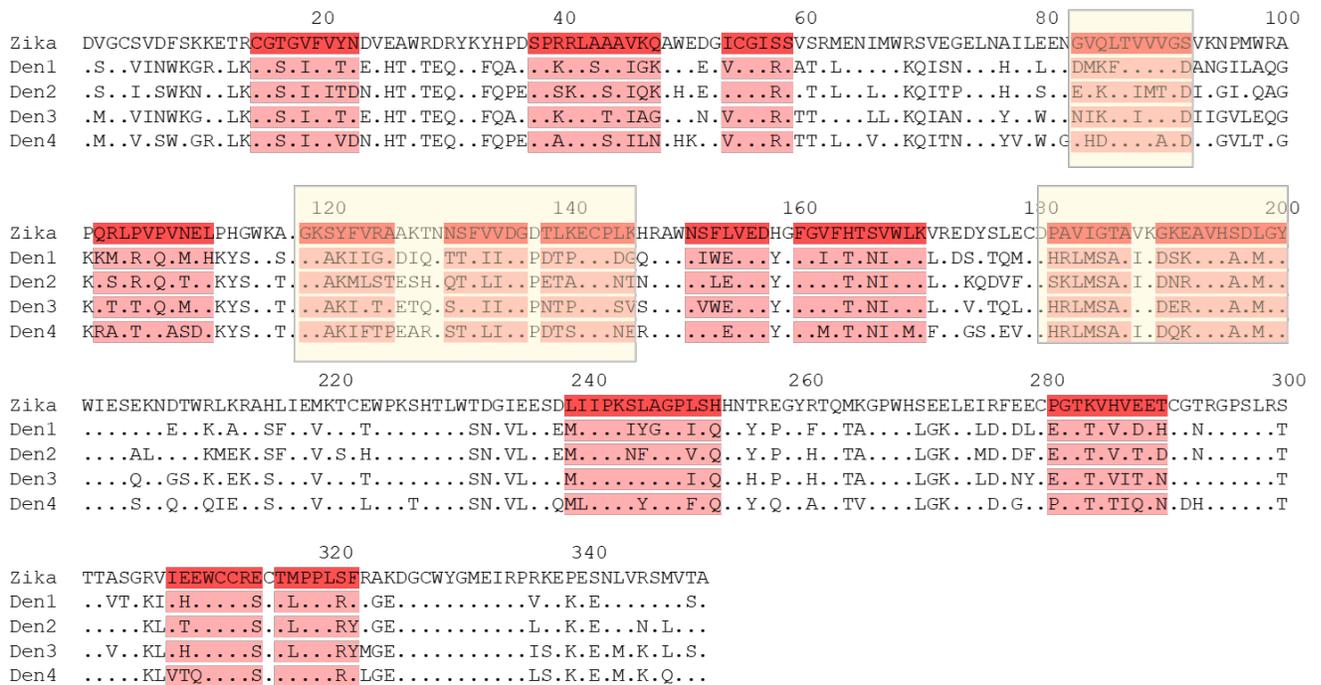


Figura 15. Alineamiento de las secuencias consenso de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV y los 4 serotipos de DENV. Los sitios marcados con rojo corresponden a sitios antigénicos de la secuencia de ZIKV y, en rosa, los péptidos equivalentes dentro de la secuencia de NS1 de DENV. Los aminoácidos que son iguales entre ZIKV y DENV se encuentran marcados con un punto. Aquellas secuencias peptídicas marcadas en amarillo fueron seleccionadas para ser expresadas en un sistema de expresión de proteínas recombinantes.

Síntesis del multi-péptido de ZIKV en *Escherichia coli*

El siguiente objetivo consistió en sintetizar y purificar los péptidos seleccionados de NS1 de ZIKV en un modelo de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Para este objetivo primero se obtuvo un producto de DNA codificante para el multi-péptido de NS1 de ZIKV mediante una PCR de ensamblaje, la cual tiene el objetivo de formar un fragmento de DNA de doble cadena, a partir de la hibridación de dos oligonucleótidos de menor tamaño.

La secuencia de nucleótidos que codifica para el multi-péptido de ZIKV es de 189 pares de bases, la cual incluye la región codificante para cada péptido separada por dos alaninas y un codón de término al final de la secuencia (Fig. 16A). Se diseñaron dos oligonucleótidos para la PCR de ensamblaje, el primero corresponde a los 111 nucleótidos que inician la secuencia que codifica para el multi-péptido de ZIKV, y el segundo es el reverso complementario de los últimos 111 nucleótidos más un codón de paro (Fig. 16B).

Como resultado de la reacción de PCR de ensamblaje se obtuvo un fragmento de DNA de 189 pb

(Fig. 16C). El cual fue clonado en el vector de expresión pTrcHis-TOPO® mediante una reacción de ligación TA. Posteriormente, se verificó la orientación del inserto mediante restricción enzimática y secuenciación.



Figura 16. Multi-péptido diseñado a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV. A) secuencia de aminoácidos del multi-péptido de ZIKV, se muestran en verde los tres péptidos antigénicos y en rojo los espaciadores de alanina. B) la secuencia codificante para el multi-péptido de ZIKV se encuentra en negro, en morado se encuentran los dos oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR de ensamblaje, y en rojo se ubican los nucleótidos compartidos entre ambos oligonucleótidos, que servirán para la hibridación de ambos. C) producto de la reacción de PCR de ensamblaje (189 pb).

Al inducir la expresión del vector en células competentes para expresión BL21, no se observó la expresión del multi-péptido, posiblemente porque el tamaño del inserto era menor a 300 pb, el tamaño mínimo recomendado, por lo que se realizó una subclonación en los vectores de expresión de la familia pCri-1a, 4a, 6a y 8a. Para esta subclonación, el fragmento codificante para el multi-péptido de ZIKV se extrajo del vector pTrcHis-TOPO mediante la digestión enzimática con EcoRI y NcoI. La familia de los vectores pCri cuentan con el promotor T7 y se utilizan para expresar proteínas recombinantes junto con un tag de histidinas y diversas proteínas de fusión, que van a ser de utilidad para incrementar la solubilidad del producto [210]. En la figura 7 (Materiales y Métodos) se encuentra esquematizado cada uno de los vectores utilizados. Estos vectores contienen el gen de la proteína amarilla fluorescente (EYFP), el cual fue extraído mediante la digestión con enzimas de restricción (EcoRI y NcoI), y en su lugar, se insertó el fragmento que contiene la región codificante para el multi-péptido de ZIKV, el tag de histidinas y el sitio de corte de enteroquinasa (Fig17A).

Cada vector se transformó en células competentes para clonación Mach-1 y se verificó la presencia del inserto por PCR de colonia y secuenciación de Sanger. Aquellos plásmidos que tuvieron la secuencia del inserto correcta y dentro del marco de lectura de los vectores pCri, fueron transformados en células competentes BL21 para la inducción de su expresión con IPTG.

La estructura general de las construcciones de los vectores pCri que incluyen la región codificante para el multi-péptido de ZIKV se encuentra en la figura 17A. Se obtuvo el extracto de proteínas en fracciones solubles e insolubles mediante buffer de lisis y sonicación. Posteriormente, se corrió un SDS-PAGE de cada uno de los cultivos como se muestra en la figura 17B-E.

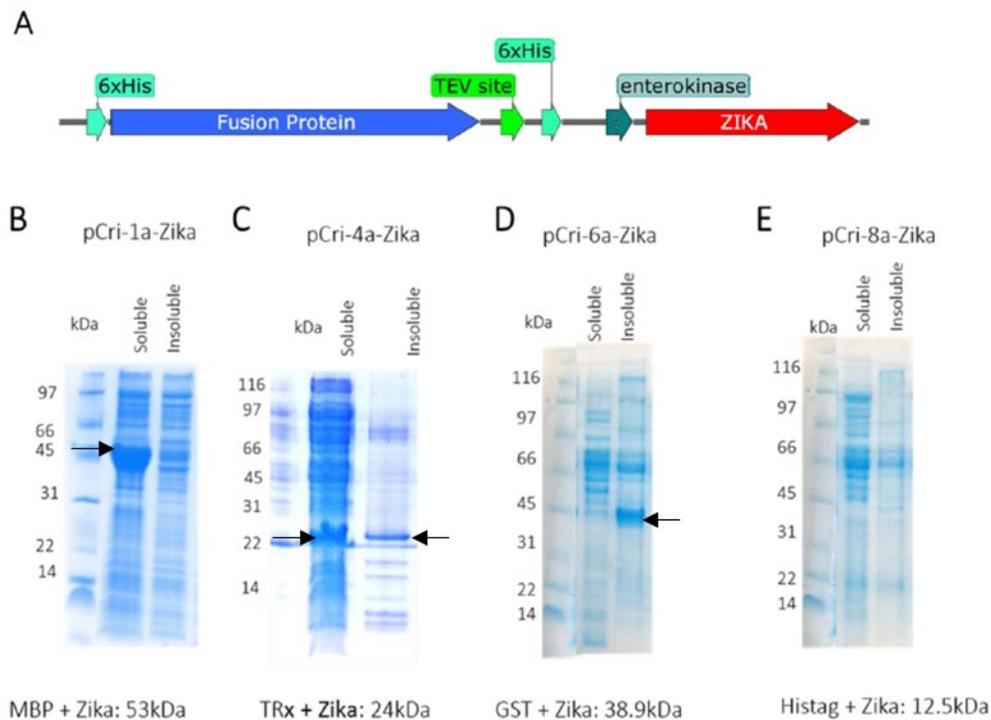


Figura 17. Evaluación de la expresión de los péptidos recombinantes utilizando los vectores pCri 1a, 4a, 6a y 8a, mediante SDS-PAGE. A) Construcción de los vectores pCri con el inserto correspondiente al multi-péptido de ZIKV y un sitio de corte para enteroquinasa. B) SDS-PAGE de los extractos de proteínas solubles e insolubles obtenidas por el cultivo de células competentes transformadas con el vector pCri1a-ZIKV, el peso esperado del producto es de 53kDa, que corresponde al peso de MBP más el peso del multi-péptido de ZIKV. C) Extractos de proteínas solubles e insolubles, expresadas con el vector pCri4a-ZIKV. D) Extractos de proteínas solubles e insolubles, expresadas con el vector pCri6a-ZIKV. E) Extractos de proteínas solubles e insolubles, expresadas con el vector pCri8a-ZIKV.

De acuerdo con estos resultados, utilizando el vector pCri1a es posible obtener el multi-péptido de ZIKV fusionado con MBP en la fracción soluble, por lo que se procedió a la producción a mayor escala y su posterior purificación y cuantificación.

La purificación del multi-péptido fusionado con MBP se realizó con una columna de afinidad a histidinas en un equipo para cromatografía líquida de proteínas FPLC. En la figura 18A, se encuentra el seguimiento de la cromatografía mediante la medición de la absorbancia a 280 nm de las fracciones unidas y no unidas a la columna. El buffer de elución de columna se colocó al iniciar la fracción 19, por lo que todo lo que se encuentra posteriormente corresponde a lo que se unió a la columna de afinidad de histidinas. En la figura 18B, se observa un SDS-PAGE correspondiente a las fracciones 19, 20, 21, 22 y 23, en las cuales se observa posiblemente el multi-péptido de ZIKV fusionado con MBP.

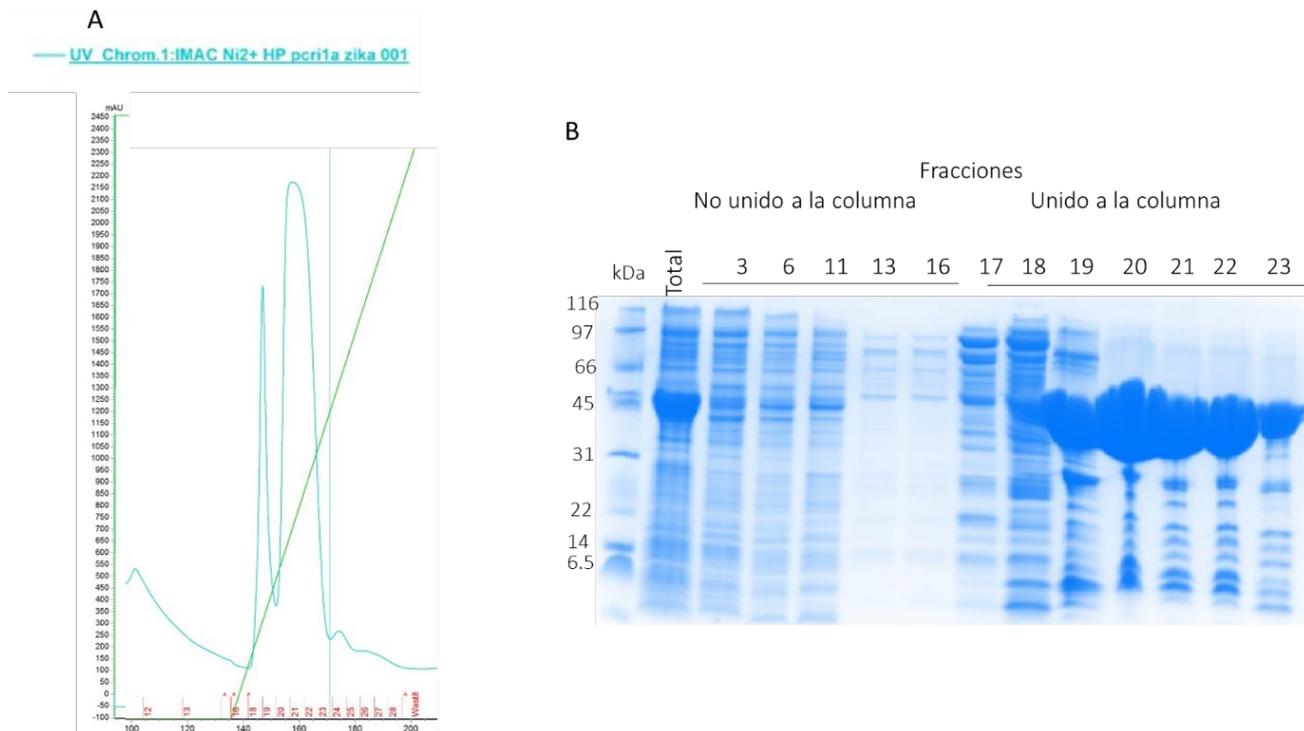


Figura 18. Purificación del multi-péptido de ZIKV a partir de la fracción soluble del cultivo celular. A) seguimiento de la absorbancia a 280 nm de las fracciones unidas y no unidas a la columna de afinidad. B) SDS-PAGE de las fracciones unidas a la columna.

El producto de la purificación fue tratado con la enzima de corte TEV para separar el multi-péptido de MBP. Sin embargo, no se logró separarlos posiblemente porque el sitio de corte no se encuentra estructuralmente disponible, o porque solo se está expresando MBP. El producto se cuantificó y se lograron obtener 1.8mg de proteína, con un rendimiento final de 440 µg/litro de cultivo.

Estandarización de un ensayo de ELISA utilizando los péptidos de NS1 de ZIKV con muestras de suero de sujetos con infección previa por DENV y ZIKV

Debido a la pandemia del virus SARS-CoV-2 se tuvieron que parar las actividades en el laboratorio y no se pudo continuar con la purificación del multi-péptido, por lo que se optó por mandar a sintetizar los péptidos con la compañía Genscript, y con ellos, estandarizar el ensayo de ELISA. Los péptidos se ensayaron con muestras de suero de sujetos con infección previa por DENV y ZIKV, previamente caracterizados. Se sintetizaron los péptidos individuales: NS1-A (GVQLTVVVGGS), NS1-B (GSKYFVRAAKTNNFVVDGDTLKECPLK) y NS1-C (PAVIGTAVKKGKEAVHSLDGY). Estos fueron utilizados en una mezcla de los tres a la misma concentración, no en multi-péptido debido a que, de esta forma, si alguno tiene mayor reactividad cruzada se puede eliminar de la mezcla.

Las muestras de suero colectadas en Mixtequilla, Oaxaca en 2016, al igual que muestras de sujetos sin previa exposición a ZIKV o DENV fueron utilizadas para la estandarización. Estos sueros se emplearon a una dilución 1:100 inicialmente.

Primero se evaluaron 3 concentraciones de la mezcla de péptidos fueron, 200 ng (67 ng de cada péptido por pozo), 400 ng (134 ng de cada péptido por pozo) y 1 μ g (334 ng de cada péptido por pozo), esto se realizó con el anticuerpo secundario anti-IgG HRP a una dilución de 1:40,000 por 30 minutos. Los resultados se encuentran en la figura 19A. No se observaron diferencias al evaluar la densidad óptica con las tres concentraciones diferentes, y tampoco se observaron diferencias entre las muestras de sujetos con previa exposición a ZIKV y aquellos que no (ANOVA de medidas repetidas $p=0.07$).

La incubación de los sueros fue evaluada en dos condiciones, 2 horas a temperatura ambiente y una incubación a 4°C toda la noche (Fig. 19B). Se utilizaron 4 sueros provenientes de sujetos con exposición previa a ZIKV, de la colecta realizada en 2016 en Oaxaca. Lo que se encontró es que en las condiciones de 2 horas a temperatura ambiente los resultados tenían una desviación estándar mayor (desviación estándar media =0.043), en comparación con los resultados obtenidos al incubar las diluciones de sueros a 4°C, toda la noche (desviación estándar media= 0.040), por lo que era menos consistente cuando se repetían los ensayos, por lo cual se decidió continuar utilizando la incubación de los sueros a 4°C, toda la noche.

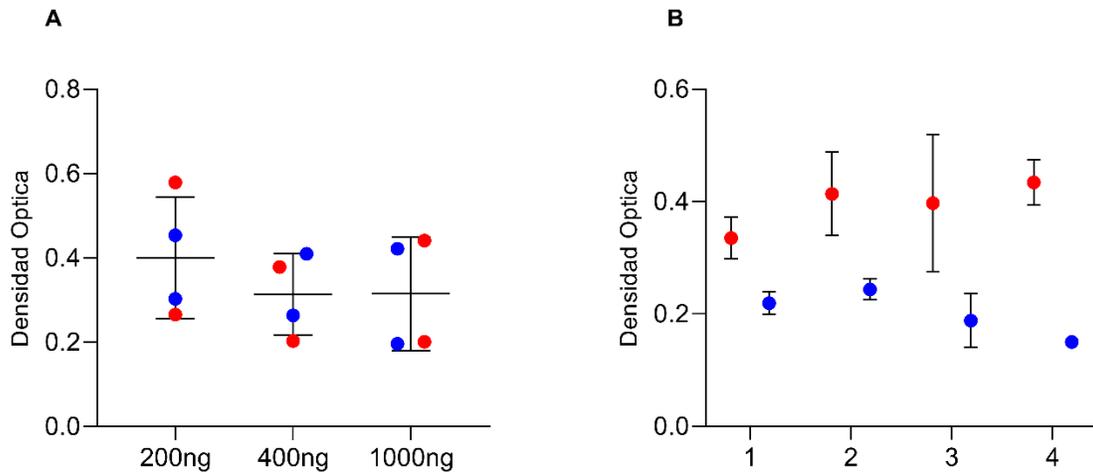


Figura 19. Estandarización de concentración de péptidos en placa y de condiciones de incubación de las diluciones de suero. A) se evaluaron 4 sueros, 2 pertenecientes al grupo de muestras IgG anti-ZIKV positivos (rojos) y dos pertenecientes al grupo de muestras de sujeto IgG anti-ZIKV negativos (azul), en tres concentraciones de péptidos diferentes (200 ng, 400 ng y 1000 ng). Se muestran las barras de desviación estándar y $p=0.07$ por la prueba de ANOVA. B) se evaluaron 4 sueros de sujetos IgG anti-ZIKV positivos, y dos condiciones para su incubación. En rojo se observan la media de 2 experimentos independientes con duplicados, incubando una dilución 1:100 de los sueros por 2 horas a temperatura ambiente, en azul se observan la media de 2 experimentos independientes con duplicados, incubando una dilución 1:100 de los sueros overnight a 4°C, en todos los puntos se observa la desviación estándar. En ambos experimentos se utilizó una dilución del anticuerpo secundario a 1:40,000 por 30 minutos.

Posteriormente dos concentraciones del anticuerpo secundario fueron evaluadas (1:20,000 y 1:40,000), ambas siendo las más recomendadas por el fabricante del anticuerpo Peroxidasa AffinityPure (cabra) Anti-Human-IgG-HRP (Fig. 20). Se evaluaron 13 muestras de suero (dilución 1:100) en dos experimentos independientes y cada muestra por duplicado. Estas muestras fueron colectadas en el brote de ZIKV en 2016 en la comunidad de Santa María Mixtequilla, y todas fueron positivas tanto a IgG anti-ZIKV con el ensayo de Euroimmun, y también para IgG anti-DENV, evaluadas con el ensayo de DRG. La desviación estándar promedio se obtuvo de las muestras evaluadas con una dilución del anticuerpo secundario a 1:20,000 (desviación estándar media= 0.191) y con una dilución de 1:40,000 (desviación estándar media =0.094), siendo esta menor cuando se utiliza la dilución de 1:40,000.

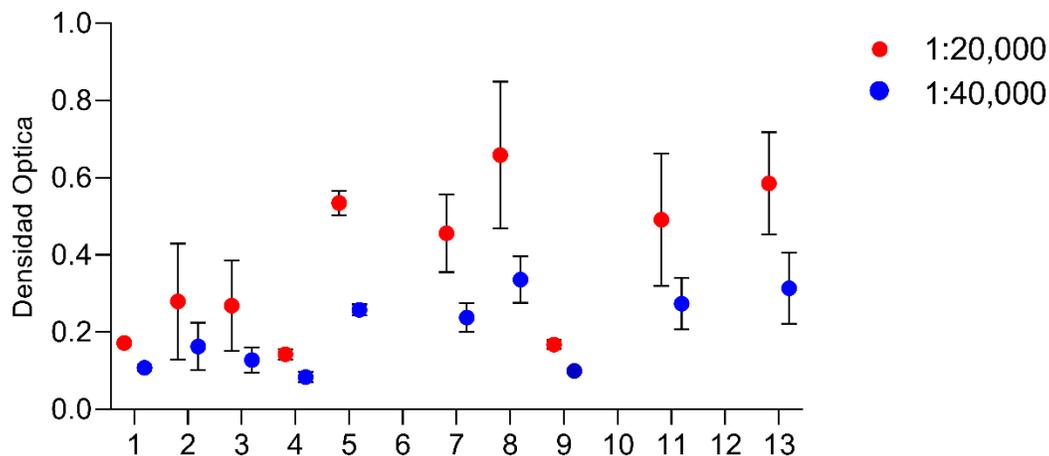


Figura 20. Comparación entre dos diluciones del anticuerpo secundario. Se evaluaron 13 muestras de suero (sueros de sujetos previamente caracterizados y positivos para IgG anti-ZIKV de la colecta de 2016 en Oaxaca) a una dilución 1:100 (incubándolos toda la noche a 4°C) y utilizando dos distintas diluciones del anticuerpo secundario con anti-IgG HRP 1:20,000 (rojo) y 1:40,000 (azul).

Finalmente, se evaluaron 34 muestras de suero provenientes de sujetos negativos para IgG anti-ZIKV o IgG anti-DENV y 30 muestras de suero colectadas en el brote de ZIKV en Oaxaca 2016, además de 8 muestras de suero de la colecta de Veracruz en 2015. Las condiciones que se utilizaron para esta prueba fueron las siguientes:

- 200 ng de la mezcla de péptidos de NS1 de ZIKV (67 ng de cada péptido por pozo).
- Una dilución 1:100 de sueros, incubándolos toda la noche a 4°C.
- Una dilución del anticuerpo secundario anti-Human IgG-HRP de 1:40,000.

Estas condiciones se probaron en 2 experimentos independientes, evaluando cada muestra por duplicado en cada experimento (Fig. 21). Se obtuvo que la media de la densidad óptica al evaluar el grupo de muestras de sujetos negativos para IgG anti-ZIKV fue de 0.221 en comparación con la media del grupo positivo para anti-IgG ZIKV que fue de 0.264, y no se observó una diferencia significativa entre los valores de densidad óptica al comparar ambos grupos ($p > 0.05$). Debido a que no se observaron diferencias entre las muestras de sujetos con exposición previa a ZIKV y los controles negativos, se decidió no continuar con el ensayo de ELISA, ya que las muestras positivas para IgG anti-ZIKV tuvieron resultados negativos con el ensayo de ELISA propuesto.

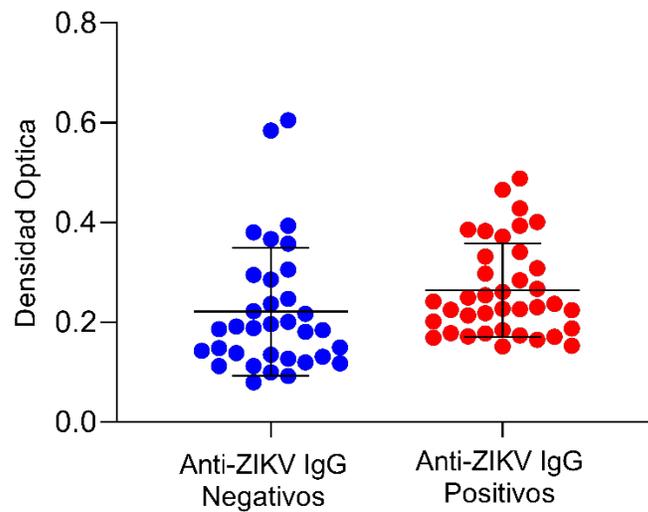


Figura 21. Comparación entre muestras de suero de sujetos negativos para IgG anti-ZIKV (azul) y sujetos positivos para IgG anti-ZIKV (rojo) por ELISA, utilizando la mezcla de péptidos como antígeno, una dilución de sueros 1:100 y una dilución del anticuerpo secundario anti-IgG HRP. Cada punto corresponde al valor promedio de la densidad óptica obtenido en dos experimentos independientes donde cada muestra se evaluó por duplicado. Valor $p= 0.108$.

Discusión

El diagnóstico convencional que se realizaba cuando DENV era el único arbovirus que circulaba en regiones endémicas, como México, se complicó cuando el ZIKV emergió en estas regiones, porque se requirió realizar un diagnóstico diferencial de estos virus. Las pruebas serológicas con las que se cuenta no eran lo suficientemente específicas para dar un diagnóstico confirmatorio, debido a la reactividad cruzada que presentan los anticuerpos anti-DENV o anti-ZIKV, generados durante la infección por estos miembros del género *Flavivirus*, ya que comparten una alta homología entre sus proteínas.

El diagnóstico diferencial es crucial para el manejo clínico en regiones endémicas o con potencial para su surgimiento, porque la infección por ZIKV puede ocasionar complicaciones neurológicas severas, como síndrome de Guillain-Barre y síndrome congénito asociado a ZIKV. En este proyecto de investigación planteamos como objetivo desarrollar un ensayo de detección serológico específico para ZIKV y evaluar su desempeño con muestras de suero de pacientes provenientes de regiones endémicas a DENV y ZIKV en México.

Para desarrollar este proyecto requeríamos contar con muestras de suero de sujetos con exposición previa a DENV, CHIKV y ZIKV. La conservación de muestras de suero históricas en el laboratorio es muy compleja porque se requiere una red fría, particularmente congeladores, para mantener la integridad de las proteínas o anticuerpos en la muestra. Una forma alternativa para conservar muestras biológicas es fijarlas en una matriz inerte como el papel filtro [211]. Estas muestras se conocen como muestras secas fijadas en papel filtro, y pueden ser de diferente naturaleza, como sangre total, suero, plasma, saliva, orina, entre otras [176,212,213]. Como primer objetivo evaluamos el uso de DSS provenientes de sujetos con exposición previa a los arbovirus circulantes en México, con ensayos de ELISA comerciales para la detección de anticuerpos anti-DENV, anti-CHIKV y anti-ZIKV, con el fin de mostrar su utilidad en comparación con muestras de suero convencionales. Las muestras utilizadas fueron colectadas en regiones endémicas a DENV desde la década de 1980 [214], y que han sido afectadas por otros arbovirus como CHIKV desde 2014[215] y ZIKV desde finales del 2015[195].

Inicialmente se determinó que las diluciones de DSS equipararan los resultados de las muestras de suero convencionales (Figs. 8 a 11). Al analizar los resultados de DSS en comparación con las muestras de suero, se encontró una concordancia mayor al 89% al evaluar la presencia de IgM anti-CHIKV, IgM e IgG anti-DENV e IgG anti-ZIKV, además de que se tuvo una especificidad del 100% ya que no se encontraron resultados falsos positivos al evaluar las DSS. En este trabajo proporcionamos evidencias de que en las DSS se pueden detectar anticuerpos con una concordancia mayor al 89% con los resultados de suero y confirman que las DSS pueden ser

evaluadas hasta 200 días después de su preparación si se mantienen en condiciones de refrigeración o congelación [179–181]. Esta forma de almacenar DSS puede ser bastante útil para reducir costos de transportación en red fría [216], e incluso para preparar en el laboratorio con el fin de reducir el espacio destinado al almacenamiento de muestras.

Sin embargo, encontramos que para la determinación de IgM anti-DENV se subestimaron algunos resultados positivos (Fig. 9). Esta subestimación ya se había encontrado previamente en algunos estudios al evaluar muestras de sangre secas en papel filtro [217], y en el caso de este trabajo, la subestimación de los resultados podría deberse a que las muestras de suero positivas tuvieron valores del cociente relativamente bajos (1.1 a 1.8), en comparación con los obtenidos para IgM anti-CHIKV (1.1 a 6). Posiblemente los bajos valores del cociente obtenidos en la determinación en suero de IgM anti-DENV se deba a que los sujetos se encuentren cursando una segunda infección por DENV, ya que se ha reportado que estos suelen tener menores valores de IgM y mayores de IgG. De hecho, siendo la relación entre los valores de IgM e IgG se ha considerado como un parámetro para determinar si un sujeto está cursando una infección secundaria o primaria por DENV [218–221].

Las muestras analizadas fueron colectadas en la región de Veracruz, la cual ha sido una región endémica para DENV por al menos 4 décadas, y donde la última estimación de seroprevalencia en 2006 estableció que un 76% de la población estudiada había estado expuesta ya que presentaba IgG anti-DENV [222]. Por otro lado, otros cálculos correspondientes en el estado de Morelos, otra región endémica a DENV en México, se estima que de 2011 a 2016 la seroprevalencia incrementó aproximadamente un 14.2%, siendo 76.3% en 2011, 86.9% en 2014, 88.9% en 2015 y 90.5% en 2016 [223]. Estos cálculos podrían extrapolarse a la población de Veracruz ya que, de acuerdo con los datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, en 2011 se registraron 776 casos de fiebre por DENV (hemorrágica y no hemorrágica) en Morelos y 1,647 en Veracruz [224], en 2013 hubieron 3,227 casos en Morelos y 8,799 en Veracruz [194], y para 2015 se reportaron 595 casos en Morelos y 3,760 casos en Veracruz [195]. Así, de 2011 a 2013 hubo un incremento del 415% y del 534% de casos registrados en Morelos y en Veracruz, respectivamente, y una disminución del 18.4% y de 42.7% del 2013 al 2015 en Morelos y Veracruz, respectivamente. La disminución que se observa en el número de casos de infección por DENV en 2015 pudo ser debido a la introducción de CHIKV y posteriormente a la de ZIKV [225]. Esta disminución en el número de casos de infección por DENV en 2015 pudo haberse debido a la introducción de CHIKV, y la alta seroprevalencia hacia DENV en la región de Veracruz podría explicar por qué se tuvieron solo 6 muestras positivas para IgM anti-DENV y que estas tuvieran valores del cociente bajos en comparación con los obtenidos para la determinación de IgM anti-CHIKV.

En este trabajo se observó que entre el 7.4% y el 16% de muestras colectadas en Veracruz durante brotes de DENV, en fechas anteriores al primer brote de ZIKV en México (noviembre 2015) [195,226], presentan anticuerpos IgG con reactividad cruzada hacia ZIKV. Durante el periodo de tiempo donde estas muestras fueron colectadas no se había identificado la circulación de ZIKV en México, por lo que estos resultados exponen el reto que genera la presencia de anticuerpos anti-DENV con reactividad cruzada hacia antígenos de ZIKV. Resultados similares han sido reportados en el trabajo de Low et al. 2021 [227], donde encuentran hasta un 22% de resultados falsos positivos al analizar muestras de sujetos con exposición previa a DENV con ensayos comerciales para la detección de IgG anti-ZIKV, donde incluso reportan que la reactividad cruzada hacia antígenos de ZIKV es principalmente detectada en muestras de suero de sujetos con más de una infección por DENV, situación que es común en regiones donde DENV es endémico, como la región de Veracruz, y que incluso podría ser el caso de las muestras analizadas en este proyecto.

A partir del análisis de la reactividad cruzada hacia la proteína NS1 de ZIKV que presentan las muestras de suero de sujetos con exposición previa a DENV, y lo reportado en la literatura, consideramos que la obtención de un ensayo serológico diferencial entre ZIKV y DENV se puede lograr mediante la identificación de regiones poco conservadas entre ZIKV y DENV, en lugar de utilizar una proteína viral completa con múltiples regiones conservadas. En este trabajo se realizó la identificación de regiones peptídicas dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1, que sean potencialmente antigénicas y que tengan una baja identidad entre ZIKV y DENV, con el fin de utilizarlas como antígenos en un ensayo de ELISA, sin embargo, no se logró obtener un ensayo diferencial.

Consideramos que el análisis que se llevó a cabo para la selección de los péptidos de ZIKV, para que estos fueran antigénicos y poco conservados con DENV fue adecuado ya que se lograron identificar varios péptidos dentro de la secuencia de aminoácidos de una de las proteínas más inmunogénicas durante la infección por ZIKV. Este abordaje a la problemática de la reactividad cruzada de los anticuerpos durante las infecciones por *Flavivirus* ha sido considerado por otros trabajos donde han seleccionado péptidos de ZIKV con baja identidad con DENV [228,229] o han seleccionado péptidos por su potencial antigénico, siendo incluso algunas regiones también identificadas en este trabajo [230,231]. Incluso se han evaluado todos los péptidos sobrelapantes de la poliproteína de ZIKV [232]. Estos trabajos han tenido resultados prometedores principalmente cuando se incluyen en ensayos de microarreglos de péptidos [228,232], donde las interacciones péptido-anticuerpo se ven más favorecidas que en un ensayo de ELISA [233].

Sin embargo, la deficiencia de este trabajo se encuentra en la exhibición de los péptidos en el ensayo de ELISA, porque a pesar de que los anticuerpos presentes en suero si pudiesen tener la capacidad de unirse a los péptidos, la sensibilidad encontrada no es mayor al 50% [229,232]. En

comparación con otros estudios, se observa que se optaron por varias alternativas para su diseño, con el fin de obtener resultados más eficientes en el ensayo de ELISA. Por ejemplo, en el trabajo de Sola et al. 2018 [230] utilizaron un copolímero de azida para conjugar los péptidos con la placa, lo que le da mayor estabilidad a la estructura del péptido, y permite que éste se una solo en la orientación deseada y con la distribución espaciada, que permita la unión de los anticuerpos de manera más efectiva. Otra de las alternativas que se han utilizado para un ensayo de ELISA es la propuesta por Mishra et al. 2018 donde proponen la utilización de concatámeros de 24 copias del mismo péptido [232], y donde comparan la eficiencia de un ensayo de ELISA con el péptido seleccionado de forma individual y en arreglo de concatámero, obteniendo que con los péptidos individuales la sensibilidad era menor al 50%, y al utilizar concatámeros la sensibilidad fue mayor de 80%. En otro ensayo de Mascini et al. 2019 se utilizaron péptidos unidos a maleinimida-PEG2-biotina con el fin de mejorar su solubilidad, unión a placa, y espaciamiento entre ellos [234].

Como podemos ver, las estrategias para elegir los péptidos son similares a las utilizadas en este proyecto, sin embargo, la deficiencia que tuvo este trabajo fue en el diseño de la prueba, ya que si se utilizan péptidos cortos parece ser necesario que sean evaluados individualmente en microarreglos de péptidos o si se quieren utilizar en un ensayo de ELISA debe enfocarse en cómo van a ser presentados de una forma más eficiente donde se optimice su espaciamiento y disponibilidad. De hecho, solo un trabajo ha reportado una sensibilidad aceptable utilizando simplemente péptidos como antígenos en ensayos de ELISA, Lee et al. 2018, en el cual localizan 8 péptidos de la proteína NS1 de ZIKV que, al ser utilizados como antígenos en un ensayo de ELISA, dan resultados con alta sensibilidad y especificidad, sin embargo, es un estudio que no da muchos detalles del procedimiento [231].

El diseño de un ensayo de ELISA que sea diferencial para la detección de anticuerpos específicos anti-ZIKV es complejo debido a la reactividad cruzada hacia epítopes de DENV, lo que impide que se utilicen partículas virales o proteínas completas como antígenos. Por esta razón varios trabajos se han enfocado en la identificación de epítopes con baja conservación entre *Flavivirus* y su utilización para ensayos serológicos. Sin embargo, al utilizar regiones peptídicas cortas, se requiere contar con estrategias que permitan una buena presentación de los péptidos para optimizar el ensayo. Una de las alternativas que pudo haber sido útil en este trabajo fue el desarrollo del multi-péptido de ZIKV, ya que este pudo haber ofrecido el espaciamiento requerido para que la unión antígeno-anticuerpo y su posterior identificación por los reactivos de ELISA fuera más eficaz.

Otras alternativas que han sido exploradas en años más recientes, incluyen ensayos de ELISA en donde se utilizan como antígenos, péptidos o proteínas completas con mutaciones en regiones altamente conservadas entre ZIKV y DENV, como en la región N terminal de la proteína NS1 [235],

o en el dominio II de la proteína E [236], encontrando una especificidad y sensibilidad mayores al 79% para NS1 y mayores al 90% para la proteína E. También se han elaborado ensayos que utilizan aptámeros de DNA o RNA en un ELISA de captura para la identificación de la proteína NS1 en suero, o para ensayos de ELISA indirectos para la identificación de anticuerpos, en estos ensayos encuentran alta especificidad, sin embargo, en algunos casos de infecciones secundarias por *Flavivirus* hay resultados falsos positivos [237,238]. Finalmente, otras alternativas para el diagnóstico serológico o detección diferencial de anticuerpos por la exposición a ZIKV y/o DENV, ha sido la optimización de ensayos de seroneutralización, con la utilización de partículas virales de una sola ronda, es decir, partículas virales que son capaces de entrar a una célula y expresar el genoma viral, sin embargo, estas presentan mutaciones en su genoma y la partícula viral no es ensamblada, y en su lugar se expresa una proteína fluorescente que se utiliza como reportero. Los ensayos de seroneutralización son el estándar de oro, ofrece resultados con sensibilidad y especificidad mayores al 90%, sin embargo, en algunos casos de infecciones secundarias por *Flavivirus*, aun es difícil hacer una detección diferencial [239–241].

Otra limitación que se encuentra al diseñar ensayos serológicos diferenciales entre *Flavivirus* es la diversidad de la respuesta de anticuerpos generada, ya que esta va a variar dependiendo de si se está experimentando una infección primaria por ZIKV o algún serotipo de DENV, o si se está cursando una infección secundaria. Durante las infecciones primarias a DENV o ZIKV la respuesta de IgM es de gran magnitud y está dirigida a varios epítopes a lo largo de la poliproteína y durante una infección secundaria por DENV o ZIKV la magnitud de respuesta de IgM es menor[242]. La respuesta de IgG también varía si se ha experimentado una infección primaria o una secundaria por DENV o ZIKV. Durante las infecciones secundarias la magnitud de respuesta de IgG es mayor que en las infecciones primarias y durante las infecciones secundarias la respuesta convaleciente temprana está mayormente dirigida a epítopes conservados entre *Flavivirus*. Entonces, la respuesta inicial va a tener alta reactividad cruzada, sin embargo, esta respuesta va madurando y en una fase tardía convaleciente (6 a 8 meses post infección) va a ser más virus-específica [148,242]. Estas observaciones también implican que los péptidos que sean usados como antígenos en un ensayo de ELISA deben cubrir un mayor número de regiones inmunogénicas de las proteínas virales, por ejemplo, incluir péptidos de la proteína E [125].

A partir de este estudio consideramos que un mejor abordaje al problema del diagnóstico serológico diferencial entre ZIKV y DENV debe incluir el uso de múltiples péptidos antigénicos y poco conservados entre *Flavivirus*, preferentemente seleccionados de varias proteínas virales. Además, se debe planear un diseño adecuado para la unión antígeno-anticuerpo, por ejemplo, en multi-péptido, múltiples péptidos concatenados o la utilización de espaciadores.

Conclusiones

1. En este trabajo se demostró que las muestras de suero seco en papel filtro, de pacientes con infecciones por DENV, ZIKV y CHIKV, son una buena alternativa al uso de muestras de suero convencionales, para la determinación de anticuerpos específicos. Además, determinamos que aproximadamente 7.7% de las muestras colectadas en periodos previos a la llegada de ZIKV a México tienen anticuerpos anti-DENV con reactividad cruzada hacia ZIKV, lo que hace evidente la necesidad de contar con un ensayo serológico específico para ZIKV y DENV que permita diferenciarlos en el contexto de su cocirculación.
2. Este trabajo planteamos desarrollar un ensayo de detección serológico específico del ZIKV, para lo cual se identificaron 3 sitios antigénicos en la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 de ZIKV, para esta selección la menor identidad encontrada entre ZIKV y DENV fue aproximadamente 35% al 50%, ya que las regiones menos conservadas no resultaron ser antigénicas.
3. Los 3 péptidos sintéticos de la proteína NS1 de ZIKV, NS1-A, NS1-B y NS1-C, no permitieron diferenciar entre sueros provenientes de sujetos con previa exposición a ZIKV y sueros provenientes de sujetos sin exposición previa a *Flavivirus*, ya sea por separado o en una mezcla de los tres.

El diseño de un sistema de detección de anticuerpos específicos para ZIKV es un reto debido a la reactividad cruzada que tienen los anticuerpos generados durante las infecciones por DENV o ZIKV, siendo esta mayor al cursar infecciones secundarias. Además de que la diversidad de la respuesta de anticuerpos va a depender de estas múltiples posibles exposiciones a ambos virus y del tiempo de en el que se colecta la muestra respecto al inicio de los síntomas de la infección.

Consideramos que las limitaciones que tuvo este proyecto pueden ofrecer recomendaciones para proyectos futuros, ya que la problemática que genera la reactividad cruzada entre *Flavivirus* puede continuar en el caso de que vuelva a ocurrir un brote importante de ZIKV o incluso, pueden ocurrir nuevos brotes epidemiológicos de otros *Flavivirus*, como YFV o WNV, los cuales ya se encuentran circulando en otras regiones de América del sur, Asia y África.

Referencias:

1. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29 (3): 487–524. doi:10.1128/CMR.00072-15
2. Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. *New England Journal of Medicine.* 2016;374(7): 601–604. doi:10.1056/NEJMp1600297
3. Salles TS, da Encarnação Sá-Guimarães T, de Alvarenga ESL, Guimarães-Ribeiro V, de Meneses MDF, de Castro-Salles PF, et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasit Vectors.* 2018;11(1): 264. doi:10.1186/s13071-018-2830-8
4. Subsecretaría de Salubridad, Dirección General de Epidemiología. Boletín Epidemiológico, Febrero, 1981. México; 1981. Available: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>
5. Organización Panamericana de la Salud, World Health Organization-Regional Office for the Americas. Zika -Actualización Epidemiológica, 29 de julio de 2016. 2016. Available: <https://www.paho.org/es/documentos/29-julio-2016-zika-actualizacion-epidemiologica>
6. Barnard TR, Abram QH, Lin QF, Wang AB, Sagan SM. Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly. *Trends Biochem Sci.* 2021;46(5): 378–390. doi:10.1016/j.tibs.2020.12.007
7. Barrows NJ, Campos RK, Liao K-C, Prasanth KR, Soto-Acosta R, Yeh S-C, et al. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev.* 2018;118(8): 4448–4482. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00719
8. Mishra PM, Uversky VN, Giri R. Molecular Recognition Features in Zika Virus Proteome. *J Mol Biol.* 2018;430(16): 2372–2388. doi:10.1016/j.jmb.2017.10.018
9. Neves-Martins TC, Mebus-Antunes NC, Caruso IP, Almeida FCL, Da Poian AT. Unique structural features of flaviviruses' capsid proteins: new insights on structure-function relationship. *Curr Opin Virol.* 2021;47: 106–112. doi:10.1016/j.coviro.2021.02.005
10. Tan TY, Fibriansah G, Kostyuchenko VA, Ng T-S, Lim X-X, Zhang S, et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat Commun.* 2020;11(1): 895. doi:10.1038/s41467-020-14647-9
11. Faustino, Martins, Karguth, Artilheiro, Enguita, Ricardo, et al. Structural and Functional Properties of the Capsid Protein of Dengue and Related Flavivirus. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16): 3870. doi:10.3390/ijms20163870
12. Li L, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, et al. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science.* 2008;319(5871): 1830–1834. doi:10.1126/science.1153263
13. Dai L, Song J, Lu X, Deng Y-Q, Musyoki AM, Cheng H, et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host*

Microbe. 2016;19(5): 696–704. doi:10.1016/j.chom.2016.04.013

14. Esswein SR, Gristick HB, Jurado A, Peace A, Keeffe JR, Lee YE, et al. Structural basis for Zika envelope domain III recognition by a germline version of a recurrent neutralizing antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(18): 9865–9875. doi:10.1073/pnas.1919269117

15. Gallichotte EN, Young EF, Baric TJ, Yount BL, Metz SW, Begley MC, et al. Role of Zika Virus Envelope Protein Domain III as a Target of Human Neutralizing Antibodies. *mBio*. 2019;10(5): e01485-19. doi:10.1128/mBio.01485-19

16. Lai C-Y, Tsai W-Y, Lin S-R, Kao C-L, Hu H-P, King C-C, et al. Antibodies to Envelope Glycoprotein of Dengue Virus during the Natural Course of Infection Are Predominantly Cross-Reactive and Recognize Epitopes Containing Highly Conserved Residues at the Fusion Loop of Domain II. *J Virol*. 2008;82(13): 6631–6643. doi:10.1128/JVI.00316-08

17. Brand C, Bisailon M, Geiss BJ. Organization of the Flavivirus RNA replicase complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2017;8(6): 10.1002/wrna.1437. doi:10.1002/wrna.1437

18. Bujalowski PJ, Bujalowski W, Choi KH. Identification of the viral RNA promoter stem loop A (SLA)-binding site on Zika virus polymerase NS5. *Sci Rep*. 2020;10(1):13306. doi:10.1038/s41598-020-70094-y

19. Filomatori C V., Iglesias NG, Villordo SM, Alvarez DE, Gamarnik A V. RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase. *J Bio Chem*. 2011;286(9): 6929–6939. doi:10.1074/jbc.M110.162289

22. Wang S, Chan KWK, Tan MJA, Flory C, Luo D, Lescar J, et al. A conserved arginine in NS5 binds genomic 3' stem-loop RNA for primer-independent initiation of flavivirus RNA replication. *RNA*. 2022;28(2): 177–193. doi:10.1261/rna.078949.121

21. Duan YP, Zeng M, Jiang B, Zhang W, Wang M, Jia R, et al. Flavivirus RNA-dependent RNA polymerase interacts with genome UTRs and viral proteins to facilitate flavivirus RNA replication. *Viruses*. 2019; 11(10):929. doi:10.3390/v11100929

22. Berzal-Herranz A, Berzal-Herranz B, Ramos-Lorente SE, Romero-López C. The Genomic 3' UTR of Flaviviruses Is a Translation Initiation Enhancer. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15):8604. doi:10.3390/ijms23158604

23. Xie X, Zou J, Zhang X, Zhou Y, Routh AL, Kang C, et al. Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. *Cell Host Microbe*. 2019;26(5): 606-622.e8. doi:10.1016/j.chom.2019.09.015

24. Graham ME, Merrick C, Akiyama BM, Szucs MJ, Leach S, Kieft JS, et al. Zika virus dumbbell-1 structure is critical for sfRNA presence and cytopathic effect during infection. *mBio*. 2023; e0110823. doi:10.1128/mbio.01108-23

25. Ng W, Soto-Acosta R, Bradrick S, Garcia-Blanco M, Ooi E. The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses*. 2017;9: 137. doi:10.3390/v9060137

26. Syenina A, Vijaykrishna D, Gan ES, Cheng Tan H, Choy MM, Siriphanitchakorn T, et al. Positive epistasis between viral polymerase and the 3' untranslated region of its genome reveals the epidemiologic fitness of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(20):

11038–11047. doi:10.1073/pnas.1919287117

27. Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kedzierski L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol.* 2018;9:2180. doi:10.3389/fimmu.2018.02180
28. Reyes-del Valle J, Salas-Benito J, Soto-Acosta R, del Angel RM. Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism. *Curr Trop Med Rep.* 2014;1: 36–43. doi:10.1007/s40475-013-0002-7
29. Sirohi D, Kuhn RJ. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J Infect Dis.* 2017;216 (suppl_10):S935-S944. doi:10.1093/infdis/jix515
30. Brinton MA. Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus. *Viruses.* 2013;6(1): 13–53. doi:10.3390/v6010013
31. Zhang Y, Yan Y, Li S, Yuan F, Wen D, Jia N, et al. Broad Host Tropism of Flaviviruses during the Entry Stage. *Microbiol Spectr.* 2023;11(2): e0528122. doi:10.1128/spectrum.05281-22
32. Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, et al. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe.* 2012;12(4): 544–557. doi:10.1016/j.chom.2012.08.009
33. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses.* 2011;3(2): 160–171. doi:10.3390/v3020160
34. Peruzzu D, Amendola A, Venturi G, de Turrís V, Marsili G, Fortuna C, et al. Zika Virus Exploits Lipid Rafts to Infect Host Cells. *Viruses.* 2022;14(9): 2059. doi:10.3390/v14092059
35. Osuna-Ramos JF, Reyes-Ruiz JM, del Ángel RM. The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8: 388. doi:10.3389/fcimb.2018.00388
36. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.* 2015;89(17): 8880–8896. doi:10.1128/jvi.00354-15
37. Xie S, Zhang H, Liang Z, Yang X, Cao R. AXL, an Important Host Factor for DENV and ZIKV Replication. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11: 575346. doi:10.3389/fcimb.2021.575346
38. Persaud M, Martinez-Lopez A, Buffone C, Porcelli SA, Diaz-Griffero F. Infection by Zika viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. *Virology.* 2018;518: 301–312. doi:10.1016/j.virol.2018.03.009
39. Strange DP, Jiyarom B, Pourhabibi Zarandi N, Xie X, Baker C, Sadri-Ardekani H, et al. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. *mBio.* 2019;10(4): e01372-19. doi:10.1128/mBio.01372-19
40. Niu J, Jiang Y, Xu H, Zhao C, Zhou G, Chen P, et al. TIM-1 Promotes Japanese Encephalitis Virus Entry and Infection. *Viruses.* 2018;10(11): 630. doi:10.3390/v10110630
41. Zwernik SD, Adams BH, Raymond DA, Warner CM, Kassam AB, Rovin RA, et al. AXL receptor is required for Zika virus strain MR-766 infection in human glioblastoma cell lines. *Mol Ther Oncolytics.* 2021;23: 447–457. doi:10.1016/j.omto.2021.11.001
42. Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M, Kriegstein AR. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem

- Cells. *Cell Stem Cell*. 2016;18(5): 591–596. doi:10.1016/j.stem.2016.03.012
43. Richard AS, Shim B-S, Kwon Y-C, Zhang R, Otsuka Y, Schmitt K, et al. AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(8): 2024–2029. doi:10.1073/pnas.1620558114
44. Carrera J, Trenerry AM, Simmons CP, Mackenzie JM. Flavivirus replication kinetics in early-term placental cell lines with different differentiation pathways. *Viol J*. 2021;18(1): 251. doi:10.1186/s12985-021-01720-y
45. Agrelli A, de Moura RR, Crovella S, Brandão LAC. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infect Genet Evol*. 2019;69:22–29. doi:10.1016/j.meegid.2019.01.018
46. Sharma A, Vasanthapuram R, M Venkataswamy M, Desai A. Prohibitin 1/2 mediates Dengue-3 entry into human neuroblastoma (SH-SY5Y) and microglia (CHME-3) cells. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):55. doi:10.1186/s12929-020-00639-w
47. Srivastava M, Zhang Y, Chen J, Sirohi D, Miller A, Zhang Y, et al. Chemical proteomics tracks virus entry and uncovers NCAM1 as Zika virus receptor. *Nat Commun*. 2020;11(1):3896. doi:10.1038/s41467-020-17638-y
48. Chuang C-K, Yang T-H, Chen T-H, Yang C-F, Chen W-J. Heat shock cognate protein 70 isoform D is required for clathrin-dependent endocytosis of Japanese encephalitis virus in C6/36 cells. *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 4): 793–803. doi:10.1099/jgv.0.000015
49. Khachatoorian R, Cohn W, Buzzanco A, Riahi R, Arumugaswami V, Dasgupta A, et al. HSP70 Copurifies with Zika Virus Particles. *Virology*. 2018;522: 228–233. doi:10.1016/j.virol.2018.07.009
50. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(6): 670–684. doi:10.1007/s00018-004-4464-6
51. Taguwa S, Maringer K, Li X, Bernal-Rubio D, Rauch JN, Gestwicki JE, et al. Defining Hsp70 Subnetworks in Dengue Virus Replication Reveals Key Vulnerability in Flavivirus Infection. *Cell*. 2015;163(5): 1108–1123. doi:10.1016/j.cell.2015.10.046
52. Phoo WW, El Sahili A, Zhang ZZ, Chen MW, Liew CW, Lescar J, et al. Crystal structures of full length DENV4 NS2B-NS3 reveal the dynamic interaction between NS2B and NS3. *Antiviral Res*. 2020;182:104900. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104900
53. Quek JP, Ser Z, Chew BLA, Li X, Wang L, Sobota RM, et al. Dynamic Interactions of Post Cleaved NS2B Cofactor and NS3 Protease Identified by Integrative Structural Approaches. *Viruses*. 2022;14(7):1440. doi:10.3390/v14071440
54. Falgout B, Pethel M, Zhang Y-M, Lai C-J. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol*. 1991;65(5): 2467–75. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2016768>
55. Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep*. 2017;18(9): 2113–2123. doi:10.1016/j.celrep.2017.02.014

56. van den Elsen K, Quek JP, Luo D. Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. *Viruses*. 2021;13(6): 956. doi:10.3390/v13060956
57. Cerikan B, Goellner S, Neufeldt CJ, Haselmann U, Mulder K, Chatel-Chaix L, et al. A Non-Replicative Role of the 3' Terminal Sequence of the Dengue Virus Genome in Membranous Replication Organelle Formation. *Cell Rep*. 2020;32(1): 107859. doi:10.1016/j.celrep.2020.107859
58. Wang Y, Xie X, Shi P-Y. Flavivirus NS4B protein: Structure, function, and antiviral discovery. *Antiviral Res*. 2022;207: 105423. doi:10.1016/j.antiviral.2022.105423
59. Neufeldt CJ, Cortese M, Scaturro P, Cerikan B, Wideman JG, Tabata K, et al. ER-shaping atlastin proteins act as central hubs to promote flavivirus replication and virion assembly. *Nat Microbiol*. 2019;4(12): 2416–2429. doi:10.1038/s41564-019-0586-3
60. Płaszczycza A, Scaturro P, Neufeldt CJ, Cortese M, Cerikan B, Ferla S, et al. A novel interaction between dengue virus nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous replication organelle. *PLoS Pathog*. 2019;15(5): e1007736. doi:10.1371/journal.ppat.1007736
61. Hoffmann HH, Schneider WM, Rozen-Gagnon K, Miles LA, Schuster F, Razooky B, et al. TMEM41B Is a Pan-flavivirus Host Factor. *Cell*. 2021;184(1): 133-148.e20. doi:10.1016/j.cell.2020.12.005
62. Klema VJ, Padmanabhan R, Choi KH. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses*. 2015;7(8): 4640–4656. doi:10.3390/v7082837
63. Fajardo T, Sanford TJ, Mears H V., Jasper A, Storrie S, Mansur DS, et al. The flavivirus polymerase NS5 regulates translation of viral genomic RNA. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(9): 5081–5093. doi:10.1093/nar/gkaa242
64. Bhatnagar P, Sreekanth GP, Murali-Krishna K, Chandele A, Sitaraman R. Dengue Virus Non-Structural Protein 5 as a Versatile, Multi-Functional Effector in Host–Pathogen Interactions. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 18;11:574067. doi:10.3389/fcimb.2021.574067
65. Lescar J, Soh S, Lee LT, Vasudevan SG, Kang C, Lim SP. The Dengue Virus Replication Complex: From RNA Replication to Protein-Protein Interactions to Evasion of Innate Immunity. *Adv Exp Med*;2018;1062:115-129 doi:10.1007/978-981-10-8727-1_9
66. Zhang X, Xie X, Xia H, Zou J, Huang L, Popov VL, et al. Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly. *mBio*. 2019;10(5): e02375-19. doi:10.1128/mBio.02375-19
67. Rana J, Campos JLS, Poggianella M, Burrone OR. Dengue virus capsid anchor modulates the efficiency of polyprotein processing and assembly of viral particles. *J Gen Virol*. 2019;100(12): 1663–1673. doi:10.1099/jgv.0.001346
68. Tabata K, Arimoto M, Arakawa M, Nara A, Saito K, Omori H, et al. Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep*. 2016;16(9): 2339–2347. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.068
69. Viettri M, Zambrano JL, Rosales R, Caraballo GI, Gutiérrez-Escolano AL, Ludert JE. Flavivirus

- infections induce a Golgi stress response in vertebrate and mosquito cells. *Sci Rep*. 2021;11(1):23489. doi:10.1038/s41598-021-02929-1
70. Sager G, Gabaglio S, Sztul E, Belov G. Role of Host Cell Secretory Machinery in Zika Virus Life Cycle. *Viruses*. 2018;10(10): 559. doi:10.3390/v10100559
71. Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, et al. Flavivirus NS1 Structures Reveal Surfaces for Associations with Membranes and the Immune System. *Science*. 2014;343(6173): 881–885. doi:10.1126/science.1247749
72. Edeling MA, Diamond MS, Fremont DH. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(11): 4285–4290. doi:10.1073/pnas.1322036111
73. Somnuk P, Hauhart RE, Atkinson JP, Diamond MS, Avirutnan P. N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement. *Virology*. 2011;413(2): 253–264. doi:10.1016/j.virol.2011.02.022
74. Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d’Alayer J, Ermonval M, et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(19): 8003–8008. doi:10.1073/pnas.1017338108
75. Zhang S, He Y, Wu Z, Wang M, Jia R, Zhu D, et al. Secretory pathways and multiple functions of nonstructural protein 1 in flavivirus infection. *Front Immunol*. 2023;14:1205002. doi:10.3389/fimmu.2023.1205002
76. Shu B, Ooi JSG, Tan AWK, Ng TS, Dejnirattisai W, Mongkolsapaya J, et al. CryoEM structures of the multimeric secreted NS1, a major factor for dengue hemorrhagic fever. *Nat Commun*. 2022;13(1):6756. doi:10.1038/s41467-022-34415-1
77. Rodrigues de Sousa J, Azevedo R do S da S, Quaresma JAS, Vasconcelos PF da C. The innate immune response in Zika virus infection. *Rev Med Virol* 2021;31(2):e2166. doi:10.1002/rmv.2166
78. Chen S, Wu Z, Wang M, Cheng A. Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. *Viruses*. 2017;9(10): 291. doi:10.3390/v9100291
79. Modhiran N, Watterson D, Blumenthal A, Baxter AG, Young PR, Stacey KJ. Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunol Cell Biol*. 2017;95(5): 491–495. doi:10.1038/icb.2017.5
80. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J*. 2016;13: 131. doi:10.1186/s12985-016-0590-7
81. Nie Y, Deng D, Mou L, Long Q, Chen J, Wu J. Dengue Virus 2 NS2B Targets MAVS and IKKε to Evade the Antiviral Innate Immune Response. *J Microbiol Biotechnol*. 2023;33(5): 600–606. doi:10.4014/jmb.2210.10006
82. Ma J, Ketkar H, Geng T, Lo E, Wang L, Xi J, et al. Zika virus non-structural protein 4A blocks the RLR-MAVS signaling. *Front Microbiol*. 2018;9:1350. doi:10.3389/fmicb.2018.01350

83. Li Q, Zhou D, Jia F, Zhang L, Ashraf U, Li Y, et al. Japanese Encephalitis Virus NS1' Protein Interacts with Host CDK1 Protein to Regulate Antiviral Response. *Microbiol Spectr.* 2021;9(3):e0166121. doi:10.1128/spectrum.01661-21
84. Xia H, Luo H, Shan C, Muruato AE, Nunes BT, Medeiros DBA, et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat Commun.* 2018;9(1): 414. doi:10.1038/s41467-017-02816-2
85. Ngan NTT, Kim SJ, Lee JY, Myoung J. Zika virus proteins NS2A and NS4A are major antagonists that reduce IFN- β promoter activity induced by the MDA5/RIG-I signaling pathway. *J Microbiol Biotechnol.* 2019;29(10): 1665–1674. doi:10.4014/jmb.1909.09017
86. Zhao Z, Tao M, Han W, Fan Z, Imran M, Cao S, et al. Nuclear localization of Zika virus NS5 contributes to suppression of type I interferon production and response. *J Gen Virol.* 2019;102(3):001376. doi:10.1099/JGV.0.001376
87. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe.* 2016;19(6): 882–890. doi:10.1016/j.chom.2016.05.009
88. Kumar A, Hou S, Airo AM, Limonta D, Mancinelli V, Branton W, et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep.* 2016;17(12): 1766–1775. doi:10.15252/embr.201642627
89. Fanunza E, Grandi N, Quartu M, Carletti F, Ermellino L, Milia J, et al. INMI1 Zika virus NS4B antagonizes the interferon signaling by suppressing STAT1 phosphorylation. *Viruses.* 2021;13(12):2448. doi:10.3390/v13122448
90. Mellors J, Tipton T, Longet S, Carroll M. Viral Evasion of the Complement System and Its Importance for Vaccines and Therapeutics. *Front Immunol.* 2020;11:1450. doi:10.3389/fimmu.2020.01450
91. Conde JN, Silva EM, Barbosa AS, Mohana-Borges R. The Complement System in Flavivirus Infections. *Front Microbiol.* 2017;8:213. doi:10.3389/fmicb.2017.00213
92. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* 2014;22(3): 138–146. doi:10.1016/j.tim.2013.12.011
93. Patterson J, Sammon M, Garg M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med.* 2016;17(6): 671–679. doi:10.5811/westjem.2016.9.30904
94. Silva NM, Santos NC, Martins IC. Dengue and Zika Viruses: Epidemiological History, Potential Therapies, and Promising Vaccines. *Trop Med Infect Dis.* 2020;5(4): 150. doi:10.3390/tropicalmed5040150
95. Salam AP, Horby P. Isolation of viable Zika virus from spermatozoa. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(2): 144. doi:10.1016/S1473-3099(18)30020-3
96. Mead PS, Duggal NK, Hook SA, Delorey M, Fischer M, Olzenak McGuire D, et al. Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *N Engl J Med.* 2018;378(15): 1377–1385.

doi:10.1056/NEJMoa1711038

97. Da Cruz TE, Souza RP, Pelloso SM, Morelli F, Suehiro TT, Damke E, et al. Case report: Prolonged detection of zika virus RNA in vaginal and endocervical samples from a Brazilian woman, 2018. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;100(1): 183–186. doi:10.4269/ajtmh.18-0623
98. Reyes Y, Bowman NM, Becker-Dreps S, Centeno E, Collins MH, Liou GJA, et al. Prolonged shedding of zika virus RNA in vaginal secretions, Nicaragua. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(4): 808–810. doi:10.3201/eid2504.180977
99. Hills SL, Russell K, Hennessey M, Williams C, Oster AM, Fischer M, et al. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission — Continental United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(8): 215–216. doi:10.15585/mmwr.mm6508e2
100. Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(28): 716–717. doi:10.15585/mmwr.mm6528e2
101. Vogt MB, McDonald EM, Delorey M, Mead PS, Hook SA, Hinckley AF, et al. Association Between Prolonged Shedding of Zika Virus in Human Semen and Male Reproductive Tract Inflammation. *J Infect Dis.* 2022;226(7): 1140–1150. doi:10.1093/infdis/jiac329
102. Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *The Lancet.* 2016;387(10023): 1051. doi:10.1016/S0140-6736(16)00624-3
103. Desgraupes S, Hubert M, Gessain A, Ceccaldi PE, Vidy A. Mother-to-child transmission of arboviruses during breastfeeding: From epidemiology to cellular mechanisms. *Viruses.* 2021;13(7):1312 doi:10.3390/v13071312
104. Venturi G, Fortuna C, Alves RM, Passos do Prado Paschoal AG, da Silva Júnior PJ, Remoli ME, et al. Epidemiological and clinical suspicion of congenital Zika virus infection: Serological findings in mothers and children from Brazil. *J Med Virol.* 2019;91(9): 1577–1583. doi:10.1002/jmv.25504
105. Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveill.* 2014;19(3): 20751. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751
106. Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-Artur P, Eyrolle-Guignot D, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *The Lancet.* 2016;387(10033): 2125–2132. doi:10.1016/S0140-6736(16)00651-6
107. Pomar L, Malinger G, Benoist G, Carles G, Ville Y, Rousset D, et al. Association between Zika virus and fetopathy: a prospective cohort study in French Guiana. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017;49(6): 729–736. doi:10.1002/uog.17404
108. Morris G, Barichello T, Stubbs B, Köhler CA, Carvalho AF, Maes M. Zika Virus as an

- Emerging Neuropathogen: Mechanisms of Neurovirulence and Neuro-Immune Interactions. *Mol Neurobiol.* 2017;55(5): 4160–4184. doi:10.1007/s12035-017-0635-y
109. Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JVC, Diallo M, et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(1): e2636. doi:10.1371/journal.pntd.0002636
110. Jouannic J-M, Friszer S, Leparç-Goffart I, Garel C, Eyrolle-Guignot D. Zika virus infection in French Polynesia. *The Lancet.* 2016;387(10023): 1051–1052. doi:10.1016/S0140-6736(16)00625-5
111. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360(24): 2536–2543. doi:10.1056/NEJMoa0805715
112. Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature.* 2017;546(7658): 411–415. doi:10.1038/nature22402
113. Faria NR, Azevedo R do S da S, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science.* 2016;352(6283): 345–349. doi:10.1126/science.aaf5036
114. Thézé J, Li T, du Plessis L, Bouquet J, Kraemer MUG, Somasekar S, et al. Genomic Epidemiology Reconstructs the Introduction and Spread of Zika Virus in Central America and Mexico. *Cell Host Microbe.* 2018;23(6): 855-864.e7. doi:10.1016/j.chom.2018.04.017
115. Faria NR, Quick J, Claro IM, Thézé J, de Jesus JG, Giovanetti M, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature.* 2017;546(7658): 406–410. doi:10.1038/nature22401
116. Pan American Health Organization, World Health Organization. Epidemiological Alert Zika virus infection. 2015 May. Available: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/34232>
117. Tellechea AL, Luppó V, Morales MA, Groisman B, Baricalla A, Fabbri C, et al. Surveillance of microcephaly and selected brain anomalies in Argentina: Relationship with Zika virus and other congenital infections. *Birth Defects Res.* 2018;110(12): 1016–1026. doi:10.1002/bdr2.1347
118. Hernández-Ávila JE, Palacio-Mejía LS, López-Gatell H, Alpuche-Aranda CM, Molina-Vélez D, González-González L, et al. Zika virus infection estimates, Mexico. *Bull World Health Organ.* 2018;96(5): 306–313. doi:10.2471/BLT.17.201004
119. Pan American Health Organization. Casos de la Enfermedad del Virus del Zika. In: Plataforma de Información en Salud de las Américas (PLISA). Datos reportados por los Ministerios e Institutos de Salud de los países y territorios de la Región. [Internet]. 2020. Available: <https://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-zika.html>
120. Abtibol-Bernardino MR, Peixoto L de FA de A, Castilho M da C, Bôtto-Menezes CHA, Benzecry SG, Otani RH, et al. Would Zika virus Infection in Pregnancy Be a Sentence of Poor

Neurological Prognosis for Exposed Children? Neurodevelopmental Outcomes in a Cohort from Brazilian Amazon. *Viruses*. 2022;14(12): 2659. doi:10.3390/v14122659

121. Peixoto L de FA de A, Abtibol-Bernardino MR, Guerra CVC, de Oliveira GA, Chaves BCS, de Souza Rodrigues C, et al. Growth Velocity and Nutritional Status in Children Exposed to Zika Virus during Pregnancy from Amazonas Cohort, Brazil. *Viruses*. 2023;15(3): 662. doi:10.3390/v15030662

122. de Souza LCMR, Ribeiro CTM, Hamanaka T, Ribeiro LC, de Souza NCO, Pone SM, et al. Characterizing Disabilities in Preschool Aged Children with Congenital Zika Virus Syndrome with the ICF Model. *Viruses*. 2022;14(10): 2108. doi:10.3390/v14102108

123. Sobral da Silva P, Eickmann S, Ximenes R, Martelli C, Brickley E, C. Lima M, et al. Neurodevelopment in Children Exposed to Zika Virus: What Are the Consequences for Children Who Do Not Present with Microcephaly at Birth? *Viruses*. 2021;13(8): 1427. doi:10.3390/v13081427

124. Hunsberger S, Ortega-Villa AM, Powers JH, Rincón León HA, Sosa SC, Ruiz Hernández E, et al. Patterns of signs, symptoms and laboratory values associated with Zika, dengue and undefined acute illnesses in a dengue endemic region: secondary analysis of a prospective cohort study in southern México. *Int J Infect Dis*. 2020;98:241-249. doi:10.1016/j.ijid.2020.06.071

125. Xu X, Vaughan K, Weiskopf D, Grifoni A, Diamond MS, Sette A, et al. Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika Virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species. *PLoS Curr*. 2016;8: ecurrents.outbreaks.9aa2e1fb61b0f632f58a098773008c4b. doi:10.1371/currents.outbreaks.9aa2e1fb61b0f632f58a098773008c4b

126. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*. 1997;78(Pt 9): 2279–2284. doi:10.1099/0022-1317-78-9-2279

127. Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, Tellez Y, Saborío SI, Mercado JC, et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(3): 449–456. doi:10.4269/ajtmh.2006.74.449

128. Higuera A, Ramírez JD. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. *Acta Trop*. 2019;190: 99–111. doi:10.1016/j.actatropica.2018.11.010

129. Martínez JD, Cárdenas-de la Garza JA, Cuellar-Barboza A. Going Viral 2019: Zika, Chikungunya and Dengue. *Dermatol Clin*. 2019;37(1): 95–105. doi:10.1016/j.det.2018.07.008

130. World Health Organization, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. Geneva; 2009 [cited 14 Aug 2023]. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>

131. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”, INDRE. Lineamientos para la vigilancia de dengue y otras arbovirosis. Secretaría de Salud. México; 2017. Available: <https://www.gob.mx/salud/documentos/lineamientos-vigentes-red->

nacional-de-laboratorios-de-salud-publica

132. Rathore APS, Farouk FS, St. John AL. Risk factors and biomarkers of severe dengue. *Curr Opin Virol.* 2020;43: 1–8. doi:10.1016/j.coviro.2020.06.008
133. OhAinle M, Balmaseda A, Macalalad AR, Tellez Y, Zody MC, Saborío S, et al. Dynamics of Dengue Disease Severity Determined by the Interplay Between Viral Genetics and Serotype-Specific Immunity. *Sci Transl Med.* 2011;3: 114ra128-114ra128. doi:10.1126/scitranslmed.3003084
134. Katzelnick LC, Zambrana JV, Elizondo D, Collado D, Garcia N, Arguello S, et al. Dengue and Zika virus infections in children elicit cross-reactive protective and enhancing antibodies that persist long term. *Sci Transl Med.* 2021 Oct 6;13(614):eabg9478. doi: 10.1126/scitranslmed.abg9478
135. Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science.* 2017;358(6365): 929–932. doi:10.1126/science.aan6836
136. Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Determination of antibody concentration as the main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells. *Arch Virol.* 2014;159(1): 103–116. doi:10.1007/s00705-013-1787-3
137. Singla M, Kar M, Sethi T, Kabra SK, Lodha R, Chandele A, et al. Immune Response to Dengue Virus Infection in Pediatric Patients in New Delhi, India—Association of Viremia, Inflammatory Mediators and Monocytes with Disease Severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3): e0004497. doi:10.1371/journal.pntd.0004497
138. Waggoner JJ, Katzelnick LC, Burger-Calderon R, Gallini J, Moore RH, Kuan G, et al. Antibody-Dependent Enhancement of Severe Disease Is Mediated by Serum Viral Load in Pediatric Dengue Virus Infections. *J Infect Dis.* 2020;221: 1846–1854. doi:10.1093/infdis/jiz618
139. Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 2): 365–375. doi:10.1099/vir.0.82537-0
140. Hung NT, Lei H-Y, Lan NT, Lin Y-S, Huang K-J, Lien LB, et al. Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: A Study of Clinical and Cytokine Profiles. *J Infect Dis.* 2004;189(2): 221–232. doi:10.1086/380762
141. Lin Y-W, Wang K-J, Lei H-Y, Lin Y-S, Yeh T-M, Liu H-S, et al. Virus Replication and Cytokine Production in Dengue Virus-Infected Human B Lymphocytes. *J Virol.* 2002;76(23): 12242–12249. doi:10.1128/JVI.76.23.12242-12249.2002
142. Puerta-Guardo H, Raya-Sandino A, Gonzalez-Mariscal L, Rosales VH, Ayala-Davila J, Chavez-Mungia B, et al. The Cytokine Response of U937-Derived Macrophages Infected through Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Disrupts Cell Apical-Junction Complexes and Increases Vascular Permeability. *J Virol.* 2013;87(3): 7486–7501.

doi:10.1128/JVI.00085-13

143. World Health Organization. Dengue and Severe Dengue. 17 Mar 2023 [cited 15 Aug 2023]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
144. World Mosquito Program. Dengue. 2023 [cited 15 Aug 2023]. Available: <https://www.worldmosquitoprogram.org/en/learn/mosquito-borne-diseases/dengue>
145. Frank SA. Immunology and Evolution of Infectious Disease. Chapter 4: Specificity and Cross - Reactivity. 2002.
146. Rogers TF, Goodwin EC, Briney B, Sok D, Beutler N, Strubel A, et al. Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. *Sci Immunol*. 2017;2(14):eaan6809. doi:10.1126/sciimmunol.aan6809
147. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016;353(6301): 823–826. doi:10.1126/science.aaf8505
148. Andrade P, Gimblet-Ochieng C, Modirian F, Collins M, Cárdenas M, Katzelnick LC, et al. Impact of pre-existing dengue immunity on human antibody and memory B cell responses to Zika. *Nat Commun*. 2019;10(1): 938. doi:10.1038/s41467-019-08845-3
149. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol*. 2016;17(9): 1102–1108. doi:10.1038/ni.3515
150. Larocca RA, Abbink P, Ventura JD, Chandrashekar A, Mercado N, Li Z, et al. Impact of prior Dengue immunity on Zika vaccine protection in rhesus macaques and mice. *PLoS Pathog*. 2021;17(6): e1009673. doi:10.1371/journal.ppat.1009673
151. Terzian ACB, Schanoski AS, Mota MT de O, da Silva RA, Estofolete CF, Colombo TE, et al. Viral Load and Cytokine Response Profile Does Not Support Antibody-Dependent Enhancement in Dengue-Primed Zika Virus–Infected Patients. *Clin Infect Dis*. 2017;65(8): 1260–1265. doi:10.1093/cid/cix558
152. Santiago GA, Sharp TM, Rosenberg E, Sosa Cardona II, Alvarado L, Paz-Bailey G, et al. Prior Dengue Virus Infection Is Associated With Increased Viral Load in Patients Infected With Dengue but Not Zika Virus. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(7):ofz320. doi:10.1093/ofid/ofz320
153. Halai UA, Nielsen-Saines K, Moreira ML, De Sequeira PC, Pereira JP, De Araujo Zin A, et al. Maternal Zika virus disease severity, virus load, prior dengue antibodies, and their relationship to birth outcomes. *Clin Infect Dis*. 2017;65(6): 877–883. doi:10.1093/cid/cix472
154. Gordon A, Gresh L, Ojeda S, Katzelnick LC, Sanchez N, Mercado JC, et al. Prior dengue virus infection and risk of Zika: A pediatric cohort in Nicaragua. *PLoS Med*. 2019;16(1): e1002726. doi:10.1371/journal.pmed.1002726
155. Grifoni A, Pham J, Sidney J, O’Rourke PH, Paul S, Peters B, et al. Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. *J Virol*. 2017;91(24): e01469–17. doi:10.1128/JVI.01469-17

156. Valiant WG, Lalani T, Yun HC, Kunz A, Burgess TH, Mattapallil JJ. Human Serum With High Neutralizing Antibody Titers Against Both Zika and Dengue Virus Shows Delayed In Vitro Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5(10):Ofy151. doi:10.1093/ofid/ofy151
157. George J, Valiant WG, Mattapallil MJ, Walker M, Huang Y-JS, Vanlandingham DL, et al. Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques. *Sci Rep.* 2017;7(1): 10498. doi:10.1038/s41598-017-10901-1
158. Pan American Health Organization. *Dengue: guidelines for patient care in the Region of the Americas.* 2. ed. PAHO, editor. Washington, DC; 2016. Available: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/31207>
159. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8): 1232–1239. doi:10.3201/eid1408.080287
160. CDC. Updated Guidance for US Laboratories Testing for Zika Virus Infection. 2017 [cited 14 Aug 2023]. Available: <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/laboratory-guidance-zika.pdf>
161. Pan American Health Organization. Reported Cases of Dengue Fever in The Americas. 2023 [cited 17 Jul 2023]. Available: <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>
162. Priyamvada L, Cho A, Onlamoon N, Zheng N-Y, Huang M, Kovalenkov Y, et al. B Cell Responses during Secondary Dengue Virus Infection Are Dominated by Highly Cross-Reactive, Memory-Derived Plasmablasts. *J Virol.* 2016;90(12): 5574–5585. doi:10.1128/JVI.03203-15
163. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Ac Sci USA.* 2016;113(28): 7852–7857. doi:10.1073/pnas.1607931113
164. Kikuti M, Tauro LB, Moreira PSS, Campos GS, Paploski IAD, Weaver SC, et al. Diagnostic performance of commercial IgM and IgG enzyme-linked immunoassays (ELISAs) for diagnosis of Zika virus infection. *Virol J.* 2018;15(1): 108. doi:10.1186/s12985-018-1015-6
165. Morales I, Rosenberger KD, Magalhaes T, Morais CNL, Braga C, Marques ETA, et al. Diagnostic performance of anti-Zika virus IgM, IgAM and IgG ELISAs during co-circulation of Zika, dengue, and chikungunya viruses in Brazil and Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(4): e0009336. doi:10.1371/journal.pntd.0009336
166. Felix AC, Souza NCS, Figueiredo WM, Costa AA, Inenami M, da Silva RMG, et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J Med Virol.* 2017;89(8): 1477–1479. doi:10.1002/jmv.24789
167. Needham JW, Raychaudhuri S. Immunoassay methods and compositions for detecting infection involving use of test antigens as cross-reactive control antigens. USA; WO 2018/026845 A1, 2018.
168. Basile AJ, Ao J, Horiuchi K, Semenova V, Steward-Clark E, Schiffer J. Performance of InBios

- ZIKV Detect™ 2.0 IgM Capture ELISA in two reference laboratories compared to the original ZIKV Detect™ IgM Capture ELISA. *J Virol Methods*. 2019;271: 113671. doi:10.1016/j.jviromet.2019.05.011
169. Nascimento EJM, Bonaparte MI, Luo P, Vincent TS, Hu B, George JK, et al. Use of a blockade-of-binding ELISA and microneutralization assay to evaluate Zika virus serostatus in dengue-endemic areas. *Am J Trop Me Hyg*. 2019;101(3): 708–715. doi:10.4269/ajtmh.19-0270
170. Kerkhof K, Falconi-Agapito F, Van Esbroeck M, Talledo M, Ariën KK. Reliable Serological Diagnostic Tests for Arboviruses: Feasible or Utopia? *Trends Microbiol*. 2020;28(4): 276–292. doi:10.1016/j.tim.2019.11.005
171. Farinelli EC, Baquero OS, Stephan C, Chiaravalloti-Neto F. Low socioeconomic condition and the risk of dengue fever: A direct relationship. *Acta Trop*. 2018;180: 47–57. doi:10.1016/j.actatropica.2018.01.005
172. Abebe GM. Emerging and Re-Emerging Viral Diseases: The Case of Coronavirus Disease-19 (COVID-19). *International Journal of Virology and AIDS*. 2020;7. doi:10.23937/2469-567X/1510067
173. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez.” Lineamientos para la Toma, Manejo y Envío de Muestras para Diagnóstico a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública. México; 2019. Available: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/487550/LTMEM_RNLSP_4T.pdf
174. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2019-2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO Geneva; 2019. Available: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149288/1/WHO_HSE_GCR_2015.2_eng.pdf?ua=1&ua=1.
175. Condorelli F, Scalia G, Stivala A, Gallo R, Marino A, Battaglini CM, et al. Detection of immunoglobulin G to measles virus, rubella virus, and mumps virus in serum samples and in microquantities of whole blood dried on filter paper. *J Virol Methods*. 1994;49: 25–36. doi:10.1016/0166-0934(94)90052-3
176. Desbois D, Roque-Afonso AM, Lebraud P, Dussaix E. Use of dried serum spots for serological and molecular detection of hepatitis A virus. *J Clin Microbiol*. 2009;47: 1536–1542. doi:10.1128/JCM.02191-08
177. Balmaseda A, Saborio S, Tellez Y, Mercado JC, Pérez L, Hammond SN, et al. Evaluation of immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for dengue diagnosis and epidemiological studies. *Journal of Clinical Virology*. 2008;43: 287–291. doi:10.1016/j.jcv.2008.07.016
178. Köster PC, Bailo B, Dashti A, Hernández-Castro C, Calero-Bernal R, Ponce-Gordo F, et al. Long-term preservation and storage of faecal samples in whatman® cards for pcr detection and genotyping of giardia duodenalis and cryptosporidium hominis. *Animals*. 2021;11. doi:10.3390/ani11051369

179. Hegazy MM, Hegazy MK, Azab MS, Nabih N. Validation of dried blood spots in monitoring toxoplasmosis. *Pathog Glob Health*. 2020;114: 242–250. doi:10.1080/20477724.2020.1765125
180. Whittaker K, Mao YQ, Lin Y, Zhang H, Zhu S, Peck H, et al. Dried blood sample analysis by antibody array across the total testing process. *Sci Rep*. 2021;11: 20549. doi:10.1038/s41598-021-99911-8
181. McAllister G, Shepherd S, Templeton K, Aitken C, Gunson R. Long term stability of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in dried blood spot samples and eluates. *Journal of Clinical Virology*. 2015;71: 10–17. doi:10.1016/j.jcv.2015.07.303
182. World Health Organization. Blood Collection and Handling – Dried Blood Spot (DBS). 2005. Available:
http://www.who.int/diagnostics_laboratory/documents/guidance/pm_module14.pdf
183. Saud B, Thapa B, Shrestha V. Dried Blood Spot for Developing Countries: An Opinion. *Curr Trends Biomed Eng Biosci*. 2018;14: 57–58. doi:10.19080/CTBEB.2018.14.555886
184. Rodriguez-Auad JP, Rojas-Montes O, Maldonado-Rodriguez A, Alvarez-Muñoz MaT, Muñoz O, Torres-Ibarra R, et al. Use of Dried Plasma Spots for HIV-1 Viral Load Determination and Drug Resistance Genotyping in Mexican Patients. *Biomed Res Int*. 2015;2015: 1–9. doi:10.1155/2015/240407
185. Astbury S, Costa Nunes Soares MM, Peprah E, King B, Jardim ACG, Shimizu JF, et al. Nanopore sequencing from extraction-free direct PCR of dried serum spots for portable hepatitis B virus drug-resistance typing. *Journal of Clinical Virology*. 2020;129. doi:10.1016/j.jcv.2020.104483
186. Villar LM, Cruz HM, Deodato RM, Miguel JC, da Silva EF, Flores GL, et al. Usefulness of automated assays for detecting hepatitis B and C markers in dried blood spot samples. *BMC Res Notes*. 2019;12: 523. doi:10.1186/s13104-019-4547-y
187. Yamamoto C, Nagashima S, Isomura M, Ko K, Chuon C, Akita T, et al. Evaluation of the efficiency of dried blood spot-based measurement of hepatitis B and hepatitis C virus seromarkers. *Sci Rep*. 2020;10: 3857. doi:10.1038/s41598-020-60703-1
188. Anders KL, Nguyet NM, Quyen NTH, Ngoc T Van, Tram T Van, Gan TT, et al. An Evaluation of Dried Blood Spots and Oral Swabs as Alternative Specimens for the Diagnosis of Dengue and Screening for Past Dengue Virus Exposure. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87: 165–170. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0713
189. Weisser H, Steinhagen K, Höcker R, Borchardt-Lohölter V, Anvari Ö, Kern PM. Evaluation of dried blood spots as alternative sampling material for serological detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies using established ELISAs. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2021;59: 979–985. doi:10.1515/cclm-2020-1436
190. Baroncelli S, Galluzzo CM, Liotta G, Andreotti M, Jere H, Luhanga R, et al. Dried blood spots for the quantitative evaluation of IgG isotypes and correlation with serum samples in HIV-exposed uninfected (HEU) infants. *J Immunol Methods*. 2021;493: 113019.

doi:10.1016/j.jim.2021.113019

191. Mubarak HS El, Yüksel S, Mustafa OM, Ibrahim SA, Osterhaus ADME, de Swart RL. Surveillance of measles in the Sudan using filter paper blood samples. *J Med Virol.* 2004;73: 624–630. doi:10.1002/jmv.20136

192. Toh ZQ, Higgins RA, Anderson J, Mazarakis N, Do LAH, Rautenbacher K, et al. The use of dried blood spots for the serological evaluation of SARS-CoV-2 antibodies. *J Public Health (Bangkok).* 2021. doi:10.1093/pubmed/fdab011

193. Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet.* 2016;387(10027): 1531–1539. doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6

194. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica 52, 2013. México; 2013. Available: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>

195. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica 52, 2015. México; 2015. Available: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>

196. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica 52, 2016. México; 2016. Available: <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-231750>

197. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica 52, 2017. México; 2017. Available: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>

198. Maldonado-Rodríguez A, Rojas-Montes O, Vazquez-Rosales G, Chavez-Negrete A, Rojas-Uribe M, Posadas-Mondragon A, et al. Serum Dried Samples to Detect Dengue Antibodies: A Field Study. *Biomed Res Int.* 2017;2017: 7215259. doi:10.1155/2017/7215259

199. viprbrc.org. Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) - Coronaviridae - About. 2020 pp. 3209–3226. Available: <http://www.viprbrc.org/>

200. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular. Mol Biol Evol.* 2015;33: 1870–1874.

201. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009;25: 1189–1191. doi:10.1093/bioinformatics/btp033

202. Secretaría de Salud, Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades

- Transmisibles. Panorama Epidemiológico de Dengue. Semana Epidemiológica 27,2020. 2020. Available: <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2020>
203. Madden T. The BLAST Sequence Analysis Tool. McEntyre J, Ostell J, editors. In: The NCBI Handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/book/NBK21097>
204. Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. Trends in Genetics. 2000;16: 276–277. Available: <http://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer>
205. Predicting Antigenic Peptides. In: Immunomedicine Group, Universidad Complutense de Madrid [Internet]. 2002. Available: <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>
206. SVMTriP: a tool to predict linear antigenic epitopes. 2014. Available: <http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/prediction.php>
207. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS Lett. 1990;276: 172–174. doi:10.1016/0014-5793(90)80535-Q
208. Yao B, Zhang L, Liang S, Zhang C. SVMTriP: A Method to Predict Antigenic Epitopes Using Support Vector Machine to Integrate Tri-Peptide Similarity and Propensity. PLoS One. 2012;7(9): e45152. doi:10.1371/journal.pone.0045152
209. Wegmuller S, Schmid S. Recombinant Peptide Production in Microbial Cells. Curr Org Chem. 2014;18(8): 1005–1019. doi:10.2174/138527281808140616160013
210. Goulas T, Cuppari A, Garcia-Castellanos R, Snipas S, Glockshuber R, Arolas JL, et al. The pCri System: A Vector Collection for Recombinant Protein Expression and Purification. PLoS One. 2014;9(11): e112643. doi:10.1371/journal.pone.0112643
211. Mei J V., Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens. J Nutr. 2001;131: 1631S-1636S. doi:10.1093/jn/131.5.1631S
212. Zheng N, Zeng J, Ji QC, Angeles A, Aubry AF, Basdeo S, et al. Bioanalysis of dried saliva spot (DSS) samples using detergent-assisted sample extraction with UHPLC-MS/MS detection. Anal Chim Acta. 2016 Aug 31;934:170-9. doi:10.1016/j.aca.2016.05.057
213. Grüner N, Stambouli O, Ross RS. Dried blood spots--preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. J Vis Exp. 2015 Mar 13;(97):52619. doi:10.3791/52619
214. Díaz FJ, Black WC 4th, Farfán-Ale JA, Loroño-Pino MA, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. Arch Med Res. 2006 Aug;37(6):760-73. doi:10.1016/j.arcmed.2006.02.004
215. Nava-Frías M, Searcy-Pavía RE, Juárez-Contreras CA, Valencia-Bautista A. Chikungunya fever: Current status in México. Bol Med Hosp Infant Mex. 2016;73: 67–74.

doi:10.1016/j.bmhix.2016.03.001

216. Amini F, Auma E, Hsia Y, Bilton S, Hall T, Ramkhelawon L, Heath PT, Le Doare K. Reliability of dried blood spot (DBS) cards in antibody measurement: A systematic review. *PLoS One*. 2021 Mar 15;16(3):e0248218. doi:10.1371/journal.pone.0248218

217. Tran TN, de Vries PJ, Hoang LP, Phan GT, Le HQ, Tran BQ, et al. Enzyme-linked immunoassay for dengue virus IgM and IgG antibodies in serum and filter paper blood. *BMC Infect Dis*. 2006 Jan 25;6:13. doi:10.1186/1471-2334-6-13

218. Falconar AK, de Plata E, Romero-Vivas CM. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Sep;13(9):1044-51. doi:10.1128/CVI.00105-06

219. Sa-Ngasang A, Anantapreecha S, A-Nuegoonpipat A, Chanama S, Wibulwattanakij S, Pattanakul K, et al. Specific IgM and IgG responses in primary and secondary dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Epidemiol Infect*. 2006 Aug;134(4):820-5. doi:10.1017/S0950268805005753

220. Changal KH, Raina AH, Raina A, Raina M, Bashir R, Latief M, et al. Differentiating secondary from primary dengue using IgG to IgM ratio in early dengue: an observational hospital based clinico-serological study from North India. *BMC Infect Dis*. 2016 Nov 28;16(1):715. doi:10.1186/s12879-016-2053-6

221. Chanama S, Anantapreecha S, A-nuegoonpipat A, Sa-gnasang A, Kurane I, Sawanpanyalert P. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *J Clin Virol*. 2004 Nov;31(3):185-9. doi:10.1016/j.jcv.2004.03.005

222. Navarrete-Espinosa J, Antonio Acevedo-Vales J, Huerta-Hernández E, Torres-Barranca J, Guadalupe Gavaldón-Rosas D. Prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira en la población de Jáltipan, Veracruz. *Salud Publica Mex*. 2006;48: 220–228.

223. Amaya-Larios IY, Martínez-Vega RA, Diaz-Quijano FA, Sarti E, Puentes-Rosas E, Chihu L, Ramos-Castañeda J. Risk of dengue virus infection according to serostatus in individuals from dengue endemic areas of Mexico. *Sci Rep*. 2020 Nov 4;10(1):19017. doi:10.1038/s41598-020-75891-z

224. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. *Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica 52, 2011. México; 2011.* Available: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>

225. Fernandes-Matano L, Monroy-Muñoz IE, Pardavé-Alejandro HD, Uribe-Noguez LA, Hernández-Cueto MLA, Rojas-Mendoza T, Santacruz-Tinoco CE, Grajales-Muñiz C, Muñoz-Medina JE. Impact of the introduction of chikungunya and zika viruses on the incidence of dengue in endemic zones of Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Dec 2;15(12):e0009922.

doi:10.1371/journal.pntd.0009922

226. Guerbois M, Fernandez-Salas I, Azar SR, Danis-Lozano R, Alpuche-Aranda CM, Leal G, et al. Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. *Journal of Infectious Diseases*. 2016;214: 1349–1356. doi:10.1093/infdis/jiw302

227. Low SL, Leo YS, Lai YL, Lam S, Tan HH, Wong JCC, Tan LK, Ng LC. Evaluation of eight commercial Zika virus IgM and IgG serology assays for diagnostics and research. *PLoS One*. 2021 Jan 26;16(1):e0244601. doi:10.1371/journal.pone.0244601

228. Hansen, S., Hotop, SK., Faye, O. et al. Diagnosing Zika virus infection against a background of other flaviviruses: Studies in high resolution serological analysis. *Sci Rep* 9, 3648 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40224-2>

229. Martinez Viedma M del P, Panossian S, Gifford K, García K, Figueroa I, Parham L, et al. Evaluation of ELISA-Based Multiplex Peptides for the Detection of Human Serum Antibodies Induced by Zika Virus Infection across Various Countries. *Viruses*. 2021;13: 1319. doi:10.3390/v13071319

230. Sola L, Gagni P, D’Annessa I, Capelli R, Bertino C, Romanato A, et al. Enhancing Antibody Serodiagnosis Using a Controlled Peptide Coimmobilization Strategy. *ACS Infect Dis*. 2018;4: 998–1006. doi:10.1021/acsinfectdis.8b00014

231. Lee H-J, Cho Y, Kang HJ, Choi H, Han KR, Chong CK, et al. Identification of peptide based B-cell epitopes in Zika virus NS1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;505: 1010–1014. doi:10.1016/j.bbrc.2018.10.024

232. Mishra N, Caciula A, Price A, Thakkar R, Ng J, Chauhan LV, Jain K, et al. Diagnosis of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *mBio*. 2018 Mar 6;9(2):e00095-18. doi:10.1128/mBio.00095-18.

233. Lebrun SJ, VanRenterghem B. Performance Characteristics of Colorimetric Protein Microarrays Compared to ELISA. *Assay Drug Dev Technol*. 2006;4: 197–202. doi:10.1089/adt.2006.4.197

234. Mascini M, Dikici E, Robles Mañueco M, Perez-Erviti JA, Deo SK, Compagnone D, et al. Computationally Designed Peptides for Zika Virus Detection: An Incremental Construction Approach. *Biomolecules*. 2019;9: 498. doi:10.3390/biom9090498

235. Yap TL, Hong SY, Soh JH, Ravichandraprabhu L, Lim VWX, Chan HM, et al. Engineered NS1 for Sensitive, Specific Zika Virus Diagnosis from Patient Serology. *Emerg Infect Dis*. 2021 May;27(5):1427-1437. doi: 10.3201/eid2705.190121

236. Tsai WY, Driesse K, Tsai JJ, Hsieh SC, Sznajder Granat R, Jenkins O, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays using virus-like particles containing mutations of conserved residues on envelope protein can distinguish three flavivirus infections. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec;9(1):1722-1732. doi: 10.1080/22221751.2020

237. Matsunaga KI, Kimoto M, Lim VW, Tan HP, Wong YQ, Sun W, Vasoo S, et al. High-affinity

five/six-letter DNA aptamers with superior specificity enabling the detection of dengue NS1 protein variants beyond the serotype identification. *Nucleic Acids Res.* 2021 Nov 18;49(20):11407-11424. doi: 10.1093/nar/gkab515

238. Thevendran R, Rogini S, Leighton G, Mutombwera A, Shigdar S, Tang TH, Citartan M. The Diagnostic Potential of RNA Aptamers against the NS1 Protein of Dengue Virus Serotype 2. *Biology (Basel)*. 2023 May 15;12(5):722. doi: 10.3390/biology12050722

239. Lücke AC, Vom Hemdt A, Wieseler J, Fischer C, Feldmann M, Rothenfusser S, et al. High-Throughput Platform for Detection of Neutralizing Antibodies Using Flavivirus Reporter Replicon Particles. *Viruses*. 2022 Feb 8;14(2):346. doi: 10.3390/v14020346

240. Yamanaka A, Matsuda M, Okabayashi T, Pitaksajakul P, Ramasoota P, Saito K, et al. Seroprevalence of Flavivirus Neutralizing Antibodies in Thailand by High-Throughput Neutralization Assay: Endemic Circulation of Zika Virus before 2012. *mSphere*. 2021 Aug 25;6(4):e0033921. doi: 10.1128/mSphere.00339-21

241. Nunes JGC, Nunes BT, Shan C, Moraes AF, Silva TR, de Mendonça MHR, et al. Reporter Virus Neutralization Test Evaluation for Dengue and Zika Virus Diagnosis in Flavivirus Endemic Area. *Pathogens*. 2021 Jul 3;10(7):840. doi: 10.3390/pathogens10070840

242. Falconi-Agapito F, Kerkhof K, Merino X, Michiels J, Van Esbroeck M, Bartholomeeusen K, et al. Dynamics of the Magnitude, Breadth and Depth of the Antibody Response at Epitope Level Following Dengue Infection. *Front Immunol.* 2021;12: 686691. doi:10.3389/fimmu.2021.686691

Anexo 1: Preparación de DSS

1. Colectar la muestra de sangre.
2. Centrifugar a 1500 g por 15 minutos para separar el suero.
3. Preparar alícuotas de suero de aproximadamente 100 μ l, para congelar.
4. Dispensar 30 μ l de suero en cada uno de los círculos presentes en las tarjetas de papel filtro Whatman Schleicher & Schell #903 (Keene NH, USA) (Fig. 1 Anexo 1).
5. Dejar secar a temperatura ambiente por dos horas o hasta que estén completamente secas, preferentemente en campana de bioseguridad.
6. Marcarlas con la fecha de colecta y preparación, y la clave asignada al sujeto.
7. Guardar en un sobre de papel, y este en una bolsa resellable de plástico, junto con 2-4 paquetes de sílica como desecante.
8. Estas se pueden almacenar a temperatura ambiente o a 4°C hasta 3 meses, pero es más conveniente almacenarlas a -20°C.

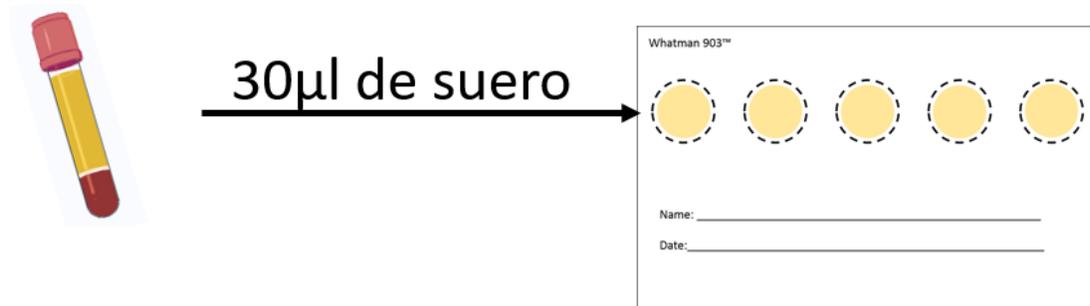


Figura 1 Anexo 1: Diagrama de un papel filtro Whatman Schleicher & Shell #903, que contiene 5 círculos marcados en donde se colocaran los 30 μ l de suero.

Anexo 2: Elución de DSS

1. Cortar un círculo de la tarjeta de papel filtro con tijeras estériles, en pedazos pequeños.
2. Colocar los pedazos en un microtubo de 1.5 ml con 200 μ l de PBS 1x estéril pH 7.4, libre de proteasas y nucleasas (Fig. 1 Anexo 2).
3. Incubar por 1 h a 4°C en un shaker orbital a 1500 rpm.
4. Centrifugar por 30 segundos a 10,000 rpm.
5. Separar el sobrenadante y transferirlo a un microtubo estéril.
6. Se puede usar inmediatamente o almacenarlo a -20°C hasta su uso.

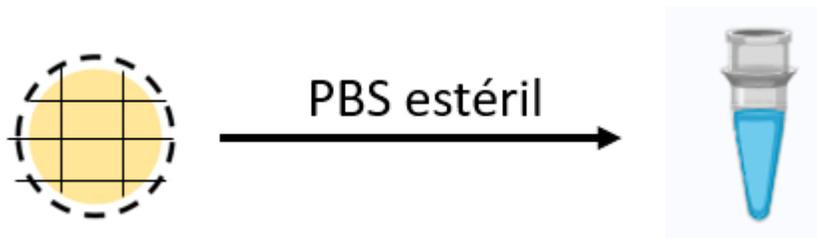


Figura 1 Anexo 2: el círculo de papel filtro debe recortarse en pedazos pequeños y posteriormente eluir en 200 μ l de PBS 1x estéril pH 7.4, libre de proteasas y nucleasas.

Anexo 3: Artículo publicado

Am. J. Trop. Med. Hyg., 00(00), 2023, pp. 1–4
doi:10.4269/ajtmh.22-0742
Copyright © 2023 American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Dried Serum Samples for Antibody Detection in Arthropod-Borne Virus Infections Are an Effective Alternative to Serum Samples

Daniela Würsch,^{1,2} Othon Rojas-Montes,¹ Angélica Maldonado-Rodríguez,¹ Edgar Sevilla-Reyes,³ Ana María Cevallos,⁴ Gilma Sánchez-Burgos,⁵ Adolfo Chávez-Negrete,⁶ and Rosalía Lira^{1*}

¹Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico; ²Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; ³Laboratorio de Transcriptómica e Inmunología Molecular, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México, Mexico; ⁴Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico; ⁵Unidad de Investigación Médica Yucatán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mérida, Mexico; ⁶Educación e Investigación en Salud, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

Abstract. The disease burden of arthropod-borne infections is particularly high in low- and middle-income countries, where the availability of resources for surveillance and testing is limited. The lack of local infrastructure demands that biological samples be sent to central laboratories by refrigerated transport, which increases costs and the risk of sample degradation. Dried blood spot samples are an alternative for ensuring sample integrity during transportation and storage. They can be used for the detection of nucleic acids and proteins, such as antigens or antibodies. Here, we compared anti-chikungunya IgM, anti-dengue IgM, anti-dengue IgG, and anti-Zika IgG detection between paired serum and dried serum samples (DSSs); the agreement between results was found to be 90.6%, 94.1%, 85.9%, and 95.5%, respectively, indicating a strong correlation. Our results suggest that DSSs provide a reliable alternative for detection of specific antibodies in arthropod-borne infections.

INTRODUCTION

During the last decade, many outbreaks of emerging and reemerging viral infections have occurred.^{1,2} Low- and middle-income countries are the most affected because of the lack of local infrastructure, particularly in remote areas, which makes diagnosis and epidemiological surveillance more complex.³

In tropical and subtropical regions, the majority of viral outbreaks are caused by arthropod-borne viruses such as dengue (DENV), Zika (ZIKV), and chikungunya (CHIKV) viruses. In the Americas, more than 3 million cases of DENV have been reported since 2019, with approximately 10,000 cases of severe dengue.⁴ The emergence of CHIKV, which causes severe and long-lasting arthralgias, and ZIKV, which can cause Guillain-Barre syndrome in adults and microcephaly in newborns, has demonstrated the need for urgent trustworthy diagnosis and clinical research.^{5,6}

Dried serum samples (DSSs) and dried blood spots (DBSs) are drops of bodily fluids blotted and dried on filter paper. Both DBSs and DSSs have been used for many serological tests, including the detection of viral nucleic acids^{7,8} and proteins such as antigens^{9,10} or antibodies.^{7–11} Dried blood spot samples have been found to be stable at room temperature (RT) and at 4°C for 4 to 12 weeks^{12,13} and at ≤ 4°C for up to 200 days¹⁴ without sample degradation, decreasing costs of sample handling and cold-chain transportation, especially in low-resource countries.¹⁵

Antibody detection is widely used not only for diagnosis but also for epidemiological research when seroprevalence or previous exposure can be studied.^{8,16} In this work, we compared the detection of anti-CHIKV, anti-DENV, and anti-

ZIKV antibodies with ELISA commercial tests using DSS and serum paired samples collected in 2015 and 2016, as we previously reported for DENV IgG antibodies.¹⁷ Our results demonstrate that the use of DSSs is an effective alternative for the detection of anti-arboviral antibodies compared with serum, the recommended gold standard sample.

MATERIALS AND METHODS

We analyzed DSS and serum paired samples from 128 patients with a clinical suspicion of arthropod-borne viral infection, collected in October 2015 in Veracruz, México, during an arboviral outbreak originally suspected to be DENV and later proven to be the first CHIKV outbreak in México.¹⁸ Anti-CHIKV IgM, anti-DENV IgM, and anti-DENV IgG were determined in these samples (Figure 1A and Supplemental Table 1). In addition, we tested 22 serum samples collected during a ZIKV outbreak in March 2016 by the research group of E. S.-R. in Santa María Mixtequilla, Oaxaca. These 22 samples were used for DSS preparation and anti-ZIKV IgG detection in DSS and serum paired samples (Figure 1B). All samples were collected according to the Ethics Committee and the Institutional Review Board of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (R-2011-785-051) and the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas in Mexico City (C16-16).

Serum samples collected during 2015 in Veracruz were used for DSS preparation at the site.¹⁷ Briefly, 30 µL of serum was spotted onto each circle of filter paper cards (Schleicher & Schell #903, Keene, NH) and dried for 2 hours at RT, then stored in a paper envelope inside a resealable plastic bag with silica desiccant.²⁰ Samples were sent to Mexico City in a cold chain for serum or at RT for DSS. Serum samples were stored at –70°C, and DSSs were stored at –20°C. Similarly, serum samples from the ZIKV outbreak in 2016 were originally sent to Mexico City under refrigeration, but later serum samples were stored at –70°C, and then DSSs were prepared and stored at –20°C until use.

*Address correspondence to Rosalía Lira, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City 06720, Mexico. E-mail: drarosalia@igmail.com

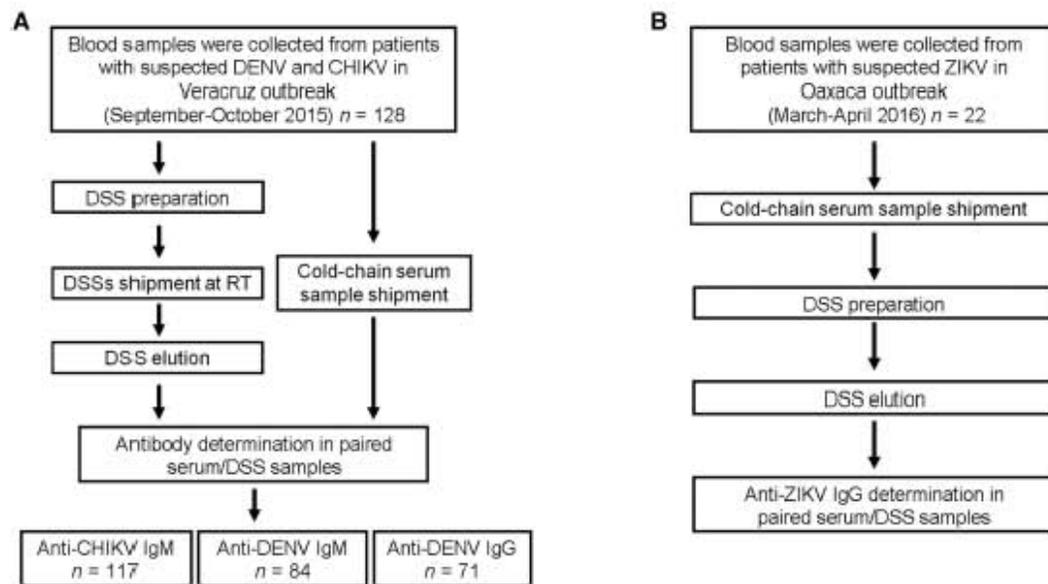


FIGURE 1. Flow chart for sample collection and processing. (A) Samples collected in Veracruz 2015, (B) Samples collected in Oaxaca 2016. It was not possible to do all tests in all samples; therefore, the number of samples performed in each test varied. CHIKV = chikungunya virus; DENV = dengue virus; DSS = dried serum sample; RT = room temperature; ZIKV = Zika virus.

The DSS elution and antibody determination were performed 2 to 6 months after the DSS preparation. Each sample spot was cut into small pieces, then placed into a 1.5-mL tube with 200 μ L of DNase, RNase and protease free 1 \times phosphate-buffered saline (PBS) (Fisher BioReagents, cat# BP24384, Fair Lawn, NJ) and incubated for 1 hour at 4 $^{\circ}$ C in an orbital shaker at 1,500rpm (OS-100; Allsheng Instruments, Hangzhou, China). After centrifugation, the supernatant was transferred into a clean tube and stored at -20 $^{\circ}$ C until use.

IgM and IgG determination was performed using Anti-Chikungunya Virus ELISA (IgM), Anti-Dengue Virus ELISA (IgM), and Anti-Zika Virus ELISA (IgG) (EUROIMMUN, Lübeck, Germany) and DRG Anti-Dengue Virus IgG (DRG International, Inc., Springfield, NJ). For serum samples the assays were performed according to the manufacturer's instructions, and for DSS the assay was modified as follows: 40 μ L of eluted DSS was diluted in 960 μ L of buffer sample (1:25 dilution factor), and 100 μ L of this dilution was used for each test.¹⁷ The rest of the assay was performed according to the manufacturer's instructions, and results were expressed as recommended by the manufacturers.

Data analyses were performed with the GraphPad Prism 7 package (GraphPad Software, La Jolla, CA). Linear correlation coefficients were obtained using Pearson's simple linear regression. Dried serum sample results were classified as true positive, false positive, true negative, or false negative, taking the serum sample result as the gold standard. Sensitivity and specificity were calculated.¹⁹

RESULTS

For the serum samples collected from patients with a suspicion of arboviral infection in Veracruz, anti-CHIKV IgM determination was performed in 117 DSS and serum paired samples; 40% (47/117) were positive for anti-CHIKV IgM, whereas 7% (6/84) were positive for anti-DENV IgM. Our

data confirmed the outbreak of CHIKV in this area. We were unable to test 11 samples because of a lack of adequate sample volume. We found result agreement in 106 paired samples (90.6%), 37 positive and 69 negative paired samples. Of the 11 discordant samples (9.4%), 8 samples were positive in serum but negative in DSS, 2 samples were positive in serum but indeterminate in DSS, and 1 sample was indeterminate in serum but negative in DSS. There was a statistically significant correlation between the ratio values from DSS and serum paired samples ($R^2 = 0.804$ and $P < 0.0001$) (Figure 2A). The sensitivity was 82.5%, and the specificity was 100% (no false positives identified) (Table 1).

For anti-DENV IgM determination, we excluded 44 samples because of inadequate serum sample volume and tested 84 paired samples; we found agreement in 79 paired samples (94.1%): 1 positive and 78 negative paired samples. Among the five discordant samples (5.9%), four positive serum samples were negative in DSSs and one was indeterminate in DSSs. The linear regression between the ratio values from paired samples had an R^2 value of 0.525 and $P < 0.0001$ (Figure 2B). The calculated sensitivity and specificity of DSSs compared with those of serum samples were 54.5% and 100% respectively (Table 1).

For anti-DENV IgG determination, we tested 71 DSSs and paired serum samples (we excluded 57 samples because of inadequate serum sample volume). We found result agreement in 61 paired samples (85.9%): 42 positive and 19 negative paired samples. Of the 10 discordant samples (14.1%), 4 samples were positive in serum but negative in DSSs, 4 samples were positive in serum but indeterminate in DSSs, and 2 indeterminate serum samples were negative in DSSs. There was a statistically significant correlation between the DRG units from paired samples ($R^2 = 0.657$ and $P < 0.0001$) (Figure 2C). The sensitivity of the DSS assay was 86.2%, and the specificity was 100%.

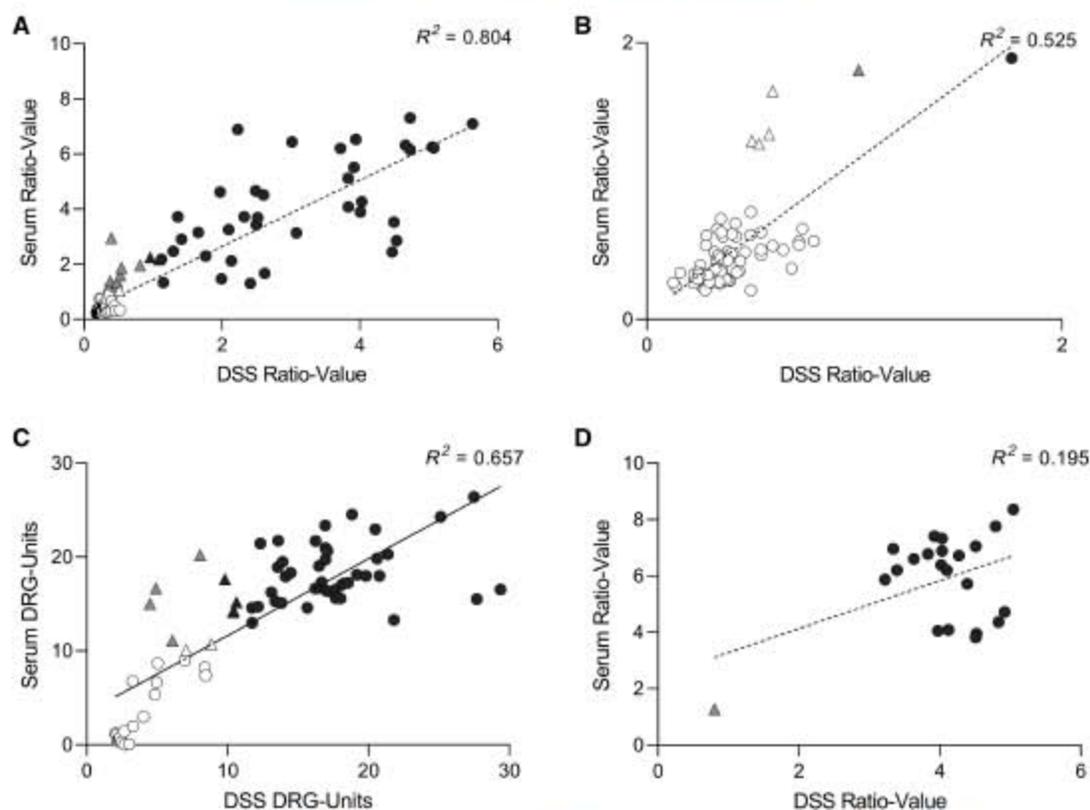


FIGURE 2. Linear regression of (A) anti-CHIKV IgM determination in 117 DSS and serum paired samples, (B) anti-DENV IgM determination in 84 DSS and serum paired samples, (C) anti-DENV IgG determination in 71 DSS and serum paired samples, and (D) anti-ZIKV IgG determination in 22 DSS and serum paired samples. Black circles are positive results, and white circles are negative results in DSS and serum paired samples. The samples with no agreement are represented as triangles: black triangles represent samples with a positive result in serum but indeterminate in DSS, gray triangles represent samples with a positive result in serum but negative in DSS, and white triangles represent samples with an indeterminate result in serum but negative in DSS. CHIKV = chikungunya virus; DENV = dengue virus; DSS = dried serum sample; ZIKV = Zika virus.

A total of 22 DSS and serum paired samples collected in Oaxaca were tested for anti-ZIKV IgG determination. We found result agreement in 21 paired samples (95.5%), all with a positive result. Only one paired sample was discordant, being positive in serum but negative in DSSs. The correlation between the ratio values from DSSs and serum paired samples was $R^2 = 0.195$ and $P = 0.039$ (Figure 2D). The sensitivity was 95.7%, and the specificity was not determined because this set of samples was all anti-ZIKV IgG positive.

DISCUSSION

When biological samples are transported and stored, it is imperative to ensure that they do not degrade during delivery, storage, and processing. Dried samples have been

proposed as a reliable and inexpensive alternative to the cold chain for the safe transport of biological samples. We previously reported the effective use of DSSs for anti-DENV IgG detection.¹⁷ In this study, we analyzed whether the same protocol could be used for CHIKV and ZIKV and confirmed its utility for DENV antibody detections.

The resulting agreement between DSSs and paired serum samples was higher than 85% for anti-CHIKV IgM, anti-DENV IgM and IgG, and anti-ZIKV IgG determinations. In addition, the specificity for all tests was 100%, emphasizing the lack of false-positive results by using the present protocol for DSS preparation, storage, elution, and testing. The false-negative results in DENV IgM DSSs, may be due to the fact that IgM levels are usually lower in patients with secondary DENV infections,²⁰ and similar results have been reported for anti-DENV IgM and IgG determination in

TABLE 1
Summary of anti-CHIKV IgM and anti-DENV IgG results in DSS and serum samples

Antibody	Serum determination			DSS determination		
	Positive	Indeterminate	Negative	Positive	Indeterminate	Negative
Anti-CHIKV IgM	47/117	1/117	69/117	37/117	2/117	78/117
Anti-DENV IgM	6/84	0/84	78/84	1/84	1/84	82/84
Anti-DENV IgG	50/71	2/71	19/71	42/71	4/71	25/71

CHIKV = chikungunya virus; DENV = dengue virus; DSS = dried serum sample.

DBSs.²¹ We suggest that decreasing the DSS dilution factor in these false-negative samples might improve IgM detection in DSSs.

Anti-DENV IgG determination in DSSs had a sensitivity of 85.9% compared with that of serum samples, and these results are consistent with our previous findings.¹⁷ In another study published by Anders et al.⁸ in 2012, a sensitivity of 91.1% was obtained with comparison of anti-DENV IgG detection in DBSs and serum samples. Anti-ZIKV IgG identified agreement in 21 paired samples, with only one discordant result. The sample size was small, and this result should therefore be confirmed with more tests. In addition, the possibility that false negatives are likely when there are low levels of antibodies in DSSs should be considered. Because of the known cross-reactivity between DENV and ZIKV antigens, ideally subjects with no previous exposure to DENV or ZIKV should be included.

The results of this work suggest that antibody detection in DSSs is an effective method for seroprevalence or epidemiologic studies of arboviral infections.

Received December 1, 2022. Accepted for publication July 17, 2023.

Note: Supplemental table appears at www.ajtmh.org.

Acknowledgments: D. W. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and has received CONACYT fellowship 532889. We thank Edith Guillen Salomon for support during sample collection in Veracruz.

Financial support: This work was supported by a grant from Fondo de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social FIS/IMSS/PROT/G12/1104.

Authors' addresses: Daniela Würsch, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico, and Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, E-mail: dwurschmolina@gmail.com. Othon Rojas-Montes, Angélica Maldonado-Rodríguez, and Rosalía Lira, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico, E-mails: othonrojas@yahoo.com, mangimr@yahoo.com.mx, and drrosalialira@gmail.com. Edgar Sevilla-Reyes, Laboratorio de Transcriptómica e Inmunología Molecular, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México, Mexico, E-mail: edgar.sevilla@gmail.com. Ana María Cevallos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico, E-mail: amcevallos@biomedicas.unam.mx. Gilma Sánchez-Burgos, Unidad de Investigación Médica Yucatán, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mérida, Mexico, E-mail: gilmaburgos@gmail.com. Adolfo Chávez-Negrete, Educación e Investigación en Salud, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico, E-mail: achavezni@gmail.com.

REFERENCES

- Abebe GM, 2020. Emerging and re-emerging viral diseases: the case of coronavirus disease-19 (COVID-19). *Int J Virol AIDS* 7: 067.
- Pierson TC, Diamond MS, 2020. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol* 5: 796–812.
- Farinelli EC, Baquero OS, Stephan C, Chiaravalloti-Neto F, 2018. Low socioeconomic condition and the risk of dengue fever: a direct relationship. *Acta Trop* 180: 47–57.
- Pan American Health Organization, Plataforma de Información en Salud de las Américas, 2020. *Dengue y Dengue Grave, Casos y Muertes para Subregiones de las Américas*. Available at: <https://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-regional/506-dengue-reg-ano-es.html>. Accessed June 13, 2022.
- Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M, 2018. Zika, chikungunya, and other emerging vector-borne viral diseases. *Annu Rev Med* 69: 395–408.
- Higuera A, Ramírez JD, 2019. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and chikungunya arboviruses: an update. *Acta Trop* 190: 99–111.
- Baroncelli S et al., 2021. Dried blood spots for the quantitative evaluation of IgG isotypes and correlation with serum samples in HIV-exposed uninfected (HEU) infants. *J Immunol Methods* 493: 113019.
- Anders KL et al., 2012. An evaluation of dried blood spots and oral swabs as alternative specimens for the diagnosis of dengue and screening for past dengue virus exposure. *Am J Trop Med Hyg* 87: 165–170.
- Yamamoto C et al., 2020. Evaluation of the efficiency of dried blood spot-based measurement of hepatitis B and hepatitis C virus seromarkers. *Sci Rep* 10: 3857.
- Riddell MA, Leydon JA, Catton MG, Kelly HA, 2002. Detection of measles virus-specific immunoglobulin M in dried venous blood samples by using a commercial enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 40: 5–9.
- Toh ZQ et al., 2021. The use of dried blood spots for the serological evaluation of SARS-CoV-2 antibodies. *J Public Health* 44: e260–e263.
- Hegazy MM, Hegazy MK, Azab MS, Nabih N, 2020. Validation of dried blood spots in monitoring toxoplasmosis. *Pathog Glob Health* 114: 242–250.
- Whittaker K, Mao YQ, Lin Y, Zhang H, Zhu S, Peck H, Huang RP, 2021. Dried blood sample analysis by antibody array across the total testing process. *Sci Rep* 11: 20549.
- McAllister G, Shepherd S, Templeton K, Aitken C, Gunson R, 2015. Long term stability of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in dried blood spot samples and eluates. *J Clin Virol* 71: 10–17.
- Amini F, Auma E, Hsia Y, Bilton S, Hall T, Ramkhalawon L, Heath PT, le Doare K, 2021. Reliability of dried blood spot (DBS) cards in antibody measurement: a systematic review. *PLoS One* 16: e0248218.
- McDade TW et al., 2020. High seroprevalence for SARS-CoV-2 among household members of essential workers detected using a dried blood spot assay. *PLoS One* 15: e0237833.
- Maldonado-Rodríguez A, Rojas-Montes O, Vázquez-Rosales G, Chávez-Negrete A, Rojas-Urbe M, Posadas-Mondragón A, Aguilar-Faisal L, Cevallos AM, Xocostle-Cazares B, Lira R, 2017. Serum dried samples to detect dengue antibodies: a field study. *BioMed Res Int* 2017: 7215259.
- Dirección General de Epidemiología, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2015. *Historico Boletín Epidemiológico, Semana Epidemiológica* 52, 2015. Available at <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>. Accessed March 24, 2023.
- Meyers E et al., 2021. Comparison of dried blood spots and venous blood for the detection of SARS-CoV-2 antibodies in a population of nursing home residents. *Microbiol Spectr* 9: e0017821.
- Chanama S, Anantapreecha S, A-nuegonpipat A, Sa-gnasang A, Kurane I, Sawanpanyalert P, 2004. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *J Clin Virol* 31: 185–189.
- Tran TNT et al., 2006. Enzyme-linked immunoassay for dengue virus IgM and IgG antibodies in serum and filter paper blood. *BMC Infect Dis* 6: 13.

