



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**



**CARRERA QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**“ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA PROGRESIÓN  
DEL BROTE DE CHIKUNGUNYA EN MÉXICO”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

**OMAR MONDRAGÓN FONSECA**

MATRÍCULA:  
308267420

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. EN C. JOSÉ ESTEBAN MUÑOZ MEDINA**

**ASESOR:  
DRA. ROSALINDA ESCALANTE PLIEGO.**

**CIUDAD DE MÉXICO. 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

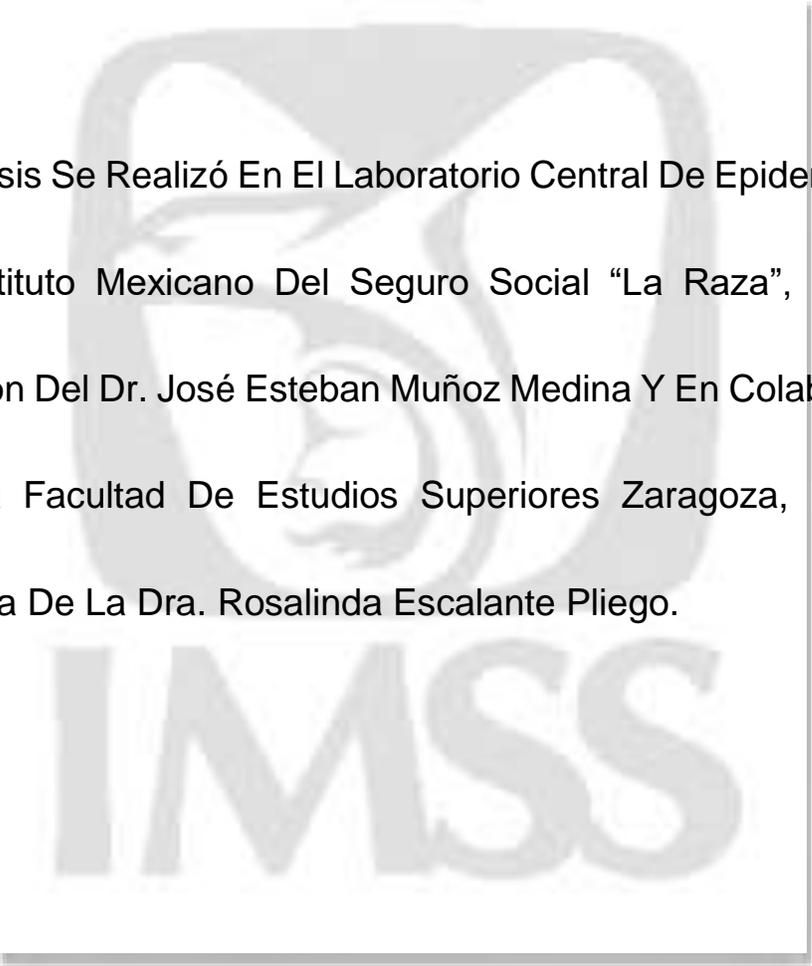


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

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

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

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



Esta Tesis Se Realizó En El Laboratorio Central De Epidemiologia  
Del Instituto Mexicano Del Seguro Social “La Raza”, Bajo La  
Dirección Del Dr. José Esteban Muñoz Medina Y En Colaboración  
Con La Facultad De Estudios Superiores Zaragoza, Bajo La  
Asesoría De La Dra. Rosalinda Escalante Pliego.

## AGRADECIMIENTOS.

- ❖ A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
- ❖ A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
- ❖ AL LABORATORIO CENTRAL DE EPIDEMIOLOGIA DEL IMSS “LA RAZA”

## DEDICATORIA.

A MI DIRECTOR DE TESIS: JOSÉ ESTEBAN MUÑOZ MEDINA.

*Por darme la oportunidad de abrir nuevos horizontes, por sus consejos y su paciencia durante toda mi estancia.*

A MI ASESOR DE TESIS: ROSALINDA ESCALANTE PLIEGO.

*Por su apoyo y consejos durante toda la carrera y en esta parte tan importante como profesionalista.*

### **A MIS SINODALES Y MAESTROS.**

*Por sus enseñanzas, sus consejos y dedicación para lograr  
profesionistas de calidad.*

### **A MIS PADRES Y HERMANOS.**

*Por ser lo más valioso que tengo, por sus valores, su tiempo, su  
apoyo incondicional, sus consejos, sus regaños y todo el esfuerzo  
por lograr salir adelante.*

*Gracias.*

*Papá, Mamá, Ángeles, Manuel, Lourdes, Arturo, Oscar,  
Alejandro, Nancy, Mariana*

### **A MIS AMIGOS**

*Por todos los momentos de risa, desvelos, estrés, locura y por  
hacer más agradables los días de clases.*

*Gracias.*

*Mario, Rodrigo, Elizabeth, Edwin, Ana, Carolina, etc.  
Finalmente, a Alejandra por motivarme y apoyarme a seguir  
día a día.*

## Índice General

Índice de figuras	III
Índice de tablas	IV
<b>1. Introducción.</b>	1
<b>2. Marco teórico</b>	3
2.1. <i>Antecedentes</i>	3
2.2. <i>Cuadro clínico</i>	4
2.3. <i>Estructura Viral</i>	5
2.4. <i>Ciclo de replicación</i>	6
2.5. <i>Presencia del virus en el hemisferio oeste</i>	7
2.6. <i>Diagnóstico</i>	10
<b>3. Justificación</b>	12
<b>4. Planteamiento del problema</b>	12
<b>5. Hipótesis</b>	13
<b>6. Objetivos</b>	13
6.1. <i>Objetivo general</i>	13
6.2. <i>Objetivos específicos</i>	13
<b>7. Materiales y Métodos.</b>	14
7.1. <i>Tipo de investigación:</i>	14
7.2. <i>Población:</i>	14
7.3. <i>Tipo de muestreo:</i>	14
7.4. <i>Criterios de inclusión, muestras:</i>	14
7.5. <i>Criterios de No inclusión, muestras:</i>	15
7.6. <i>Criterio de exclusión, muestras:</i>	15
7.7. <i>Variables independientes:</i>	15
7.7.1. <i>Población susceptible:</i>	15
7.8. <i>Variables Dependientes:</i>	16
7.8.1. <i>Positividad</i>	16
7.8.2. <i>Genotipo Viral:</i>	16
7.8.3. <i>Presencia de mutaciones</i>	16
7.9. <i>Materiales</i>	17
7.9.1. <i>RT-qPCR</i>	17
7.9.2. <i>Secuenciación</i>	17

<b>7.10.</b>	<b>Bioseguridad y buenas prácticas de laboratorio</b>	18
<b>7.11.</b>	<b>Diagrama de Flujo</b>	19
<b>7.12.</b>	<b>Selección de las muestra</b>	19
<b>7.13.</b>	<b>RT-qPCR</b>	20
<b>7.14.</b>	<b>Secuenciación</b>	27
<b>7.15.</b>	<b>Edición de secuencias</b>	30
<b>7.16.</b>	<b>Construcción del árbol filogenético.</b>	31
<b>7.17.</b>	<b>Alineamientos múltiples.</b>	31
<b>7.18.</b>	<b><i>Aspectos éticos.</i></b>	32
<b>8.</b>	<b>Resultados.</b>	32
8.7.	<i>Número de casos</i>	34
8.8.	<i>Secuenciación</i>	37
8.9.	<i>Purificación</i>	39
8.10.	<i>Electroferograma de secuenciación</i>	40
8.11.	<i>Filogenia</i>	41
8.12.	<i>Alineamientos</i>	44
<b>9.</b>	<b>Discusión de resultados</b>	51
<b>10.</b>	<b>Conclusiones</b>	56
<b>11.</b>	<b>Referencias</b>	57

## Índice de Figuras

Figura 1. Mosquitos vectores del VCHIK 1 .....	4
Figura 2. Diagrama del genoma del VCHIK. Tomada de Niyas KP, 2010 .....	5
Figura 3. Diagrama del ciclo de replicación del VCHIK .....	7
Figura 4. Distribución del VCHIK en el hemisferio oeste .....	9
Figura 5. Algoritmo diagnóstico para la identificación de fiebre Chikungunya.....	12
Figura 6. Templado de adición.....	24
Figura 7. Muestra positiva al VCHIK.....	26
Figura 8. Muestra negativa al VCHIK .....	26
Figura 9. Electroferograma obtenido de la secuenciación capilar.....	30
Figura 10-A. Mapa de temporalidad diciembre de 2014 a enero de 2015 .....	35
Figura 10-B. Mapa de temporalidad febrero de 2015 a abril de 2015 .....	36
Figura 10-C. Mapa de temporalidad mayo de 2015 a agosto de 2015.....	36
Figura 10-D. Mapa de temporalidad septiembre a diciembre del 2015 .....	37
Figura 11. Productos de PCR punto final.....	38
Figura 12. Gel constitutivo de las muestras del gen de la proteína E1.....	39
Figura 13. Gel con las bandas purificadas de cada muestra.....	40
Figura 14. Electroferograma editado.....	41
Figura 15. Árbol filogenético con los diversos genomas.....	42
Figura 16. Árbol filogenético de las 25 secuencias analizadas.....	43
Figura 17. Alineamientos de las secuencias del genotipo Asia, del InDRE y del LCE.....	44

Figura 18 A. Cambio sinónimo encontrado en la posición 387, sustituyendo Citosina por Timina en 17 de las 25 muestras del LCE.....	46
Figura 18 B. Cambio sinónimo encontrado en la posición 519, sustituyendo Timina por Adenina en 16 de las 25 muestras del LCE.....	46
Figura 18-C. Cambio no sinónimo encontrado en la posición 623, sustituyendo Citosina por Timina en 17 de las 25 muestras del LCE, Cambiando el aminoácido Treonina por Metionina en el codón (ACG-ATG).....	47
Figura 18-D. Cambio sinónimo encontrado en la posición 744, sustituyendo Adenina por Guanina en 19 de las 25 muestras del LCE.....	47
Figura 18-G. Cambio sinónimo encontrado en la posición 1057, sustituyendo Timina por Citosina en 16 de las 25 muestras del LCE.....	49
Figura 18-I. Cambio sinónimo encontrado en la posición 1250, sustituyendo Timina por Citosina en 17 de las 25 muestras del LCE.....	50

### Índice de tablas.

Tabla 1. Mezcla de reacción para Chikungunya.....	22
Tabla 2. Mezcla de reacción para RP.....	22
Tabla 3 Mezcla de reacción para Chikungunya.....	28
Tabla 4. Características de la población de estudio.....	32
Tabla 5. Frecuencia de síntomas en pacientes con Chikungunya.....	33
Tabla 6. Mutaciones encontradas en el gen de la proteína E1.....	45

## 1. Introducción.

La Fiebre Chikungunya es una enfermedad infecciosa transmitida por la picadura de mosquitos del género *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* infectados con el virus de Chikungunya. El virus de Chikungunya (VCHIK) es un alfavirus que pertenece a la familia Togaviridae, fue aislado por primera vez en 1953 durante un brote en Tanzania. Su genoma está constituido por una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 12 000 pb, su genoma codifica para 4 proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4) y 5 estructurales (C, E1, E2, E3 y 6K). Se han identificado tres genotipos del virus Chikungunya: Asiático, Africano Oeste y Africano Este/Central/Sur, reconocido por las siglas ECSA, en la que se ha observado la presencia de una mutación llamada A226V en la proteína de envoltura E1 y que se relaciona con la mayor capacidad de replicación del virus en el mosquito *A. albopictus*. Su distribución global, marca zonas endémicas como África y Asia lo cual ha ocasionado brotes epidémicos recurrentes. América estaba libre de la enfermedad, hasta diciembre del 2013, cuando comienza la publicación de los primeros casos autóctonos de fiebre Chikungunya registrados en este continente, abarcando los territorios de las islas caribeñas: Islas Vírgenes Británicas, Guadalupe Martinica, San Bartolomé, San Martín (holandesa), San Martín (francesa), Guyana francesa, Dominica, Anguila y Aruba, Santo Domingo y Haití con 130,941 casos sospechosos y 4,486 casos confirmados en ese año. La aparición de fiebre Chikungunya como enfermedad emergente en el continente americano obligó a la publicación por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), de

una serie de recomendaciones para evitar la progresión de la transmisión autóctona de esta enfermedad, sin embargo, la enfermedad se extendió de una forma rápida y progresiva, y para diciembre del 2015 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) notificó 30,356 casos confirmados en América, mientras que en México, la Secretaría de Salud informó que se habían confirmado 11,468 hasta la semana 52 de 2015. A un año de la introducción del VCHIK en nuestro país y próximos a la siguiente temporada de lluvias cuando se espera aumenten los casos de infección por este virus, no se cuenta con información suficiente sobre el grado de conservación o divergencia de las cepas de Chikungunya que circulan en los distintos estados del país, de igual manera, aun cuando los genomas de Chikungunya reportados en el Genbank no presentan la mutación A226V, el número de secuencias reportadas es tan bajo que no es representativo de las mutaciones que pudieran estar circulan en nuestro país, por lo que el presente trabajo está encaminado a generar información sobre el grado de conservación de las cepas circulantes, así como la búsqueda de mutaciones que pudieran brindar al virus alguna ventaja evolutiva.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Antecedentes

La fiebre Chikungunya es un padecimiento reemergente y junto con Dengue son enfermedades víricas, transmitidas por mosquitos, que son endémicas en países tropicales y subtropicales (1). El origen de la palabra Chikungunya viene de la lengua africana makonde, que quiere decir “doblarse por el dolor”. Este virus fue detectado por primera vez en Mawia, Makonde y Rondo hoy en día Tanzania en 1953 (2).

#### Transmisión

La infección es transmitida a través de la picadura de mosquitos *Aedes aegypti* y/o *Aedes albopictus*; el primero también puede transmitir el Dengue y la Fiebre Amarilla, y está presente en las zonas tropicales y subtropicales de América, y el segundo se encuentra en áreas más templadas, extendiéndose desde la costa este y estados del sudeste de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Figura 1). Se considera que *A. aegypti* tiene un comportamiento más rural, ya que se encuentra en depósitos de agua cercanos a las casas y normalmente se encuentran dentro de las casas, a diferencia de *A. albopictus* que presenta un comportamiento menos rural, sin embargo su mayor susceptibilidad a ser infectado por el VCHIK equilibra su papel como vector (3,4).



*Aedes aegypti*



*Aedes albopictus*

Figura 1. Mosquitos vectores del VCHIK 1 (5).

## 2.2. Cuadro clínico

Clínicamente, la enfermedad se manifiesta de forma aguda y abrupta, con fiebre alta, dolor de cabeza, erupción cutánea, artralgias típicamente simétricas y que afectan primordialmente muñecas, rodillas, tobillos y las pequeñas articulaciones de las manos. Los síntomas se presentan de tres a siete días después de ser picado por un mosquito infectado (6). Mientras que la mayoría de los síntomas desaparecen dentro de la primera semana, las artralgias pueden persistir incluso por algunos años (7). En contraste a otras infecciones con otros arbovirus sólo del 5 al 25% de las infecciones con el VCHIK son asintomáticas. Existe evidencia de la asociación de la infección del VCHIK con manifestaciones cardíacas y neuronales severas, y en algunos casos incluso con defunciones (8), también hay reportes de alta morbilidad cuando se transmite de madre a hijo durante el embarazo (9).

Las complicaciones son más frecuentes en niños menores de un año y en mayores de 65 años y/o con enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión, etc.). A la fecha no existe

un tratamiento específico, ni una vacuna disponible para prevenir la infección de este virus (6).

### 2.3. Estructura Viral

El VCHIK es un alfavirus que pertenece a la familia Togaviridae; las partículas virales de aproximadamente 70nm de diámetro son esféricas y con envoltura, su genoma está constituido por ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 12,000 ordenado de la siguiente manera: una región 5' no traducible (NTR), seguido por ARN que codifica para 4 proteínas no estructurales (nsP1-4) y 5 proteínas estructurales (C, E3, E2, 6K y E1) una región 3' no traducible y una cola de poly A terminal (10) (Figura 2).

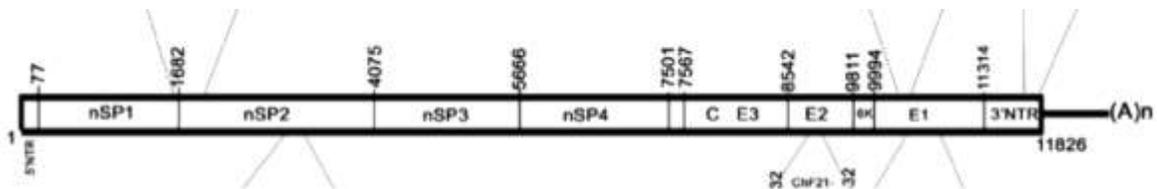


Figura 1. Diagrama del genoma del VCHIK. Tomada de Niyas KP, 2010 (11).

Los genes que codifican para las proteínas no estructurales nsP1, nsP2(helicasa viral), nsP3y nsP4 (polimerasa viral) se asocian para formar el complejo de replicación viral; la proteína C está relacionada con la formación de la núcleo cápside del virión maduro(12). Las glicoproteínas E1 y E2 se asocian para formar un heterodímero que se ubica sobre la superficie del virión y se encargan de la unión y entrada a células susceptibles en infecciones subsecuentes (13). La participación de la proteína 6K aún es ambigua, aunque se cree que participa en el proceso de ensamble, finalmente la proteína E3 se encarga de dirigir a las proteínas estructurales al retículo endoplásmico.

Se han identificado tres genotipos del VCHIK, nombrados de acuerdo a la región en la que se identificaron, los genotipos se conocen como: Asiático, Africano Oeste (WA por sus siglas en inglés) y Africano Este/Central/Sur (ECSA por sus siglas en inglés) (14).

En estudios recientes se identificó que la adquisición de una mutación, llamada A226V en la proteína de envoltura E1 del VCHIK del genotipo ECSA, se relaciona con la mayor capacidad de replicación del virus en el mosquito *A. albopictus*. El virus mutado se diseminó desde el Océano Índico hasta África Oriental y Asia, así como en la transmisión en Italia. Sin embargo, el análisis filogenético demostró que el VCHIK del genotipo ECSA que infectó a los casos autóctonos de la isla Reunión, posición francesa del Pacífico, no tenía la mutación en la posición A226V (15). Por otro lado, el análisis filogenético de la secuencia nucleotídica completa del virus detectado en los primeros casos de San Martín (holandesa) mostró que pertenece al genotipo asiático (16).

#### 2.4. *Ciclo de replicación*

El virus ingresa a las células hospederas mediante endocitosis (3). Una vez que el VCHIK es endocitado, el ambiente ácido del endosoma provoca cambios conformacionales en su envoltura que exponen a la glicoproteína E1, la cual media la fusión de la envoltura viral con el endosoma y permite la liberación del material genético. Una vez liberado el ARN viral, es transcrito para generar cuatro proteínas no estructurales (nsP1-4) que forman el complejo de replicación viral, el cual genera un intermediario de ARN de sentido negativo que sirve de templado para sintetizar ARN genómico (49S) y ARN subgenómico (26S). A partir del mARN<sub>26S</sub> se genera la poliproteína precursora de C, pE2, 6K y E1, una serinproteasa libera a la cápside (C) y el resto de las proteínas sufren modificaciones

postraduccionales en el aparato de Golgi y se exportan a la membrana plasmática para unirse al virión durante su liberación (17). pE2 genera a las glicoproteínas E2 y E3, la cual media el plegamiento correcto de pE2 y su subsecuente asociación con E1. De manera normal el ciclo de replicación dura entre 8 y 16 horas (Figura 3).

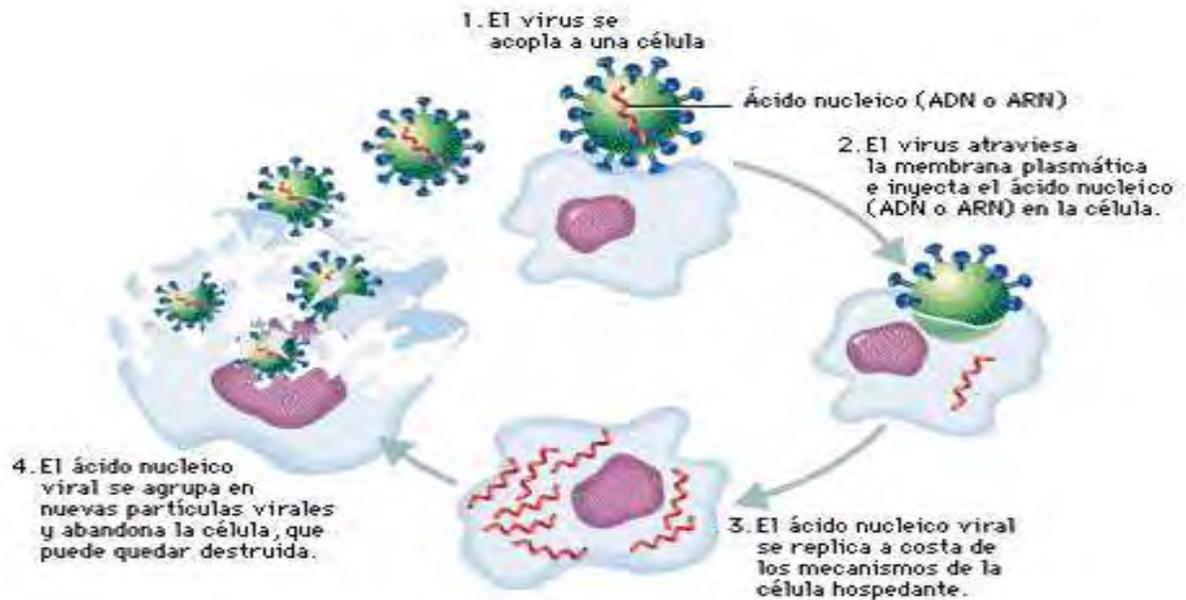


Figura 2. Diagrama del ciclo de replicación del VCHIK (18).

### 2.5. Presencia del virus en el hemisferio oeste

La enfermedad es endémica en África y Asia, ocasionando brotes epidémicos recurrentes. La expansión de la enfermedad a través de casos importados originó brotes epidémicos autóctonos en regiones del Océano Índico y Europa como el acontecido en el norte de Italia en 2007(1), en donde el virus ocasionó un brote en la región de Emilia-Romagna, al ser transmitido localmente por *A. albopictus*. Antes de la primera confirmación de la transmisión autóctona, en la región se habían registrado varios casos importados de viajeros que habían regresado con el virus de Asia o África (19).

Hasta antes de diciembre de 2013, el continente americano se consideraba libre de la enfermedad, sin embargo, a partir de esta fecha inició la publicación de los primeros casos autóctonos de fiebre Chikungunya registrados en este continente, abarcando los territorios de las islas caribeñas: Islas Vírgenes Británicas, Guadalupe, Martinica, San Bartolomé, San Martín (holandesa), San Martín (francesa), Guayana francesa, Dominica, Anguila y Aruba, Santo Domingo y Haití, con 130,941 casos sospechosos y 4,486 casos confirmados(20). Debido a la aparición de Fiebre Chikungunya como enfermedad emergente en el continente americano, obligó a la OMS a publicar una serie de recomendaciones para evitar la progresión de la transmisión autóctona de esta enfermedad (16); sin embargo la enfermedad se extendió de una forma rápida y progresiva y para diciembre del 2015 la OPS notificó 30,356 casos confirmados en América (21).



Figura 3. Distribución del VCHIK en el hemisferio oeste (19).

En México, de enero a noviembre de 2014, el Laboratorio Central de Epidemiología realizó la búsqueda intencionada de VCHIK en muestras con diagnóstico inicial de Dengue que cumplían con la definición de caso sospechoso de Fiebre Chikungunya sin encontrar la presencia del virus (datos no publicados). A partir de diciembre de 2014 y

hasta la semana 52 de 2015 (22), la Secretaría de Salud informó que se habían confirmado 11, 468 casos los cuales se reportaron en los estados de Chiapas, Guerrero y Oaxaca (23,24).

El LCE del IMSS participó activamente en la notificación de los primeros casos y actualmente cuenta con la autorización del Consejo Nacional de Vigilancia Epidemiológica (CONAVE) para la realización del diagnóstico confirmatorio.

#### 2.6. *Diagnóstico*

A partir de la semana epidemiológica 45 del 2014, ante la introducción del virus de Chikungunya a nuestro país, la Dirección General de Epidemiología (DGE) modificó la definición operacional de caso para Fiebre Chikungunya, eliminando el requerimiento de viaje a zona endémica, de tal manera que en los Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico por Laboratorio de Fiebre Chikungunya, publicados por el InDRE en Noviembre de 2014, la definición operacional de caso es la siguiente:

- Caso sospechoso de Fiebre Chikungunya:

Toda persona que presente cuadro febril agudo más la presencia de poliartralgias severas (incapacitantes) o artritis de comienzo agudo y que se identifique alguna asociación epidemiológica.

La asociación epidemiológica puede ser: presencia del vector, antecedente de visita o residencia en áreas de transmisión en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico, existencia de casos confirmados en la localidad.

- Caso confirmado de Fiebre Chikungunya:

Todo caso sospechoso con resultado positivo a virus Chikungunya mediante alguna de las siguientes pruebas de laboratorio específicas:

Detección de ARN viral mediante *RT-PCR* en tiempo real en muestras de suero tomado en los primeros cinco días de inicio de la fiebre (fase aguda).

- Detección de anticuerpos IgM en muestra de suero a partir de sexto día de iniciada la fiebre (fase crónica).
- Debido a que la sintomatología desarrollada por el virus Chikungunya puede confundirse con Dengue y viceversa, el algoritmo diagnóstico considera la realización de un diferencial entre estos virus.

El algoritmo para la vigilancia epidemiológica y diagnóstico por laboratorio de CHIKV implementado por el InDRE en el país se describe en el esquema siguiente:



Figura 4. Algoritmo diagnóstico para la identificación de fiebre Chikungunya. (25).

### **3. Justificación**

Debido a las características geográficas, climáticas y poblacionales de nuestro país y a la experiencia obtenida de la vigilancia epidemiológica de otros arbovirus como Dengue, es probable que el virus Chikungunya se convierta rápidamente en un problema Nacional de Salud Pública; por lo que obtener información referente a su filogenia y el incremento de la susceptibilidad del mosquito a ser infectado por el virus, es relevante para la toma de decisiones y activación de mecanismos de respuesta que, a su vez, propicien la atención oportuna de la población de derechohabiente en el IMSS.

### **4. Planteamiento del problema**

A un año de la introducción del VCHIK en nuestro país y próximos a la siguiente temporada de lluvias cuando se espera aumenten los casos de infección por este virus, no se cuenta con información suficiente sobre el grado de conservación o divergencia de las cepas de Chikungunya que circulan en los distintos estados del país, de igual manera, aun cuando los genomas de Chikungunya reportados en el Genbank no presentan la mutación A226V, el número de secuencias reportadas es tan bajo que no es representativo de las mutaciones que pudieran estar circulando en nuestro país, por lo que el presente trabajo está encaminado a generar información sobre el grado de conservación de las cepas circulantes, así como la búsqueda de mutaciones que pudieran brindar al virus alguna ventaja evolutiva.

## **5. Hipótesis**

Debido a la presión evolutiva que se origina sobre cualquier agente patógeno al enfrentarse a una nueva población con características inmunológicas específicas, así como a vectores (mosquitos) habituados a condiciones climáticas particulares, es probable que el virus de Chikungunya desarrolle mutaciones que le permitan una mejor adaptación.

## **6. Objetivos**

### *6.1. Objetivo general*

- Realizar análisis filogenético entre cepas de Chikungunya provenientes de diferentes estados de la república mexicana correspondientes al periodo de diciembre de 2014 a diciembre de 2015.

### *6.2. Objetivos específicos*

- Verificar la presencia del VCHIK en las muestras de suero recibidas en el LCE que cumplan con la definición operacional de caso sospechoso de Fiebre Chikungunya durante el periodo de diciembre de 2014 a diciembre de 2015.
- Determinar el genotipo o genotipos del VCHIK que circulan en México.

- Determinar la presencia de mutaciones en la proteína E1 del virus de Chikungunya.

## **7. Materiales y Métodos.**

### *7.1. Tipo de investigación:*

Aleatorio Prospectivo, Observacional, Descriptivo, Transversal.

### *7.2. Población:*

La población está integrada por 100 muestras de suero que se encuentran en el biobanco del Laboratorio Central de Epidemiología del CMN “La Raza”, las cuales fueron obtenidas entre diciembre de 2014 y diciembre de 2015

### *7.3. Tipo de muestreo:*

El estudio estuvo limitado a la existencia de material biológico que cumpliera con los siguientes criterios de inclusión, así como presupuestales del IMSS

### *7.4. Criterios de inclusión, muestras:*

De suero enviadas al LCE para realizar diagnóstico confirmatorio de virus Chikungunya y se encuentren en el biobanco.

Con volumen suficiente (1.0 mL)

No contaminadas

No lipémicas

No hemolizadas

*7.5 Criterios de No inclusión, muestras:*

Con volumen insuficiente (<1mL)

Contaminadas

Lipémicas

Hemolizadas

*7.6 Criterio de exclusión, muestras:*

Sin presencia de ácidos nucleicos

*7.7. Variables independientes:*

a) Definición operacional: Existencia de moscos capaces de transmitir al virus de Chikungunya

b) Categoría: Cualitativa

c) Escala de medición: Nominal, dicotómica

*7.7.1. Población susceptible:*

a) Definición operacional: Individuos en riesgo de infectarse con el virus de chikungunya

b) Categoría: Cualitativa

c) Escala de medición: Nominal, dicotómica

## *7.8. Variables Dependientes:*

### *7.8.1. Positividad*

a) Definición operacional: Número de casos con infección por el virus de Chikungunya

b) Categoría: Cualitativa

c) Escala de medición: Nominal, dicotómica

d) Unidad de medición: Presencia de los ácidos nucleicos del virus de Chikungunya determinado por *RT-qPCR*

### *7.8.2. Genotipo Viral:*

a) Definición operacional: Uno de los tres genotipos de Chikungunya descritos a la fecha

b) Categoría: Cualitativa

c) Escala de medición: Nominal

d) Unidad de medición: Secuenciación tipo Sanger

### *7.8.3. Presencia de mutaciones*

a) Definición operacional: Cambios en la secuencia nucleotídica del genoma del virus de Chikungunya

b) Categoría: Cualitativa

c) Escala de medición: Nominal

d) Unidad de medición: Alineamientos mediante análisis bioinformático con los programas BioEdit, Megalign y MEGA6.

## 7.9. Materiales

### *7.9.1. RT-qPCR*

- Guantes de nitrilo
- Lentes de protección
- Cubre bocas N95
- Gorro y zapatones
- Solución inhibidora de RNA (RNAsa Away Reagent Cat. 10328-011)
- Etanol al 70%
- kit QuantiTec® Probe RT-PCR (QIAGEN Cat. 204445)
- Tubos Eppendorf

### *7.9.2. Secuenciación*

- Agarosa (Invitrogen Cat. 16500500)
- TBE (Invitrogen Cat. 15581044)
- Marcadores de 100 y 25 pares de bases (Biolab Cat. 0341103)
- kit Pure Link Quick Gel Extraction® (Invitrogen Cat. K210012)
- Gel Red (Biotium Cat. 41003)
- kit Big Dye® v3.1 (Applied Biosystems)

## 7.10. Bioseguridad y buenas prácticas de laboratorio

### 7.10.1. *Equipo de protección personal (EPP):*

Para todas las actividades frente al gabinete de seguridad biológica (GSB) se utilizó el siguiente EPP: Bata, guantes de nitrilo, lentes de protección, cubre bocas N95, gorro y zapatones.

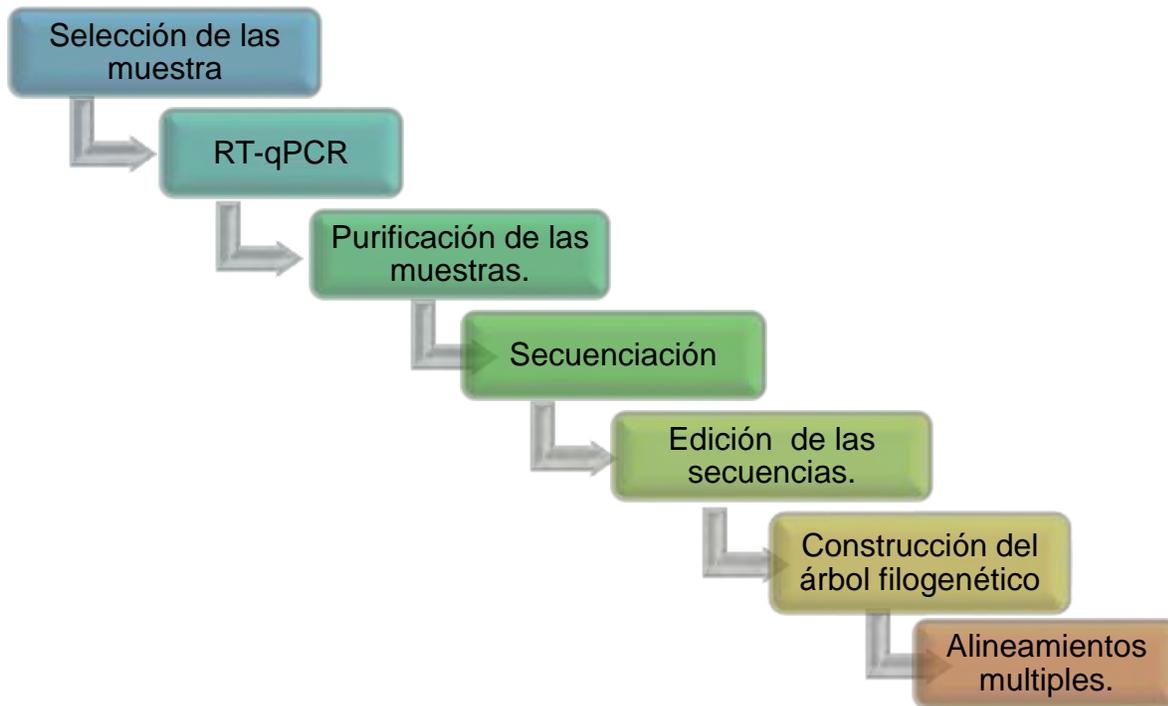
### 7.10.2. *Limpieza de del gabinete de seguridad biológica (GSB).*

Se realizó la limpieza del área: primero se limpió con cloro al 0-5% recién preparado, posteriormente con agua destilada (para eliminar el exceso de cloro), en seguida con etanol al 70% y finalmente con solución inhibidora de RNAs y DNAs (RNAsa Away Reagent 10328-011).

Una vez realizada la limpieza, se dejó el GSB a exposición de la luz UV por un lapso de 15 a 30 minutos; al finalizar se apagó la luz UV y se encendió el flujo de aire del GSB para disipar el ozono durante 5 min.

Una vez terminada la limpieza del GSB, se introdujo el material previamente limpio con etanol al 70%.

### 7.11. Diagrama de Flujo



### 7.12. Selección de las muestra

A partir de las muestras recibidas en el Laboratorio Central de Epidemiología entre diciembre del 2014 y diciembre del 2015, se seleccionaron 100 muestras que cumplieron con los criterios de inclusión y que tuvieran un resultado positivo previo a la presencia del virus Chikungunya por la técnica de RT-qPCR utilizando el kit QuantiTec® Probe RT-PCR (QIAGEN cat. 204445)

### 7.13. RT-qPCR

De acuerdo a las recomendaciones del CDC e InDRE para la realización del diagnóstico molecular confirmatorio para el virus de Chikungunya, el proceso de *RT-qPCR* se dividió en cinco pasos (inactivación de la muestra, extracción, preparación de la mezcla de reacción, adición, corrida de la *RT-qPCR*), cada uno de estos pasos se realizó en áreas del laboratorio físicamente separadas.

#### *Inactivación:*

Una vez que se limpió el GSB y se seleccionaron las muestras, se procedió a la inactivación de las mismas, para lo cual se colocaron 140 µL de cada muestra en tubos eppendorf previamente etiquetados y posteriormente se adicionaron 560 µL de buffer de lisis (Viral Lysis Buffer cat. 1014777) a cada muestra, al finalizar se dejaron por 10 min a temperatura ambiente.

#### 7.13.1. *Extracción:*

Transcurridos los diez minutos, las muestras fueron transportadas al área de extracción, en donde se adicionaron 560 µL de etanol absoluto grado biología molecular a cada muestra, posteriormente se agitaron en el vortex por 15s y se centrifugaron 1 min a 8000 rpm.

Cada muestra se colocó en la columna previamente rotulada con su tubo recolector y se centrifugaron 1 min a 8000 rpm cambiando y desechando el tubo colector en cada lavado.

Después de filtrar las muestras, a cada una se les adicionó 500  $\mu$ L del buffer AW1 y se centrifugaron 1 min a 8000 rpm. Posteriormente se les colocó 500  $\mu$ L de AW2 y se centrifugaron 3 min a 14000 rpm; para eliminar el AW2 residual, se centrifugaron por segunda vez 1 min a 14000 rpm y se colocó cada una de las columnas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado.

En seguida, se adicionaron 60  $\mu$ L de buffer de elución en el centro de cada columna y se incubaron 1 min a temperatura ambiente; finalmente se centrifugaron 1 min a 8000 rpm, y se guardaron solamente los tubos Eppendorf que contienen el RNA viral de cada muestra.

#### 7.13.2. *Preparación de la mezcla de reacción:*

Al finalizar la extracción de las muestras se preparó la mezcla de reacción con el kit QuantiTec® Probe RT-PCR (QIAGEN cat. 204445)

Para esto se atemperaron todos los reactivos necesarios (agua, buffer 2X, iniciadores y sonda), durante este momento, se rotularon los tubos Eppendorf correspondiente a cada juego de iniciadores y sondas (Chikungunya y RP).

Se preparó la cantidad necesaria de mix para el número de muestras a procesar más un exceso equivalente al requerido para una muestra por cada 20 reacciones. La mezcla se realizó de acuerdo a los volúmenes referidos en las tablas 1 y 2, para Chikungunya y RP respectivamente.

Nota: Se recomienda seguir el orden de adición que muestran las tablas.

Tabla 1. Mezcla de reacción para Chikungunya

Agua libre de nucleasas	2X QuantiTect Probe RT- PCR Master Mix	Sonda	Iniciador sentido	Iniciador anti sentido	QuantiTect RT Mix
6.6 µL	12.5 µL	0.15 µL	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL

Primer F: 5' AAA GGG CAA ACT CAG CTT CAC 3'

Primer R: 3' GCC TGG GCT CAT CGT TAT TC 5'

Sonda: FAM CGC TGT GAT ACA GTG GTT TCG TGT G BHQ-1

Tabla 2. Mezcla de reacción para RP

Agua libre de nucleasas	2X QuantiTect Probe RT- PCR Master Mix	Sonda	Iniciador sentido	Iniciador anti sentido	QuantiTect RT Mix
5.75 µL	12.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.25 µL

Antes de dispensar la mezcla en la placa de reacción, se mezcló perfectamente y centrifugó 5s, se colocaron 20  $\mu$ L en cada pozo de la placa en las posiciones correspondientes (figura 6)

### 7.13.3. Adición.

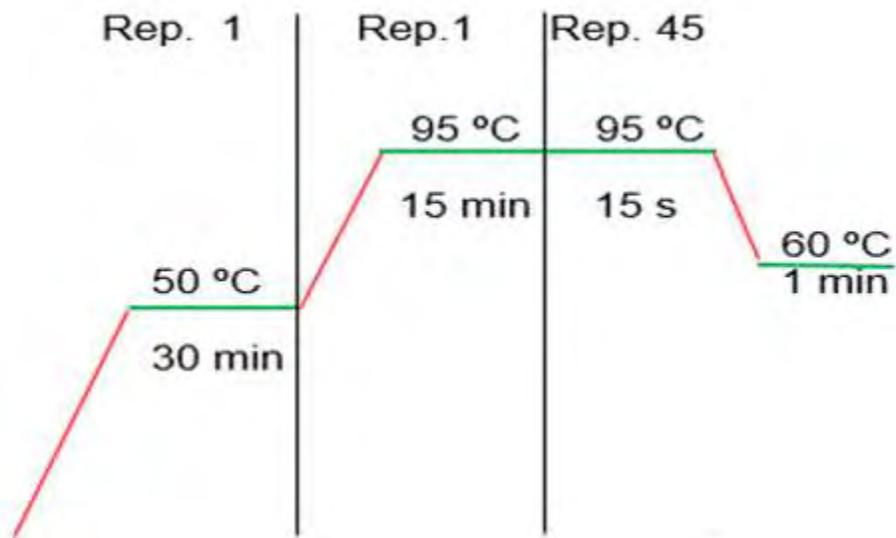
Se trasladó la placa con la mezcla de reacción al área de adición y se adicionaron 5  $\mu$ L del templado obtenido en el paso de extracción en los pozos correspondientes a cada muestra según lo indica el formato de la hoja de emisión y verificación de resultados para la detección de Chikungunya por *RT-qPCR*; inmediatamente después de la adición de cada columna, se colocaron las tapas ópticas con ayuda del dispositivo para colocar tapas. Finalmente, se colocó una tira de tapas sobrepuestas en los últimos 2 pozos de la placa (12G Y 12H) correspondientes a los controles positivos (figura 6) y se pasó el formato y la placa al área de amplificación.

Figura 6. Templado de adición.

CHIK	A	NTC	M1										V
RP	B	NTC	M1										V
	C		M2										V
	D		M2										V
	E		M3										V
	F		M3										V
	G		M4								M40		CP CHIK
	H		M4								M 40		CP RP

#### 7.13.4. Amplificación:

Una vez en el área de amplificación, se adicionaron 5  $\mu$ L del control positivo (CP) en cada pozo correspondiente de la columna 12, se taparon todos los pozos con el dispositivo para colocar las tapas y se centrifugó 1 minuto a 1200 rpm. Se colocaron en el termociclador (7500 FAST) donde se llevó de acuerdo al siguiente programa de amplificación:



7.13.5. Interpretación de resultados:

Se consideró como resultado positivo a toda aquella muestra que presentó amplificación para el gen de Chikungunya y el control interno RP (figura 7). Se consideró como resultado negativo a toda aquella muestra que no presentó amplificación para el gen de Chikungunya, pero si para el control interno RP (figura 8). Se consideró como muestra inadecuada cuando el control interno no estuvo presente.

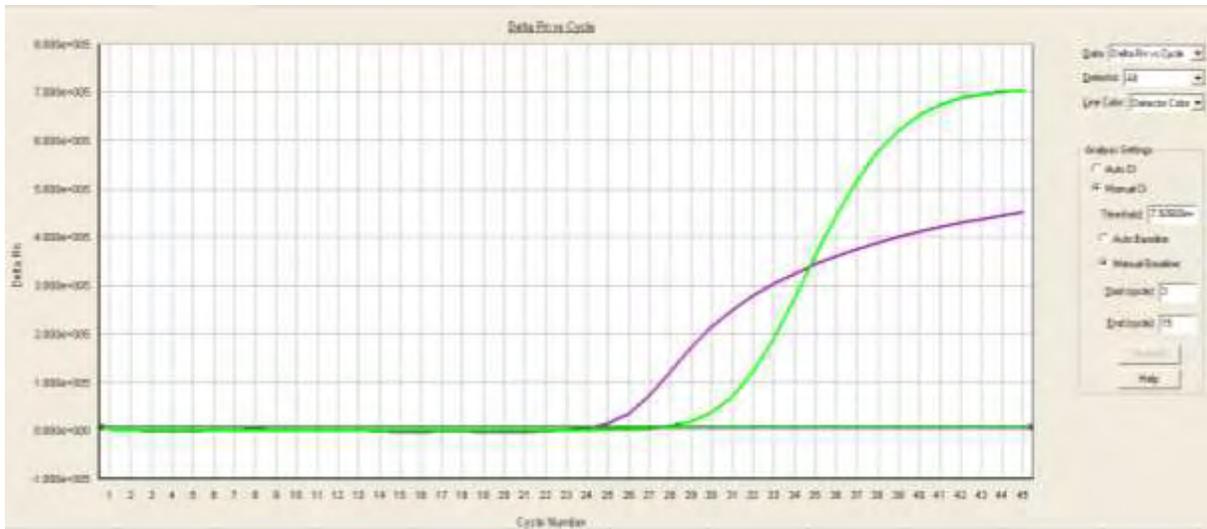


Figura 7. Muestra positiva al VCHIK.

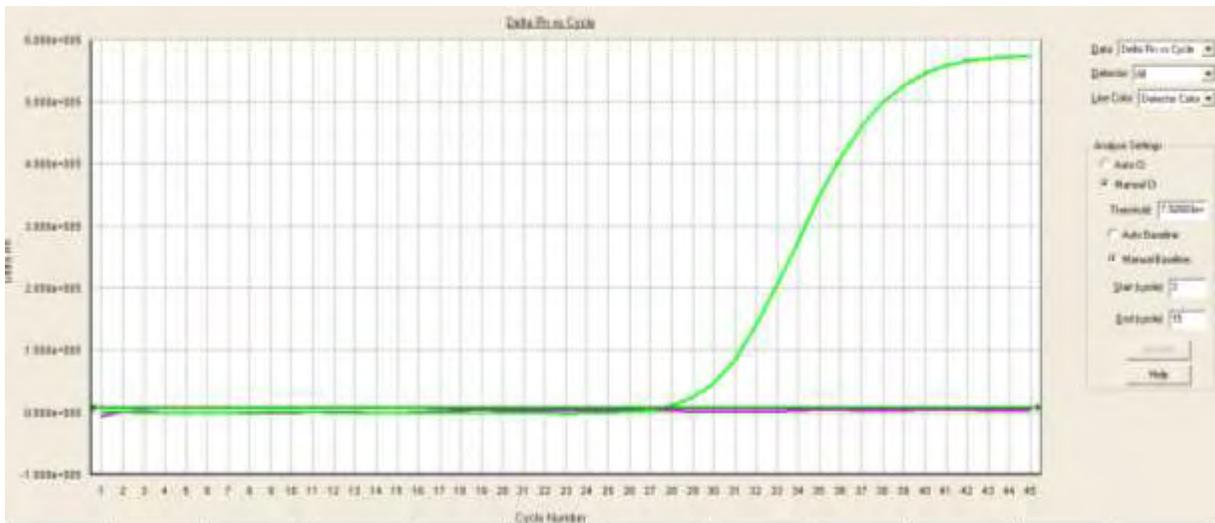


Figura 8. Muestra negativa al VCHIK

## **7.14. Secuenciación**

### *7.14.1. Selección de las muestras para secuenciación*

Una vez que se confirmó el diagnóstico de Chikungunya se seleccionaron 5 muestras de los 5 estados con mayor circulación del virus (Colima, Yucatán, Guerrero, Chiapas y Veracruz.) para un total de 25 muestras.

### *7.14.2. RT-PCR para el Gen E1*

A partir de las muestras seleccionadas se realizó una nueva PCR para amplificar el gen de la proteína E1. Se utilizaron primers específicos con nucleótidos degenerados, de tal manera que fueran capaces de amplificar con cualquiera de los tres genotipos de chikungunya. La mezcla de reacción se realizó utilizando la enzima QuantiTec® Probe RT-PCR (QIAGEN cat. 204445) se atemperaron todos los reactivos necesarios para Chikungunya (agua, buffer 2X, iniciadores y enzima). Se preparó la cantidad necesaria de mix para el número de muestras a procesar más un exceso equivalente al requerido para una muestra por cada 20 reacciones. La mezcla se realizó de acuerdo a los volúmenes referidos en la tabla 3 para Chikungunya.

Nota: Se recomienda seguir el orden de adición que muestran las tablas.

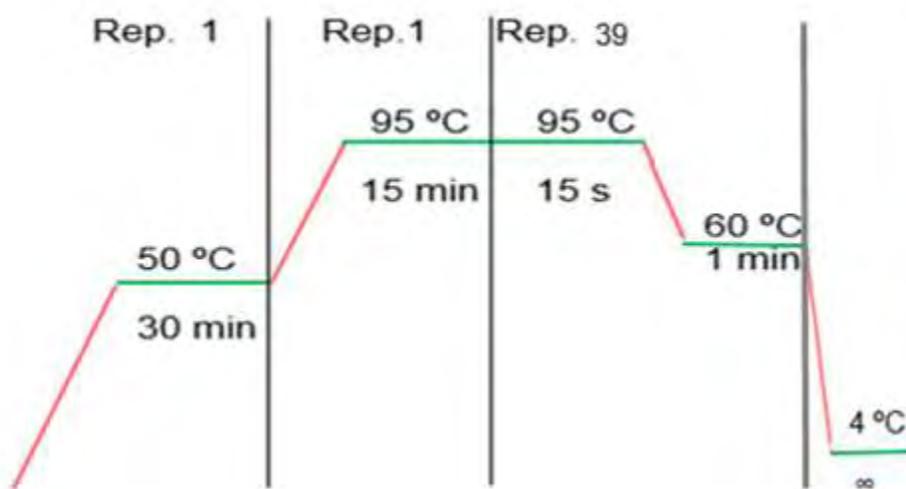
Tabla 3 Mezcla de reacción para Chikungunya.

Agua libre de nucleasas	2X QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	Enzima	Iniciador sentido	Iniciador antisentido
5.0 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L

Primer F: 5' GGC GCC TAC TGC TTY TGC G 3'

Primer R: 3' CCT GCT RAA CGA CAC GCA TAG CA 5'

Antes de dispensar la mezcla en la placa de reacción, se mezcló perfectamente y se centrifugó 5s; se colocaron 20  $\mu$ L en cada pozo de la placa y posteriormente se adicionaron 5  $\mu$ L de muestra en las posiciones correspondientes. Se colocaron en el termociclador donde se llevó a cabo la amplificación de acuerdo al siguiente programa:



#### 7.14.3. *Electroforesis.*

Terminada la RT-PCR; se preparó un gel de agarosa (Invitrogen cat. 16500500) al 1.5% con TBE 1X (Invitrogen cat. 15581044), al que se le adicionaron 5 µL de Gel Red (Biotium cat. 41003) por cada 100 mL de disolución de agarosa.

Se vertió la agarosa en el molde y se dejó gelificar; ya gelificada se colocó en la cámara de electroforesis con los pocillos orientados al polo negativo y posteriormente se inundó la cubeta de electroforesis con un tampón de TBE 1X hasta la marca de la cubeta.

Se preparó una mezcla con 5 µL de buffer de carga y 5 µL del producto de PCR de muestra diferente para cada pozo del gel. En los extremos de cada gel, se colocó el buffer de carga con el marcador de 100 y 25 pares de bases (Biolab cat. 0341103).

Una vez que se terminó de dispensar en los pozos, se colocó la tapa de la cámara de electroforesis junto con los cables de alimentación eléctrica a 95 voltios durante 90 min. Transcurrido éste tiempo, se retiró el gel de la cámara y se reveló con ayuda de una lámpara UV, se marcó con un bisturí el contorno de las bandas a purificar; ya sin la exposición a UV, se cortaron las bandas marcadas y se colocó cada una de ellas en un tubo Eppendorf para ser pesadas.

#### 7.14.4. *Purificación de bandas*

Para recuperar el DNA correspondiente al gen E1, se utilizó el kit Pure Link Quick Gel Extraction® (Invitrogen cat. k210012). A las muestras pesadas en los tubos Eppendorf, se les adicionaron dos tercios de su peso correspondiente del buffer L3 y se disolvieron a 50°C 10 min, la solución se pasó a una columna en la que se

centrifugó 1 min a 12000 rpm, posteriormente se agregaron 500µL de buffer W1 a cada muestra, centrifugándolas 1 min a 12000 rpm; finalmente se agregaron 50µL de buffer E5 y se dejaron incubar 2 min para poder ser centrifugadas 1 min a 12000 rpm y obtener las muestras purificadas.

#### 7.14.5. *Electroforesis capilar*

Los productos purificados fueron enviados al Instituto Nacional de Perinatología, donde se secuenciaron mediante electroforesis capilar en un equipo 3130 con un popote 7 y un capilar de 36cm utilizando el kit Big Dye® v3.1 (Applied Biosystems).

#### 7.15. Edición de secuencias

Una vez secuenciadas las muestras se obtuvieron los electroferogramas en formato “.fasta”, los cuales son gráficos de los resultados de la secuenciación capilar, en los que el equipo asigna la base correspondiente y un color a cada una de ellas (figura 9).

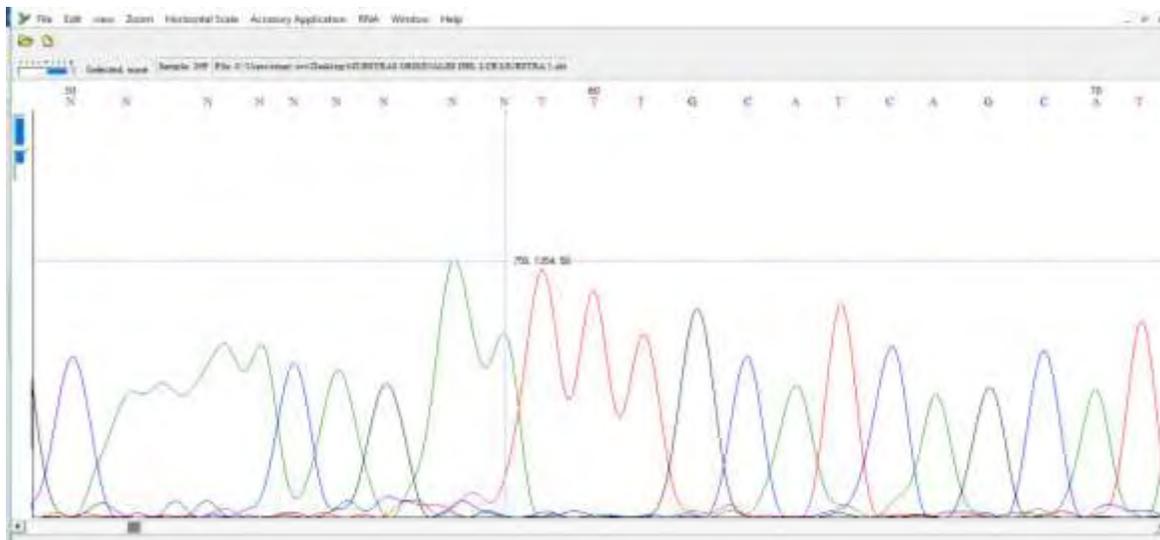


Figura 9. Electroferograma obtenido de la secuenciación capilar

Sin embargo, al existir una baja resolución de la técnica, se obtuvieron picos encimados; para solucionar este problema se insertó el archivo “.fasta” de cada muestra secuenciada al programa Bioedit, en donde se seleccionó la opción “editar secuencia” y se ampliaron las zonas donde los picos estaban encimados para poder asignar la base correspondiente.

### **7.16. Construcción del árbol filogenético.**

Una vez editadas las secuencias, con el objetivo de determinar a qué genotipo corresponden, se generó una base de datos con secuencias correspondientes a los 3 genotipos de Chikungunya (Asia, WA, ECSA) las cuales fueron descargadas de la base de datos del NCBI en formato “.fasta”, para poder ser utilizadas en el programa MEGA6 junto con las secuencias de las muestras editadas.

Este programa nos ayudó a construir un árbol filogenético, en el cual se alinearon todas las secuencias con una prueba Clustal W y posteriormente se construyó el árbol filogenético de Neighbor Joining con una prueba bootstrap de 1000 réplicas

### **7.17. Alineamientos múltiples.**

Finalmente, se realizaron los alineamientos múltiples de las secuencias obtenidas del proceso de secuenciación. Se tomaron los archivos con terminación “.fasta” y se utilizó el programa Megalign; en este programa se empleó la prueba Clustal W al alinear secuencias, con el fin de que existiera el menor número de diferencias entre

ellas. Para ello se le asignó el valor de score más alto y permitió observar las diferencias o mutaciones presentes en cada secuencia.

#### 7.18. Aspectos éticos.

La investigación no presenta riesgo de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación.

Se garantiza que la información de las muestras biológicas utilizadas en este estudio no es rastreable a los datos de identificación de los sujetos.

### 8. Resultados.

Entre diciembre de 2014 y 2015, el LCE recibió muestras de suero para realizar diagnóstico confirmatorio de fiebre Chikungunya, de las cuales se analizaron 100 alícuotas que cumplieron la definición operacional de caso. La proporción de género F/M fue de 1.56 y la distribución por grupos edad mostro una mayor proporción en personas entre 18 y 29 años de edad. (Tabla 4)

Tabla 4. Características de la población de estudio.

	Positivas
<b>Edad</b>	
Media	36
<b>Grupos de edad; (%)</b>	
≤ 17	22%
18-29	15%
30-39	19%

40-49	12%
50-59	18%
60-69	5%
≥ 70	4%
<b>Genero</b>	
F/M	61/39
Proporción	1.56

Los principales síntomas presentes en los individuos positivos fueron fiebre (100%), mialgias (96%), artralgias (96%), cefalea (80%), artritis (76%) y dolor retro ocular (60%) (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia de síntomas en pacientes con Chikungunya.

<b>Síntoma</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Fiebre	100
Artralgias	96
Mialgias	96
Cefalea	80
Escalofrío	80
Artritis	76
Dolor retro ocular	60
Exantema	28
Dolor abdominal	20
Fatiga	12

Conjuntivitis	8
Diarrea	8
Esplenomegalia	8
Vomito	8
Disminución de agudeza visual	4
Ictericia	4
Hepatomegalia	4
Tos	4
Hemorragia	4
Rinitis	0
Rinorrea	0
Faringitis	0
Pérdida de peso	0
Sudoración	0

### 8.7. Número de casos

De las 100 muestras procesadas por *RT-qPCR* para verificar la presencia del virus y su calidad para realizar el proceso de secuenciación, se observó presencia del virus en 97 muestras, lo que refleja un porcentaje de concordancia del 97%. En cuanto a la distribución geográfica de los casos positivos, observamos una mayor concentración en los estados del sur del país (Colima, Guerrero, Yucatán, Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Ciudad de México y Quintana Roo) (Figura 10-D).

En cuanto a la temporalidad del brote, se observa que en el lapso de un año el virus se distribuyó por el centro y sur del territorio mexicano, y para diciembre de 2015 se registraban casos en 8 estados de la República (Figura 10 A, B, C, D).



Figura 10-A. Mapa de temporalidad diciembre de 2014 a enero de 2015



Figura 10-B. Mapa de temporalidad febrero de 2015 a abril de 2015

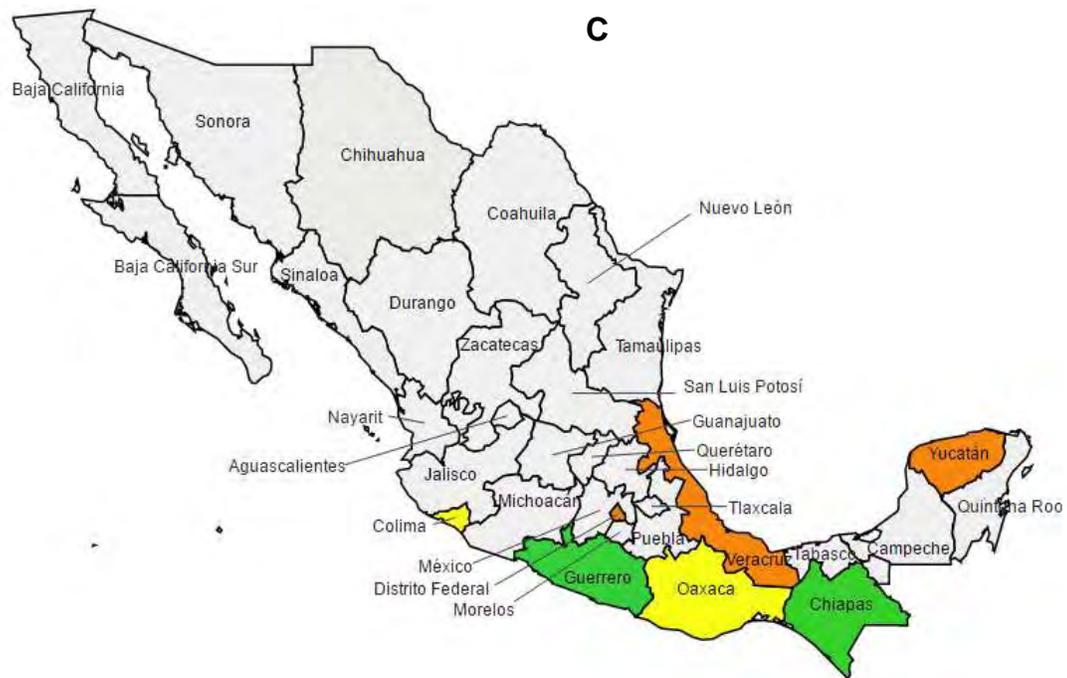


Figura 10-C. Mapa de temporalidad mayo de 2015 a agosto de 2015

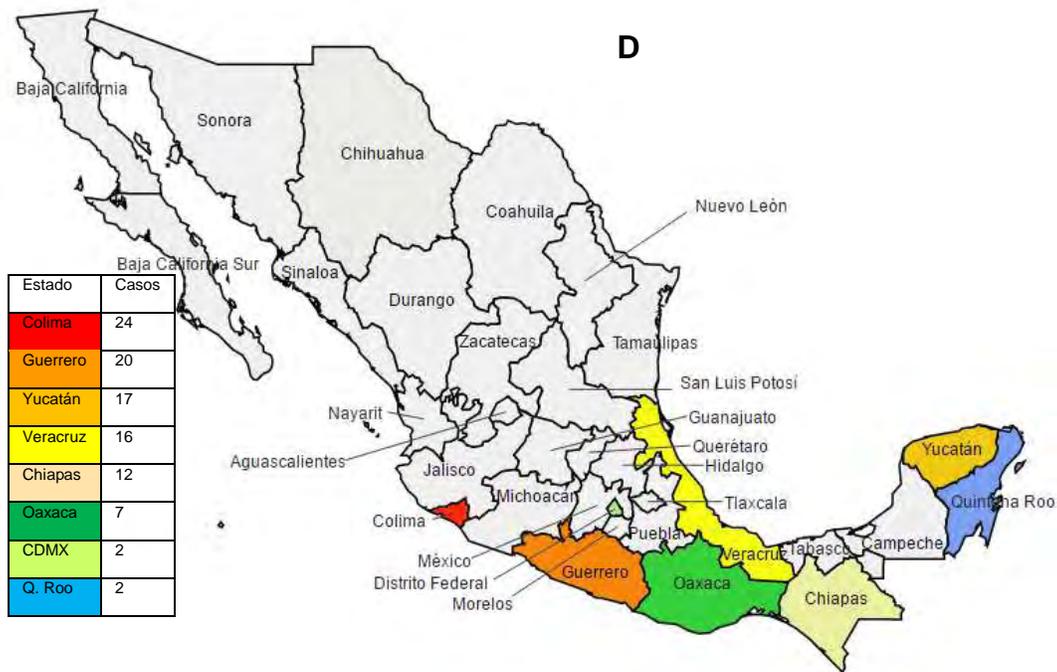


Figura 10-D. Mapa de temporalidad septiembre a diciembre del 2015  
 Figura 10. Temporalidad del brote de Chikungunya en México. En la figura se muestra la progresión del brote de Chikungunya en México, en color se muestran los estados que reportaron casos de transmisión autóctona por primera vez en los meses de A) diciembre de 2014 a enero de 2015; B) febrero de 2015 a abril de 2015; C) mayo de 2015 a agosto de 2015; D) septiembre a diciembre del 2015

### 8.8. Secuenciación

Con la intención de obtener un producto de *PCR* puro, para realizar la secuenciación capilar, se realizó una *PCR* punto final de las 25 muestras del gen E1 de Chikungunya, las cuales se corrieron posteriormente en un gel de agarosa (figura

11) para verificar la presencia de la proteína E1 y continuar con la purificación de la banda correspondiente.

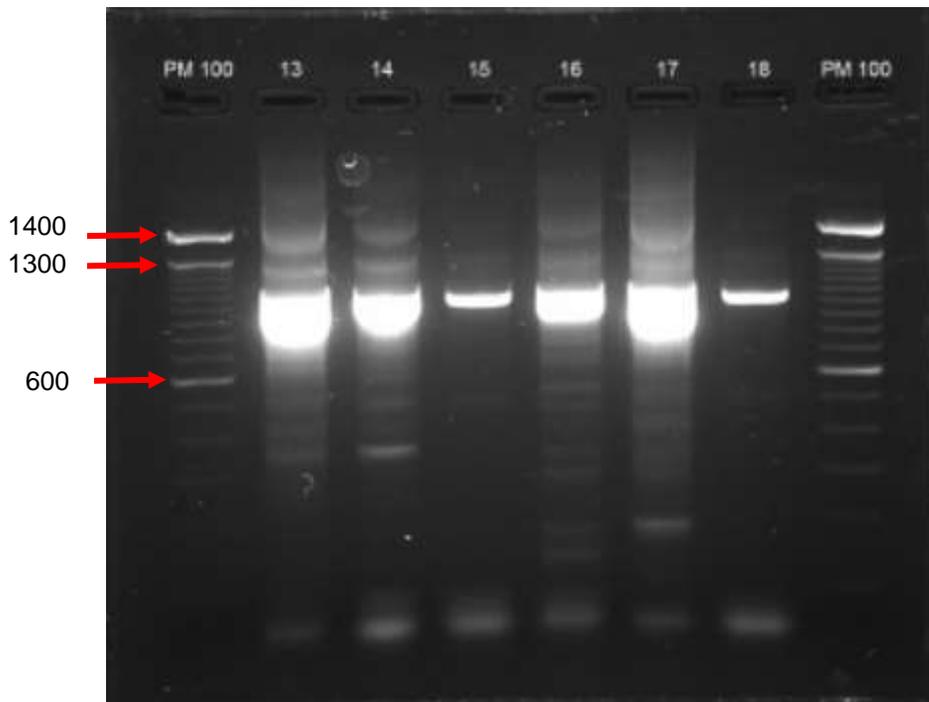


Figura 11. Productos de PCR punto final.

En la imagen se muestra las bandas correspondientes al amplificado obtenido para el gen de la proteína E1 de Chikungunya en la banda 1100.

Una vez confirmada la amplificación, se corrió un gel constitutivo para obtener las bandas del gen de la proteína E1 de cada una de las 25 muestras.

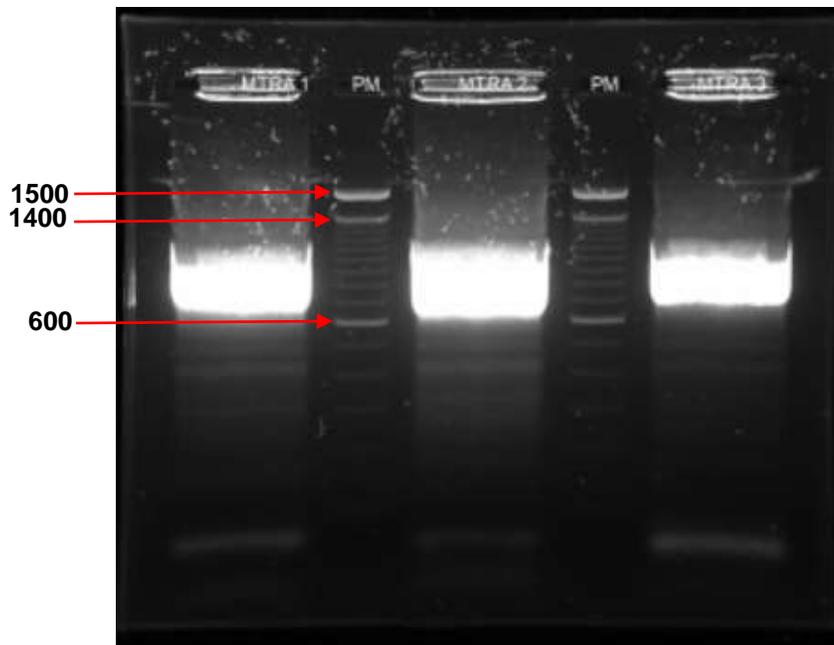


Figura 12. Gel constitutivo de las muestras del gen de la proteína E1.

En el cual se muestran menos bandas que el gel de la (figura 11) y más definidas las de la proteína E1 en la banda 1100.

### 8.9. Purificación

Finalmente se corrió un último gel del procedimiento de purificación, con la finalidad de eliminar el arrastre de DNA que no corresponde al gen de la proteína E1 en cada lavado, quedándonos solo con el gen de la proteína E1, para mandarlo a secuenciar posteriormente (figura 13).

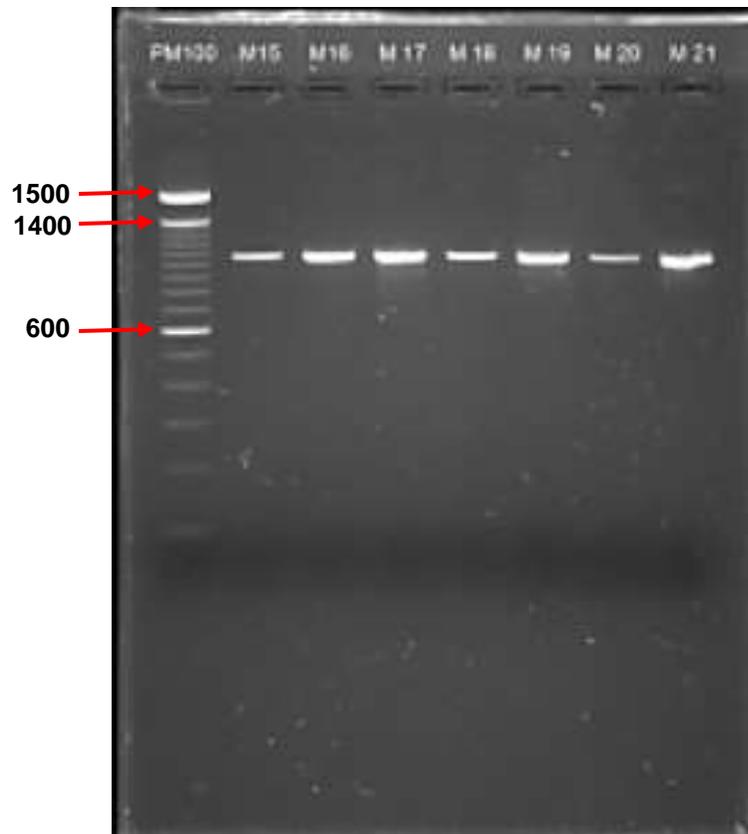


Figura 13. Gel con las bandas purificadas de cada muestra  
Se observa que solo se obtuvo la banda del gen de la proteína E1 de cada muestra, las cuales se mandaron a secuenciar posteriormente.

#### 8.10. Electroferograma de secuenciación

Una vez mandadas a secuenciar las 25 muestras, se obtuvo un electroferograma de cada una de ellas en formato ".fasta"; los cuales son gráficos de los resultados de la secuenciación capilar y en algunos casos el equipo asigna una "N" en lugar

del nucleótido correspondiente, sin embargo fueron editados con el programa BioEdit asignando el nucleótido correspondiente a cada pico (figura 14).

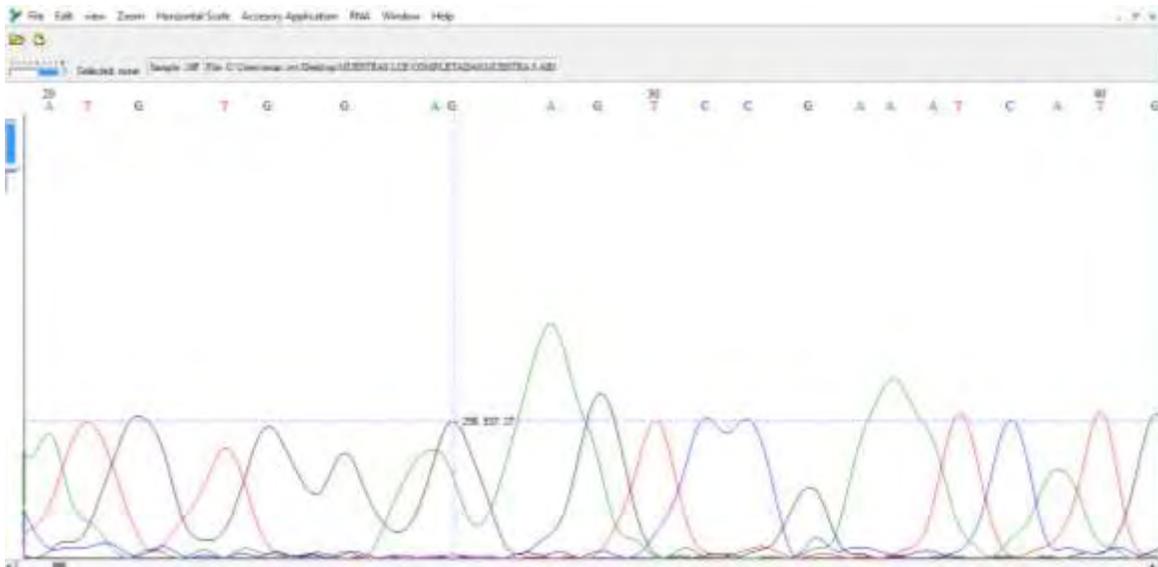


Figura 14. Electroferograma editado.

En la imagen se muestran los gráficos editados de una muestra, completando la secuencia de nucleótidos con el programa BioEdit.

### 8.11. *Filogenia*

Mediante el programa MEGA6 se alinearon todas las secuencias de Chikungunya (Asia, WA, ECSA, LCE, INDRE) con el algoritmo Clustal W y posteriormente se construyó el árbol filogenético de Neighbor Joining con una prueba bootstrap de 1000 réplicas (figura 15) en el que se determinó el genotipo Asia como causante del brote de Chikungunya en México. Además se construyó otro árbol filogenético en el cual sólo se incluyeron las muestras del LCE, para ver la similitud entre ellas (figura 16)

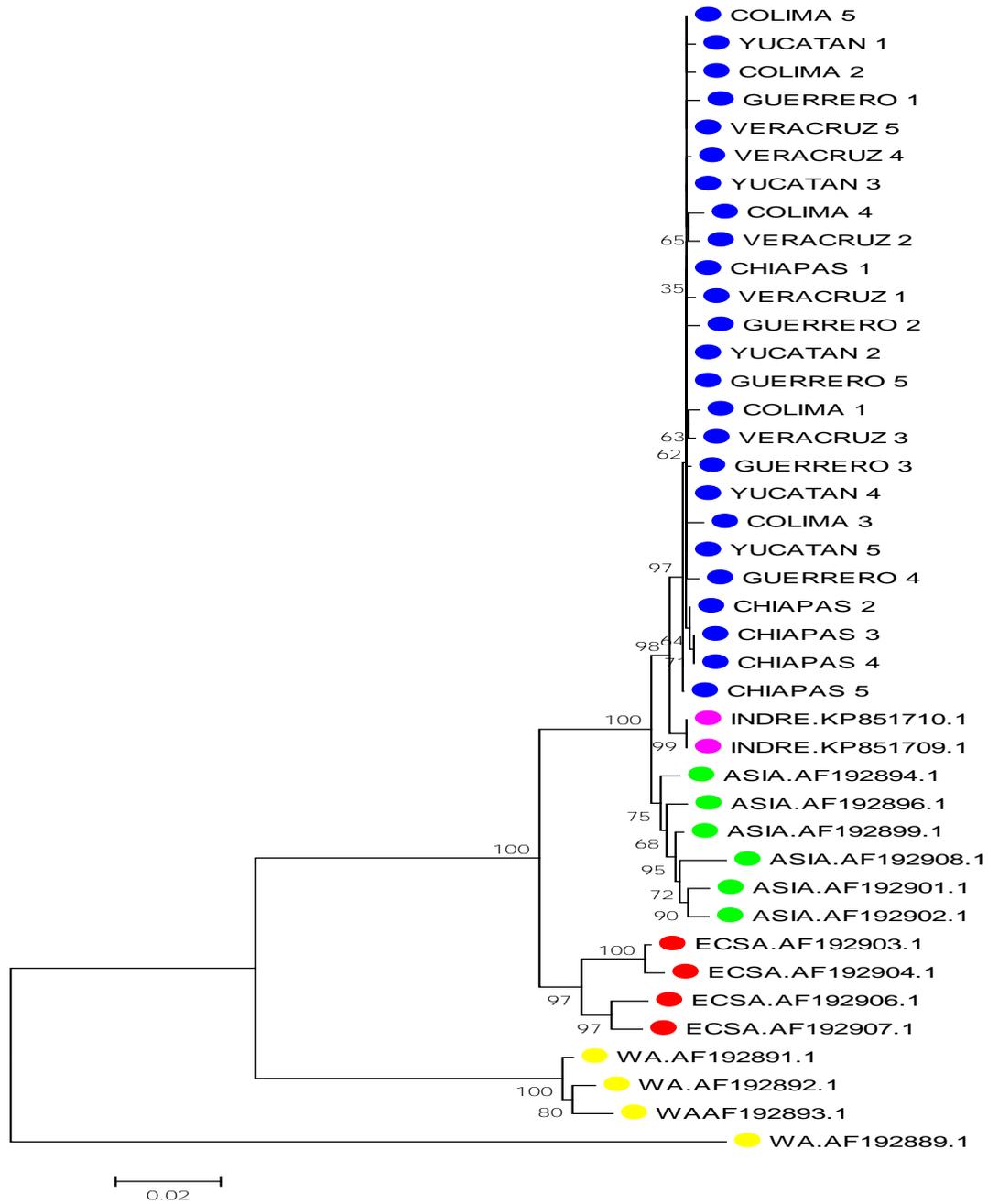


Figura 15. Árbol filogenético con los diversos genomas.

En azul se muestran las secuencias del LCE, en rosa las secuencias reportadas por el InDRE, en verde las secuencias correspondientes al genotipo Asia, en rojo las secuencias correspondientes al genotipo ECSA y en amarillo las secuencias correspondientes al genotipo WA.

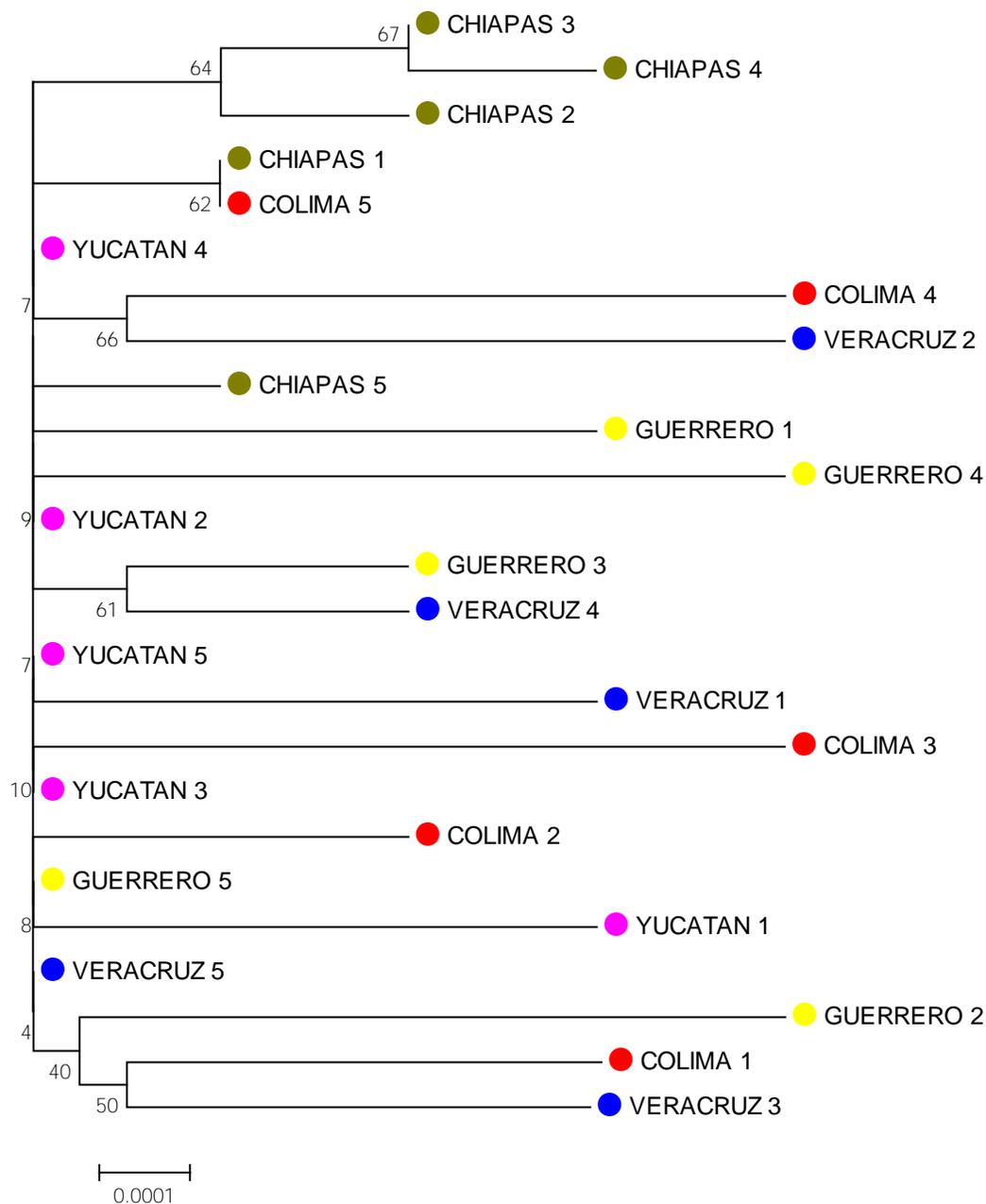


Figura 16. Árbol filogenético de las 25 secuencias analizadas.

En rojo se muestran las secuencias de Colima, en amarillo las secuencias de Guerrero, en verde las secuencias de Chiapas, en azul se muestran las secuencias de Veracruz y en rosa las secuencias de Yucatán.

### 8.12. Alineamientos

Una vez realizado el árbol filogenético, se realizó una nueva alineación con las secuencias del genotipo; Asia, InDRE y del LCE, utilizando el algoritmo Clustal W del programa Megalign, para encontrar las variaciones en sus secuencias (Figura

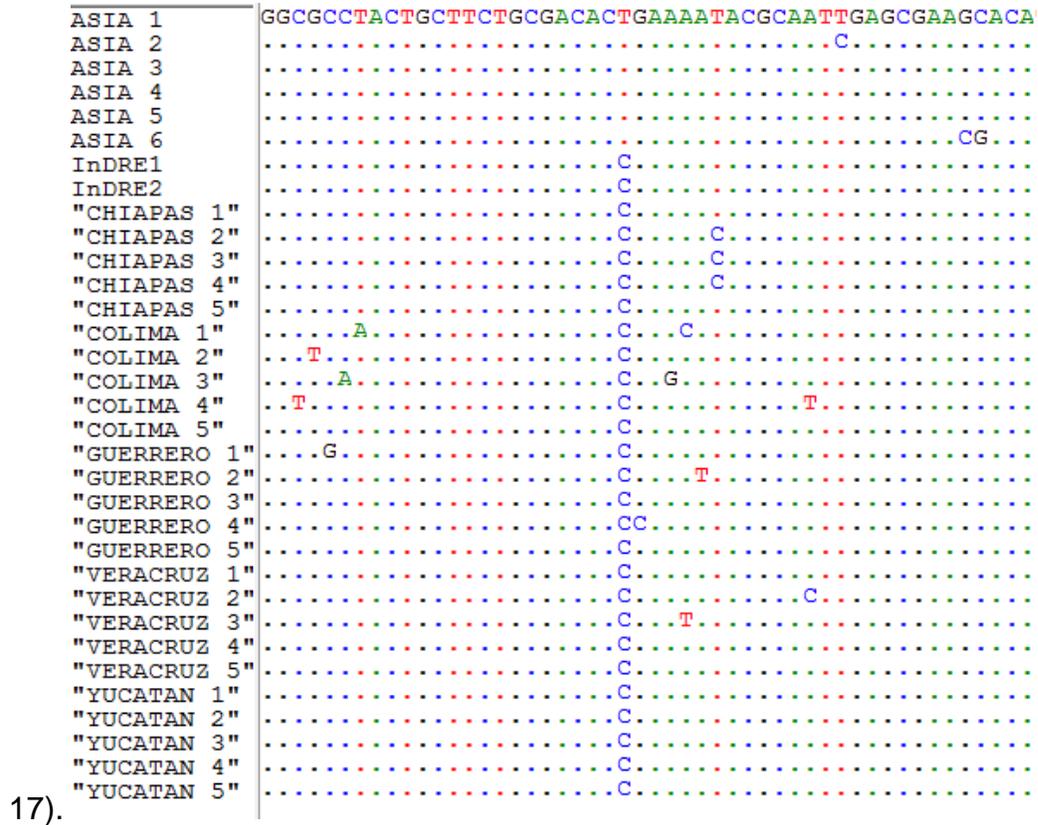


Figura 17. Alineamientos de las secuencias del genotipo Asia, del InDRE y del LCE

### 8.12.1. Mutaciones identificadas

#### Identificación del genotipo Asia en México

El análisis de la secuencia del gen E1 permitió determinar el genotipo Asia como el causante del primer brote de Chikungunya en México, además de verificar la ausencia de la mutación A226V en las muestras analizadas, sin embargo, se lograron identificar 7 cambios sinónimos y 2 cambios no sinónimos (tabla 6) (figura18 A-I).

Tabla 6. Mutaciones encontradas en el gen de la proteína E1.

<b>Nucleótido</b>	<b>Cambio nt</b>	<b>Cambio a.a.</b>	<b>Codón</b>
387	C-T	.	129
519	T-A	.	173
623	C-T	T-M	208
744	A-G	.	248
858	G-A	.	286
874	G-A	V-I	292
1057	T-C	.	353
1203	A-G	.	401
1250	T-C	.	417

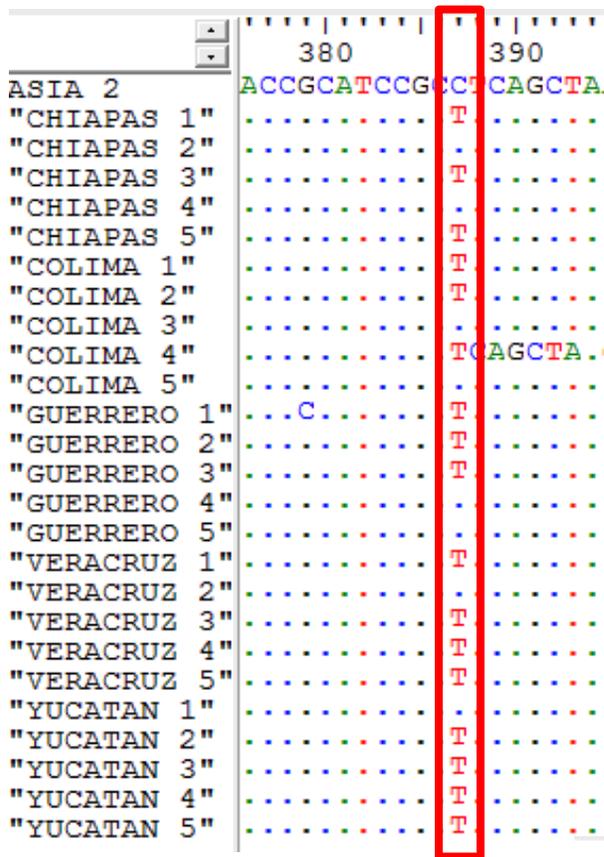
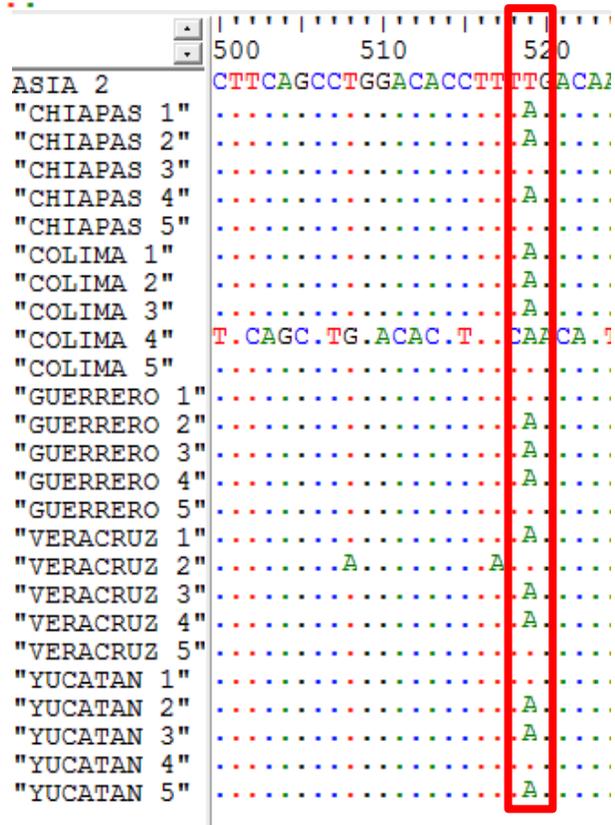


Figura 18 A. Cambio sinónimo encontrado en la posición 387, sustitución de Citosina por Timina en 17 de las 25 muestras del LCE

Figura 18 B. Cambio sinónimo encontrado en la posición 519, sustitución de Timina por Adenina en 16 de las 25 muestras del LCE.



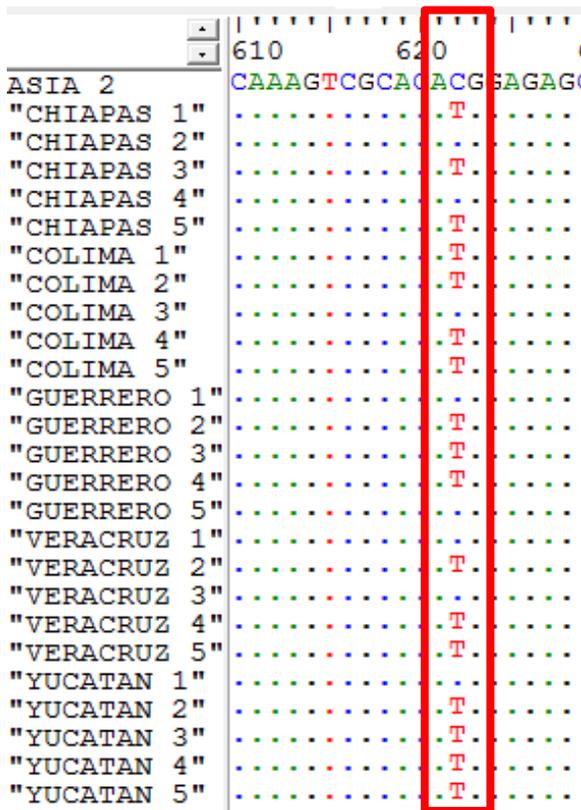
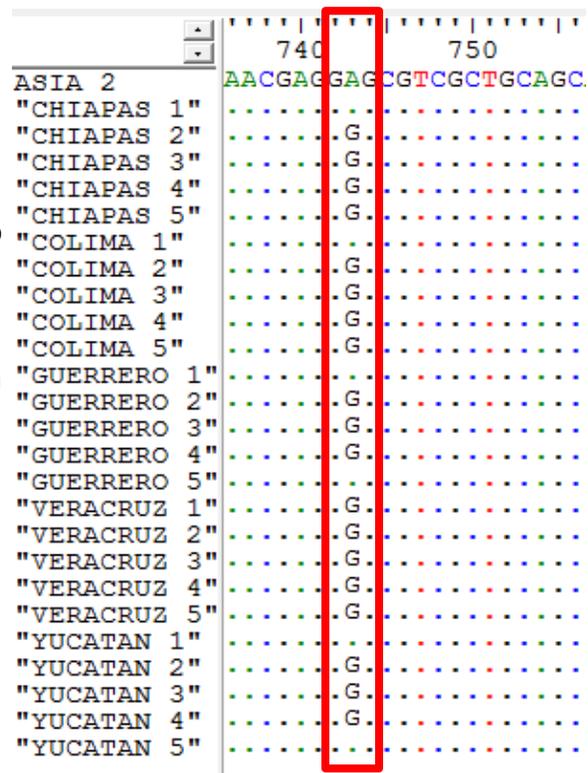


Figura 18-C. Cambio no sinónimo encontrado en la posición 623, sustitución de Citosina por Timina en 17 de las 25 muestras del LCE. Cambio de Treonina por Metionina a nivel de aminoácido (ACG-ATG)

Figura 18-D. Cambio sinónimo encontrado en la posición 744, sustitución de Adenina por Guanina en 19 de las 25 muestras del LCE.



	850	851
ASIA 2	A C C G G A C G C G G C G T T	
"CHIAPAS 1"	.....A.....	
"CHIAPAS 2"	.....A.....	
"CHIAPAS 3"	.....A.....	
"CHIAPAS 4"	.....A.....	
"CHIAPAS 5"	.....A.....	
"COLIMA 1"	.....A.....	
"COLIMA 2"	.....A.....	
"COLIMA 3"	.....A.....	
"COLIMA 4"	.....A.....	
"COLIMA 5"	.....A.....	
"GUERRERO 1"	.....A.....	
"GUERRERO 2"	.....A.....	
"GUERRERO 3"	.....A.....	
"GUERRERO 4"	.....A.....	
"GUERRERO 5"	.....A.....	
"VERACRUZ 1"	.....A.....	
"VERACRUZ 2"	.....A.....	
"VERACRUZ 3"	.....A.....	
"VERACRUZ 4"	.....A.....	
"VERACRUZ 5"	.....A.....	
"YUCATAN 1"	.....A.....	
"YUCATAN 2"	.....A.....	
"YUCATAN 3"	.....A.....	
"YUCATAN 4"	.....A.....	
"YUCATAN 5"	.....A.....	

Figura 18-E. Cambio sinónimo encontrado en la posición 858, sustitución de Guanina por Adenina en 19 de las 25 muestras del LCE.

Figura 18-F. Cambio no sinónimo encontrado en la posición 874, sustitución de Guanina por Adenina en 17 de las 25 muestras del LCE. Cambio de Valina por Isoleucina a nivel de aminoácido (GTC-ATC).

	870	871	872	880
ASIA 2	G G T C G T C G T C G C G C C A T			
"CHIAPAS 1"	.....A.....			
"CHIAPAS 2"	.....A.....			
"CHIAPAS 3"	.....A.....			
"CHIAPAS 4"	.....A.....			
"CHIAPAS 5"	.....A.....			
"COLIMA 1"	.....A.....			
"COLIMA 2"	.....A.....			
"COLIMA 3"	.....A.....			
"COLIMA 4"	.....A.....			
"COLIMA 5"	.....A.....			
"GUERRERO 1"	.....A.....			
"GUERRERO 2"	.....A.....			
"GUERRERO 3"	.....A.....			
"GUERRERO 4"	.....A.....			
"GUERRERO 5"	.....A.....			
"VERACRUZ 1"	.....A.....			
"VERACRUZ 2"	.....A.....			
"VERACRUZ 3"	.....A.....			
"VERACRUZ 4"	.....A.....			
"VERACRUZ 5"	.....A.....			
"YUCATAN 1"	.....A.....			
"YUCATAN 2"	.....A.....			
"YUCATAN 3"	.....A.....			
"YUCATAN 4"	.....A.....			
"YUCATAN 5"	.....A.....			

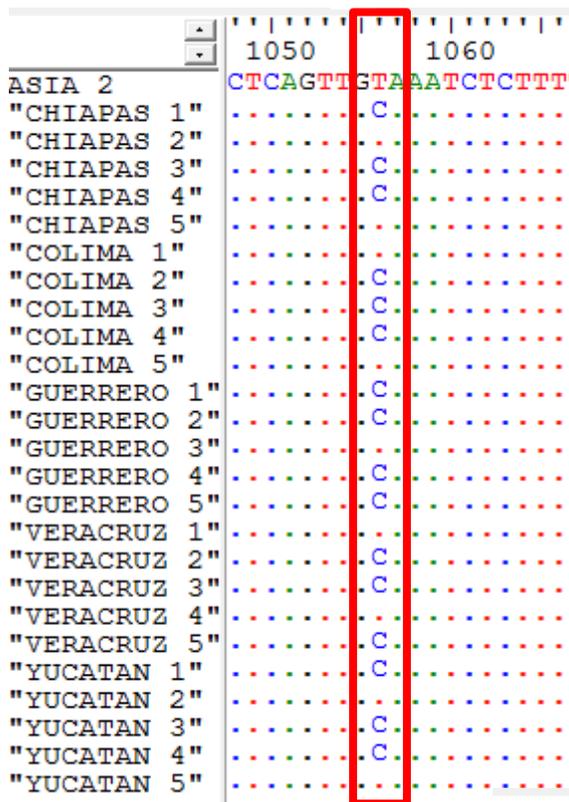
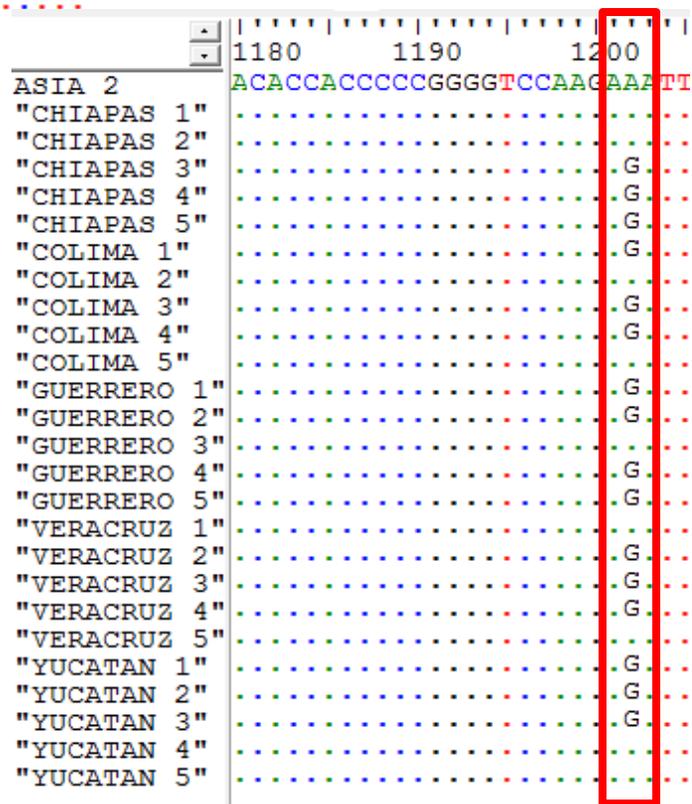


Figura 18-G. Cambio sinónimo encontrado en la posición 1057, sustitución de Timina por Citosina en 16 de las 25 muestras del LCE.

Figura 18-H. Cambio sinónimo encontrado en la posición 1203, sustitución de Adenina por Guanina en 16 de las 25 muestras del LCE.



	1230	1240	1250
ASIA 2	GCAG	AAGATCACGGGAGGT	TTGSACT
"CHIAPAS 1"	.	.	.
"CHIAPAS 2"	.	.	.C.
"CHIAPAS 3"	.	.	.C.
"CHIAPAS 4"	.	.	.
"CHIAPAS 5"	.	.	.C.
"COLIMA 1"	.	.	.
"COLIMA 2"	.	.	.C.
"COLIMA 3"	.	.	.
"COLIMA 4"	.	.	.C.
"COLIMA 5"	.	.	.C.
"GUERRERO 1"	.	.	.C.
"GUERRERO 2"	.	.	.
"GUERRERO 3"	.	.	.C.
"GUERRERO 4"	.	.	.C.
"GUERRERO 5"	.	.	.C.
"VERACRUZ 1"	.	.	.
"VERACRUZ 2"	.	.	.C.
"VERACRUZ 3"	.	.	.C.
"VERACRUZ 4"	.	.	.C.
"VERACRUZ 5"	.	.	.
"YUCATAN 1"	.	.	.C.
"YUCATAN 2"	.	.	.C.
"YUCATAN 3"	.	.	.C.
"YUCATAN 4"	.	.	.
"YUCATAN 5"	.	.	.C.

Figura 18-I. Cambio sinónimo encontrado en la posición 1250, sustitución de Timina por Citosina en 17 de las 25 muestras del LCE.

## 9. Discusión de resultados

La fiebre Chikungunya es un padecimiento originario del continente africano, ha provocado brotes en Asia, Europa y más recientemente en la región de las américas. En México los primeros casos se presentaron en octubre de 2014 y debido a las características ambientales y poblacionales del territorio mexicano, la fiebre de Chikungunya se está convirtiendo en un padecimiento endémico. Esto aunado a que en la última década se ha reportado la mutación A226V del genotipo ECSA, la cual se relaciona con una mayor capacidad de replicación del virus en el mosquito *A. albopictus* (26), lo cual representa un nuevo panorama de riesgo incluso en zonas templadas (27).

En este trabajo se analizaron los casos de 100 muestras positivas a Chikungunya, verificadas por *RT-qPCR*. Se obtuvieron datos epidemiológicos sobre su circulación y positividad, pero también, datos moleculares sobre su genotipo y variabilidad genética

En cuanto a los datos demográficos, la población en estudio estuvo constituida en un porcentaje mayor por mujeres entre 18 y 29 años (tabla 4). sin embargo, de acuerdo a lo reportado en otros trabajos (30) no parece existir un grupo etario que sea más susceptible a la infección. En las condiciones actuales del país debemos considerar que hasta antes de octubre del 2014, salvo casos excepcionales de personas que tuvieron contacto con el virus en algún otro país, el grueso de la

población presentaba un sistema inmunológico virgen a este virus, por lo que potencialmente cualquier individuo, sin importar género y edad podría infectarse.

Con respecto a los síntomas observados, se encontró principalmente: fiebre (100%), mialgias (96%), artralgias (96%), cefalea (80%), artritis (76%) y dolor retro ocular (60%) (Tabla 5), estos valores son similares a los que se reportan en Estados Unidos donde de igual manera, la fiebre es el síntoma principal (100%) seguido de artralgias con un 84.6 % (31). La poca variabilidad en la sintomatología representa un arma de doble filo, ya que, si bien ayuda a realizar una sospecha clínica de manera más sensible, es poco específica cuando se trata de diferenciarla de infecciones por otros arbovirus como Dengue y Zika. Es debido a esta situación que se requieren técnicas de laboratorio confirmatorias, las cuales puedan identificar la presencia de estos virus ya sea en la fase aguda utilizando *RT-qPCR* o en la fase convaleciente con técnicas que identifican la presencia de anticuerpos como es la técnica de ELISA.

En cuanto a la distribución geográfica del virus, se ha observado que se puede presentar en climas tropicales y sub tropicales, lo que explica la distribución de los casos analizados en este estudio, ya que la gran mayoría que provienen de los estados de la Republica que presentan este tipo de climas como es el caso de Colima (24), Guerrero (20), Yucatán (17), Veracruz (16), Chiapas (12), Oaxaca (7), Ciudad de México (2) y Quintana Roo (2).

En cuanto a la temporalidad del brote, los primeros casos se presentaron en los estados de Chiapas y Guerrero (figura 10 A), lo cual nos permite hipotetizar sobre la ruta que siguió el virus para llegar a nuestro país, ya que antes de que se detectaran los primeros casos de transmisión autóctona en México, la organización mundial de la salud había reportado brotes en la zona del caribe (al este del estado de Yucatán) pero también en Guatemala (al norte con el estado de Chiapas) por lo que de acuerdo a los datos parece más probable que el virus haya ingresado al país por la frontera con Guatemala.

Una vez en el territorio mexicano, el virus se dispersó a los estados de Oaxaca y Colima (figura 10 B), posteriormente a Veracruz, Yucatán y Ciudad de México (figura 10 C), aquí es importante resaltar que los casos de la ciudad de México se consideran importados ya que los pacientes tenían antecedentes de viaje, y por último se registró la presencia del Virus en el estado de Quintana Roo (figura 10 D).

Al observar los datos de número de casos por estado y de la temporalidad del brote podemos percatarnos que estos datos no coinciden, es decir, el estado de Chiapas que fue en el que se detectaron los primeros casos no es el que presenta la mayor frecuencia, sin embargo, esto no necesariamente debería ser así, ya que el número de casos en cada punto donde el virus ha sido introducido puede ser afectado por varios factores como son las condiciones ambientales, densidad de población y acciones del sector salud por citar algunas, por lo que a pesar de que el tiempo de

exposición es un factor a tomar en cuenta no puede explicar por si solo la incidencia de la enfermedad.

Otro factor que podría influir en la incidencia de casos es la variabilidad genética entre las cepas que se presentan en cada estado, con esta premisa se analizaron por secuenciación 5 cepas de los 5 estados con mayor circulación del virus

Para su análisis se amplificó la región de la proteína E1 purificando las muestras en geles de agarosa y fueron secuenciadas por electroforesis capilar tipo Sanger, realizando un análisis filogenético junto con cepas de Asia, WA y ECSA, reportadas en el NCBI, en lo cual es importante mencionar que los softwares utilizados (Megaalign, Bioedit y Mega6) fueron de gran ayuda en el análisis evolutivo (35).

Las secuencias fueron alineadas utilizando el algoritmo Clustal W. Con el método de Neighbor Joining (36). El porcentaje de árboles replicados en la prueba de arranque fue de (10000 repeticiones). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Máxima Verosimilitud (37). Encontrando solamente una cepa circulante en México que deriva del Genotipo Asia, esto lo vemos en el árbol filogenético (figura 15) debido a su homología y cercanía que presentan al agruparse también con las cepas del InDRE. Además se puede observar en la (figura 16) que las cepas del LCE no presentan tanta variabilidad, pero las que se encuentran mejor conservadas son las del estado de Chiapas en la (figura 16), que fue el primer estado en el que se reportaron los casos de Chikungunya junto con el estado de Guerrero. Sin embargo, en Guerrero no se muestran tan conservadas las

cepas como en el de Chiapas por lo que se puede decir que el brote entró por el estado de Chiapas distribuyéndose a los demás estados por sus múltiples infecciones y con el transcurso del tiempo, llegando con un poco de variabilidad entre ellas, como se puede ver en la (figura 16). Además, Colima que fue el estado con más casos reportados pero con mayor variabilidad entre las muestras analizadas, se refleja lo antes mencionado a pesar de que se reportaron casos desde el segundo trimestre debido al tiempo, distancia y forma que llegó al estado. Por otro lado en las muestras analizadas no se encontró la mutación A226V la cual se ha reportado solamente en cepas del genotipo ECSA, por lo que se sospecha que la distribución del virus se mantiene desde el Caribe con ligeras variaciones (38).

Sin embargo, durante el análisis se observaron nueve cambios en la secuencia de la proteína E1, de los cuales dos son cambios no sinónimos que no se han reportado en los nucleótidos 623 y 874 de Treonina por Metionina en el codón 208 y Valina por Isoleucina en el codón 292 respectivamente, aunque no se ha esclarecido su impacto en el Virus de Chikungunya. Las podemos contrastar con mutaciones reportadas en codones adyacentes como la mutación V291I de la india 2008-2013 la cual se asocia con una mayor citopatogenicidad en células HEK293 Vero (39) o la mutación Q352R de RD del Congo (40) que no se ha asociado aun a alguna patología pero son mutaciones que se han reportado en codones adyacentes y pueden tener algún impacto en el virus. Respecto a las demás mutaciones observadas durante el estudio, no se han encontrado casos reportados en las

misma posiciones, sin embargo hay mutaciones ya reportadas que son cercanas a las observadas en el estudio, pero no se les ha asociado a alguna característica patológica, como es el caso de la mutación D284E de la India, cercana a la posición 286 de la mutación encontrada en el estudio, otro caso es la mutación L242V RD del Congo (40) y S250P de China reportada en el 2010 (41) que son las más cercanas a la mutación en la posición 248, pero de igual manera no se ha asociado con alguna característica del virus. Por lo que es necesario hacer más pruebas para asociar las mutaciones encontradas con riesgos patológicos que pudiera presentar el virus.

## **10. Conclusiones**

Este estudio contribuye a los datos internacionales que indican que México es uno de los territorios en los que circula el virus de Chikungunya, pero adicionalmente se apreció que las cepas que se encontraron en el país, pertenecen al genotipo asiático, en las que se observó poca variabilidad entre las cepas de los diferentes estados de la República, manteniéndose mejor conservadas las del estado de Chiapas, donde se presume que inició el brote de Chikungunya.

Además, en el análisis de las muestras, se observó la presencia de nueve mutaciones no reportadas, de las cuales dos son mutaciones no sinónimo en los nucleótidos 623 y 874, las cuales no se han asociado a alguna patología.

Finalmente, se descartó la presencia de la mutación A226V en el territorio mexicano, la cual solo se ha presentado en el genotipo ECSA.

## 11. Referencias

1. Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* 2007 May;7(5):319-27.
2. Ross RW. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond)* 1956 Jun;54(2):177-91.
3. Caglioti C, Lalle E, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordi L. Chikungunya virus infection: an overview. *New Microbiol* 2013 Jul;36(3):211-27.
4. Tsetsarkin KA, Chen R, Yun R, Rossi SL, Plante KS, Guerbois M, et al. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nat Commun* 2014;5:4084.
5. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res* 2015 May 12;120:32-9.

6. Organización Panamericana de la Salud. Chikungunya: un nuevo virus en la región de las Américas. 24-4-2015. 15-7-2015.
7. Lohachanakul J, Phuklia W, Thannagith M, Thongsakulprasert T, Smith DR, Ubol S. Differences in response of primary human myoblasts to infection with recent epidemic strains of Chikungunya virus isolated from patients with and without myalgia. *J Med Virol* 2015 May;87(5):733-9.
8. Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses--an overview. *Nat Rev Rheumatol* 2012 Jul;8(7):420-9.
9. Gerardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. *PLoS Med* 2008 Mar 18;5(3):e60.
10. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 1994 Sep;58(3):491-562.
11. Niyas KP, Abraham R, Unnikrishnan RN, Mathew T, Nair S, Manakkadan A, et al. Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical

- samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. *Virol J* 2010;7:189.
12. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology* 2009 Oct 25;393(2):183-97.
13. Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 2010 Dec 2;468(7324):709-12.
14. Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol* 2000 Feb;81(Pt 2):471-9.
15. Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, et al. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 2007;2(11):e1168.
16. Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, de L, X. Chikungunya in the Americas. *Lancet* 2014 Feb 8;383(9916):514.

17. Leung JY, Ng MM, Chu JJ. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. *Adv Virol* 2011;2011:249640.
18. Lum FM, Ng LF. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res* 2015 Jun 16;120:165-74.
19. Morrison TE. Reemergence of chikungunya virus. *J Virol* 2014 Oct;88(20):11644-7.
20. Organización Panamericana de la Salud. Países/territorios con transmisión autóctona o casos importados de Chikungunya en las Américas, SE40, 2014. 3-10-2014. 29-4-2016.
21. Organización Panamericana de la Salud. Número de casos de Fiebre Chikungunya en las Américas 2013-2015. 24-4-2015. 15-7-2015
22. Secretaría de Salud. Boletín Epidemiológico. 20-6-2015. 15-7-2015.
23. Troribio L. (Confirman 458 casos de chikungunya en el país). *Excelsior Mex* 2015 abril.

24. Rivera-Avila RC. [Chikungunya fever in Mexico: confirmed case and notes on the epidemiologic response]. *Salud Publica Mex* 2014 Jul;56(4):402-4.
25. Dirección General de Epidemiología. Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico por Laboratorio de Fiebre Chikungunya. 25-11-2014. 15-7-2015.
26. Zeller H, Van Bortel W, Sudre B. Chikungunya: Its History in Africa and its Spread to New Regions in 2013-2014. 2016 Dic. 214(5)436-440
27. Manore CA, Ostfeld RS, Agosto FB, et al.. Defining the Risk of Zika and Chikungunya Virus Transmission in Human Population Centers of the Eastern United States. 2017. 11 (1)
28. Sissoko D, Malvy D, Ezzedine k. et al. Enfermedad de Chikungunya Pierre V. Post-epidemia: caso de manifestaciones reumáticas y factores asociados a más de 15 meses. 2009; 3 (3) 10.1371 / 89
29. Schilte C, F. Staikowsky, Couderc T, et al. Chikungunya artralgia a largo plazo asociada al virus: estudio prospectivo longitudinal a 36 meses 2013; 7 (3):
30. Ali Ou Alla S., B. Combe arthritis después de la infección con el virus de Chikungunya. *Mejor Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2011; 25 (3): 337-346.

31. Goupil BA, Mores CN A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. 2016 NOV. 30(10) 129-140
32. Rochlin I, Ninivaggi D, V. Hutchinson M, L. Cambio climático y rango de expansión del mosquito tigre (*Aedes albopictus*) en el noreste de EE.UU: implicaciones para los profesionales de la salud. 2016.
33. Bartlett-Healy K, Unlu I, Obenauer P, Hughes T, et al. larvas de mosquito, Hábitat Utilización y dinámica de la comunidad de *Aedes albopictus* y *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae). 2012. 49: 813-824.
34. LaDeau SL, Leisnham PT, Biehler D, et al. Mosquito Superior de Producción en barrios de bajos ingresos de Baltimore y Washington, DC: Controladores ecológicos Comprensión y transmitidas por mosquitos riesgo de enfermedad en las ciudades de clima templado. 2013 Revista Internacional de Investigación del Medio Ambiente y la Salud Pública 10: 1505-1526
35. Tamura K, G Stecher, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular Evolutiva Genética Análisis versión 6.0. Molecular Biology and Evolution. 2013; 30:2725-29.

36. Saitou N, Nei M. El método del vecino en particular: Un nuevo método para la reconstrucción de árboles filogenéticos. *Molecular Biology and Evolution*. 1987; 4 : 406-25
37. Tamura K, M Nei, Kumar S. Las perspectivas para inferir filogenias muy grandes usando el método de vecino a participar. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias (EE.UU.)* 2004; 101 : 11030-35.
38. Yactayo S, Grapas JE, Millot V, et al. J infect Dis. Epidemiología de Chikungunya en las Américas. 2016 dic. 213 (5) 441-445.
39. Abraham R, Manakkadan A, Mudaliar P, et al. Correlation of phylogenetic clade diversification and in vitro infectivity differences among Cosmopolitan genotype strains of Chikungunya virus. *Infect Genet Evol* 2016 Jan;37:174-84.
40. Tong JC, Simarmata D, Lin RT. HLA class I restriction as a possible driving force for Chikungunya evolution. *PLoS One* 2010;5(2).
41. Wu D, Zhang Y, Zhouhui Q, et al. Chikungunya virus with E1-A226V mutation causing two outbreaks in 2010. 2013;10:174.