



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETECCIÓN DE VIRUS DEL ZIKA Y BETA-
GLOBINA EN MUESTRAS DE SUERO UTILIZANDO
PCR TIEMPO REAL Y CURVAS DE DISOCIACIÓN
DE ALTA RESOLUCIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

NÉSTOR RICARDO MORALES CASTELÁN



**DIRECTOR DE TESIS
DR. EDGAR ENRIQUE SEVILLA REYES**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2017



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. DATOS DEL ALUMNO

Apellido paterno: Morales
Apellido materno: Castelán
Nombres: Néstor Ricardo
Teléfono: 55 2813 7444
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera: Biología
Número de cuenta: 308294466

2. DATOS DEL TUTOR

Grado: Dr.
Nombres: Edgar Enrique
Apellido paterno: Sevilla
Apellido materno: Reyes

3. DATOS DEL SINODAL 1

Grado: Dra.
Nombres: Luisa Alvarina
Apellido paterno: Alba
Apellido materno: Lois

4. DATOS DEL SINODAL 2

Grado: Dra.
Nombres: Ana María
Apellido paterno: Velasco
Apellido materno: Velasco

5. DATOS DEL SINODAL 3

Grado: Dra.
Nombres: Rosa Elena
Apellido paterno: Sarmiento
Apellido materno: Silva

6. DATOS DEL SINODAL 4

Grado: Biól.
Nombres: Saúl
Apellido paterno: Cano
Apellido materno: Colín

7. DATOS DEL TRABAJO ESCRITO

Título: Detección de virus del zika y beta globina en muestras de suero utilizando PCR tiempo real y curvas de disociación de alta resolución
Número de páginas: 77
Año: 2017

AGRADECIMIENTOS

A la vida, que además de ser tan pródiga conmigo, me hizo coincidir con muchas personas que me han servido de ejemplo a seguir y con otras tantas que me han mostrado lo que no quiero llegar a ser.

A la UNAM, que durante 9 años me ha brindado las herramientas necesarias para lograr mi desarrollo en lo profesional y lo personal.

Al INER, por abrirme las puertas para realizar esta tesis, a los integrantes del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) por toda la amabilidad y ayuda recibida durante mi estancia.

A la Red temática INMUNOCANEI-Conacyt, por el apoyo recibido.

Gracias a mi tutor, el Dr. Edgar Enrique Sevilla Reyes, por la confianza que depositó en mí al incluirme en su equipo de trabajo y por permitirme aprender tanto de él.

Gracias a la Q.F.B. Elvira Piten Isidro, por su invaluable ayuda durante la fase experimental de la tesis, durante la cual, me tuvo más paciencia de la que merecía.

Gracias al Q.F.B.T. José Eduardo Márquez García, por su apoyo en la secuenciación, sin el cual se hubiera retrasado considerablemente esta tesis.

Gracias a los miembros de jurado por su tiempo y observaciones, en particular a la Dra. Luisa Alvarina Alba Lois, por toda su ayuda durante esta última etapa.

Al grupo Nighthwolf, por ayudarme a encontrar un equilibrio entre lo mental, lo físico y lo humano, es un honor contarme entre ustedes.

A Enrique, por una amistad a prueba de tiempo, que en lugar de quedar estancada, mejora con los años.

A mis amigos del CCH Naucalpan, a "Alex" por su amistad sincera, que le permite decir esas cosas que no quiero escuchar o aceptar; a Bernardo, cuya forma de pensar y actuar permitió que hiciéramos amistad casi al momento de conocernos, una amistad que ha resistido múltiples pruebas a lo largo de los años.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, en especial a Gaby "bioloca", quien me insistió en la conveniencia de titularse por tesis. Gracias por convencerme de no tomar el camino fácil, una vez más el tiempo te dio la razón.

A mis padres, que además de darme la vida siempre me han dado un apoyo incondicional; espero haber aprendido de su carácter, tenacidad, voluntad y experiencia, que me sirven de inspiración. Estoy orgulloso de tener unos padres como ustedes.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	IX
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Características generales del virus del Zika.....	2
2.2 Origen geográfico y distribución del virus del Zika	2
2.2.1 Virus del Zika en América	3
2.3 Transmisión del virus del Zika	4
2.3.1 Transmisión mediada por vector	4
2.3.2 Transmisión no mediada por vector	6
2.4 Infección por virus del Zika.....	7
2.5 Filogenia del virus del Zika	8
2.6 Diagnóstico de infección por virus del Zika.....	8
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo general.....	11
3.2 Objetivos particulares	11
4. JUSTIFICACIÓN.....	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
5.1 Diseño de oligos para la PCR	12
5.2 Toma de muestra de sangre y obtención del panel de sueros sanguíneos	12
5.3 Extracción de RNA viral	13
5.4 Construcción, clonación, recuperación, cuantificación y dilución de plásmidos	14
5.5 Electroforesis en gel de agarosa y extracción de DNA del gel	16
5.6 Secuenciación de los productos amplificados.....	18
5.7 Protocolo para la detección de RNA del virus del Zika.....	18
5.8 Determinación del límite de detección y eficiencia de la qPCR	19
5.9 Verificación de especificidad de primers para virus del Zika	20
5.10 Elección del control interno y optimización de su amplificación.....	21
5.11 Análisis del panel de sueros sanguíneos de Santa María Mixtequilla.....	22

6. RESULTADOS	24
6.1 Diseño de primers Zi2 F/R	24
6.2 Cuantificación y dilución de plásmido control	26
6.3 Determinación del límite de detección y eficiencia de reacción	29
6.4 Especificidad de los primers Zi2 F/R	30
6.5 Elección del gen constitutivo como control interno	31
6.6. Comparación con otros ensayos de qPCR para virus del Zika	37
6.7. Análisis del panel de sueros de Mixtequilla	38
7. DISCUSIÓN	42
7.1. Detección de ZIKV	42
7.2. Amplificación de β -globina con los primers RPC041F/EX02R	44
7.3 Protocolo para la detección de ZIKV y β -globina	46
8. CONCLUSIONES	47
9. LITERATURA CITADA	48
ANEXO 1	61
ANEXO 2	62
ANEXO 3	64
ANEXO 4	65
ANEXO 5	68
ANEXO 6	71
GLOSARIO	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma del ZIKV.....	2
Figura 2. Ciclos de transmisión mediada por vector.....	5
Figura 3. Algoritmo diagnóstico de DENV y su vigilancia epidemiológica en México.....	9
Figura 4. Diagrama de flujo de extracción de RNA de suero sanguíneo de pacientes y fibroblastos en cultivo.....	13
Figura 5. Diagrama de flujo de recuperación de plásmidos utilizando el kit QIAprep Miniprep (QIAGEN).....	16
Figura 6. Diagrama de flujo de la extracción del producto de PCR en gel de agarosa.....	17
Figura 7. Fórmula para calcular eficiencia de ensayos de una qPCR.....	20
Figura 8. Secuencias diferenciales de ZIKV para Zi2 R.....	24
Figura 9. Alineación de secuencias de flavivirus diferenciales y Zi2 F.....	25
Figura 10. Alineación de secuencias de flavivirus diferenciales y Zi2 R.....	25
Figura 11. Tm teórica del producto de Zi2 F/R.....	26
Figura 12. HRM de plásmido pZ551 y cultivo de ZIKV.....	27
Figura 13. Tamaño del producto de la PCR con los primers Zi2 F/R de pZ551 y ZIKV en cultivo.....	27
Figura 14. Secuencia KX856011.1 comparada con inserto control en pZ551.....	28
Figura 15. Curva estándar de Zi2 F/R.....	29
Figura 16. Cq obtenidos graficados contra copias de plásmido por reacción.....	30
Figura 17. HRM de productos de qPCR de flavivirus diferenciales y ZIKV.....	31
Figura 18. Diagrama de la ubicación de RPC041F y EX02R en el gen de β -globina.....	33
Figura 19. Gel con producto de los primers RPC041F/EX02R de RNA de fibroblastos humanos en cultivo primario.....	34
Figura 20. HRM del producto de RPC041F/EX02R.....	35
Figura 21. Electroforesis del producto de la qPCR de RPC041 y EX02R con RNA de fibroblastos humanos en cultivo primario.....	35
Figura 22. Producto teórico y experimental de β -globina.....	36
Figura 23. HRM de productos de RPC041F/EX02R.....	36
Figura 24. Curva de disociación de suero 519.....	38
Figura 25. Secuencia de ZIKV del suero 527.....	39
Figura 26. HRM de productos inespecíficos de ZIKV1086/ZIKV1162c.....	40
Figura 27. Diagrama de flujo del protocolo para el diagnóstico de ZIKV.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias utilizadas para evaluar la especificidad teórica de los primers Zi2 F/R.	12
Tabla 2. Reacción de PCR punto final.	14
Tabla 3. Reacción de ligación.	14
Tabla 4. Reacción de secuenciación.	18
Tabla 5. Condiciones de ciclado y termociclador utilizados para la reacción de secuenciación.	18
Tabla 6. Equipo, kit, volumen y condiciones de reacción utilizados durante el protocolo.	19
Tabla 7. Reacción de RT-PCR para determinar el límite de detección y la eficiencia de reacción.	20
Tabla 8. Reacción de qPCR-HRM para determinar el límite de detección y la eficiencia de reacción.	20
Tabla 9. Reacción de RT-PCR durante la verificación de especificidad de Zi2 F/R.	20
Tabla 10. Reacción de qPCR-HRM durante la verificación de especificidad de Zi2 F/R.	21
Tabla 11. Concentraciones finales de primers evaluadas.	21
Tabla 12. Reacción de RT-PCR durante ensayos con material genético de fibroblastos humanos. .	21
Tabla 13. Reacción de qPCR-HRM durante ensayos con material genético de fibroblastos humanos.	21
Tabla 14. Reacción de RT-PCR con RNA de 10 sueros sanguíneos.	22
Tabla 15. Reacción de qPCR-HRM con RNA de 10 sueros sanguíneos.	22
Tabla 16. Reacciones de RT-PCR para el análisis de sueros sanguíneos de Mixtequilla.	23
Tabla 17. Reacciones de qPCR-HRM para el análisis de sueros sanguíneos de Mixtequilla.	23
Tabla 18. Primers para la amplificación específica de ZIKV.	24
Tabla 19. Lecturas del NanoDrop 1000 para el plásmido control.	26
Tabla 20. Primers reportados para detectar CI en qPCR utilizando material genético encontrado en suero sanguíneo.	32
Tabla 21. Primers para amplificar β -globina.	33
Tabla 22. Tamaño y Tm teóricos según la naturaleza del β -globina amplificado.	33
Tabla 23. Cq con distintas concentraciones de primers RPC041F/EX02R en ensayos con RNA de fibroblastos humanos en cultivo primario.	34
Tabla 24. Comparación de ensayos específicos para la detección de ZIKV.	37
Tabla 25. Comparación de resultados del InDRE y el protocolo estandarizado en esta tesis.	39
Tabla 26. Secuencias de ZIKV para evaluación de cobertura de primers Zi2F/R.	62
Tabla 27. ΔG máxima de los primers utilizados en el protocolo.	64
Tabla 28. ΔG durante la formación de dímeros de primers.	64
Tabla 29. Virus no amplificados por los ensayos para la detección de ZIKV.	65
Tabla 30. Límite de detección reportado por los autores originales de los ensayos y por Corman y colaboradores.	67
Tabla 31. Resultados por muestra del panel de Santa María Mixtequilla.	68
Tabla 32. Secuencias humanas con identidad del 100% al extremo 3' de ZIKV1086.	71
Tabla 33. Secuencias humanas con identidad del 100% al extremo 3' de ZIKV1162c.	73
Tabla 34. Secuencias de DENV con identidad del 94.11% al primer ZIKV1086.	74

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A		adenina
C		citosa
CHIKV	(chikungunya virus)	virus del chikungunya
CI		control interno
Cq	(<i>cycle of quantification</i>)	ciclo de cuantificación
DENV	(dengue virus)	virus del dengue
DENV-1		serotipo 1 del virus del dengue
DENV-2		serotipo 2 del virus del dengue
DENV-3		serotipo 3 del virus del dengue
DENV-4		serotipo 4 del virus del dengue
DGE		Dirección General de Epidemiología
DNA	(<i>deoxyribonucleic acid</i>)	ácido desoxirribonucleico
ds	(<i>double strand</i>)	doble cadena
ELISA	(<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
F	(<i>forward primer</i>)	iniciador en sentido
FIOCRUZ		Fundación Oswaldo Cruz
G		guanina
GAPDH		gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HRM	(<i>high resolution melting</i>)	disociación del DNA de alta resolución
ID	(<i>identification</i>)	identificación
InDRE		Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
INER		Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
K		guanina o timina
LB		Luria-Bertani
min		minuto

mRNA	(messenger RNA)	RNA mensajero
NCR	(<i>noncoding region</i>)	región no codificante
NS	(<i>nonstructural protein</i>)	proteína no estructural
NTC	(<i>no template control</i>)	control sin material genético
N/E		no evaluado
OMS		Organización Mundial de la Salud
OPS		Organización Panamericana de la Salud
pb		pares de bases
PCR	(<i>polymerase chain reaction</i>)	reacción en cadena de la polimerasa
PFU	(<i>plaque-forming unit</i>)	unidad formadora de placa
qPCR		reacción en cadena de la polimerasa tiempo real
QCMD	(<i>Quality Control for Molecular Diagnostics</i>)	Control de calidad para diagnósticos moleculares
r		purina
R	(<i>reverse primer</i>)	iniciador antisentido
RNA	(<i>ribonucleic acid</i>)	ácido ribonucleico
rpm		revoluciones por minuto
RT	(<i>reverse transcription</i>)	transcripción reversa
S		citocina o guanina
s		segundos
SiNaVE		Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
S.O.C.	(<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>)	Medio súper óptimo con represión de catabolitos
SSa		Secretaría de Salud
T		timina
TBE		Tris-borato-EDTA
TE		Tris-EDTA

T _m	(<i>melting temperature</i>)	temperatura de disociación
WNV	(West Nile virus)	virus del oeste del Nilo
Y		pirimidina
YFV	(yellow fever virus)	virus de la fiebre amarilla
ZIKV	(Zika virus)	virus del Zika
λ		longitud de onda

DetECCIÓN DE VIRUS DEL ZIKA Y β -GLOBINA EN MUESTRAS DE SUERO UTILIZANDO PCR TIEMPO REAL Y CURVAS DE DISOCIACIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN

1. RESUMEN

“La simplicidad es el grado máximo de sofisticación”.
Frase atribuida a Leonardo da Vinci

El virus del Zika (ZIKV) es un flavivirus descrito en el año 1947, que a partir del 2007 ha producido una serie de epidemias en islas del Pacífico y en América continental. El ZIKV se transmite, principalmente, por picaduras de mosquito (los cuales son su vector), pero se ha reportado también por transmisiones sexual, sanguínea, congénita y perinatal, incluida la lactancia. La mayoría de las infecciones son asintomáticas o leves, pero en raros casos se presentan complicaciones de tipo neurológico.

El diagnóstico de la infección por flavivirus se realiza, tradicionalmente, por pruebas serológicas, pero las reacciones cruzadas entre antígenos y anticuerpos con varios miembros del género complica el diagnóstico en áreas con circulación de flavivirus endémicos, convirtiendo a las técnicas moleculares en poderosas herramientas de diagnóstico. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) es compatible con otras tecnologías, como las curvas de disociación de DNA de alta resolución (HRM), lo que reduce el riesgo de contaminación y tiempo necesarios para el diagnóstico.

En esta tesis se reporta un protocolo de técnicas moleculares para la detección de ZIKV en suero sanguíneo, acoplado a la amplificación de un fragmento del gen codificante de la subunidad β de la hemoglobina del hospedero como control interno (CI). Con este protocolo se evaluó un panel de sueros de la región del istmo de Tehuantepec en el estado de Oaxaca, con circulación de ZIKV y virus de dengue (DENV).

La evaluación de este ensayo fue favorable al compararse con otros reportados en la literatura para ZIKV, reduciendo el número de falsos negativos al incluir la detección de β -globina como CI.

2. INTRODUCCIÓN

"Ni aun el genio más grande llegaría muy lejos si tuviera que sacarlo todo de su propio interior".
Johann Wolfgang von Goethe

2.1 Características generales del virus del Zika

El ZIKV es un virus emergente (Holland, 1998) del que se conocía poco hasta años recientes. Se clasifica dentro del género *Flavivirus* que está subscrito a la familia *Flaviviridae*, el cual abarca al menos 53 especies de virus (Grard *et al.*, 2010). Los virus de esta familia presentan envoltura, tienen simetría icosaédrica (Lindenbach y Rice, 2003) y pertenecen a la clase IV de Baltimore (Baltimore, 1971). El genoma de ZIKV consiste en una cadena de RNA de polaridad positiva que tiene una longitud de 10,794 nucleótidos y contiene dos regiones no codificantes (5' NCR y 3' NCR), las cuales flanquean un único marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína con longitud de 3,419 residuos de aminoácidos. Este polipéptido es procesado por proteasas virales y del hospedero para generar 3 proteínas estructurales: cápside, membrana (M) y envoltura (E); y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Kuno y Chang, 2007) (Figura 1).

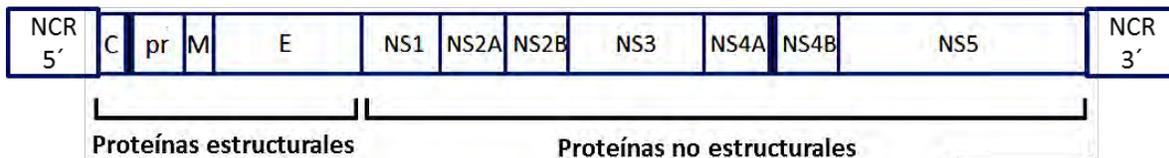


Figura 1. Genoma del ZIKV.

C: cápside. prM: precursor de membrana. M: proteína de membrana. E: envoltura. NS1: involucrada en las primeras fases de la replicación viral. NS2A: replicación y ensamblaje viral, antagonista del interferón. NS2B: coenzima de NS3. NS3: procesamiento de la poliproteína, replicación viral. NS4A: papel en la replicación de ácido ribonucleico (RNA) viral, coenzima de NS3, antagonista del interferón. NS4B: papel en la replicación de RNA, antagonista del interferón. NS5: RNA polimerasa dependiente de RNA (Knipe y Howley, 2007). (El diagrama no se encuentra a escala)

El virión de ZIKV consiste de una envoltura lipídica y una nucleocápside. En la envoltura se encuentran dos proteínas virales: la proteína E, que es el principal componente de la envoltura viral y está involucrada en la unión y fusión con la membrana celular; y la proteína M, fragmento proteolítico de prM, péptido necesario para el correcto plegamiento de la proteína E. Al interior de la envoltura se encuentra la cápside, conformada por la proteína de la cápside, rica en residuos básicos que favorecen la unión con el RNA viral (Lindenbach y Rice, 2003).

2.2 Origen geográfico y distribución del virus del Zika

El ZIKV fue aislado por primera vez en el bosque Zika, Uganda, de un ejemplar de mono Rhesus (*Macaca mulatta*) en abril de 1947 y de mosquitos *Aedes africanus*

en enero del siguiente año (Dick *et al.*, 1952). En 1954 se tuvo registro de los primeros casos de infección por ZIKV en humanos en tres habitantes de Nigeria (Macnamara, 1954). En 1969 el virus fue aislado, por primera vez fuera de África, de mosquitos *A. aegypti* en Malasia (Marchette *et al.*, 1969) y para 1977 se detectaron los primeros humanos infectados en Indonesia (Olson *et al.*, 1981).

Antes del 2007 sólo se habían reportado 13 casos de infección natural por ZIKV en humanos (Petersen *et al.*, 2016). La primera epidemia de ZIKV se registró entre abril y mayo del 2007 en las islas de Yap, en Micronesia. Los médicos reportaron una epidemia con cuadro clínico similar a la infección por DENV, pero ensayos de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) mostraron que se trataba de un brote por ZIKV, el cual causó aproximadamente 5,000 infecciones en una población de 6,700 habitantes (Duffy *et al.*, 2009). En octubre del 2013 inició en la Polinesia Francesa la epidemia de ZIKV donde se registraron 30,000 casos, el 11.5% de la población total de la región (Musso *et al.*, 2014b).

En enero de 2014, posterior a los casos importados desde la Polinesia Francesa, se registró la primera transmisión autóctona en Nueva Caledonia (Pacífico). Durante este brote se confirmaron 1,400 casos (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2015). Ese mismo mes se reportaron los primeros casos de infección por ZIKV en la isla de Pascua (Chile) y para marzo se habían confirmado 51 (Tognarelli *et al.*, 2016). En marzo se declaró la epidemia en las Islas Cook (Pacífico), registrándose 905 casos (Roth *et al.*, 2014).

2.2.1 Virus del Zika en América

Se propuso que el ingreso del ZIKV al continente americano ocurrió entre junio y julio del 2014 durante la copa mundial de futbol (Salvador y Fujita, 2016) o en agosto del 2014 debido al campeonato mundial de canotaje (Musso, 2015). Sin embargo, basado en la filogenia molecular de secuencias del genotipo asiático de ZIKV se sugiere que la introducción ocurrió entre agosto y diciembre del 2013 desde la Polinesia Francesa (Faria *et al.*, 2016).

Los primeros casos de infección por ZIKV en América continental se registraron en Brasil a finales del 2014. Para abril del 2015 se confirmó al ZIKV como el agente etiológico causante de la epidemia (Cardoso *et al.*, 2015). En octubre del 2015 se confirmaron los primeros casos de infección por ZIKV en Colombia (Camacho *et al.*, 2016), donde se alcanzaron los 9,799 casos en diciembre de 2016 (OPS/OMS, 2016d). Ese mismo mes la transmisión autóctona se había registrado en 48 países y territorios de América, donde los casos acumulados alcanzaron un total de 177,614 (OPS/OMS, 2016d).

La epidemia de infección por ZIKV fue declarada emergencia de salud pública de interés internacional en febrero del 2016 por la Organización Mundial de la Salud y se dio por terminada en noviembre del 2016 (OMS, 2016b).

Los primeros casos de infección por ZIKV en México se reportaron en la segunda semana epidemiológica de 2016 (SiNaVE, 2016a). Hasta diciembre del 2016 se habían registrado 7,575 casos acumulados, distribuidos principalmente en los estados de Veracruz, Yucatán, Nuevo León, Chiapas y Guerrero (SiNaVE, 2016d). En nuestro país, los primeros casos del síndrome de Guillain-Barré asociado con la infección por ZIKV se registraron en el mes de septiembre del mismo año (SiNaVE, 2016c) y el primer caso de microcefalia asociado a la infección por ZIKV se presentó dos meses después, en noviembre (SSa, 2017).

2.3 Transmisión del virus del Zika

2.3.1 Transmisión mediada por vector

La picadura por mosquitos infectados con ZIKV es la principal forma de transmisión y se presenta en dos ciclos distintos: uno selvático, identificado en África principalmente; y otro suburbano-urbano. Durante el ciclo selvático, especies de mosquitos de los subgéneros *Stegomyia* y *Diceromyia*, género *Aedes*, actúan como vectores (Diallo *et al.*, 2014) y primates no humanos son hospederos y posibles reservorios (Hayes, 2009; McCrae y Kirya, 1982). El ciclo suburbano-urbano involucra a humanos y a pocas especies del género *Aedes*, principalmente *A. aegypti* y *A. albopictus* (Grard *et al.*, 2014) (Figura 2). Aunque no se aisló el ZIKV de ningún *A. hensilli* y *A. polynesiensis* (Duffy *et al.*, 2009) se sospecha que actuaron como su vector durante los brotes en Yap y la Polinesia Francesa respectivamente (Ledermann *et al.*, 2014; Musso *et al.*, 2014b), debido a su predominancia regional y ser vectores del DENV (Rosen *et al.*, 1985; Savage *et al.*, 1998).

A. aegypti es originario de África central (Smith, 1956) y aunque actualmente se distribuye en gran cantidad de regiones tropicales y subtropicales (Soumahoro *et al.*, 2010) existen diferencias de competencia vectorial entre poblaciones (Diagne *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2012). La población de *A. aegypti* en Río de Janeiro posee una reducida eficiencia para la transmisión (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016), lo que podría explicar la dificultad en Brasil para aislar ZIKV de ésta (FIOCRUZ, 2016). Sin embargo, poblaciones de *A. aegypti* de poca competencia vectorial, pero en alta densidad de población, ya han provocado brotes epidémicos de otros arbovirus (Miller *et al.*, 1989).

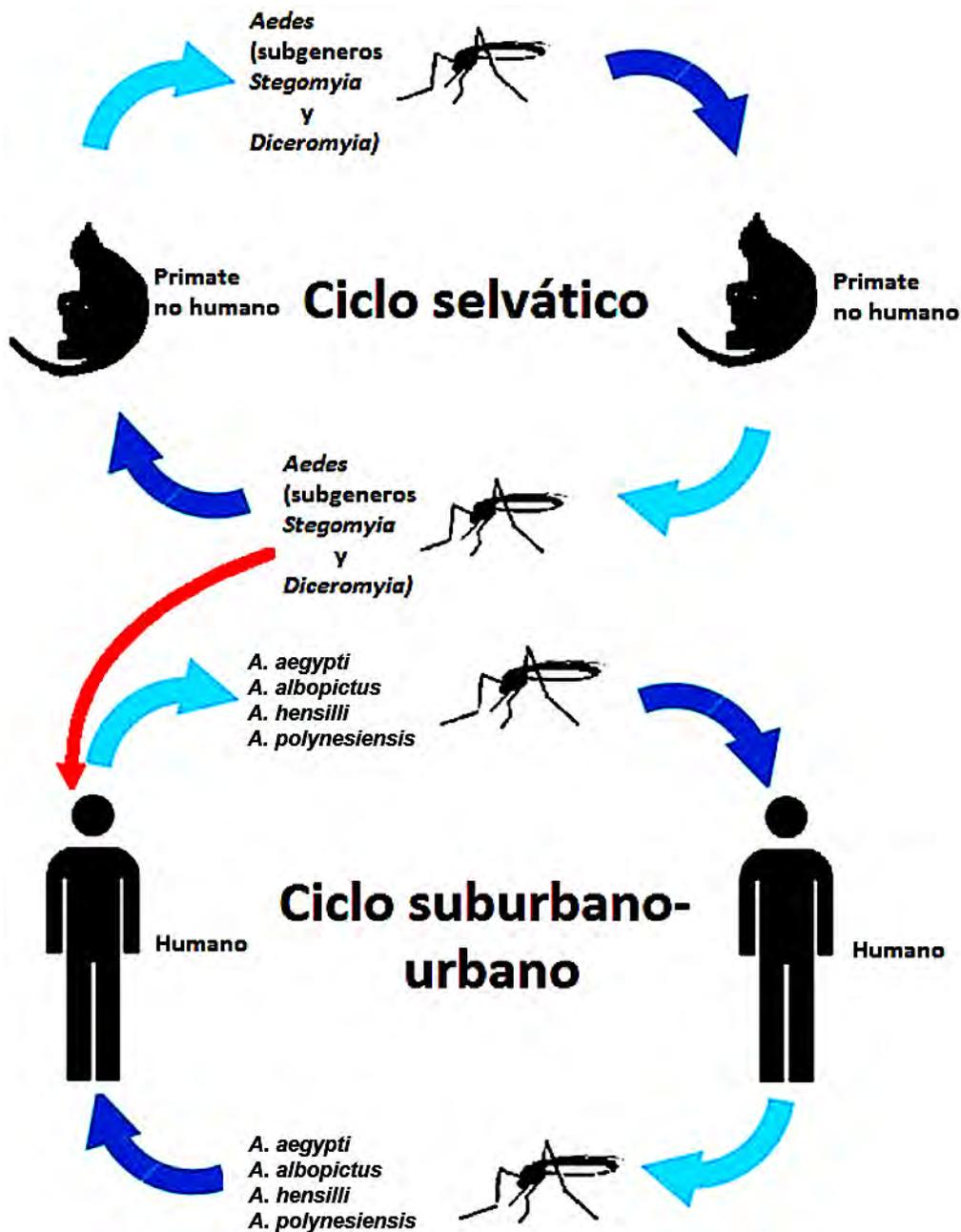


Figura 2. Ciclos de transmisión mediada por vector.

Durante el ciclo selvático el ZIKV se transmite entre primates no humanos por picadura de mosquitos *Aedes*, subgéneros *Stegomyia* y *Diceromyia*. Cuando un humano se introduce en zonas donde ocurre este ciclo, puede ser picado por mosquitos infectados y contraer el virus. Al volver a zonas urbanas el individuo puede ser picado por mosquitos *Aedes* urbanos e iniciar el ciclo suburbano-urbano.

A. albopictus es originario del sureste de Asia (Smith, 1956) y se distribuye en regiones más templadas que *A. aegypti* (Soumahoro *et al.*, 2010). *A. albopictus* también muestra diferencias de competencia vectorial entre poblaciones (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2013). En México se aisló ZIKV de esta especie, por vez primera, en abril del 2016 (OPS/OMS, 2016c).

2.3.2 Transmisión no mediada por vector

Se han reportado posibles casos de transmisión mediante transfusiones de sangre (Musso *et al.*, 2014a) y por vía sexual (Foy *et al.*, 2011; Hills *et al.*, 2016). La detección de RNA viral de ZIKV en semen y orina cuando la viremia ya era indetectable (Atkinson *et al.*, 2016; Gourinat *et al.*, 2015; Musso *et al.*, 2015b) sugiere que ZIKV es capaz de replicarse en tejido urogenital; en semen la infección fue detectable 62 días después del comienzo de los síntomas. Probablemente el ambiente inmunoprivilegiado de los testículos favorece la replicación de ZIKV por largos periodos de tiempo, generando reservorios asintomáticos (Deen *et al.*, 2015; Mate *et al.*, 2015). También se ha detectado la presencia de RNA y viriones infectivos de ZIKV en saliva (Musso *et al.*, 2015a); sin embargo, debido a la alta exposición de mucosas durante el acto sexual es difícil distinguir la ruta de transmisión, como ocurrió con el virus del herpes humano tipo 8, cuya principal vía de transmisión es por saliva y no sexual (Arvin *et al.*, 2007).

Existen pocos datos de la posible transmisión por lactancia. Se detectaron viriones infectivos de ZIKV en la leche de una madre infectada (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2016) y se registraron 2 casos de posible transmisión por lactancia durante la epidemia en la Polinesia Francesa (Besnard *et al.*, 2014). En estos casos no se pudo excluir la transmisión congénita o perinatal independiente de la lactancia, por lo que se requiere más evidencia para confirmar esta ruta de transmisión (Colt, 2017).

La transmisión congénita ha cobrado relevancia tras los 2,289 casos de microcefalia asociada con ZIKV hasta diciembre del 2016 en Brasil (OPS/OMS, 2016d). Otros factores como infecciones con otros virus, mutaciones genéticas y consumo de drogas o alcohol pueden causar microcefalia (Butler, 2016; Faheem *et al.*, 2015); sin embargo, la detección de RNA de ZIKV en tejido cerebral fetal y muestras de líquido amniótico de recién nacidos con microcefalia (Calvet *et al.*, 2016; Mlakar *et al.*, 2016) sugieren una relación causal entre la transmisión congénita de ZIKV y la microcefalia.

Se han reportado casos de transmisión a cuidadores de personas de la tercera edad por contacto físico, posiblemente asociado con la alta carga viral que estas personas pueden presentar, hasta 100,000 veces mayor que el promedio (Brent *et al.*, 2016), se presume que la transmisión ocurrió a través fluidos corporales que entraron en contacto con mucosas.

En el laboratorio la infección accidental por ZIKV ocurre principalmente por picaduras con agujas (CIDRAP, 2016), similar a lo reportado para DENV (Pedrosa y Cardoso, 2011).

2.4 Infección por virus del Zika

El ZIKV puede infectar un amplio rango de células, entre las que se encuentran los fibroblastos, los queratinocitos, los podocitos, las células mesangiales, las células endoteliales y las células dendríticas inmaduras (Alcendor, 2017; Hamel *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016).

El ciclo de infección del ZIKV inicia cuando la proteína E induce la endocitosis mediada por clatrina, permitiendo que los viriones sean endocitados (Ishak *et al.*, 1988); conforme el pH disminuye, la proteína E cambia su conformación y promueve la fusión de la envoltura con la membrana del endosoma, liberando la nucleocápside en el citoplasma de la célula (Bressanelli *et al.*, 2004; Modis *et al.*, 2004). El genoma viral es traducido y la poliproteína es procesada en el retículo endoplásmico rugoso, donde comienzan a ensamblarse los viriones, que van madurando siguiendo la vía secretora, pasando por el aparato de Golgi y siendo secretados por vesículas de egreso (Mackenzie y Westaway, 2001).

El período de incubación de ZIKV dura entre 6 a 10 días después de la picadura del mosquito (Foy *et al.*, 2011; Kutsuna *et al.*, 2014; Musso *et al.*, 2014a). Los signos y síntomas más evidentes son: fiebre moderada, dolor de cabeza, artralgia principalmente en manos y pies, mialgia, dolor retroorbital, conjuntivitis y exantema maculopapular cutáneo; sin embargo, sólo 20% de las infecciones muestran síntomas que duran de 2 a 7 días y el resto muestra un cuadro similar a una influenza leve sin signos patognomónicos (Duffy *et al.*, 2009; OMS, 2016a).

Las complicaciones asociadas con infecciones de ZIKV son aparentemente de carácter neurológico: en adultos la infección por ZIKV aumenta la incidencia del síndrome de Guillain-Barré, caracterizado por producir debilidad muscular y pérdida de sensibilidad particularmente en brazos y piernas (Oehler *et al.*, 2014) y la transmisión congénita está relacionada con microcefalia, inclusiones cerebrales, daños al tallo cerebral y daño oftalmológico, particularmente a nivel de retina (Oliveira Melo *et al.*, 2016). Se desconoce si el ZIKV adquirió la capacidad para producir estas complicaciones mediante procesos microevolutivos durante las epidemias más recientes o si las cepas ancestrales ya las causaban y estos eventos poco frecuentes se volvieron evidentes cuando la incidencia aumentó (Musso y Gubler, 2016).

Otro aspecto relevante de la enfermedad por ZIKV es que parece manifestarse mayoritariamente en mujeres (OPS/OMS, 2016a, b; SiNaVE, 2016b).

Se desconoce mucho acerca de la replicación de los flavivirus. Se creía que su ciclo de replicación se desarrollaba exclusivamente en el citoplasma (Westaway *et al.*, 1985); sin embargo, se detectaron antígenos de ZIKV en el núcleo de células Vero y AP61 infectadas (Buckley y Gould, 1988), fenómeno reportado en otros flavivirus (Uchil *et al.*, 2006).

2.5 Filogenia del virus del Zika

Mediante el análisis de la secuencia completa del marco de lectura abierto se determinó que existen 2 grandes linajes de ZIKV: el africano, conformado por cepas de Nigeria, Uganda y Senegal; y el asiático, que incluye tanto a la cepa de Malasia como a las epidémicas de Yap 2007 y Camboya 2010, sugiriendo que ZIKV fue introducido a la región del Pacífico desde el sureste de Asia (Haddow *et al.*, 2012).

Considerando únicamente la secuencia de los genes E y NS5 el linaje africano parece estar dividido en 2 grupos, uno de Uganda y otro de Nigeria (Faye *et al.*, 2014). La circulación de ambos grupos tanto en Senegal como en Costa de Marfil sugiere dos eventos de introducción desde África oriental a África occidental: uno en 1935 desde Uganda a Nigeria y África Central, continuando desde ahí hasta Senegal; el otro entre 1935 y 1940 de Uganda a Costa de Marfil y Senegal. La introducción de ZIKV en Asia ocurre aproximadamente en los años 40 del siglo pasado, donde se expandió y dio lugar al linaje asiático (Faye *et al.*, 2014).

Las cepas de ZIKV provenientes de Brasil, Colombia, Puerto Rico y Guatemala muestran una similitud del 99% en la identidad nucleotídica con la cepa epidémica de Polinesia Francesa, formando un clado que se encuentra incluido en el linaje asiático (Lanciotti *et al.*, 2016).

2.6 Diagnóstico de infección por virus del Zika

Tradicionalmente, la detección de flavivirus se realiza mediante pruebas de serología, en etapas tempranas de la infección principalmente por ELISA (DGE, 2015), dirigida al antígeno viral NS1 y, posteriormente, a las inmunoglobulinas M y G contra NS1 (Figura 3). Sin embargo, el diagnóstico se complica en zonas con flavivirus endémicos debido a pruebas poco específicas, similitud antigénica y el efecto Hoskins (Duffy *et al.*, 2009; Lanciotti *et al.*, 2008; OMS, 2016c). El efecto Hoskins ocurre cuando un nuevo antígeno reacciona con anticuerpos dirigidos contra un antígeno similar encontrado previamente, impidiendo que linfocitos B nóveles monten una nueva respuesta específica (Lambert *et al.*, 2005).

El hecho que ZIKV, DENV y el virus del chikungunya (CHIKV) cocirculen, compartan vectores y produzcan cuadros muy similares (Cardoso *et al.*, 2015; Roth *et al.*, 2014) vuelven poco sensible el diagnóstico clínico y convierten a la RT-qPCR en la técnica más poderosa para diagnosticar ZIKV en la fase aguda de la infección.

La técnica de RT-PCR en tiempo real (qPCR) permite amplificar y cuantificar, en tiempo real, una secuencia de DNA obtenida de la transcripción inversa del RNA. La amplificación de la secuencia blanco es reportada mediante lecturas de fluorescencia y normalizada, utilizando un colorante reportero que se mantiene constante a lo largo de la reacción. Secuencias añadidas o un gen constitutivo presente en la muestra pueden usarse como CI, reduciendo el número de falsos negativos (Karatayli *et al.*, 2014).

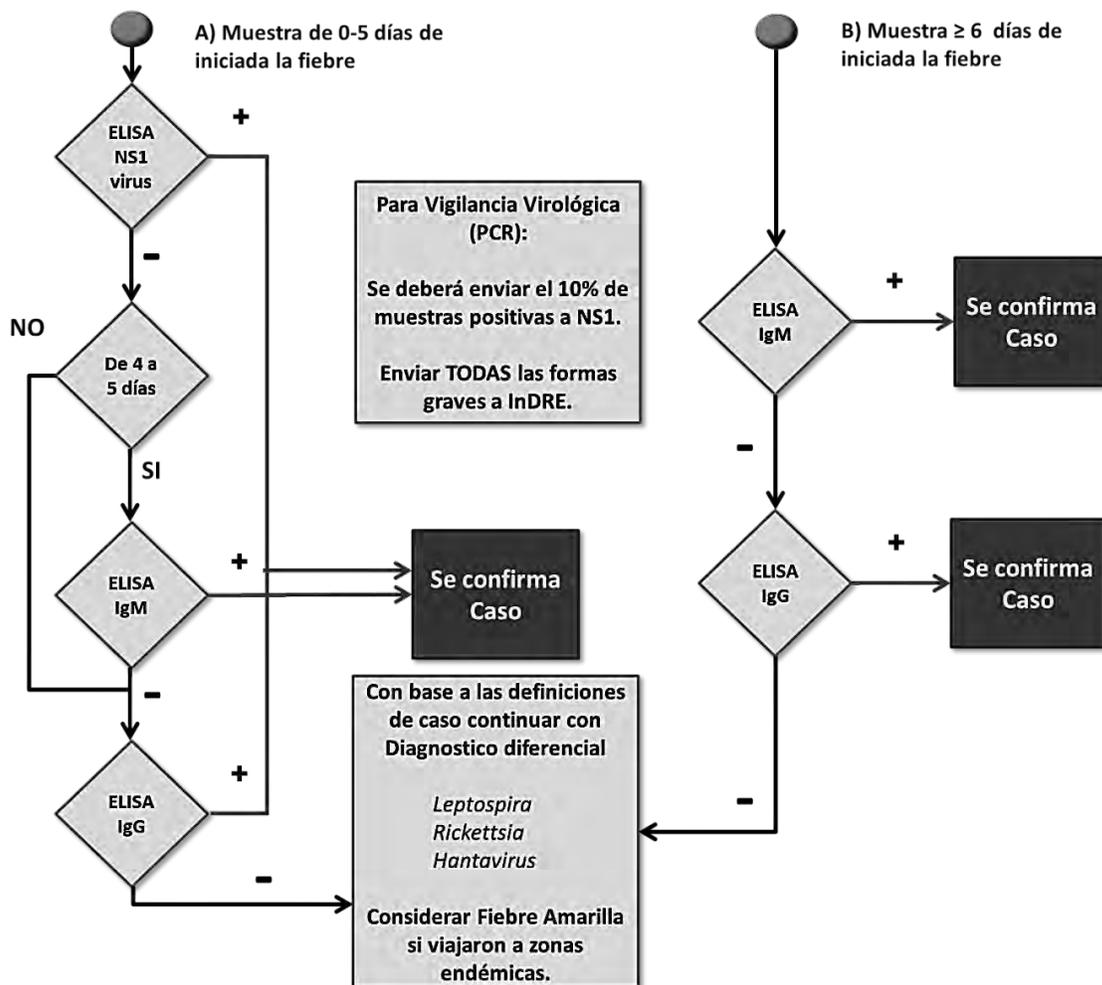


Figura 3. Algoritmo diagnóstico de DENV y su vigilancia epidemiológica en México.

Hasta principios de 2016 el diagnóstico de DENV se realizaba por ELISA utilizando muestras de suero sanguíneo de los pacientes. La aparición de ZIKV y la posibilidad de circulación de otros flavivirus impulsó un cambio de algoritmo donde la PCR es la principal técnica para el diagnóstico de flavivirus durante la fase aguda de la infección. (Figura modificada de DGE, 2015).

Existen colorantes fluorescentes de ácidos nucleicos que emiten fluorescencia al unirse al surco menor o intercalarse entre las bases nitrogenadas a lo largo de cualquier DNA de doble cadena (dsDNA) (Mao y Leung, 2010) y permiten obtener la curva de disociación del mismo si éste se expone a un rango de temperaturas y se registra la fluorescencia simultáneamente (Ririe *et al.*, 1997). Con la curva de disociación se determina la temperatura de disociación (T_m), temperatura en que la mitad del DNA presente se encuentra disociado y el resto como dsDNA; este valor depende del contenido de guanina (G) – citosina (C) / adenina (A) – timina (T), de la longitud y de la secuencia, lo cual permite diferenciar distintas secuencias de DNA (Ririe *et al.*, 1997).

La disociación del DNA de alta resolución (HRM) es una técnica compatible con el qPCR y proporciona curvas de disociación muy informativas que permiten detectar mutaciones puntuales y la realización de genotipos (Wittwer *et al.*, 2003). Esta técnica requiere de colorantes fluorescentes que tengan poco efecto en la estabilización del dsDNA, de lo contrario éstos pueden aumentar la T_m del DNA, inhibir el PCR, mostrar unión preferencial a ciertas secuencias y favorecer la formación de dímeros de primers (Gudnason *et al.*, 2007). Para el desarrollo de esta tesis se utilizó el colorante fluorescente EvaGreen, ya que tiene poco efecto en la estabilización del dsDNA (Mao *et al.*, 2007). Además, se necesitan equipos que sean capaces de realizar cambios de temperatura muy precisos, registrar con gran sensibilidad los cambios de fluorescencia y que limiten la pérdida de información durante la conversión digital de los datos (Herrmann *et al.*, 2006); esto para obtener una curva de disociación con la mayor cantidad de información posible.

La detección de ZIKV mediante RT-PCR sigue 2 estrategias: la amplificación universal de flavivirus seguida de diversos métodos para la identificación; y el uso de primers (iniciadores) específicos para ZIKV. Aunque existen ensayos universales exitosos (Gaunt y Gould, 2005; Maher-Sturgess *et al.*, 2008; Scaramozzino *et al.*, 2001) éstos pueden presentar problemas de sensibilidad (Waehre *et al.*, 2014).

Durante la epidemia de las islas Yap se diseñaron 2 ensayos para la amplificación específica de ZIKV (Lanciotti *et al.*, 2008) que actualmente son los más utilizados para el diagnóstico (Charrel *et al.*, 2016). Sin embargo, se han observado resultados discrepantes en distintos laboratorios de referencia (Charrel *et al.*, 2016) por lo que se ha vuelto necesario estandarizar nuevos protocolos que permitan el diagnóstico de ZIKV.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Diseñar un protocolo de RT-qPCR-HRM que permita la detección del RNA de ZIKV en muestras de suero utilizando EvaGreen.

3.2 Objetivos particulares

- Diseñar un juego de primers para la detección específica de ZIKV.
- Determinar el límite de detección y la eficiencia de reacción de la qPCR para detectar RNA de ZIKV.
- Establecer un gen constitutivo para su uso como CI en este ensayo.
- Evaluar la sensibilidad diagnóstica del ensayo, analizando un panel de sueros proveniente de una región con circulación de ZIKV.
- Utilizar la técnica de HRM para distinguir e identificar los productos amplificados durante la qPCR

4. JUSTIFICACIÓN

ZIKV utiliza vectores ampliamente distribuidos en el mundo, por lo que una gran parte de la población de zonas tropicales y subtropicales se convierte en un hospedero potencial. La epidemia ha experimentado un gran crecimiento en los últimos meses, aumentando el riesgo de contraer la infección y sufrir complicaciones asociadas con el ZIKV o de actuar como reservorio asintomático. Es importante contar con herramientas diagnósticas moleculares que permitan identificar infecciones causadas por el ZIKV, de forma rápida y confiable en una gran cantidad de muestras de suero sanguíneo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

“Quien huye del trabajo, huye del descanso”.
Refrán popular

Todos los procedimientos de laboratorio se llevaron a cabo en condiciones de Bioseguridad nivel 2.

5.1 Diseño de oligos para la PCR

Los oligos iniciadores (primers) utilizados en este proyecto fueron diseñados con ayuda del programa Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012). Se generó un archivo FASTA con la alineación de las secuencias de ZIKV disponibles en GenBank utilizando el programa MAFFT versión 7 (Kato y Standley, 2013). Este archivo fue procesado en MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) para evaluar la cobertura de los primers en las secuencias. La especificidad teórica se evaluó con estos mismos programas, alineando y analizando las secuencias de 10 virus del género *Flavivirus* (Tabla 1); estos flavivirus fueron seleccionados debido a su cercanía filogenética con ZIKV y a la importancia epidemiológica que tienen en México y en el mundo.

Tabla 1. Secuencias utilizadas para evaluar la especificidad teórica de los primers Zi2 F/R.

Flavivirus	Accession number
Serotipo 1 del DENV (DENV-1)	KJ189367.1
Serotipo 2 del DENV (DENV-2)	AB189124.1
Serotipo 3 del DENV (DENV-3)	AB214882.1
Serotipo 4 del DENV (DENV-4)	KP188566.1
YFV	KF769016.1
encefalitis japonesa	AY303791.1
encefalitis transmitida por garrapatas	NC_001672.1
Spondweni	NC_029055.1
Kedougou	AY632540.2
Bagaza	AY632545.2

Para calcular la T_m del producto teórico de PCR de estos primers se determinó su secuencia, la cual fue procesada utilizando el algoritmo POLAND (Steger, 1994) bajo los parámetros termodinámicos de Blake y Delcourt (1998).

5.2 Toma de muestra de sangre y obtención del panel de sueros sanguíneos

De acuerdo con el protocolo C16-16 del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (Sevilla-Reyes *et al.*, 2016) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), la toma de muestras de sangre se realizó en el mes de

marzo de 2016, en la comunidad Santa María Mixtequilla, Oaxaca (16° 22' 0" N, 95° 15' 0" W), ubicado en la región del Istmo de Tehuantepec. Se colectaron 14 mL de sangre de 79 habitantes, mediante punción venosa utilizando tubos con gel separador de suero (BD Vacutainer). La sangre se conservó en refrigeración durante su traslado a la Ciudad de México; para la obtención del suero estos tubos se centrifugaron a 3,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos (min).

5.3 Extracción de RNA viral

La extracción del RNA de suero se realizó con el kit QIAamp RNA viral (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante (Figura 4).

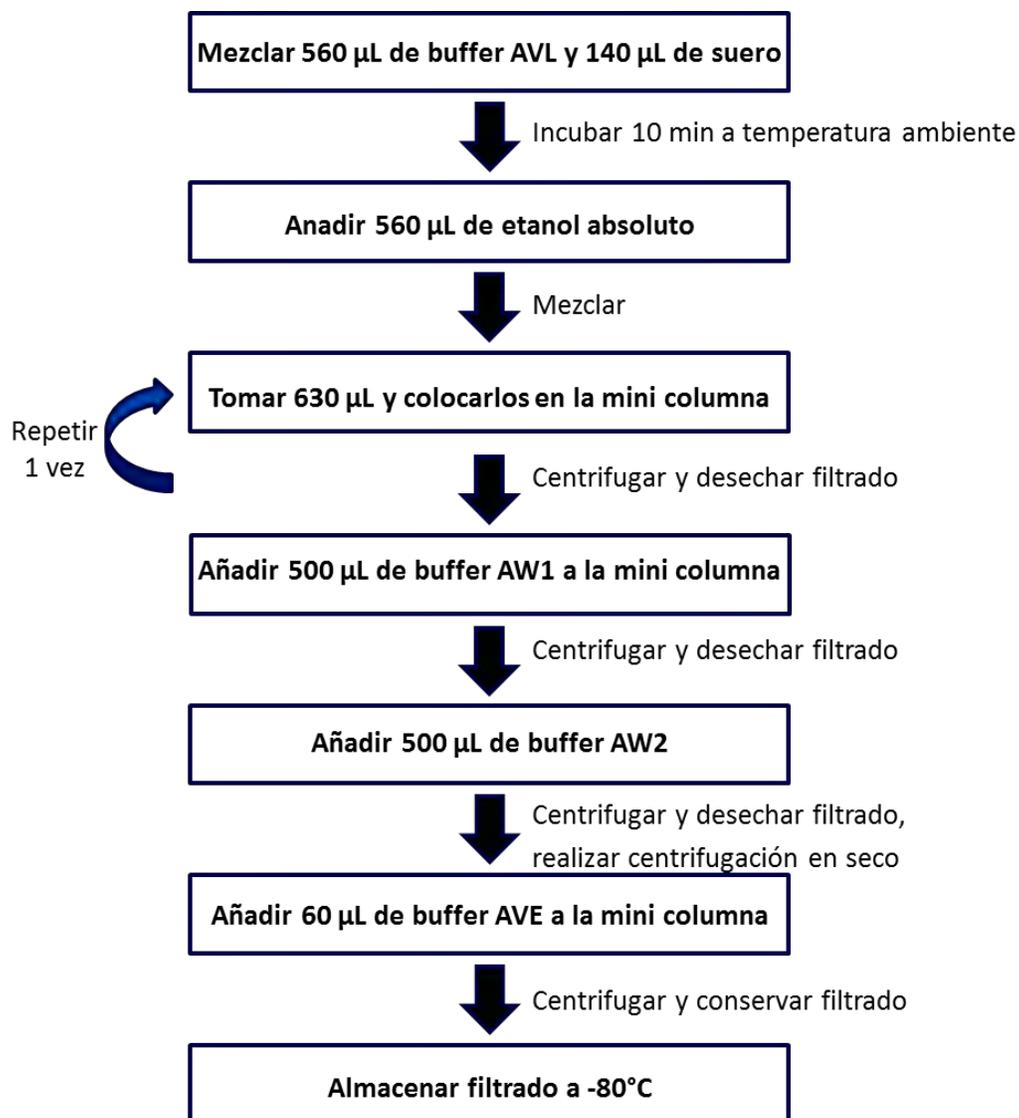


Figura 4. Diagrama de flujo de extracción de RNA de suero sanguíneo de pacientes y fibroblastos en cultivo.

5.4 Construcción, clonación, recuperación, cuantificación y dilución de plásmidos

Se construyó un plásmido que se utilizó en cantidades conocidas durante los ensayos para determinar el límite de detección y la eficiencia de la qPCR (Sección 5.7), así como control positivo de ZIKV durante la evaluación del panel de sueros de Mixtequilla (Sección 5.10). El producto de la PCR necesario para la construcción del plásmido se obtuvo con el kit OneStep RT-PCR (Qiagen) mediante una PCR de 30 ciclos (Tabla 2) siguiendo el ciclado del RT-PCR (Tabla 6) con la muestra clínica 16-11551 del protocolo C16-16 (Sevilla-Reyes *et al.*, 2016) del INER.

Para su construcción se utilizó el vector pGEM-T (Promega) en una reacción de ligación (Tabla 3) que se incubó a 4 °C durante 18 horas.

Tabla 2. Reacción de PCR punto final.

Reactivo	Volumen
5x Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5.0 µL
dNTP mix (10 mM c/u)	1.0 µL
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1.0 µL
Primers Zi2 F/R (5µM)	2.5 µL
RNA de muestra clínica 16-11551	4.0 µL
Agua libre de RNAsas	11.5 µL

Tabla 3. Reacción de ligación.

Reactivo	Volumen
2X Rapid Ligation Buffer	5.0 µL
pGEM-T (50 ng/µL)	1.0 µL
Producto de PCR	3.0 µL
DNA Ligasa T4	1.0 µL
Agua libre de nucleasas	1.0 µL

Para la clonación del plásmido se utilizaron células One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) en un volumen de 50 µL. Éstas se descongelaron en hielo y mezclaron cuidadosamente con 3.5 µL de la reacción de ligación, para luego ser incubadas en hielo por 20 min y darles un choque térmico en baño María de 46 °C durante 30 segundos (s). A cada transformación se le agregaron 250 µL de medio S.O.C. (Invitrogen) y se incubó a 225 rpm y 37 °C durante 1 hora.

Se esterilizó agar LB y se dejó enfriar a 50 °C para añadir ampicilina bajo condiciones de esterilidad a una concentración de 100 mg/mL y se hicieron placas con este agar. Se esparció 40 µL de X-Gal por placa; se incubó durante una hora

a 37 °C para permitir la difusión del X-Gal. Se esterilizó medio LB y se dejó enfriar, se añadió ampicilina a concentración de 50 mg/mL.

Se colocó 25 µL, 40 µL y 50 µL del cultivo en medio S.O.C. en tres placas de agar LB y se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Se tomó tres colonias blancas con puntas de micropipeta estériles y se incubaron en 2.5 mL de medio LB con ampicilina a concentración de 50 mg/mL durante 16 horas a 37 °C y 225 rpm.

El cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante. La recuperación de los plásmidos se realizó con el kit QIAprep Miniprep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 5).

Utilizando el equipo NanoDrop 1000 se midió la absorbancia de las eluciones a la longitud de onda (λ) 260 y 280 nm para obtener el índice de absorbancia 260/280 y la concentración de plásmido en ng/µL. Se verificó que la elución presentara un índice 260/280 entre 1,8 y 2,2 indicando una pureza aceptable. Se calculó el número de plásmidos por µL presentes en la elución y se hicieron diluciones en buffer DP para llevarlos a la concentración de 107 copias/µL. Partiendo de esta concentración, se hicieron diluciones en buffer EB para llevar al plásmido a las concentraciones de 106, 105, 104, 103, 102, 101 y 100 copias/µL necesarias para los ensayos de límite de detección y eficiencia de reacción.

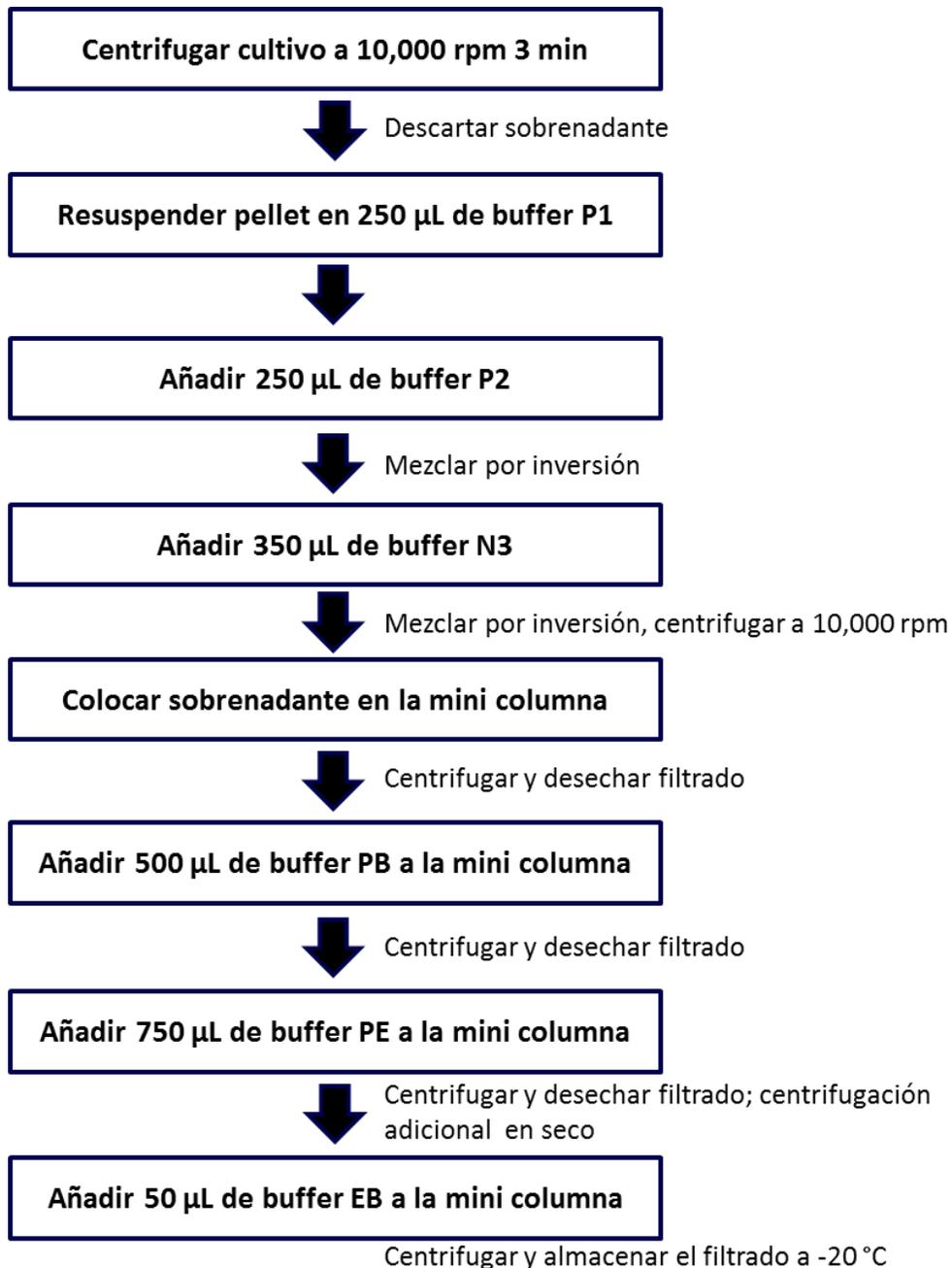


Figura 5. Diagrama de flujo de recuperación de plásmidos utilizando el kit QIAprep Miniprep (QIAGEN)

5.5 Electroforesis en gel de agarosa y extracción de DNA del gel

Los geles de agarosa se prepararon al 2% en buffer TBE, añadiéndose GelRed (Biotium) en relación 1:10,000. La solución se dejó enfriar hasta 50 °C y se vertió en un molde donde gelificó. El gel se colocó en una cámara de electroforesis y se cubrió completamente de buffer TBE. Los productos de PCR y el marcador de tamaño 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) se mezclaron con buffer de carga en

relación 4:1 y se cargaron en los pozos del gel. Se programó un flujo eléctrico de 80 voltios durante 40 min.

El gel fue visualizado en un transiluminador. La banda de interés fue ubicada en presencia de luz ultravioleta ($\lambda = 300 \text{ nm}$), cortada con una navaja estéril y colocada en un tubo de microcentrifuga de peso conocido para determinar el peso del fragmento del gel. La extracción del producto de PCR se realizó con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 6).

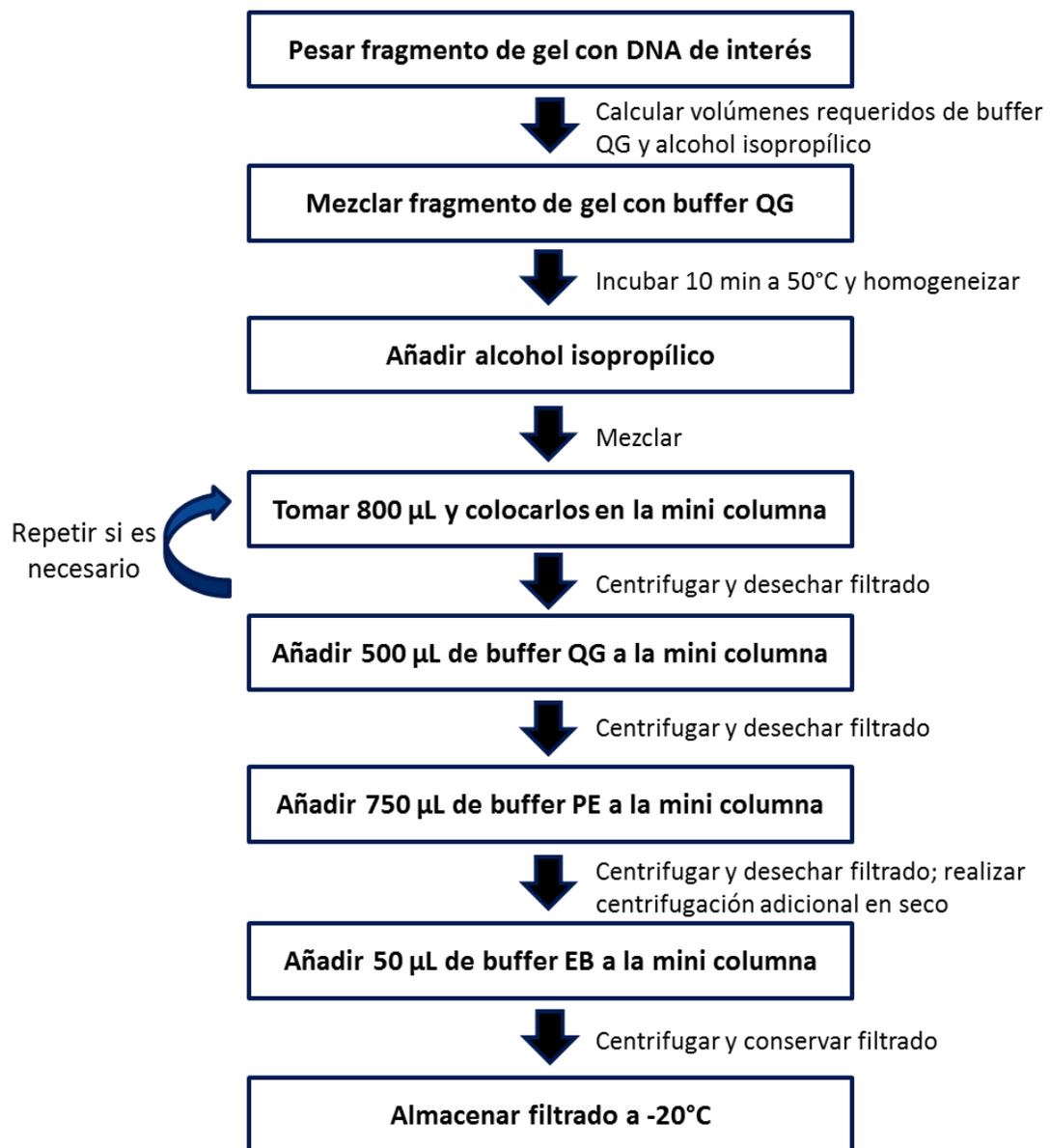


Figura 6. Diagrama de flujo de la extracción del producto de PCR en gel de agarosa.

5.6 Secuenciación de los productos amplificados

Se realizó una electroforesis de los amplificados y se extrajo el DNA de la banda de interés (Sección 5.5). Se prepararon reacciones de secuenciación con el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), utilizando sólo un primer por reacción (Tabla 4) en una placa de 96 pozos (Tabla 5).

Tabla 4. Reacción de secuenciación.

Reactivo	Volumen
BigDye Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	0.5 µL
Producto de PCR extraído de gel de agarosa	2.0 µL
Primer (2 µM)	1.0 µL
Agua desionizada	2.5 µL

Tabla 5. Condiciones de ciclado y termociclador utilizados para la reacción de secuenciación.

Condiciones de ciclado	Termociclador
96 °C- 60 s, 25 ciclos (96 °C - 10 s, 50 °C - 5 s, 60 °C - 4 min)	Veriti (Applied Biosystems)

Al término del ciclado se precipitó la reacción mezclándola vigorosamente con 12.5 µL de etanol absoluto y 0.5 µL de acetato de sodio 3 M; posteriormente se centrifugó a 2,000 rpm a 4 °C durante 30 min; se invirtió la placa y se centrifugó a 150 rpm durante 1 min para retirar los restos de etanol. Se agregó cuidadosamente 75 µL de etanol al 70 % y se centrifugó a 2,000 rpm a 4 °C durante 5 min; nuevamente se retiró el etanol invirtiendo la placa y se centrifugó a 150 rpm durante 1 min. Posteriormente se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad.

Se resuspendió las reacciones de secuenciación en 20 µL de formamida y fueron analizadas mediante electroforesis capilar en el equipo PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando el polímero POP-7 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se ensamblaron utilizando el programa GAP4 (Bonfield y Staden, 1996).

5.7 Protocolo para la detección de RNA del virus del Zika

El protocolo para detección de ZIKV fue diseñado para realizarse en dos pasos: RT-PCR y qPCR-HRM, que se realizaron con distintos equipos, kits y bajo condiciones de reacción distintas (Tabla 6).

Tabla 6. Equipo, kit, volumen y condiciones de reacción utilizados durante el protocolo.

	RT-PCR	qPCR-HRM
Termociclador	Veriti (Applied Biosystems)	StepOnePlus (Applied Biosystems)
Kit para PCR	OneStep RT-PCR (Qiagen)	SSoFast EvaGreen with Low ROX (BIO-RAD)
Volumen de reacción	10 μ L	12.5 μ L
Condiciones de reacción	50 °C -30 min, 95 °C-15 min; 16 ciclos (94 °C – 30 s, 60 °C – 60 s, 72 °C - 60 s); 72 °C-10 min	95 °C -3 min; 30 ciclos (95 °C – 30 s, 62 °C – 60 s) HRM (70 °C - 90 °C Δ T=0.3 °C/s)

Al terminar el RT-PCR se realizó una dilución 1:8 en buffer TE y se tomaron 2 μ L que servían como material genético inicial para el qPCR-HRM. La dilución busca reducir la formación de dímeros de primers y la amplificación de productos inespecíficos provenientes de la transcripción reversa.

Durante el qPCR-HRM se programó al termociclador StepOnePlus para emitir a $\lambda=500$ nm y registrar a $\lambda=530$ nm, que corresponden a la frecuencia de absorción y emisión de EvaGreen unido a DNA respectivamente.

En todos los ensayos se añadió un control sin material genético (NTC) para validar los resultados.

5.8 Determinación del límite de detección y eficiencia de la qPCR

El plásmido pZ551 se usó en cantidades conocidas (Sección 5.4) para realizar una curva patrón. Los ensayos de RT-PCR (Tabla 7) y qPCR-HRM (Tabla 8) se realizaron por duplicado. Los valores del ciclo de cuantificación (Cq) correspondientes al número de copias del plásmido pZ551 por reacción se registraron y graficaron utilizando Microsoft Excel 2010 considerando al número de copias del control positivo por reacción como la variable independiente y los valores de Cq como la variable dependiente. Utilizando el mismo programa se obtuvo la ecuación de la línea de tendencia.

Tabla 7. Reacción de RT-PCR para determinar el límite de detección y la eficiencia de reacción.

Reactivo	Volumen
5x Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	2.0 µL
dNTP mix (10 mM c/u)	0.4 µL
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0.4 µL
Plásmido pZ551 (10 ⁶ , 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² , 10, 1 copias/µL)	1.0 µL
Primers Zi2 F/R (2 µM)	1.5 µL
Agua libre de RNAsas	4.7 µL

Tabla 8. Reacción de qPCR-HRM para determinar el límite de detección y la eficiencia de reacción.

Reactivo	Volumen
2x SsoFast EvaGreen supermix with low ROX	6.25 µL
Dilución 1:8 del RT-PCR	2.0 µL
Primers Zi2 F/R (2 µM)	3.13 µL
Agua	1,12 µL

Se calculó la eficiencia del qPCR utilizando la fórmula reportada para este propósito (Bustin *et al.*, 2009) (Figura 7).

$$\text{Eficiencia del PCR} = 10^{-1/\text{pendiente}} - 1$$

Figura 7. Fórmula para calcular eficiencia de ensayos de una qPCR.

5.9 Verificación de especificidad de primers para virus del Zika

Se verificó la especificidad de los primers Zi2 F/R utilizando material genético de cultivos de virus del oeste del Nilo (WNV), DENV-2, YFV y CHIKV (Número De catálogo: QAV164186_1) proporcionados por una organización internacional independiente de evaluación externa de calidad: Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD, 2016). El material genético de estos cultivos se utilizó en ensayos de RT-PCR (Tabla 9) y qPCR-HRM (Tabla 10) de acuerdo con el protocolo para la detección de ZIKV (Sección 5.6).

Tabla 9. Reacción de RT-PCR durante la verificación de especificidad de Zi2 F/R.

Reactivo	Volumen
5x Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	2.0 µL
dNTP mix (10 mM c/u)	0.4 µL
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0.4 µL
Material genético de WNV, DENV-2, YFV y CHIKV	4.0 µL
Primers Zi2 F/R (2 µM)	1.5 µL
Agua libre de RNAsas	1.7 µL

Tabla 10. Reacción de qPCR-HRM durante la verificación de especificidad de Zi2 F/R.

Reactivo	Volumen
2x SsoFast EvaGreen supermix with low ROX	6.25 µL
Dilución 1:8 del RT-PCR	2.00 µL
Primers Zi2 F/R (2 µM)	3.13 µL
Agua	1.12 µL

5.10 Elección del control interno y optimización de su amplificación

Se buscaron primers útiles para amplificar genes constitutivos y utilizarlos como CI en la qPCR de material genético de suero sanguíneo humano. Consultando la secuencia de los genes de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), RNA ribosomal 18S y β -globina en GenBank se obtuvo la longitud y secuencia de los productos de PCR y se calculó la T_m teórica de cada uno con el algoritmo de POLAND (Steger, 1994) bajo los parámetros termodinámicos de Blake y Delcourt (1998). Los primers reportados no se consideraron útiles para este protocolo y se diseñó el juego de primers RPC041F/EX02R. Con estos primers se hicieron pruebas por duplicado con RNA de fibroblastos humanos provenientes de cultivo primario extraído con el kit QIAamp RNA viral (Qiagen) (Sección 5.3) para verificar la T_m de los productos de PCR y optimizar la concentración de primers a utilizar (Tabla 11) durante el RT-PCR (Tabla 12) y el qPCR-HRM (Tabla 13).

Tabla 11. Concentraciones finales de primers evaluadas.

Proceso	Concentraciones finales de RPC041F/EX02R evaluadas
RT-PCR	0.2 µM, 0.3 µM, 0.5 µM
qPCR-HRM	0.3 µM, 0.5 µM

Tabla 12. Reacción de RT-PCR durante ensayos con material genético de fibroblastos humanos.

Reactivo	Volumen
5x Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	2.0 µL
dNTP mix (10 mM c/u)	0.4 µL
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0.4 µL
RNA de cultivo primario de fibroblastos	2.0 µL
Primers RPC041F/EX02R (2 µM)	Variable
Agua libre de RNAsas	Variable

Tabla 13. Reacción de qPCR-HRM durante ensayos con material genético de fibroblastos humanos.

Reactivo	Volumen
2x SsoFast EvaGreen supermix with low ROX	6.25 µL
Dilución 1:8 del RT-PCR	2.0 µL
Primers RPC041F/EX02R (2 µM)	Variable
Agua	variable

Con la concentración óptima de primers RPC041F/EX02R se realizaron ensayos, por duplicado, con RNA de 10 sueros sanguíneos provenientes de muestras clínicas negativas a ZIKV (Tabla 14, Tabla 15) para verificar la detección del CI en todos ellos y determinar si estos primers podían ser utilizados para amplificar el CI.

Tabla 14. Reacción de RT-PCR con RNA de 10 sueros sanguíneos.

Reactivo	Volumen
5x Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	2.0 µL
dNTP mix (10 mM c/u)	0.4 µL
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0.4 µL
RNA de suero de paciente	2.0 µL
Primers RPC041F/EX02R (2 µM)	2.5 µL
Agua libre de RNAsas	2.7 µL

Tabla 15. Reacción de qPCR-HRM con RNA de 10 sueros sanguíneos.

Reactivo	Volumen
2x SsoFast EvaGreen supermix with low ROX	6.25 µL
Dilución 1:8 del RT-PCR	2.0 µL
Primers RPC041F/EX02R (2 µM)	1.88 µL
Agua	2.37 µL

5.11 Análisis del panel de sueros sanguíneos de Santa María Mixtequilla

Para conocer la sensibilidad diagnóstica de nuestro protocolo en muestras de suero sanguíneo se analizó un panel de 79 muestras de suero sanguíneo provenientes de Santa María Mixtequilla utilizando los juegos de primers Zi2 F/R y RPC041F/EX02R. Este panel había sido previamente analizado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) utilizando los primers ZIKV1086/ZIKV1162c. Estos primers fueron diseñados para la detección específica de ZIKV mediante sonda de hidrólisis, amplificando un producto de 70 pb de la región codificante de la proteína E (Lanciotti *et al.*, 2008).

Para el análisis del panel se utilizaron las siguientes cantidades de reactivos en la RT-PCR (Tabla 16) y el qPCR-HRM (Tabla 17).

Tabla 16. Reacciones de RT-PCR para el análisis de sueros sanguíneos de Mixtequilla.

Reactivo	Volumen
5x Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	2.0 µL
dNTP mix (10 mM c/u)	0.4 µL
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0.4 µL
RNA de suero	4.0 µL
Primers Zi2 F/R (2 µM)	1.5 µL
Primers RPC041F/EX02R (5 µM)	1.0 µL
Agua libre de RNAsas	0.7 µL

Tabla 17. Reacciones de qPCR-HRM para el análisis de sueros sanguíneos de Mixtequilla.

Reactivo	Volumen
2x SsoFast EvaGreen supermix with low ROX	6.25 µL
Dilución 1:8 del RT-PCR	2.0 µL
Primers Zi2 F/R (5 µM)	3.13 µL
Primers RPC041F/EX02R (5 µM)	0.75 µL
Agua	0.37 µL

MEDIOS Y SOLUCIONES (ANEXO 1)

1. Zi2 F	T G G T A T G G A A T G G A G A T A A G G C
2. Zika virus/SEN/1984/41671
3. Yellow fever virus strain Asibi c c c a . . t
4. Tick-borne encephalitis virus complete genome c c a . . . c . . .
5. Spondweni virus complete genome c c . t .
6. Kedougou virus strain DakAar D1470 c . c c a . . t
7. Japanese encephalitis virus strain T1P1-S1 c a . . c . . a .
8. Dengue virus 4 BR/SJRP/850/2013 g t
9. Dengue virus 3 strain: D3/Hu/TL129NID/2005 c a . . t . . a .
10. Dengue virus 2 strain: 98900666 DSS a . . c . . a .
11. Dengue virus 1 isolate PR/BID-V8188/2010 c a . . c . . a .
12. Bagaza virus strain DakAr B209 t . . a .

Figura 9. Alineación de secuencias de flavivirus diferenciales y Zi2 F.

1. Zi2 R	Y A G A A T C A C A A G C A C T C C A A G
2. Zika virus/SEN/1984/41671	t
3. Yellow fever virus strain Asibi	c . t c . . g c t c . c . . a a a
4. Tick-borne encephalitis virus complete genome	a . a c . a t g . c . c t . t . . . g g .
5. Spondweni virus complete genome	c . t g . c . . . t . c t . a . . . g . .
6. Kedougou virus strain DakAar D1470	g . a g . c . . . c . c t g c . .
7. Japanese encephalitis virus strain T1P1-S1	a . a c c . . a . g g . . c . .
8. Dengue virus 4 BR/SJRP/850/2013	g g t c . g g c a c . a . . g a . . c . t
9. Dengue virus 3 strain: D3/Hu/TL129NID/2005	t g c c . a a c a t . a g . . a . . c . t
10. Dengue virus 2 strain: 98900666 DSS	t g c c . . t c . c . a g t . .
11. Dengue virus 1 isolate PR/BID-V8188/2010	t g a t . c g c a t . . t . t . . . t . a
12. Bagaza virus strain DakAr B209	g . a c t g . . t . . a . . c . .

Figura 10. Alineación de secuencias de flavivirus diferenciales y Zi2 R.

La Tm del producto de PCR de los primers Zi2 F y Zi2 R se calculó en base a una secuencia de ZIKV (Accession number KX856011.1). La predicción fue de 79.45 °C (Figura 11).

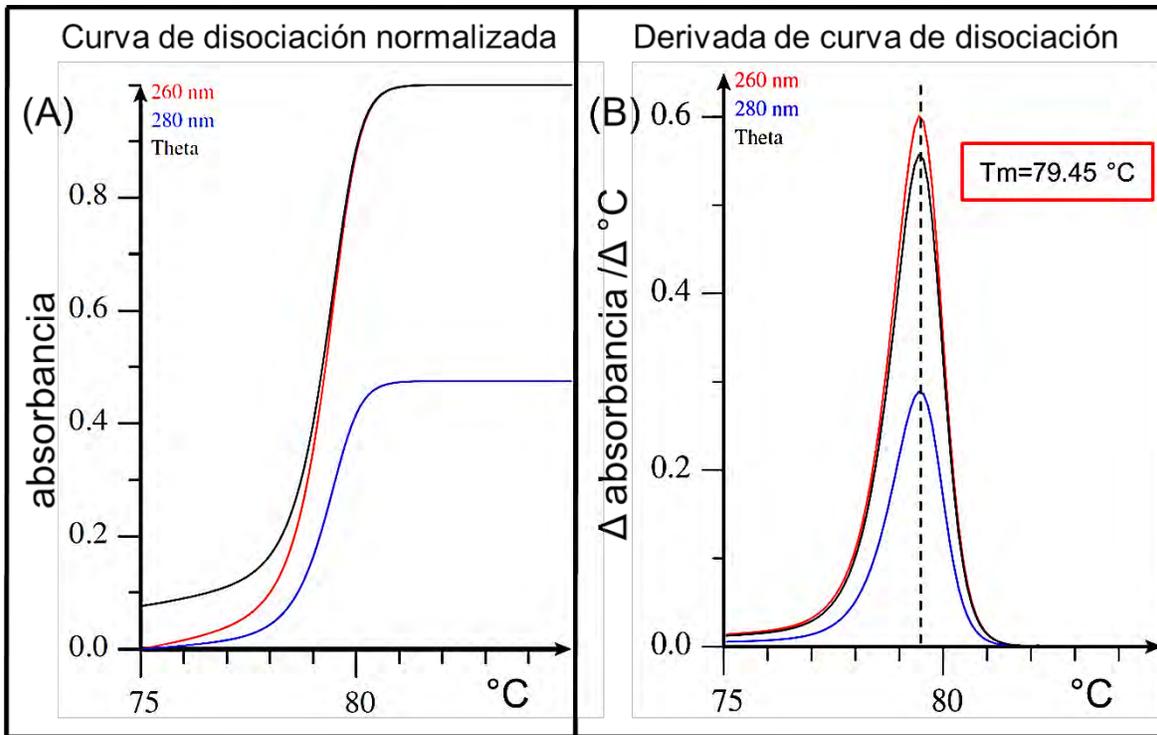


Figura 11. Tm teórica del producto de Zi2 F/R.

Conforme la temperatura aumenta el dsDNA se disocia y la absorbancia a $\lambda=260$ nm y $\lambda=280$ nm aumenta, fenómeno conocido como efecto hipercrómico (Campbell, 2012). (A) La gráfica indica las predicciones de la absorbancia del producto de PCR obtenido de la cepa *Aedes sp./MEX_1-44/2016* utilizando los primers Zi2 F y Zi2 R a $\lambda=260$ nm (línea roja) y a $\lambda=280$ nm (línea azul) entre los 75°C y 85°C. Estas 2 predicciones son distintas ya que secuencias ricas en G-U y A-U presentan un mayor efecto hipercrómico a $\lambda=260$ nm mientras que secuencias ricas en G-C lo presentan a $\lambda=280$ nm (Gray y Ratliff, 1977; Siegfried y Bevilacqua, 2009). La línea negra (Theta) representa la predicción de la disociación del DNA con base en su secuencia. Ubicar la Tm en la gráfica normalizada es complicado y para este fin se utiliza la gráfica de la derivada de la absorbancia (B), la temperatura en la cual la derivada de Theta alcanza su máximo valor corresponde a la Tm.

6.2 Cuantificación y dilución de plásmido control

Se utilizó material genético de ZIKV en cultivo, proveniente del suero sanguíneo 16-11551 del protocolo C16-16 (Sevilla-Reyes *et al.*, 2016), como inserto en el plásmido pGEM-T y posteriormente fue clonado en células TOP10. La concentración y pureza del DNA plasmídico recuperado se conoció utilizando el NanoDrop 1000, los índices de absorbancia 260/280 y 260/230 indican una alta pureza del plásmido (Tabla 19).

Tabla 19. Lecturas del NanoDrop 1000 para el plásmido control.

Concentración de plásmido (ng/ μ L)	Índice de absorbancia 260/280	Índice de absorbancia 260/230
278.80	1.92	2.28

El plásmido se nombró pZ551. Se utilizaron los primers Zi2 F/R en un qPCR de 30 ciclos seguido de un HRM para confirmar la identidad del inserto en pZ551 usando el material genético de ZIKV en cultivo como control positivo (Figura 12). También se realizó una electroforesis en gel de agarosa para confirmar que ambos productos tuvieran el tamaño esperado de 120 pb (Figura 13) y se extrajo la banda amplificada del plásmido para su secuenciación.

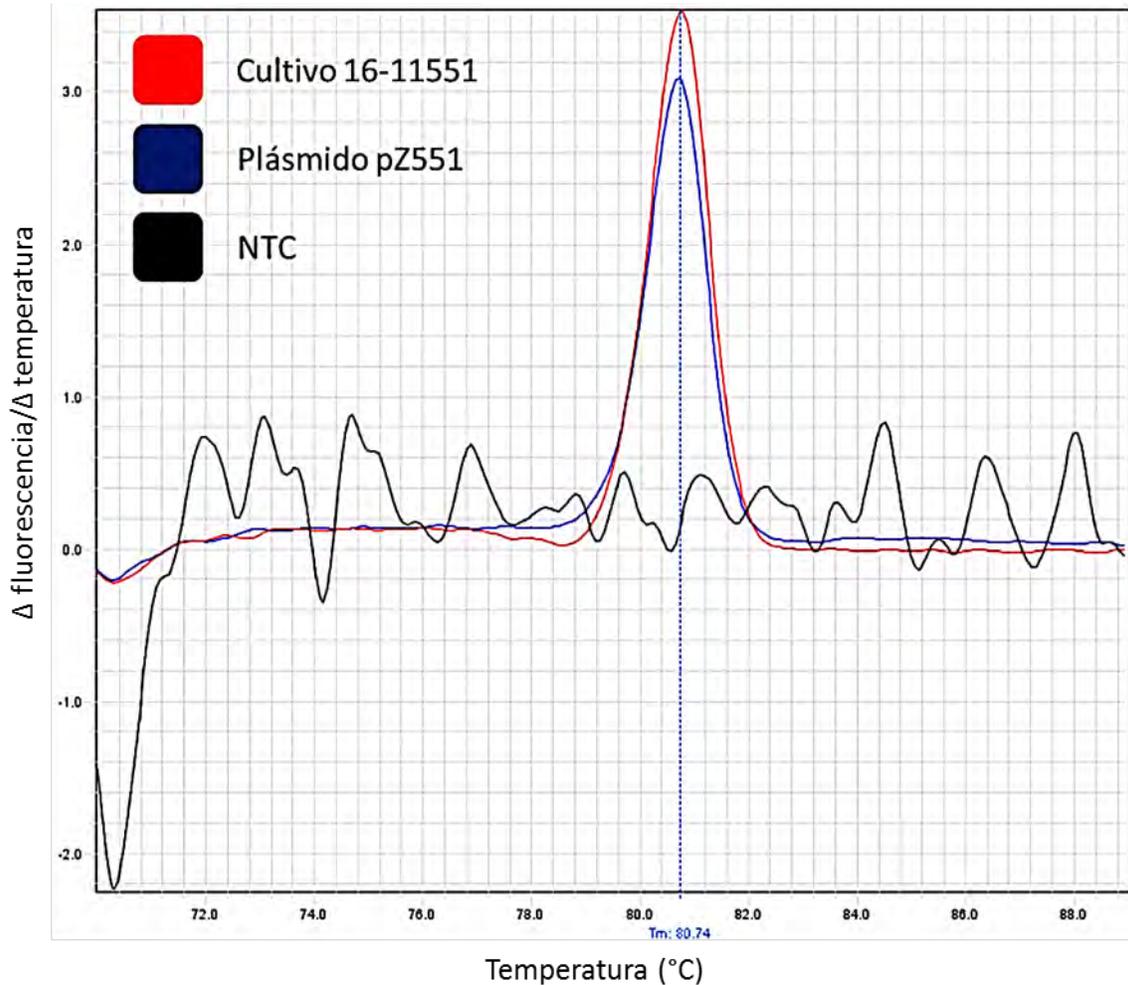


Figura 12. HRM de plásmido pZ551 y cultivo de ZIKV.

Se observa una T_m de 80.74 °C para el producto amplificado con los primers Zi2 F/R de pZ551 y ZIKV en cultivo. El HRM de control sin material genético (NTC) muestra grandes diferencias con respecto al de pZ551 y de ZIKV en cultivo.

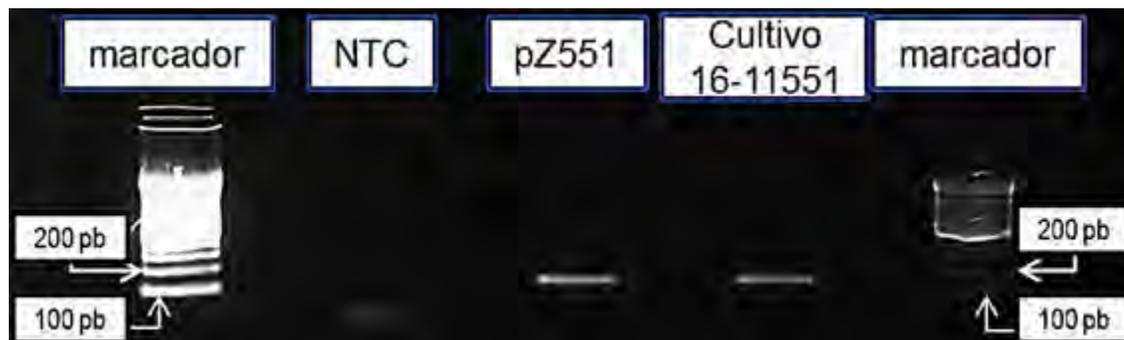


Figura 13. Tamaño del producto de la PCR con los primers Zi2 F/R de pZ551 y ZIKV en cultivo.

Se obtuvieron curvas de disociación muy similares con una Tm de 80.74 °C para los 2 productos, los cuales también mostraron el mismo tamaño en el gel, entre 100 y 200 pb.

Al ensamblar los resultados de secuenciación de Sanger se identificaron las 76 pb del inserto de pZ551 que se encuentran entre los primers Zi2 F y Zi2 R, las cuales mostraron una identidad del 100% respecto a la región homóloga de la secuencia KX856011.1 de ZIKV (Figura 14).

```

*****
.KX856011.1 C A G G A A A G A A C C A G A A A G C A A C T T A G T A A G G T C A A T G G T G A C T G C A G G A T C A A C T G A T C A C A T G G A T C A C T T C T C C C
.pZ551      C A G G A A A G A A C C A G A A A G C A A C T T A G T A A G G T C A A T G G T G A C T G C A G G A T C A A C T G A T C A C A T G G A T C A C T T C T C C C

```

Figura 14. Secuencia KX856011.1 comparada con inserto control en pZ551.

Para obtener las concentraciones requeridas en los ensayos de límite de detección se calculó el peso molecular de pZ551. Considerando que el vector pGEM-T tiene una longitud de 3,015 pb y que Zi2 F/R amplifica un producto de 120 pb, más dos timinas en los extremos que permitieron la ligación se obtiene una longitud de 3,137 pb. El peso molecular se calculó con el programa Sequence Manipulation Suite versión 2 (Stothard, 2000) y se obtuvo un valor de 138,928.19 g/mol. Con este dato se calculó la cantidad de copias/μL en la elución y se llevó al plásmido a una concentración de 10⁷ copias/μL en buffer DP. A partir de este punto se hicieron diluciones en buffer EB para llevar al plásmido a las concentraciones de 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ y 10⁰ por μL y utilizarlas en los ensayos de límite de detección y eficiencia.

6.3 Determinación del límite de detección y eficiencia de reacción

Los ensayos con cantidades conocidas del plásmido pZ551 (Tabla 7, Tabla 8) indicaron que el límite de detección del protocolo es de 10 copias de secuencia blanco/reacción (Figura 15).

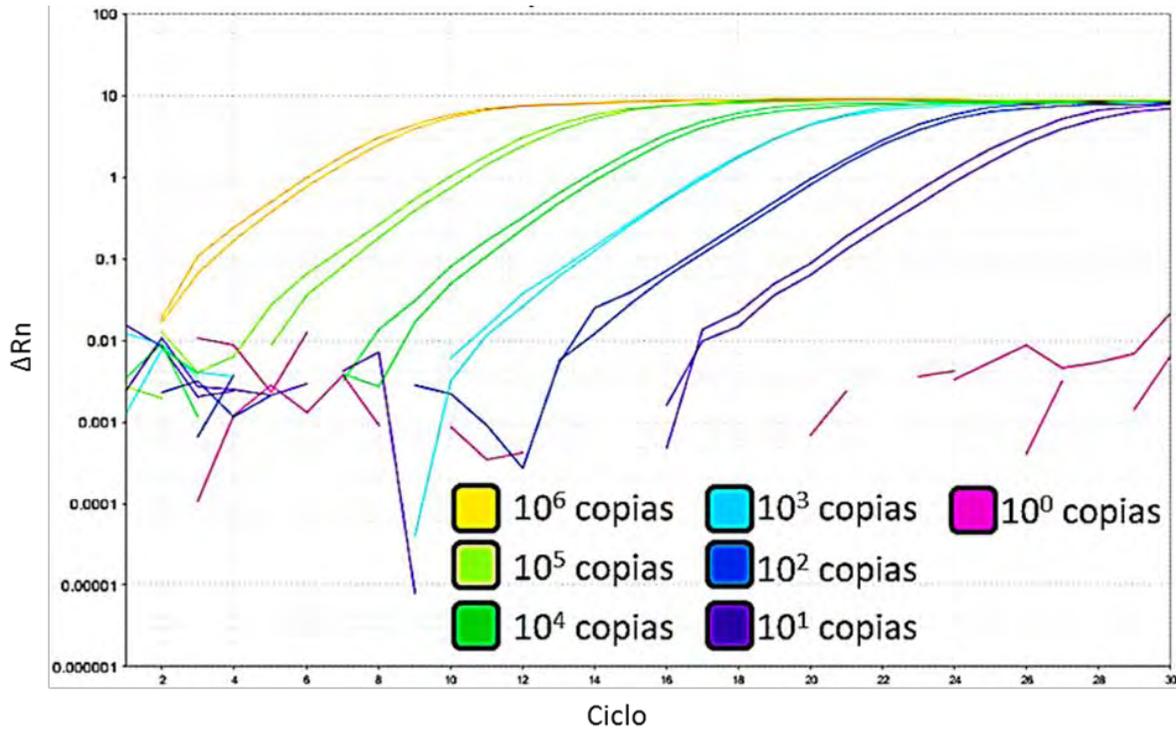


Figura 15. Curva estándar de Zi2 F/R.

Se observa detección de la secuencia blanco en todos los duplicados excepto en aquellos con sólo 1 copia de plásmido pZ551/reacción, por lo que el límite de detección del protocolo es de al menos 10 copias de secuencia blanco por reacción.

Se graficó el número inicial de copias de pZ551 por reacción contra el Cq obtenido. La regresión lineal indica una pendiente de -3.4287 (Figura 16), y en base a la fórmula de Bustin *et al.* (2009), la eficiencia de la qPCR fue de 0.9573 (95.73%).

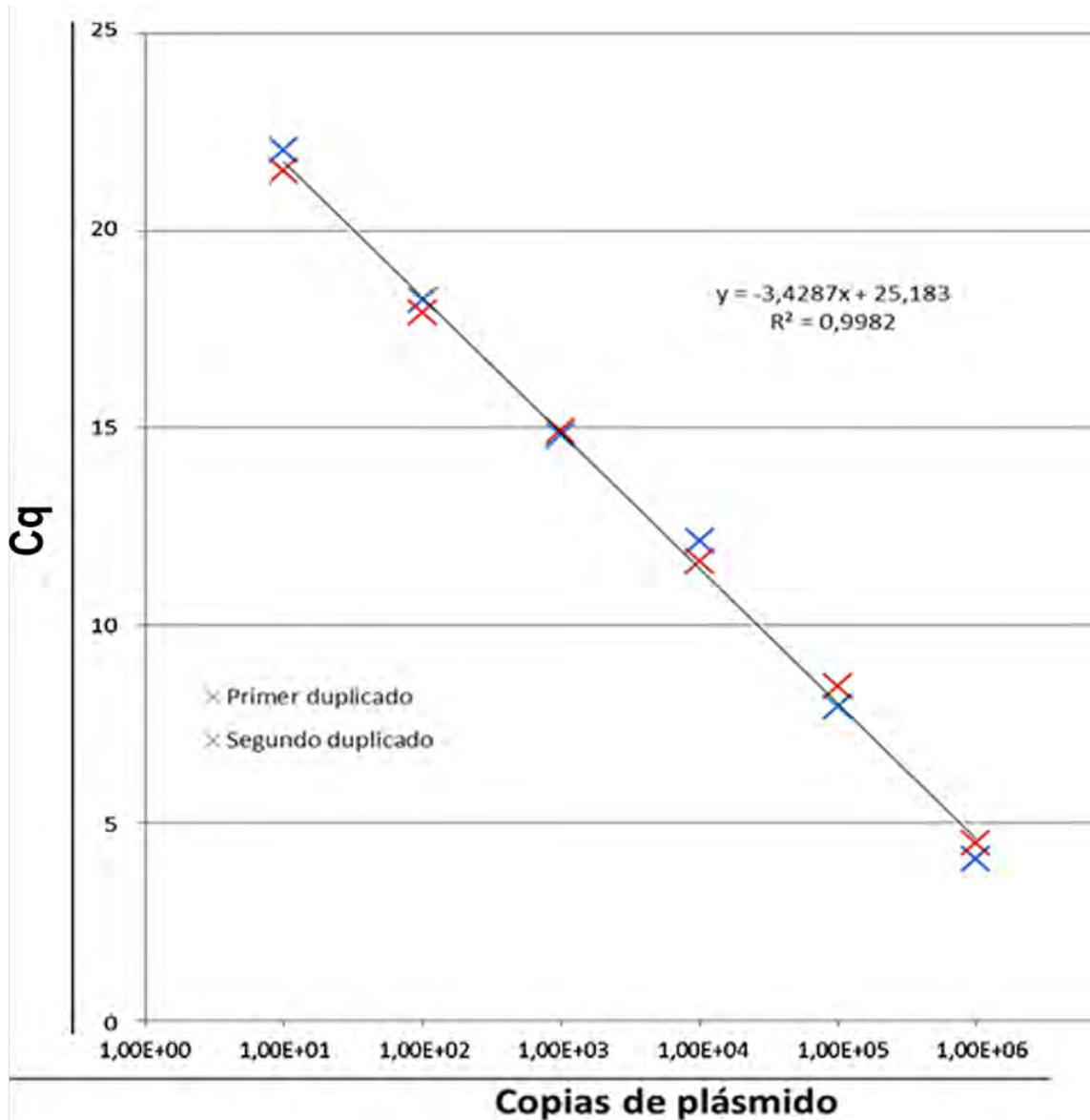


Figura 16. Cq obtenidos graficados contra copias de plásmido por reacción.

6.4 Especificidad de los primers Zi2 F/R

Los ensayos de especificidad de los primers Zi2 F/R (Tabla 9, Tabla 10) no mostraron amplificación del material genético de WNV, DENV-2, YFV y CHIKV en cultivo. Además el HRM de estas reacciones mostró grandes diferencias respecto a ZIKV (Figura 17).

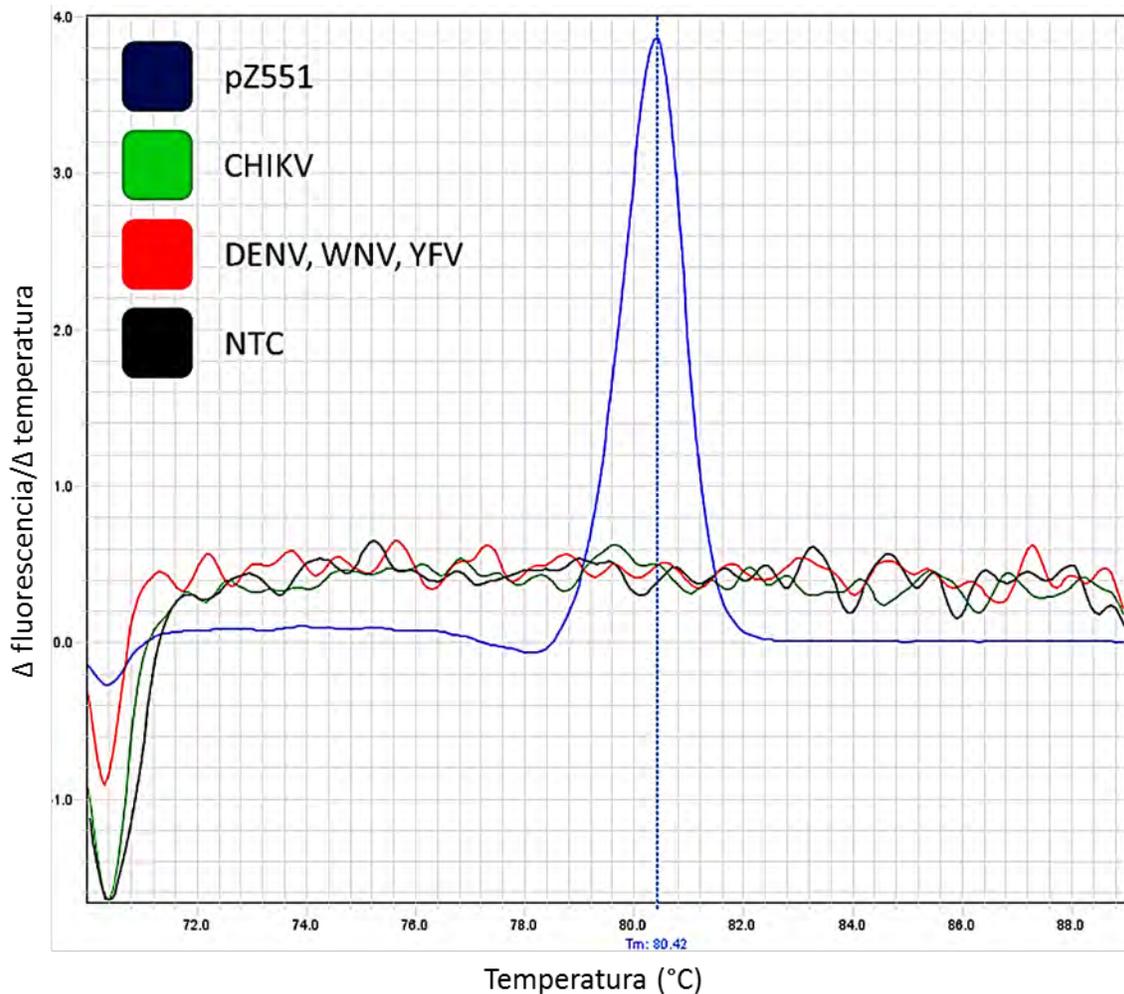


Figura 17. HRM de productos de qPCR de flavivirus diferenciales y ZIKV.

La línea azul es el HRM del producto de pZ551 y la línea negra corresponde al NTC. La línea verde es el HRM de la reacción con material genético de CHIKV en cultivo y la línea roja el de las reacciones con material genético de DENV-2 WNV y YFV en cultivo. No se aprecian diferencias significativas entre los HRM de las PCR con material genético de estos virus en cultivo y el NTC.

6.5 Elección del gen constitutivo como control interno

Para nuestro protocolo se requerían primers de CI que cumplieran estos requisitos:

- Generar un producto no mayor a 225 pb.
- Temperatura de alineación similar a Zi2 F y Zi2 R (~ 57.27 °C)
- Generar un producto de PCR con una Tm distinguible a la del producto de Zi2 F y Zi2 R (~ 80.52 °C)

Los genes más utilizados como CI en ensayos de qPCR con muestras de suero sanguíneo son: GAPDH, RNA ribosomal 18S y β -globina. Entre los primers reportados se buscaron aquellos que cumplieran los requisitos (Tabla 20).

Tabla 20. Primers reportados para detectar CI en qPCR utilizando material genético encontrado en suero sanguíneo.

Gen	Referencia	Primers (F/R)	Temperatura de alineación	Longitud del producto	Tm teórica del producto
GAPDH	Cohrs y Gilden (2007)	CACATGGCCTCCAAGGAGTAA TGAGGGTCTCTCTCTTCTCTTGT	60 °C	75 pb	78.74 °C
18S	Horlitz <i>et al.</i> (2009)	GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG	No reportada	66 pb	78.35 °C
	Andrews <i>et al.</i> (2015)	AAACGGCTACCACATCCAAG CCTCCAATGGATCCTCGTTA	60 °C	155 pb	78.35 °C, 81.25 °C
β-globina	Lay <i>et al.</i> (2010)	TAGCAACCTCAAACAGACACCA CAGCCTAAGGGTGGGAAAAT	61 °C	247 bp	79.44 °C, 81.25 °C
	Saiki <i>et al.</i> (1988)	F "PC03" ACACAACCTGTGTTCACTAGC "KM29" GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG "GH20" GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	55 °C	110 pb PC03-PC04	79.25 °C
		R "PC04" CCTTGCACCTACTTCAAC "KM38" TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG		167 pb PC03-KM38	81.35 °C
				205 pb KM29-PC04	81.64 °C
				262 pb KM29-KM38	82.35 °C
				268 pb GH20-PC04	82.05 °C
				325 pb GH20-KM38	82.35 °C

Al no existir primers reportados que cumplieran las exigencias para este ensayo se rediseñó PC04 (Saiki *et al.*, 1988), convirtiéndolo en un primer *forward* que recibió el nombre de RPC041F y se diseñó el primer *reverse* EX02R. Estos primers amplifican una región del gen de β-globina de *Homo sapiens*. RPC041F y EX02R presentan una temperatura de alineación similar a Zi2 F/R (Tabla 18, Tabla 21) y se alinean en los exones 1 y 2 de β-globina respectivamente (Figura 18), por lo que permiten diferenciar los productos amplificados de mRNA y de DNA en base al Tm teórico y al tamaño del producto (Tabla 22).

Tabla 21. Primers para amplificar β -globina.

Primers	Temperatura de alineación
RPC041F 5' GGTGAACGTGGATGAAGTTGG 3'	59.46 °C
EX02R 5' CCAAAGGACTCAAAGAACCTCTG 3'	59.18 °C

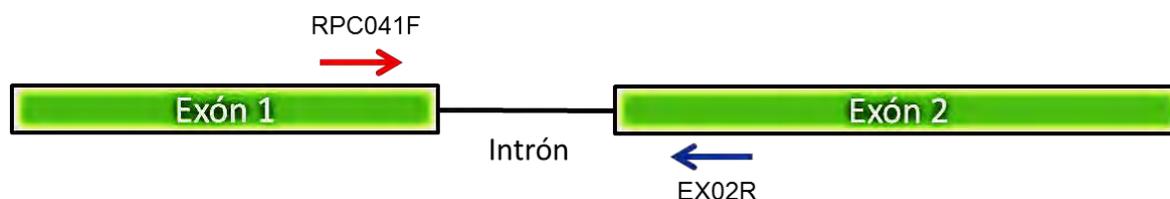


Figura 18. Diagrama de la ubicación de RPC041F y EX02R en el gen de β -globina.

Al tener sitios de alineación en distintos exones, los primers RPC041F/EX02R pueden amplificar productos de diferentes tamaños a partir de mRNA y DNA del gen de β -globina. (El diagrama no se encuentra a escala).

Con el programa OligoAnalyzer[®] 3.1 (IDT, 2012) se analizó la probabilidad de formación de homodímeros y heterodímeros entre los primers (ANEXO 3).

Tabla 22. Tamaño y Tm teóricos según la naturaleza del β -globina amplificado.

Producto	Tm
84 pb [mRNA]	84.25 °C
215 pb [DNA]	83.45 °C

Se realizó una PCR punto final por duplicado utilizando los primers RPC041F/EX02R con RNA de fibroblastos humanos en cultivo primario y el kit OneStep RT-PCR (Qiagen) bajo las mismas condiciones de reacción que el RT-PCR (Tabla 6) pero aumentando el número de ciclos a 30. La electroforesis muestra un producto con tamaño entre 200 y 300 pb (Figura 19).



Figura 19. Gel con producto de los primers RPC041F/EX02R de RNA de fibroblastos humanos en cultivo primario. El tamaño del producto observado corresponde al esperado para DNA de β -globina.

Con las concentraciones evaluadas de los primers RPC041F/EX02R durante el RT-PCR y el qPCR-HRM (Tabla 11) se obtuvieron Cq distintas (Tabla 23). Estos resultados indican que los primers RPC041F/EX02R tienen una concentración óptima con 0.5 μ M en RT-PCR y con 0.3 μ M en el qPCR. La concentración 0.5 μ M/0.5 μ M proporciona un Cq ligeramente menor, pero es excesiva y puede favorecer la formación de dímeros de primers y la amplificación de productos inespecíficos.

Tabla 23. Cq con distintas concentraciones de primers RPC041F/EX02R en ensayos con RNA de fibroblastos humanos en cultivo primario.

Concentración final de RPC041F/EX02R RT-PCR /qPCR HRM	Ct
0.2 μ M/0.3 μ M	27.9
0.3 μ M /0.3 μ M	25.11
0.5 μ M /0.3 μ M	18.24
0.2 μ M /0.5 μ M	24.58
0.3 μ M /0.5 μ M	19.26
0.5 μ M /0.5 μ M	18.12

El HRM indica que la T_m del producto de β -globina se encuentra alrededor de los 83.52 °C (Figura 20), cercana a la predicha para el producto de DNA (Tabla 22).

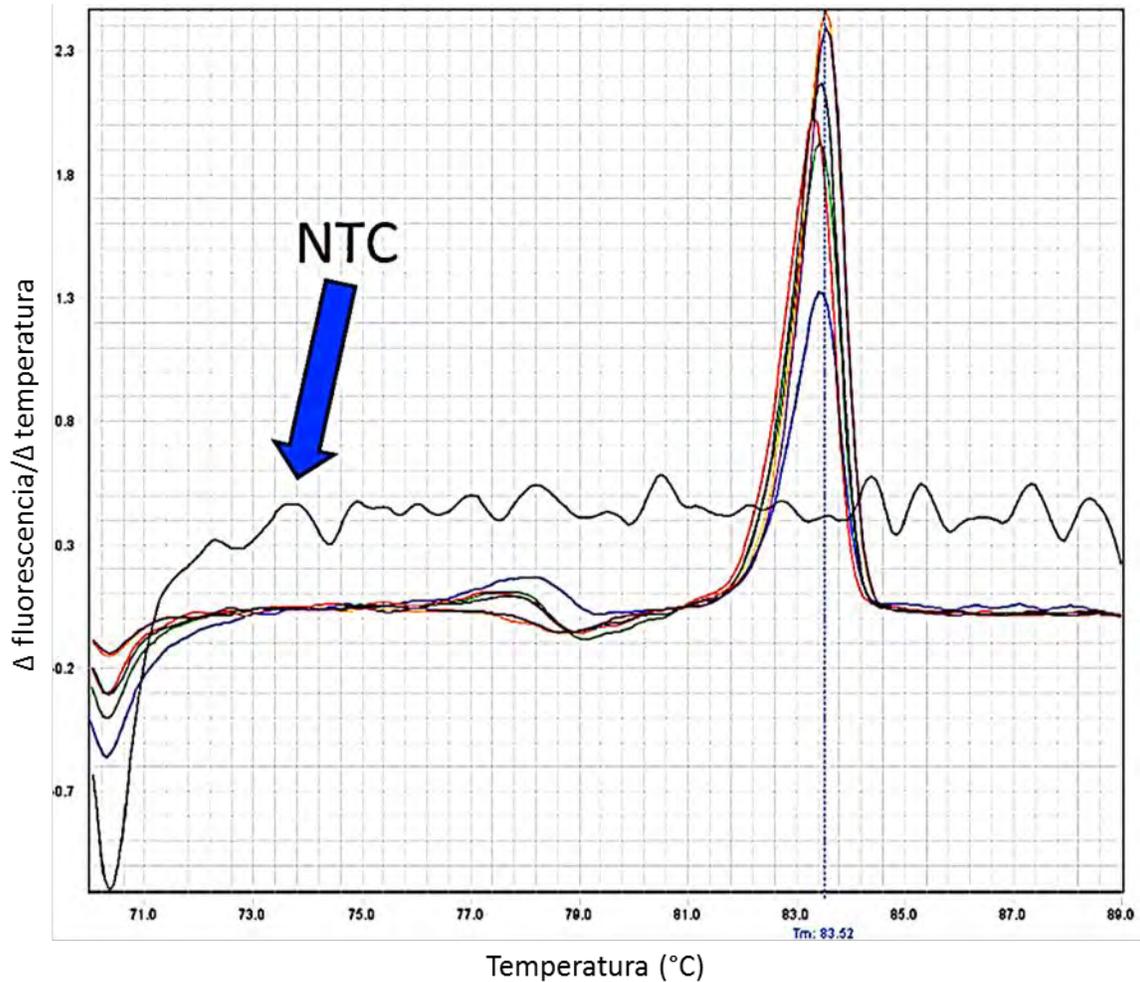


Figura 20. HRM del producto de RPC041F/EX02R.

Cada color representa una concentración evaluada de los primers RPC041F/EX02R con material genético de fibroblastos humanos en cultivo primario. La T_m del producto de este juego de primers se observa alrededor de los 83.52 °C.

La electroforesis de los productos de qPCR obtenidos mostró 2 bandas cercanas a las 200 pb (Figura 21).

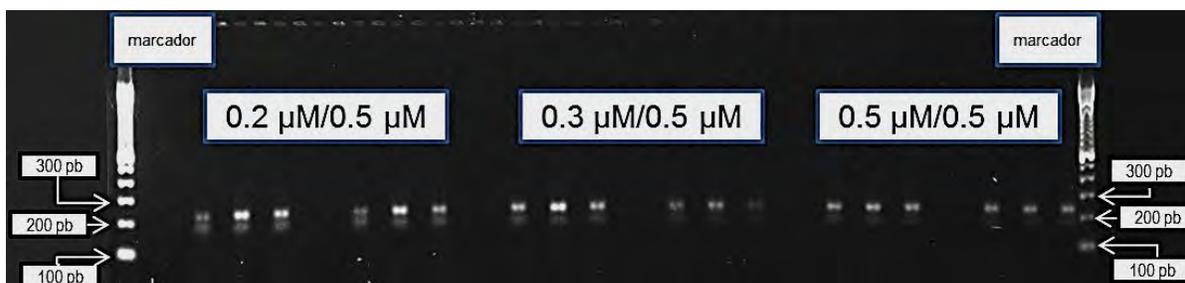


Figura 21. Electroforesis del producto de la qPCR de RPC041 y EX02R con RNA de fibroblastos humanos en cultivo primario.

La secuencia obtenida por secuenciación de Sanger a estas 2 bandas muestra identidad del 100% entre ellas y del 96% con la secuencia del gen de β -globina (Accession number: AH001475.2) (Figura 22).

```

AH001475.2      GGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAAGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGAC
.secuenciación beta-globina GGTGAGrCCCYGGCCAGGKTGGTATCAAAGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGAC
|AGAGAAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCACCCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCCTTGGACC
ACAGAAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCACCCCTTAGACTGCTGGTGSTCTACCCCTTGGACC

```

Figura 22. Producto teórico y experimental de β -globina.

Todas las reacciones con RNA de 10 sueros sanguíneos (Tabla 14, Tabla 15) muestran amplificación de la β -globina. Las T_m obtenidas con material genético de suero sanguíneo y fibroblastos humanos en cultivo primario difieren en 0.37°C (Figura 23) que se consideró el intervalo aceptable del ensayo.

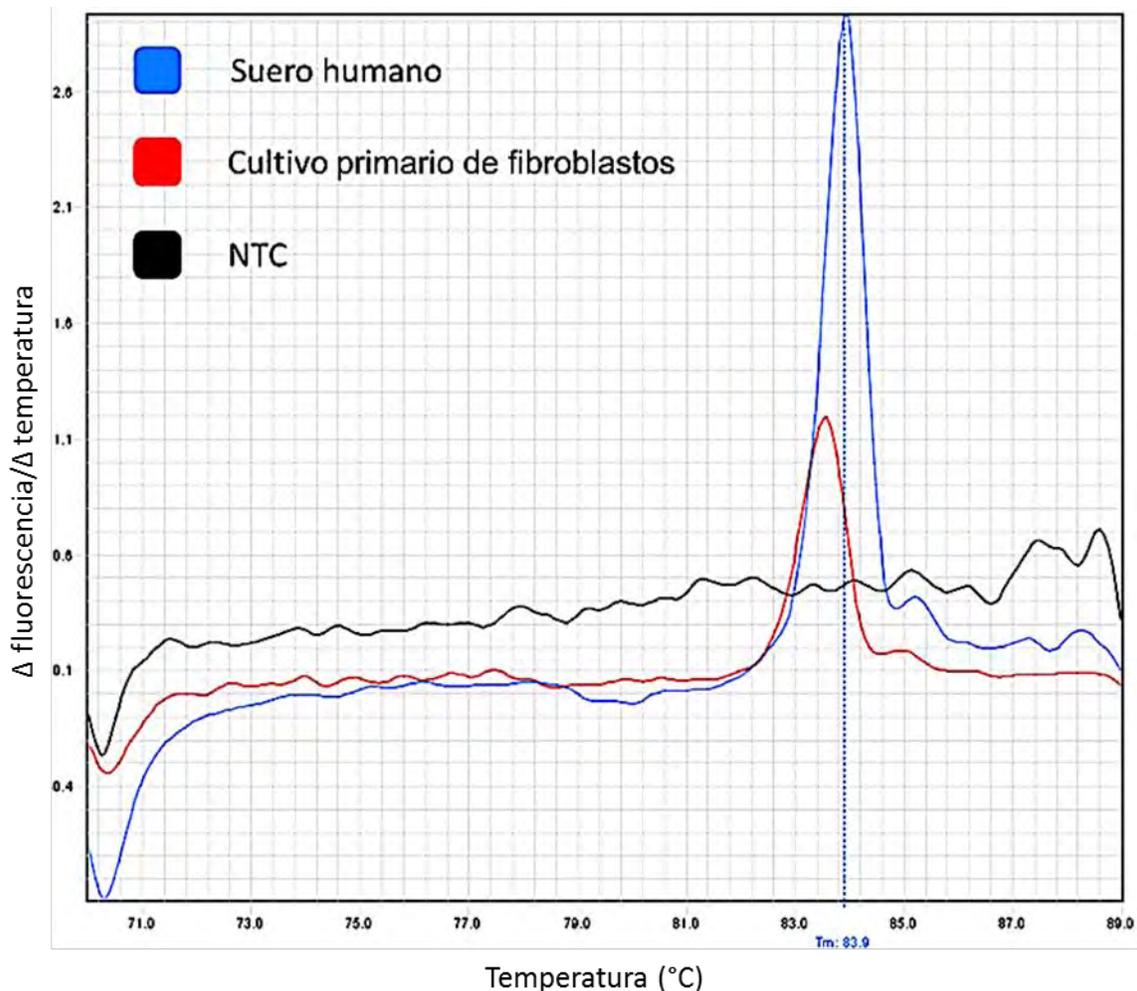


Figura 23. HRM de productos de RPC041F/EX02R.

Se muestra la curva de disociación de los productos de la PCR con los primers RPC041F/EX02R a partir de RNA extraído de suero sanguíneo humano (línea azul) y de fibroblastos en cultivo primario (línea roja).

6.6. Comparación con otros ensayos de qPCR para virus del Zika

Se comparó el límite de detección, secuencia blanco, especificidad, eficiencia de reacción y método de detección de los ensayos de qPCR reportados hasta diciembre del 2016 para amplificar ZIKV y el propuesto en esta tesis (Tabla 24). El límite de detección de todos los ensayos se evaluó con material genético basado en el genotipo asiático de ZIKV, por lo que los valores presentados sólo aplican para este genotipo.

Tabla 24. Comparación de ensayos específicos para la detección de ZIKV.

Referencia	Límite de detección*	Secuencia blanco	Especificidad*	Eficiencia de reacción	Método de detección en tiempo real
Lanciotti <i>et al.</i> (2008)	3.2(M), 4.1(E) copias/reacción	M, E	Sin detección de 38 flavivirus y 3 alphavirus.	No reportada	Sonda de hidrólisis
Faye <i>et al.</i> (2013)	8 copias/reacción	NS5	Sin detección de 40 flavivirus y CHIKV	105.38%	Sonda de hidrólisis
Pyke <i>et al.</i> (2014)	5.3(E), 12.1(NS) copias/reacción	E, NS1	Sin detección de 39 flavivirus y 4 alphavirus	No reportada	Sonda de hidrólisis
Tappe <i>et al.</i> (2014)	1,377.3 copias/reacción	NS3	Sin detección de 37 flavivirus y CHIKV	No reportada	Sonda de hidrólisis
Corman <i>et al.</i> (2016)	2.1(E), 3.1(NS1) copias/reacción	E, NS1	Sin detección de 37 flavivirus y CHIKV	No reportada	Sonda de hidrólisis
Xu <i>et al.</i> (2016)	1 PFU/reacción	NS5-NCR 3'	Sin detección de 4 flavivirus y CHIKV	85.02%	Colorante fluorescente (SYBR Green)
Zi2 F/R (Esta tesis)	10 copias/reacción	NS1	Sin detección de 3 flavivirus y CHIKV	95.73%	Colorante fluorescente (EvaGreen)

* ANEXO 4

El protocolo presentado en esta tesis muestra una menor sensibilidad que seis de los nueve ensayos reportados; también es el ensayo cuya especificidad ha sido comprobada contra menos virus.

6.7. Análisis del panel de sueros de Mixtequilla

Utilizando el protocolo estandarizado se analizó un panel de 79 sueros sanguíneos evaluado previamente por el InDRE. Se utilizó suero sanguíneo de un individuo clínicamente sano como control positivo para β -globina, 1000 copias del plásmido pZ551 como control positivo de ZIKV y también se incluyó un NTC. Se amplificó β -globina en 76 de las 79 muestras del panel y se encontraron nueve muestras positivas a RNA de ZIKV (ANEXO 5). El InDRE reportó sólo ocho muestras positivas a ZIKV sin tener un CI (Tabla 25). Los tres sueros que no amplificaron β -globina se consideraron falsos negativos y se invalidó el resultado negativo obtenido para Zi2 F/R, el HRM de un verdadero positivo debe presentar dos T_m correspondientes a los productos de los primers Zi2F/R y RPC041F/EX02R (Figura 24).

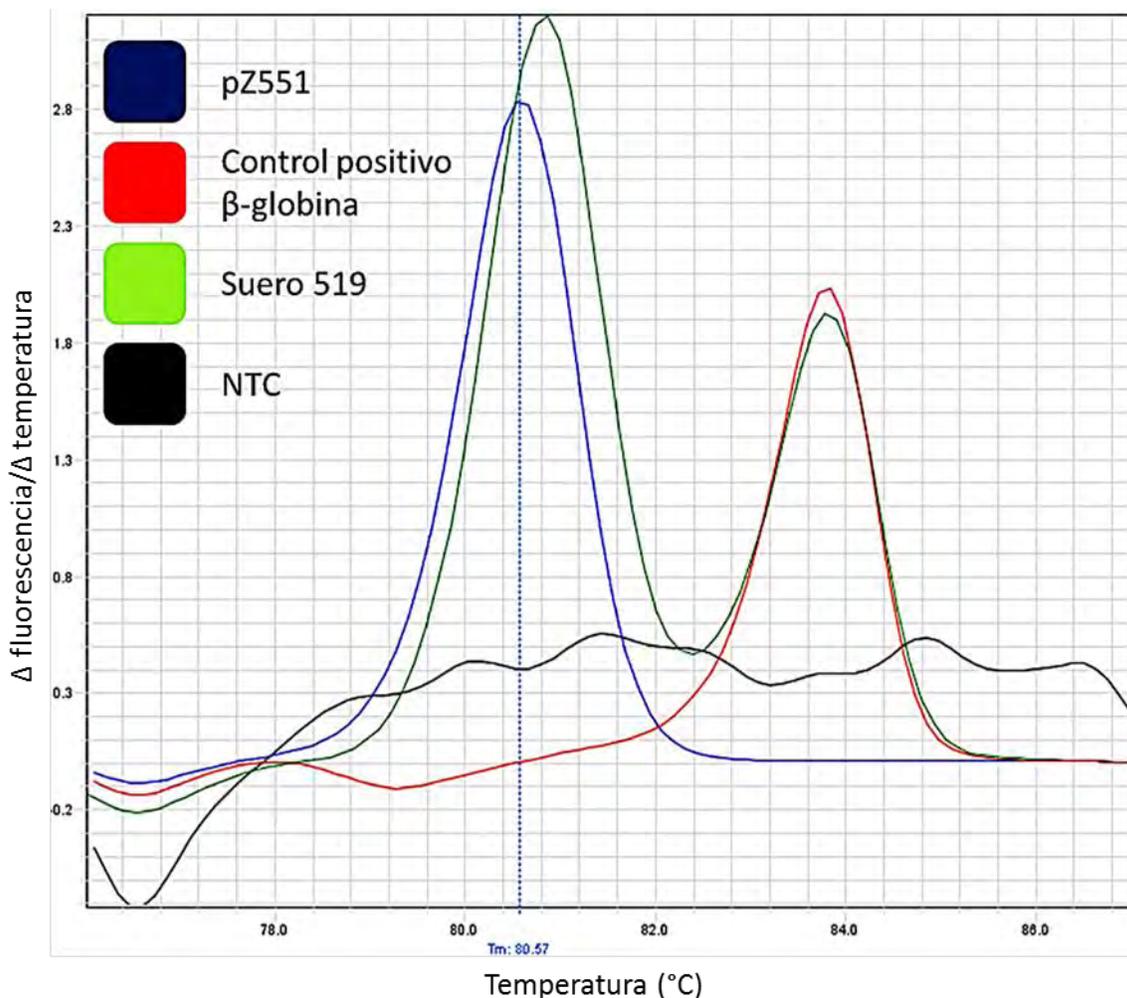


Figura 24. Curva de disociación de suero 519.

El HRM muestra las curvas de disociación del NTC (línea negra), de los controles positivos de ZIKV (línea azul) y β -globina (línea roja), así como del suero 519 (línea verde); este último presenta las dos T_m esperadas para los productos de ZIKV y β -globina por lo que se considera un verdadero positivo.

Tabla 25. Comparación de resultados del InDRE y el protocolo estandarizado en esta tesis.

InDRE ZIKV1086/ZIKV1162c (Lanciotti <i>et al.</i> , 2008)	INER Zi2 F/R - RPC041F/EX02R
8 sueros positivos a ZIKV	9 sueros positivos a ZIKV
-	3 sueros negativos a β -globina

Los sueros positivos a ZIKV detectados por el InDRE también fueron positivos por Zi2 F/R; el suero 527 fue positivo discordante y se confirmó por secuenciación. Se identificaron 87 nucleótidos con identidad del 98% respecto a la región homóloga de la secuencia de ZIKV, KX856011.1 (Figura 25).

KX856011.1 CCA GAAAGCAACTTAGTAAGGTCAATGGTGACTGCAGGATCAACTGATCACATGGATCACTTCTCCCTTGGAGTGCTTGTGATTCTG
 :suero 527 CCGGAAAGCAACTTAGTAAGGTCAATGGTGACTGCAGGATCAACTGATCACATGGATCACTTCTCCCTTGGAGTGCTTGTGATTCTA

Figura 25. Secuencia de ZIKV del suero 527.

Se evaluó el panel una vez más, utilizando en esta ocasión los primers ZIKV1086/ZIKV1162c sin sonda de hidrólisis. Estos ensayos se realizaron con el mismo equipo, kit y volúmenes utilizados para Zi2 F/R (Tabla 6, Tabla 16, Tabla 17) con la excepción de que no se incluyó a los primers RPC041F/EX02R en las reacciones. Se detectó amplificación en numerosas muestras negativas a ZIKV confirmadas por el InDRE y por Zi2 F/R; sin embargo, el HRM mostró que se trataba de amplificación de productos inespecíficos al no coincidir con la T_m del control positivo (Figura 26).

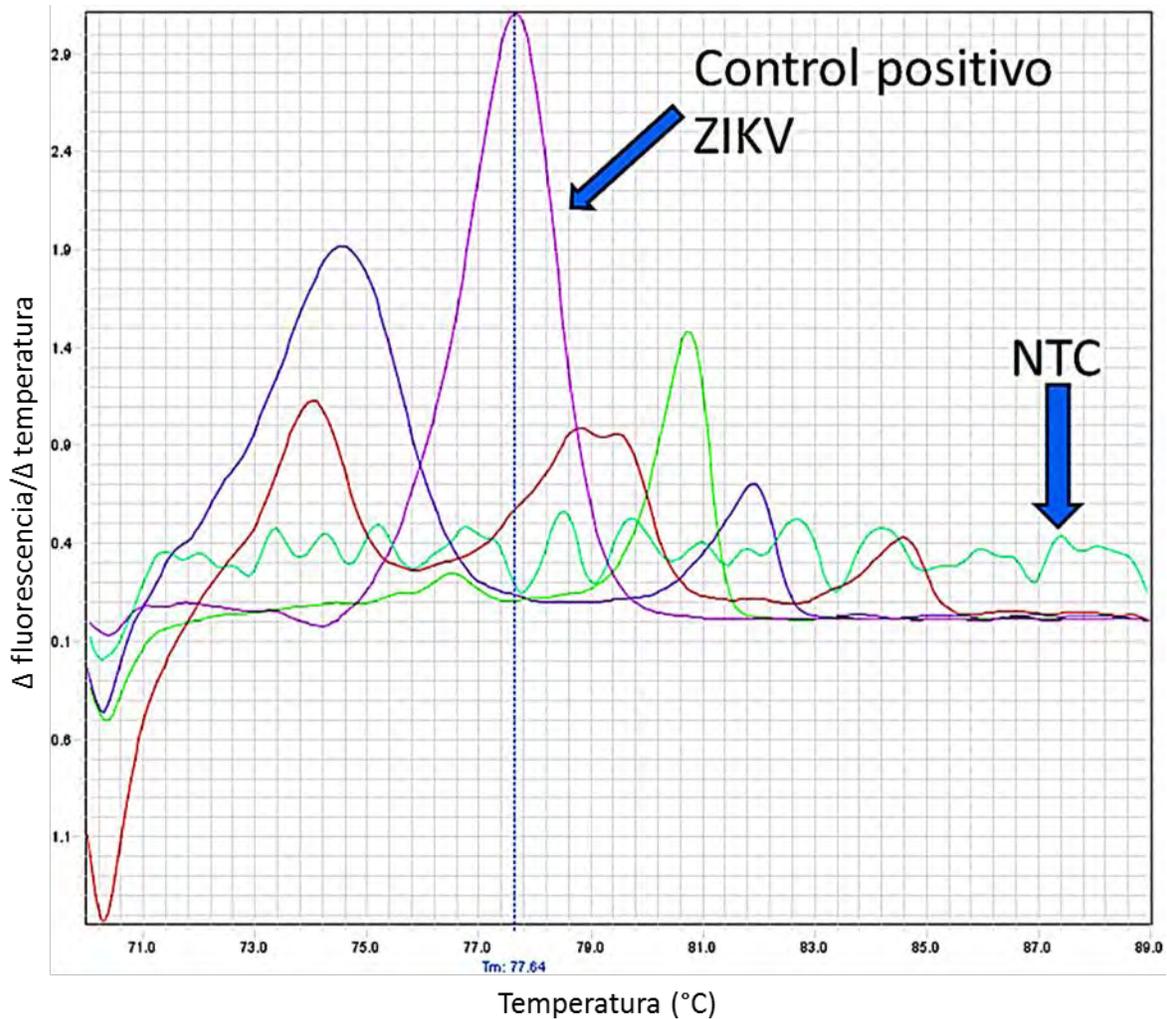


Figura 26. HRM de productos inespecíficos de ZIKV1086/ZIKV1162c.

A excepción de línea morada (control positivo de ZIKV) y de la línea cian (control negativo), el resto de los colores corresponde al HRM de distintos sueros sanguíneos, en uno se puede observar hasta tres T_m distintas a la del control positivo, pudiendo indicar la amplificación de más de un producto inespecífico.

El análisis de BLAST (Altschul *et al.*, 1997) indicó alta identidad entre diversas secuencias genómicas humanas con los primers ZIKV1086/ZIKV1162c, algunas de las cuales mostraron similitud del 100% con la región 3' de ambos primers (ANEXO 6). Además, la región 3' del primer ZIKV1086 mostró alta similitud con la región codificante de la proteína E de cepas de DENV-2 y DENV-1 (ANEXO 6). Todo lo anterior sugiere que es posible amplificar material genético humano y de DENV con ZIKV1086 y ZIKV1162c.

Finalmente, se propone el siguiente protocolo para el diagnóstico de ZIKV (Figura 27).

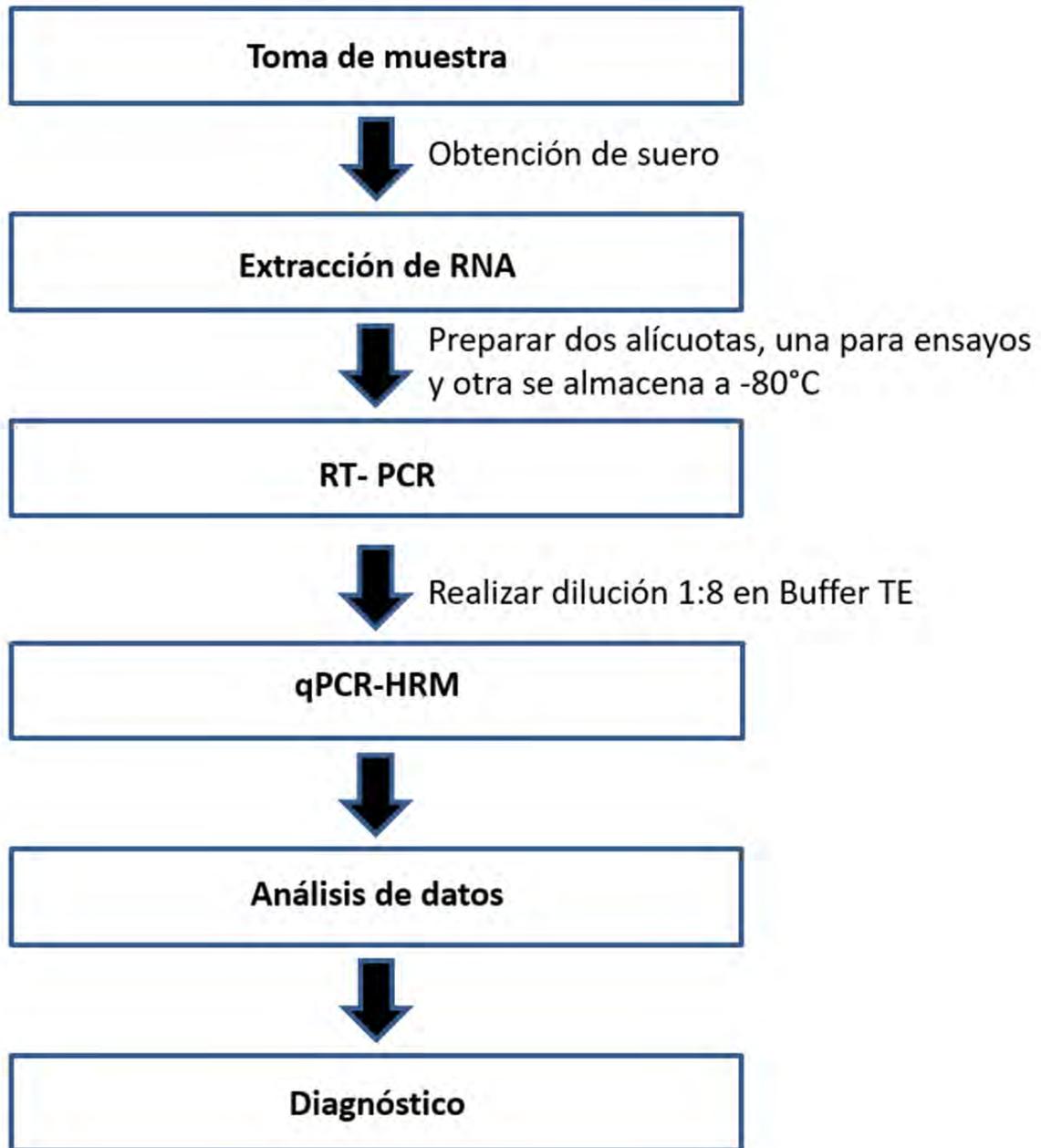


Figura 27. Diagrama de flujo del protocolo para el diagnóstico de ZIKV.

7. DISCUSIÓN

“Prefirió la dura verdad a sus más queridas ilusiones. Ése es el corazón de la ciencia”.
Carl Sagan

El objetivo general de esta tesis era diseñar un protocolo de RT-qPCR-HRM que permitiera la detección de RNA de ZIKV en muestras de suero utilizando EvaGreen. La detección de ZIKV en muestras de suero provenientes de Mixtequilla significó que se cumplió este objetivo; además, el protocolo estandarizado durante esta tesis presentó una mayor sensibilidad diagnóstica que el utilizado por el InDRE y permitió la amplificación acoplada de DNA de β -globina permitiendo la reducción de falsos negativos.

7.1. Detección de ZIKV

El uso de EvaGreen requiere primers altamente específicos, ya que al unirse al dsDNA total se registra la amplificación de productos inespecíficos. Las pruebas *in silico* mostraron que Zi2 F tiene un alto grado de similitud con los virus DENV-4, Bagaza, DENV-2 y Spondweni; esto no representa un gran problema ya que dichos virus presentan diferencias significativas con la región 3' de este mismo primer, lo que disminuye la posibilidad de amplificación del material genético (Kwok *et al.*, 1990). Por otro lado, Zi2 R tiene escasa identidad con estos 4 flavivirus, reduciendo drásticamente la posibilidad de amplificación exponencial de su material genético.

Experimentalmente se comprobó que el material genético de DENV-2, WNV, YFV y CHIKV no es amplificado por los primers Zi2 F/R. La experiencia con DENV-2 fue particularmente valiosa, ya que demostró que una diferencia de sólo tres nucleótidos respecto a Zi2 F es suficiente para que no se detecte amplificación de material genético.

Los dos ensayos propuestos por Lanciotti (2008), el diseñado por Faye (2013), uno de los de Pyke (2014) y los dos de Corman *et al.* (2016) demostraron una mayor sensibilidad que el protocolo propuesto en esta tesis, cuyo límite de detección se determinó en 10 copias de secuencia blanco por reacción; sin embargo, la resolución de nuestra curva estándar no permitió conocer si el límite de detección del protocolo se encuentra debajo de las 10 copias y es necesario hacer ensayos con cantidades más pequeñas para determinar si el protocolo presenta una mayor sensibilidad. Por otro lado, ninguno de los ensayos reportados hasta diciembre del 2016 son capaces de diferenciar los dos genotipos de ZIKV; y como se menciona más adelante, existe evidencia teórica y experimental que sugiere que el protocolo propuesto en esta tesis sí permite esa diferenciación.

Xu *et al.* (2016), reportan la sensibilidad de su ensayo en PFU detectadas; esta unidad indica el número de viriones infectivos, pero no el número de copias del genoma de ZIKV, dada la existencia de viriones no infectivos y de copias “libres” del genoma de ZIKV (Guillaume *et al.*, 2004), por lo que su sensibilidad no es comparable a la del resto de los ensayos, que reportan su sensibilidad en número de copias.

Las secuencias donde se unen Zi2 F/R se han mantenido casi invariables con tan sólo dos cambios para Zi2 R en secuencias de virus circulantes durante un intervalo de tiempo de 69 años (1947-2016), encontradas en un amplio rango geográfico y que abarcan los dos genotipos (asiático y africano), lo cual sugiere que estos primers pueden ser de gran utilidad. Es muy probable que estos primers se puedan utilizar durante largo tiempo a pesar de la tasa de mutación de ZIKV, estimada en 25 mutaciones/año (Logan, 2016). Por otro lado, los amplificadores teóricos de Zi2 F/R obtenidos con las secuencias de ZIKV mostraron diferencias de 15%, que podría ser suficiente para distinguir distintas cepas de ZIKV mediante HRM (Wittwer *et al.*, 2003).

Este protocolo mostró una eficiencia de reacción del 95.73%; cuatro de los seis ensayos publicados de qPCR para detección de ZIKV no indican su eficiencia y el propuesto por Xu *et al.* (2016) tiene una eficiencia muy baja, convirtiendo al ensayo diseñado por Faye (2013), que presenta eficiencia del 105.38%, en el único competidor en este aspecto.

Los ensayos diseñados por Lanciotti no detectan el material genético de 40 virus distintos a ZIKV; sin embargo, los resultados del panel utilizando los primers ZIKV1086 y ZIKV1162c en el qPCR-HRM indican que estos primers amplifican productos inespecíficos y sugieren que la especificidad del ensayo depende del uso de sonda de hidrólisis, que permiten la identificación del producto esperado con una alta especificidad, pero no la detección de productos inespecíficos. Por otro lado, la sensibilidad del ensayo de Lanciotti fue calculada utilizando exclusivamente material genético de ZIKV y ésta puede disminuir de forma importante en muestras clínicas debido a la amplificación de productos inespecíficos, lo que podría explicar por qué el InDRE, utilizando un ensayo de Lanciotti, fue incapaz de detectar una muestra positiva por Zi2 F/R.

La búsqueda en BLAST señaló que el extremo 3' de los primers diseñados por Lanciotti, ZIKV1086 y ZIKV1162c, tienen alta similitud con diversas secuencias genómicas humanas, lo que aumenta drásticamente la probabilidad de amplificarlas (Kwok *et al.*, 1990); esto podría explicar la diversidad de productos inespecíficos detectados durante el HRM (Figura 26). BLAST también indica similitud del extremo 3' de ZIKV1086 con DENV-2 y DENV-1; estos virus no

pueden ser amplificados de manera exponencial debido a las diferencias que presentan respecto al primer ZIKV1162c, pero el primer ZIKV1086 puede ser “secuestrado” para amplificar la secuencia complementaria del genoma de DENV, reduciendo la eficiencia de la amplificación de ZIKV.

A diferencia de los ensayos que utilizan sonda de hidrólisis, los ensayos que identifican los productos de qPCR por HRM, como el diseñado por Xu *et al.* (2016) y el presentado en esta tesis, aumentan la posibilidad de detectar la amplificación de productos inespecíficos y percatarse así de la necesidad de mejorar el protocolo, como lo demuestran los resultados del HRM de los primers ZIKV1086 y ZIKV1162c.

Si bien no se comprobó de forma experimental en esta tesis, los resultados de la alineación de los primers Zi2 F y Zi2 R respecto a las secuencias completas de ZIKV indican que es posible amplificar secuencias del genotipo africano; las diferencias entre las secuencias de los genotipos asiático y africano podrían dar productos que sean diferenciables a través de HRM; la T_m predicha por el algoritmo de POLAND para el producto del genotipo asiático es 79.45 °C y la del genotipo africano de 81.15 °C, difiriendo en 1.7 °C, suficiente para la diferenciación de ambos genotipos y permitir un diagnóstico más fino de ZIKV. Además, resultados de otros proyectos en nuestro laboratorio así lo confirman.

7.2. Amplificación de β -globina con los primers RPC041F/EX02R

A diferencia de la predicción de la T_m del producto de Zi2 F/R que difirió más de 1°C del obtenido experimentalmente, la predicción de T_m para el producto de DNA sobre el gen constitutivo β -globina con los primers RPC041F/EX02R sólo difirió 0.02 °C del experimental; sin embargo, la predicción para el producto de RNA fue más elevada que la de DNA, lo que está en contra del principio básico que señala que a mayor número de puentes de hidrogeno en el dsDNA mayor T_m (Wittwer *et al.*, 2003), mostrando que esas predicciones deben tomarse con cautela.

Durante los experimentos con material genético de suero sanguíneo y de fibroblastos humanos en cultivo primario el producto amplificado por los primers RPC041F/EX02R corresponde a DNA de β -globina de acuerdo a la secuencia obtenida. No se demostró la amplificación de mRNA de β -globina, ya que si bien en muchas curvas de disociación se pudo observar un pequeño pico alrededor de los 77.90 °C (Figura 20) que podría corresponder a la T_m del producto de mRNA, en la electroforesis no se visualizó una banda de 84 pb, longitud esperada para el producto de mRNA.

Las dos bandas observadas durante la electroforesis de la PCR de RPC041F/EX02R sólo se obtuvieron al realizar los dos pasos del protocolo (RT-

PCR, qPCR-HRM) y no al realizar una RT-PCR punto final; sugiriendo que el uso del reactivo SSoFast EvaGreen with Low ROX (BIO-RAD) tiene una relación causal con esto. La secuenciación indicó que en ambas bandas se encuentra el producto esperado de β -globina. Sería necesario estudiar si existe algún producto inespecífico presente en dicho fragmento que explique la diferencia en tamaños.

Un buen CI debe tener una estabilidad similar a la secuencia blanco para dar una idea acertada acerca del estado de ésta última en la muestra. Como el DNA es más estable que el RNA, su detección no implica un buen estado del material genético de ZIKV. Si bien el DNA de β -globina permitió reducir el número de falsos negativos para ZIKV, existen secuencias que cumplirían mejor el papel de CI para este protocolo.

Los primers RPC041F y EX02R deberían ser igual o más efectivos en la amplificación de mRNA de β -globina que de DNA del mismo gen debido al menor tamaño del producto de mRNA (Cha y Thilly, 1993). La ausencia de amplificación puede deberse a una reducida extracción de mRNA. Este fenómeno se explica por el kit utilizado para la extracción de material genético, QIAamp RNA viral (Qiagen), el cual está diseñado para maximizar la extracción de RNA viral y extraer RNA y DNA del hospedero de forma no selectiva. El mRNA representa sólo el 3-5% del RNA total en las células de mamíferos (Alberts *et al.*, 2002) y mecanismos de competencia podrían disminuir su recuperación. Para la extracción específica de mRNA se podría utilizar el kit Oligotex Suspensión (Qiagen) diseñado para este propósito. Sin embargo, cambiar el kit de extracción del material genético no es recomendable por la consecuente reducción en la recuperación del genoma viral, que aumentaría enormemente el riesgo de falsos negativos, eliminando las ventajas de tener un CI. Extraer por duplicado el material genético utilizando ambos kits es una opción, pero la cantidad de muestra necesaria, el costo monetario y temporal de esto no lo vuelven recomendable, siendo más práctico reemplazar el CI por un RNA que se pueda extraer de forma eficiente con el kit QIAamp RNA viral, el cual presentaría una estabilidad similar al material genético de ZIKV y funcionaría como un excelente CI.

Debido al reducido porcentaje que representa el mRNA, el CI se podría reemplazar por algún RNA ribosomal, que son 10 veces más abundantes en las células de mamíferos (Alberts *et al.*, 2002). Si bien los RNA de transferencia también son muy abundantes, estos serían extraídos de forma deficiente porque suelen tener una longitud aproximada de 76 nucleótidos (Juhling *et al.*, 2009) y el kit QIAamp RNA viral está diseñado para extraer RNA de tamaño mayor a los 200 nucleótidos. Además, los RNA de transferencia son más estables que la mayoría

de los RNA (Alberts *et al.*, 2002) y no indicarían una buena calidad del genoma de ZIKV.

7.3 Protocolo para la detección de ZIKV y β -globina

La amplificación múltiple y el uso de EvaGreen impiden la cuantificación viral, algo que sí ofrecen otros ensayos de qPCR específicos para ZIKV. Esto no se considera una desventaja importante, debido a que el diagnóstico requiere determinar la presencia / ausencia de ZIKV y no la carga viral. Si se desea conocer la carga viral de una muestra se pueden hacer dos reacciones independientes para ZIKV y β -globina; si existe amplificación de β -globina se puede considerar la Cq obtenida con Zi2 F/R como válida y el número de copias de secuencia blanco iniciales se calcula a partir de una curva patrón.

Si bien el qPCR es más caro que otras variantes de PCR, como el punto final y el anidado, ya que requiere más reactivos y equipo más costoso, ofrece una mayor rapidez, reduce el riesgo de contaminación y permite realizar HRM, haciendo posible la diferenciación de secuencias de tamaños similares que serían indistinguibles por electroforesis. La alta especificidad de los primers Zi2 F/R permite que éstos sean utilizados en otras variantes de PCR, a riesgo de aumentar el número de falsos positivos.

Los resultados obtenidos durante la evaluación de panel de sueros de Mixtequilla demostraron la utilidad del CI, que indicó el incorrecto procesamiento de tres sueros e invalidó el diagnóstico para ZIKV de éstos. Aunque es muy recomendable cambiar este CI debido a la aparición de dos bandas durante la electroforesis del producto de qPCR y a que existen secuencias que cumplirían mejor ese papel en este protocolo, el tenerlo le otorga ventaja sobre todos los ensayos reportados, ya que ninguno tiene forma de reducir el número de falsos negativos.

Finalmente, el detectar y confirmar una muestra positiva a ZIKV que no fue identificada por el InDRE utilizando el ensayo de Lanciotti demuestra la mayor sensibilidad diagnóstica del protocolo estandarizado durante este trabajo. Además, nuestro protocolo reduce los costos del diagnóstico al utilizar EvaGreen, ya que este reactivo es más económico que las sondas de hidrólisis; el uso de este reactivo también permite identificar productos inespecíficos, que indicarían la necesidad de reajustar este protocolo o estandarizar uno nuevo, haciendo de éste un candidato potencial a convertirse en un estándar de oro para el diagnóstico de ZIKV.

8. CONCLUSIONES

Llega el momento en que para ser lo que quieres, tienes que renunciar a ser lo que eres.
N.M.C.

- Se estandarizó un protocolo de técnicas moleculares que permite el diagnóstico de ZIKV en muestras de suero sanguíneo.
- Se diseñó un juego de primers que permiten la amplificación de material genético de ZIKV perteneciente al genotipo asiático; además, existe evidencia experimental de que también amplifican secuencias de ZIKV del genotipo africano.
- El protocolo estandarizado presentó un límite de detección de al menos 10 copias/reacción.
- La eficiencia de reacción de Zi2 F/R en qPCR fue igual a 95.73%, lo cual se considera un buen valor.
- El uso de β -globina como CI permitió detectar muestras procesadas incorrectamente e invalidar el diagnóstico negativo de ZIKV de esas muestras.
- El uso de HRM permitió identificar y diferenciar los productos de los primers Zi2 F/R y RPC041F/EX02R.
- El protocolo estandarizado en esta tesis mostró una mayor sensibilidad diagnóstica que el ensayo diseñado por Lanciotti dirigido a la secuencia codificante de la proteína E, que actualmente es el más usado para el diagnóstico de ZIKV.
- Las ventajas ofrecidas por este protocolo respecto a los ensayos reportados para el diagnóstico de ZIKV lo vuelven un buen candidato a convertirse en un estándar de oro.

9. LITERATURA CITADA

“Abre bien los ojos, hijo, y sigue al pájaro Pujuy [...]. Su destino es como el nuestro: caminar para que otros no se pierdan.”
Jacinto Canek

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Science. New York, USA.

Alcendor, D.J. 2017. Zika Virus Infection of the Human Glomerular Cells: Implications for Viral Reservoirs and Renal Pathogenesis. *J Infect Dis*. DOI: 10.1093/infdis/jix171.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25: 3389-3402.

Andrews, W.J., Brown, E.D., Dellett, M., Hogg, R.E., Simpson, D.A. 2015. Rapid quantification of microRNAs in plasma using a fast real-time PCR system. *Biotechniques*. 58: 244-252.

Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K.E., 2007. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press. Cambridge, England.

Atkinson, B., Hearn, P., Afrough, B., Lumley, S., Carter, D., Aarons, E.J., Simpson, A.J., Brooks, T.J., Hewson, R. 2016. Detection of Zika Virus in Semen. *Emerg Infect Dis*. 22: 940.

Baltimore, D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*. 35: 235-241.

Besnard, M., Lastere, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V., Musso, D. 2014. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill*. 19.

Blake, R.D., Delcourt, S.G. 1998. Thermal stability of DNA. *Nucleic Acids Res*. 26: 3323-3332.

Bonfield, J.K., Staden, R. 1996. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. *DNA Seq*. 6: 109-117.

Brent, C., Dunn, A., Savage, H., Faraji, A., Rubin, M., Risk, I., Garcia, W., Cortese, M., Novosad, S., Krow-Lucal, E.R., Crain, J., Hill, M., Atkinson, A., Peterson, D., Christensen, K., Dimond, M., Staples, J.E., Nakashima, A. 2016. Preliminary findings from an investigation of Zika virus infection in a patient with no known risk factors - Utah, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 65: 981-982.

Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F.X., Rey, F.A. 2004. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.* 23: 728-738.

Buckley, A., Gould, E.A. 1988. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus. *J Gen Virol.* 69: 1913-1920.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55: 611-622.

Butler, D. 2016. Zika virus: Brazil's surge in small-headed babies questioned by report. *Nature.* 530: 13-14.

Calvet, G., Aguiar, R.S., Melo, A.S., Sampaio, S.A., de Filippis, I., Fabri, A., Araujo, E.S., de Sequeira, P.C., de Mendonca, M.C., de Oliveira, L., Tschoeke, D.A., Schrago, C.G., Thompson, F.L., Brasil, P., Dos Santos, F.B., Nogueira, R.M., Tanuri, A., de Filippis, A.M. 2016. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis.* 16: 653-660.

Camacho, E., Paternina-Gomez, M., Blanco, P.J., Osorio, J.E., Aliota, M.T. 2016. Detection of Autochthonous Zika Virus Transmission in Sincelejo, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 22: 927-929.

Campbell, M.K., Farrell, S.O., 2012. *Biochemistry*, 7th ed. Mary Finch. Belmont, CA.

Cardoso, C.W., Paploski, I.A., Kikuti, M., Rodrigues, M.S., Silva, M.M., Campos, G.S., Sardi, S.I., Kitron, U., Reis, M.G., Ribeiro, G.S. 2015. Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 21: 2274-2276.

CIDRAP. 2016. Needle stick infects lab worker with Zika virus. Minneapolis, MN. <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2016/06/needle-stick-infects-lab-worker-zika-virus>. [Consultada el 23 de Febrero del 2017]

Cohrs, R.J., Gilden, D.H. 2007. Prevalence and abundance of latently transcribed varicella-zoster virus genes in human ganglia. *J Virol.* 81: 2950-2956.

Colt, S., Garcia-Casal, M.N., Peña-Rosas, J.P., Finkelstein, J.L., Rayco-Solon, P., Prinzo, Z.W. 2017. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* DOI: 10.1371/journal.pntd.0005528.

Corman, V.M., Rasche, A., Baronti, C., Aldabbagh, S., Cadar, D., Reusken, C.B., Pas, S.D., Goorhuis, A., Schinkel, J., Molenkamp, R., Kummerer, B.M., Bleicker, T., Brunink, S., Eschbach-Bludau, M., Eis-Hubinger, A.M., Koopmans, M.P., Schmidt-Chanasit, J., Grobusch, M.P., de Lamballerie, X., Drosten, C., Drexler, J.F. 2016. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. *Bull World Health Organ.* 94: 880-892.

Cha, R.S., Thilly, W.G. 1993. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl.* 3: S18-S29.

Charrel, R.N., Leparc-Goffart, I., Pas, S., de Lamballerie, X., Koopmans, M., Reusken, C. 2016. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. *Bull World Health Organ.* 94: 574-584D.

Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., Dupont-Rouzeyrol, M., Lourenco-de-Oliveira, R., Failloux, A.B. 2016. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 10: e0004543.

Deen, G.F., Knust, B., Broutet, N., Sesay, F.R., Formenty, P., Ross, C., Thorson, A.E., Massaquoi, T.A., Marrinan, J.E., Ervin, E., Jambai, A., McDonald, S.L., Bernstein, K., Wurie, A.H., Dumbuya, M.S., Abad, N., Idriss, B., Wi, T., Bennett, S.D., Davies, T., Ebrahim, F.K., Meites, E., Naidoo, D., Smith, S., Banerjee, A., Erickson, B.R., Brault, A., Durski, K.N., Winter, J., Sealy, T., Nichol, S.T., Lamunu, M., Stroher, U., Morgan, O., Sahr, F. 2015. Ebola RNA Persistence in Semen of Ebola Virus Disease Survivors - Preliminary Report. *N Engl J Med.* DOI: 10.1056/NEJMoa1511410.

DGE. 2015. LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE DENGUE POR LABORATORIO . Ciudad de México.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/159077/Lineamientos_para_la_vigilancia_epidemiologica_de_dengue.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=mx. [Consultada el 26 de Octubre del 2016]

Diagne, C.T., Diallo, D., Faye, O., Ba, Y., Faye, O., Gaye, A., Dia, I., Faye, O., Weaver, S.C., Sall, A.A., Diallo, M. 2015. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect Dis.* 15: 492.

Diallo, D., Sall, A.A., Diagne, C.T., Faye, O., Faye, O., Ba, Y., Hanley, K.A., Buenemann, M., Weaver, S.C., Diallo, M. 2014. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS One.* DOI: 10.1371/journal.pone.0109442.

Dick, G.W., Kitchen, S.F., Haddow, A.J. 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 46: 509-520.

Duffy, M.R., Chen, T.H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A.J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B.J., Fischer, M., Hayes, E.B. 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 360: 2536-2543.

Dupont-Rouzeyrol, M., Biron, A., O'Connor, O., Huguon, E., Descloux, E. 2016. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet.* 387: 1051.

Dupont-Rouzeyrol, M., O'Connor, O., Calvez, E., Daures, M., John, M., Grangeon, J.P., Gourinat, A.C. 2015. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis.* 21: 381-382.

Faheem, M., Naseer, M.I., Rasool, M., Chaudhary, A.G., Kumosani, T.A., Ilyas, A.M., Pushparaj, P., Ahmed, F., Algahtani, H.A., Al-Qahtani, M.H., Saleh Jamal, H. 2015. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med Genomics.* 8 Suppl 1: S4.

Faria, N.R., Azevedo Rdo, S., Kraemer, M.U., Souza, R., Cunha, M.S., Hill, S.C., Theze, J., Bonsall, M.B., Bowden, T.A., Rissanen, I., Rocco, I.M., Nogueira, J.S., Maeda, A.Y., Vasami, F.G., Macedo, F.L., Suzuki, A., Rodrigues, S.G., Cruz, A.C., Nunes, B.T., Medeiros, D.B., Rodrigues, D.S., Nunes Queiroz, A.L., da Silva, E.V., Henriques, D.F., Travassos da Rosa, E.S., de Oliveira, C.S., Martins, L.C., Vasconcelos, H.B., Casseb, L.M., Simith Dde, B., Messina, J.P., Abade, L., Lourenco, J., Carlos Junior Alcantara, L., de Lima, M.M., Giovanetti, M., Hay, S.I., de Oliveira, R.S., Lemos Pda, S., de Oliveira, L.F., de Lima, C.P., da Silva, S.P., de Vasconcelos, J.M., Franco, L., Cardoso, J.F., Vianez-Junior, J.L., Mir, D., Bello, G., Delatorre, E., Khan, K., Creatore, M., Coelho, G.E., de Oliveira, W.K., Tesh, R., Pybus, O.G., Nunes, M.R., Vasconcelos, P.F. 2016. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science.* 352: 345-349.

Faye, O., Faye, O., Diallo, D., Diallo, M., Weidmann, M., Sall, A.A. 2013. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virol J.* 10: 311.

Faye, O., Freire, C.C., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J.V., Diallo, M., Zannotto, P.M., Sall, A.A. 2014. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis.* DOI: 10.1371/journal.pntd.0002636.

FIOCRUZ. 2016. Fiocruz identifica mosquitos *Aedes aegypti* naturalmente infectados pelo vírus Zika. Brasil. <http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/fiocruz-identifica-mosquitos-aedes-aegypti-naturalmente-infectados-pelo-virus-zika>. [Consultada el 11 de Julio de 2016]

Foy, B.D., Kobylinski, K.C., Chilson Foy, J.L., Blitvich, B.J., Travassos da Rosa, A., Haddow, A.D., Lanciotti, R.S., Tesh, R.B. 2011. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis.* 17: 880-882.

Gaunt, M.W., Gould, E.A. 2005. Rapid subgroup identification of the flaviviruses using degenerate primer E-gene RT-PCR and site specific restriction enzyme analysis. *J Virol Methods*. 128: 113-127.

Gourinat, A.C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., Dupont-Rouzeyrol, M. 2015. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis*. 21: 84-86.

Grard, G., Caron, M., Mombo, I.M., Nkoghe, D., Mboui Ondo, S., Jiolle, D., Fontenille, D., Paupy, C., Leroy, E.M. 2014. Zika virus in Gabon (Central Africa)--2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis*. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002681.

Grard, G., Moureau, G., Charrel, R.N., Holmes, E.C., Gould, E.A., de Lamballerie, X. 2010. Genomics and evolution of Aedes-borne flaviviruses. *J Gen Virol*. 91: 87-94.

Gray, D.M., Ratliff, R.L. 1977. Circular dichroism evidence for G-U and G-T base pairing in poly[r(G-U)] and poly[d(G-T)]. *Biopolymers*. 16: 1331-1342.

Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D.D., Wolff, A. 2007. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res*. 35: e127.

Guillaume, V., Lefevre, A., Faure, C., Marianneau, P., Buckland, R., Lam, S.K., Wild, T.F., Deubel, V. 2004. Specific detection of Nipah virus using real-time RT-PCR (TaqMan). *J Virol Methods*. 120: 229-237.

Haddow, A.D., Schuh, A.J., Yasuda, C.Y., Kasper, M.R., Heang, V., Huy, R., Guzman, H., Tesh, R.B., Weaver, S.C. 2012. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis*. 6: e1477.

Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombattana, P., Talignani, L., Thomas, F., Cao-Lormeau, V.M., Choumet, V., Briant, L., Despres, P., Amara, A., Yssel, H., Misse, D. 2015. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*. 89: 8880-8896.

Hayes, E.B. 2009. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*. 15: 1347-1350.

Herrmann, M.G., Durtschi, J.D., Bromley, L.K., Wittwer, C.T., Voelkerding, K.V. 2006. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem*. 52: 494-503.

- Hills, S.L., Russell, K., Hennessey, M., Williams, C., Oster, A.M., Fischer, M., Mead, P. 2016. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 65: 215-216.
- Holland, D.J. 1998. Emerging viruses. *Curr Opin Pediatr.* 10: 34-40.
- Horlitz, M., Lucas, A., Sprenger-Haussels, M. 2009. Optimized quantification of fragmented, free circulating DNA in human blood plasma using a calibrated duplex real-time PCR. *PLoS One.* 4: e7207.
- IDT. 2012. OligoAnalyzer® Tool. Coralville, USA. <http://www.idtdna.com/Scitools>. [Consultada el 18 de Agosto del 2016]
- Ishak, R., Tovey, D.G., Howard, C.R. 1988. Morphogenesis of yellow fever virus 17D in infected cell cultures. *J Gen Virol.* 69: 325-335.
- Juhling, F., Morl, M., Hartmann, R.K., Sprinzl, M., Stadler, P.F., Putz, J. 2009. tRNAdb 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 37: D159-D162.
- Karatayli, E., Altunoglu, Y.C., Karatayli, S.C., Yurdaydin, C., Bozdayi, A.M. 2014. Free circulating nucleic acids in plasma and serum as a novel approach to the use of internal controls in real time PCR based detection. *J Virol Methods.* 207: 133-137.
- Katoh, K., Standley, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 30: 772-780.
- Knipe, D.M., Howley, P.M., 2007. *Field Virology*, 5th ed. Lippincot-Raven Publishers. Philadelphia, USA.
- Koressaar, T., Remm, M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 23: 1289-1291.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 33: 1870-1874.
- Kuno, G., Chang, G.J. 2007. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol.* 152: 687-696.

Kutsuna, S., Kato, Y., Takasaki, T., Moi, M., Kotaki, A., Uemura, H., Matono, T., Fujiya, Y., Mawatari, M., Takeshita, N., Hayakawa, K., Kanagawa, S., Ohmagari, N. 2014. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014 [corrected]. *Euro Surveill.* 19.

Kwok, S., Kellogg, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J.J. 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.* 18: 999-1005.

Lambert, P.H., Liu, M., Siegrist, C.A. 2005. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? *Nat Med.* 11: S54-S62.

Lanciotti, R.S., Kosoy, O.L., Laven, J.J., Velez, J.O., Lambert, A.J., Johnson, A.J., Stanfield, S.M., Duffy, M.R. 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 14: 1232-1239.

Lanciotti, R.S., Lambert, A.J., Holodniy, M., Saavedra, S., Signor Ldel, C. 2016. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerg Infect Dis.* 22: 933-935.

Lay, M.L., Lucas, R.M., Ratnamohan, M., Taylor, J., Ponsonby, A.L., Dwyer, D.E., Ausimmune Investigator, G. 2010. Measurement of Epstein-Barr virus DNA load using a novel quantification standard containing two EBV DNA targets and SYBR Green I dye. *Virology* 7: 252.

Ledermann, J.P., Guillaumot, L., Yug, L., Saweyog, S.C., Tided, M., Machieng, P., Pretrick, M., Marfel, M., Griggs, A., Bel, M., Duffy, M.R., Hancock, W.T., Ho-Chen, T., Powers, A.M. 2014. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 8: e3188.

Li, M.I., Wong, P.S., Ng, L.C., Tan, C.H. 2012. Oral susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 6: e1792.

Lindenbach, B.D., Rice, C.M. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 59: 23-61.

Liu, S., DeLalio, L.J., Isakson, B.E., Wang, T.T. 2016. AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. *Circ Res.* 119: 1183-1189.

Logan, I.S. 2016. ZIKA--How fast does this virus mutate? *Dongwuxue Yanjiu.* 37: 110-115.

Mackenzie, J.M., Westaway, E.G. 2001. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol.* 75: 10787-10799.

Macnamara, F.N. 1954. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 48: 139-145.

Maher-Sturgess, S.L., Forrester, N.L., Wayper, P.J., Gould, E.A., Hall, R.A., Barnard, R.T., Gibbs, M.J. 2008. Universal primers that amplify RNA from all three flavivirus subgroups. *Virology* 5: 16.

Mao, F., Leung, W.Y., 2010. Methods of using dyes in association with nucleic acid staining or detection and associated technology. No. de patente: US 7803943 B2.

Mao, F., Leung, W.Y., Xin, X. 2007. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol.* 7: 76.

Marchette, N.J., Garcia, R., Rudnick, A. 1969. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 18: 411-415.

Mate, S.E., Kugelman, J.R., Nyenswah, T.G., Ladner, J.T., Wiley, M.R., Cordier-Lassalle, T., Christie, A., Schroth, G.P., Gross, S.M., Davies-Wayne, G.J., Shinde, S.A., Murugan, R., Sieh, S.B., Badio, M., Fakoli, L., Taweh, F., de Wit, E., van Doremalen, N., Munster, V.J., Pettitt, J., Prieto, K., Humrighouse, B.W., Stroher, U., DiClaro, J.W., Hensley, L.E., Schoepp, R.J., Safronetz, D., Fair, J., Kuhn, J.H., Blackley, D.J., Laney, A.S., Williams, D.E., Lo, T., Gasasira, A., Nichol, S.T., Formenty, P., Kateh, F.N., De Cock, K.M., Bolay, F., Sanchez-Lockhart, M., Palacios, G. 2015. Molecular Evidence of Sexual Transmission of Ebola Virus. *N Engl J Med.* 373: 2448-2454.

McCrae, A.W., Kirya, B.G. 1982. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 76: 552-562.

Miller, B.R., Monath, T.P., Tabachnick, W.J., Ezike, V.I. 1989. Epidemic yellow fever caused by an incompetent mosquito vector. *Trop Med Parasitol.* 40: 396-399.

Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popovic, M., Poljsak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodusek, V., Vizjak, A., Pizem, J., Petrovec, M., Avsic Zupanc, T. 2016. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med.* 374: 951-958.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S.C. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.* 427: 313-319.

Musso, D. 2015. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis.* 21: 1887.

Musso, D., Gubler, D.J. 2016. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 29: 487-524.

Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., Shan Yan, A., Cao-Lormeau, V.M., Brout, J. 2014a. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* 19.

Musso, D., Nilles, E.J., Cao-Lormeau, V.M. 2014b. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect.* 20: O595-O596.

Musso, D., Roche, C., Nhan, T.X., Robin, E., Teissier, A., Cao-Lormeau, V.M. 2015a. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol.* 68: 53-55.

Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., Cao-Lormeau, V.M. 2015b. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 21: 359-361.

Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparco-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H., Musso, D., Ghawche, F. 2014. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 19.

Oliveira Melo, A.S., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P.O., Alves Sampaio, S., Bispo de Filippis, A.M. 2016. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 47: 6-7.

Olson, J.G., Ksiazek, T.G., Suhandiman, Triwibowo 1981. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 75: 389-393.

OMS. 2016a. Enfermedad por el virus Zika. Washington, D.C.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/es/>. [Consultada el 12 de Julio del 2016]

OMS. 2016b. Fifth meeting of the Emergency Committee under the International Health Regulations (2005) regarding microcephaly, other neurological disorders and Zika virus. Washington, D.C. <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/zika-fifth-ec/en/>. [Consultada el 31 de Enero del 2017]

OMS. 2016c. Pruebas de laboratorio para la infección por el virus de Zika. Ginebra, Suiza.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204898/1/WHO_ZIKV_LAB_16.1_spa.pdf?ua=1. [Consultada el 14 de Julio del 2016]

OPS/OMS. 2016a. Actualización Epidemiológica, 29 de Julio de 2016. Washington, D.C.
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599&Itemid=41691
 . [Consultada el 5 de Agosto del 2016]

OPS/OMS. 2016b. Actualización Epidemiológica, 2 de Junio de 2016. Washington, D.C.
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=34909&lang=es. [Consultada el 13 de Julio de 2016]

OPS/OMS. 2016c. Actualización Epidemiológica, 19 de Mayo de 2016. Washington, D.C.
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=34703&lang=es. [Consultada el 26 de Mayo del 2016]

OPS/OMS. 2016d. Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015-2016. Cumulative cases. Washington, D.C.
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=37583&lang=en. [Consultada el 29 de Diciembre del 2016]

Pedrosa, P.B., Cardoso, T.A. 2011. Viral infections in workers in hospital and research laboratory settings: a comparative review of infection modes and respective biosafety aspects. *Int J Infect Dis*. 15: e366-376.

Petersen, L.R., Jamieson, D.J., Powers, A.M., Honein, M.A. 2016. Zika Virus. *N Engl J Med*. 374: 1552-1563.

Pyke, A.T., Daly, M.T., Cameron, J.N., Moore, P.R., Taylor, C.T., Hewitson, G.R., Humphreys, J.L., Gair, R. 2014. Imported zika virus infection from the cook islands into australia, 2014. *PLoS Curr*. DOI: 10.1371/currents.outbreaks.4635a54dbffba2156fb2fd76dc49f65e.

QCMD. 2016. Quality Control of Molecular Diagnostics. Glasgow. <http://www.qcmd.org/>. [Consultada el 6 de Septiembre]

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 245: 154-160.

Rosen, L., Roseboom, L.E., Gubler, D.J., Lien, J.C., Chaniotis, B.N. 1985. Comparative susceptibility of mosquito species and strains to oral and parenteral infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 34: 603-615.

Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituturaga, S., Benyon, E., Guillaumot, L., Souares, Y. 2014. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. *Euro Surveill.* 19.

Saiki, R.K., Chang, C.A., Levenson, C.H., Warren, T.C., Boehm, C.D., Kazazian, H.H., Jr., Erlich, H.A. 1988. Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med.* 319: 537-541.

Salvador, F.S., Fujita, D.M. 2016. Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. *Travel Med Infect Dis.* 14: 49-51.

Savage, H.M., Fritz, C.L., Rutstein, D., Yolwa, A., Vorndam, V., Gubler, D.J. 1998. Epidemic of dengue-4 virus in Yap State, Federated States of Micronesia, and implication of *Aedes hensilli* as an epidemic vector. *Am J Trop Med Hyg.* 58: 519-524.

Scaramozzino, N., Crance, J.M., Jouan, A., DeBriel, D.A., Stoll, F., Garin, D. 2001. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol.* 39: 1922-1927.

Sevilla-Reyes, E.E., Reyes-Terán, G., Sandoval-Gutiérrez, J.L., 2016. Identificación de virus emergentes de inportancia clínica en el periodo 2016-2018. Intituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Siegfried, N.A., Bevilacqua, P.C. 2009. Thinking inside the box: designing, implementing, and interpreting thermodynamic cycles to dissect cooperativity in RNA and DNA folding. *Methods Enzymol.* 455: 365-393.

SiNaVE. 2016a. Boletín epidemiológico semana 2, 2016.
<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE02.pdf>.
[Consultada el 26 de Abril del 2016]

SiNaVE. 2016b. Boletín epidemiológico semana 26, 2016.
<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE26.pdf>.
[Consultada el 10 de Agosto del 2016]

SiNaVE. 2016c. Boletín epidemiológico semana 37, 2016.
<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE37.pdf>.
[Consultada el 20 de Octubre del 2016]

SiNaVE. 2016d. Boletín epidemiológico semana 52, 2016. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE52.pdf>. [Consultada el 26 de Enero del 2017]

Smith, C.E. 1956. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *J Trop Med Hyg.* 59: 243-251.

Soumahoro, M.K., Fontenille, D., Turbelin, C., Pelat, C., Boyd, A., Flahault, A., Hanslik, T. 2010. Imported chikungunya virus infection. *Emerg Infect Dis.* 16: 162-163.

SSa. 2017. Primer caso de microcefalia asociado con Zika. <https://www.gob.mx/salud/prensa/050-primer-caso-de-microcefalia-asociado-con-zika>. [Consultada el 22 de Mayo del 2017]

Steger, G. 1994. Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 22: 2760-2768.

Stothard, P. 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques.* 28: 1102-1104.

Tappe, D., Rissland, J., Gabriel, M., Emmerich, P., Gunther, S., Held, G., Smola, S., Schmidt-Chanasit, J. 2014. First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Euro Surveill.* 19.

Tognarelli, J., Ulloa, S., Villagra, E., Lagos, J., Aguayo, C., Fasce, R., Parra, B., Mora, J., Becerra, N., Lagos, N., Vera, L., Olivares, B., Vilches, M., Fernandez, J. 2016. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol.* 161: 665-668.

Uchil, P.D., Kumar, A.V., Satchidanandam, V. 2006. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. *J Virol.* 80: 5451-5464.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40: e115.

Waehre, T., Maagard, A., Tappe, D., Cadar, D., Schmidt-Chanasit, J. 2014. Zika virus infection after travel to Tahiti, December 2013. *Emerg Infect Dis.* 20: 1412-1414.

Westaway, E.G., Brinton, M.A., Gaidamovich, S., Horzinek, M.C., Igarashi, A., Kaariainen, L., Lvov, D.K., Porterfield, J.S., Russell, P.K., Trent, D.W. 1985. *Flaviviridae*. *Intervirology.* 24: 183-192.

Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Pryor, R.J. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 49: 853-860.

Wong, P.S., Li, M.Z., Chong, C.S., Ng, L.C., Tan, C.H. 2013. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl Trop Dis.* 7: e2348.

Xu, M.Y., Liu, S.Q., Deng, C.L., Zhang, Q.Y., Zhang, B. 2016. Detection of Zika virus by SYBR green one-step real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 236: 93-97.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13: 134.

ANEXO 1

“Algún día morirás, y hasta que no seas consciente de ello no me eres de ninguna utilidad”.
Tyler Durden

Se muestra la composición de los medios y soluciones utilizados durante el desarrollo de esta tesis.

Buffer de carga	Para 10 mL
Azul de bromofenol 0.25 %	25 mg
Xileno cianol FF 0.25%	25 mg
Sacarosa 40%	4 g
Buffer DP	
10 mM	Tris-Cl (pH 8.0)
1 mM	EDTA
5 ng/μL	RNA de transferencia de levadura
Buffer TE (Tris-EDTA)	
10 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
0.1 mM	EDTA
Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 10X	
Tris	108 g
H ₃ BO ₃	55 g
0.5 M EDTA, pH 8.0	9.3 g
Llevar a volumen de 1 litro con agua desionizada	
Medio LB (Luria-Bertani) con ampicilina	
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Ampicilina	50 g
Llevar a volumen de 1 litro con agua desionizada	
Medio LB con ampicilina y agar	
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Ampicilina	100 g
Agar	7 g
Llevar a volumen de 1 litro con agua desionizada	
Medio S.O.C. (Super Optimal broth with Catabolite repression)	
Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5 g
25 mM KCl	10 mL
2 M MgCl ₂	5 mL
1 M Glucosa	20 mL
Llevar a volumen de 1 litro con agua desionizada	
X-Gal	
5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido	40 mg
Llevar a volumen de 1 mL con dimetilformamida	

ANEXO 2

A pesar de todo sigo esperando lo mejor de las personas, quizá porque a pesar de todo sigo esperando lo mejor de mí mismo.
N.M.C.

La búsqueda realizada el 13 de agosto del 2016 de secuencias completas de ZIKV arrojó 56 resultados, los cuales fueron utilizados para evaluar la cobertura teórica de los primers Zi2F/R. En la siguiente tabla se indican el Accession number de estas secuencias, así como el país, año de su colecta y el genotipo al que pertenecen.

Tabla 26. Secuencias de ZIKV para evaluación de cobertura de primers Zi2F/R.

Accession number	País de colecta	Año de colecta	Genotipo
KU955594.1	Uganda	1947	Africano
KX377335.1	Uganda	1947	Africano
LC002520.1	Uganda	1947	Africano
KX601169.1	Uganda	1947	Africano
KU720415.1	Uganda	1947	Africano
KU963573.1	Uganda	1947	Africano
NC_012532.1	Uganda	1947	Africano
AY632535.2	Uganda	1947	Africano
KX377336.1	Malasia	1966	Asiático
KX601167.1	Malasia	1966	Asiático
KU963574.1	Nigeria	1968	Africano
KU955595.1	Senegal	1984	Africano
KU955592.1	Senegal	1984	Africano
KU955591.1	Senegal	1984	Africano
KX601166.1	Senegal	1984	Africano
KX198134.1	Senegal	1984	Africano
KU955593.1	Camboya	2010	Asiático
KU681082.3	Filipinas	2012	Asiático
KX369547.1	Polinesia Francesa	2013	Asiático
KU681081.3	Tailandia	2014	Asiático
KU509998.3	Haití	2014	Asiático
KX087102.1	Colombia	2015	Asiático
KX156776.1	Panamá	2015	Asiático
KX156775.1	Panamá	2015	Asiático
KX156774.1	Panamá	2015	Asiático
KX087101.2	Puerto Rico	2015	Asiático
KU707826.1	Brasil	2015	Asiático
KU365780.1	Brasil	2015	Asiático
KU365777.1	Brasil	2015	Asiático

Accession number	País de colecta	Año de colecta	Genotipo
KU365779.1	Brasil	2015	Asiático
KU321639.1	Brasil	2015	Asiático
KX197192.1	Brasil	2015	Asiático
KX280026.1	Brasil	2015	Asiático
KU527068.1	Brasil	2015	Asiático
KU312312.1	Surinam	2015	Asiático
KU365778.1	Brasil	2015	Asiático
KU497555.1	Brasil	2015	Asiático
KX247646.1	Colombia	2016	Asiático
KX198135.1	Panamá	2016	Asiático
KU922960.1	México	2016	Asiático
KU922923.1	México	2016	Asiático
KX051563.1	Haití	2016	Asiático
KX446951.1	México	2016	Asiático
KX446950.1	México	2016	Asiático
KX262887.1	Honduras	2016	Asiático
KU870645.1	Estados Unidos	2016	Asiático
KU926309.1	Brasil	2016	Asiático
KU820898.1	China	2016	Asiático
KU740184.2	China	2016	Asiático
KU926310.1	Brasil	2016	Asiático
KU853013.1	República Dominicana	2016	Asiático
KU853012.1	República Dominicana	2016	Asiático
KX117076.1	China	2016	Asiático
KU820899.2	China	2016	Asiático
KX253996.1	China	2016	Asiático
KU744693.1	China	2016	Asiático

ANEXO 3

“En la fe el espíritu descansa; en la razón vive; en el amor goza; sólo en el dolor adquiere conciencia”.
Jacinto Canek

Utilizando el programa OligoAnalyzer 3.1 se obtuvo la ΔG máxima de los primers (Tabla 27), valor de energía libre al unirse con su complemento perfecto. También se obtuvieron los máximos valores de energía libre durante la formación de homodímeros y heterodímeros de primers (Tabla 28). La diferencia entre estos valores indica bajas probabilidades de formación de dímeros de primers.

Tabla 27. ΔG máxima de los primers utilizados en el protocolo.

Primer	ΔG máxima
Zi2 F	-40.78 kcal/mol
Zi2 R	-36.59 kcal/mol
RPC041F	-39.63 kcal/mol
EX02R	-41.77 kcal/mol

Tabla 28. ΔG durante la formación de dímeros de primers.

	Zi2 F	Zi2 R	RPC041F	EX02R
Zi2 F	-3.14 kcal/mol	-	-	-
Zi2 R	-8.2 kcal/mol	-3.14 kcal/mol	-	-
RPC041F	-1.94 kcal/mol	-6.97 kcal/mol	-6.3 kcal/mol	-
EX02R	-5.92 kcal/mol	-4.64 kcal/mol	-6.97 kcal/mol	-4.67 kcal/mol

ANEXO 4

“[...] la única forma de escapar al miedo es arrollarlo con tus pies”.
Nadia Comăneci

Se utilizaron distintos virus durante las pruebas de especificidad en los ensayos reportados para la detección de ZIKV y en el propuesto en este trabajo (Tabla 29).

Tabla 29. Virus no amplificados por los ensayos para la detección de ZIKV.

	Lanciotti <i>et al.</i> (2008)	Faye <i>et al.</i> (2013)	Pyke <i>et al.</i> (2014)	Tappe <i>et al.</i> (2014)	Corman <i>et al.</i> (2016)	Xu <i>et al.</i> (2016)	Zi2 F/R
género Flavivirus	-	-	-		-	-	-
Alfuy	no evaluado (N/E)	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Aroa	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Bagaza	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Banzi	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Bouboui	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Bussuquara	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
cell fusing agent	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Culex flavi	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
dakar bat	N/E	no detectado	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
DENV-1	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
DENV-2	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
DENV-3	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
DENV-4	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Edge Hill	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
encefalitis de St- Louis	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
encefalitis japonesa	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E
encefalitis transmitida por garrapatas	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
fiebre amarilla	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	no detectado

	Lanciotti <i>et al.</i> (2008)	Faye <i>et al.</i> (2013)	Pyke <i>et al.</i> (2014)	Tappe <i>et al.</i> (2014)	Corman <i>et al.</i> (2016)	Xu <i>et al.</i> (2016)	Zi2 F/R
fiebre hemorragica de Omsk	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	no detectado	N/E
Iguape	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Ilheus	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Jugra	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Kamiti river	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
kedougou	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
kokobera	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
koutango	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Kunjin	N/E	N/E	no detectado	N/E	N/E	N/E	N/E
Lammi	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Modoc	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Murray valley	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Niénokoué	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Rocio	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
ntaya	N/E	no detectado	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
Powassan	no detectado	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
saboya	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
sepik	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
spondweni	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
stratford	N/E	N/E	no detectado	N/E	N/E	N/E	N/E
Tembusu	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Uganda S	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
Usutu	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E
wesselsbron	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	N/E	N/E

	Lanciotti <i>et al.</i> (2008)	Faye <i>et al.</i> (2013)	Pyke <i>et al.</i> (2014)	Tappe <i>et al.</i> (2014)	Corman <i>et al.</i> (2016)	Xu <i>et al.</i> (2016)	Zi2 F/R
WNV	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
yaounde	N/E	no detectado	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
género Alphavirus	-	-	-			-	-
bosque Barma	N/E	N/E	no detectado	N/E	N/E	N/E	N/E
bosque Semliki	no detectado	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
CHIKV	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado	no detectado
Ross river	N/E	N/E	no detectado	N/E	N/E	N/E	N/E
o'nyong'nyong	no detectado	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
sindbis	N/E	N/E	no detectado	N/E	N/E	N/E	N/E
virus no detectados	40	40	42	38	38	5	4

En Abril de 2016 se publicó una revisión de sobre los ensayos de qPCR diseñados para detectar ZIKV (Corman *et al.*, 2016), en la cual se determinó la especificidad de los primeros cinco ensayos de la tabla 29. En este reporte también se reevaluó el límite de detección de los ensayos; los valores obtenidos en la revisión se presentan en páginas anteriores (Tabla 24) y son mejores que los obtenidos por los autores originales (Tabla 30).

Tabla 30. Límite de detección reportado por los autores originales de los ensayos y por Corman y colaboradores.

Referencia del ensayo	Límite de detección reportado por autores originales	Límite de detección reportado por Corman <i>et al.</i> (2016)
Lanciotti <i>et al.</i> (2008)	100(M), 25(E) copias/reacción	3.2(M), 4.1(E) copias/reacción
Faye <i>et al.</i> (2013)	320 copias/reacción (genotipo africano)	8 copias/reacción
Pyke <i>et al.</i> (2014)	No reportada	5.3(E), 12.1(NS) copias/reacción
Tappe <i>et al.</i> (2014)	No reportada	1,377.3 copias/reacción

ANEXO 5

"Siembra un acto y cosecharás un hábito. Siembra un hábito y cosecharás un carácter. Siembra un carácter y cosecharás un destino".

Charles Reade

Se muestran los resultados del panel de 79 sueros de Santa María Mixtequilla (Tabla 31). Se especifica por muestra el diagnóstico de ZIKV ofrecido por el InDRE, el resultado de la amplificación de β -globina con RPC041F/EX02R y la amplificación obtenida por Zi2 F/R.

Tabla 31. Resultados por muestra del panel de Santa María Mixtequilla.

ID	Resultado InDRE ZIKV RT-qPCR	Resultado β -globina RT-qPCR	Resultado Zi2 F/R ZIKV RT-qPCR
478	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
479	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
480	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
481	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
482	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
483	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
484	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
485	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
486	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
487	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
488	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
489	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
490	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
491	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
492	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
493	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
494	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
495	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
497	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
498	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
499	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
500	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
501	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
502	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
503	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
504	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
505	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
506	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO

ID	Resultado InDRE ZIKV RT-qPCR	Resultado β-globina RT-qPCR	Resultado Zi2 F/R ZIKV RT-qPCR
507	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
508	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
509	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
510	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
511	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
512	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
513	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
514	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
515	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
516	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
517	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
518	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
519	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
520	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
521	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
522	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
523	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
524	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
525	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
527	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
528	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
529	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
530	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
531	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
532	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
533	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
534	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
535	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
536	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
537	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
538	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
539	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
540	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
541	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
542	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
543	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
544	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO

ID	Resultado InDRE ZIKV RT-qPCR	Resultado β-globina RT-qPCR	Resultado Zi2 F/R ZIKV RT-qPCR
545	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
546	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
547	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
548	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
549	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
550	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
551	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
552	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
554	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
555	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
556	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
557	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
558	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
559	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO

ANEXO 6

“[...] cuando la inteligencia y la fuerza hayan desaparecido, la gratitud y una mutua ternura vivirán aún en el corazón del hombre”.

H.G. Wells

Se muestran las secuencias genómicas humanas donde los extremos 3' de ZIKV1086 (Tabla 32) y de ZIKV1162c (Tabla 33) tuvieron una similitud del 100%; sólo se muestran secuencias en que los extremos 3' de ambos primers tuvieron similitud del 100%, aumentando la probabilidad de amplificar productos inespecíficos.

Tabla 32. Secuencias humanas con identidad del 100% al extremo 3' de ZIKV1086.

Secuencia genómica humana y Accession number	Longitud de la alineación	Posición inicial de la alineación en la secuencia	Posición terminal de la alineación en la secuencia
Cromosoma 1; NC_000001.11	14	27261405	27261392
Cromosoma 1; NC_000001.11	13	32719475	32719487
Cromosoma 1; NC_000001.11	13	91540687	91540699
Cromosoma 1; NC_000001.11	13	178882364	178882376
Cromosoma 2; NC_000002.12	13	16737927	16737915
Cromosoma 2; NC_000002.12	13	31368644	31368656
Cromosoma 2; NC_000002.12	13	54549936	54549924
Cromosoma 2; NC_000002.12	13	120563902	120563890
Cromosoma 2; NC_000002.12	13	135164136	135164148
Cromosoma 2; NC_000002.12	13	182457949	182457937
Cromosoma 3; NC_000003.12	14	22998663	22998676
Cromosoma 3; NC_000003.12	13	33859756	33859744
Cromosoma 3; NC_000003.12	13	37541985	37541973
Cromosoma 3; NC_000003.12	14	53080627	53080614
Cromosoma 3; NC_000003.12	14	79886443	79886456
Cromosoma 3; NC_000003.12	13	117557052	117557064
Cromosoma 3; NC_000003.12	14	156423759	156423746
Cromosoma 3; NC_000003.12	13	157622915	157622903
Cromosoma 3; NC_000003.12	13	187947509	187947497
Cromosoma 4; NC_000004.12	13	11679898	11679910
Cromosoma 4; NC_000004.12	13	21886348	21886360
Cromosoma 4; NC_000004.12	13	23947708	23947720
Cromosoma 4; NC_000004.12	13	107296294	107296306
Cromosoma 4; NC_000004.12	13	121461408	121461396
Cromosoma 5; NC_000005.10	13	38340490	38340502
Cromosoma 5; NC_000005.10	14	55093374	55093361

Secuencia genómica humana y Accession number	Longitud de la alineación	Posición inicial de la alineación en la secuencia	Posición terminal de la alineación en la secuencia
Cromosoma 5; NC_000005.10	14	72475275	72475288
Cromosoma 5; NC_000005.10	14	86192170	86192157
Cromosoma 5; NC_000005.10	14	110966887	110966900
Cromosoma 5; NC_000005.10	13	151892791	151892779
Cromosoma 5; NC_000005.10	14	159097908	159097921
Cromosoma 6; NC_000006.12	13	1602037	1602025
Cromosoma 6; NC_000006.12	13	127699901	127699889
Cromosoma 7; NC_000007.14	13	45159759	45159747
Cromosoma 7; NC_000007.14	14	65728830	65728843
Cromosoma 7; NC_000007.14	13	68334778	68334790
Cromosoma 7; NC_000007.14	13	134697251	134697263
Cromosoma 7; NC_000007.14	14	155200159	155200146
Cromosoma 8; NC_000008.11	14	33059187	33059174
Cromosoma 8; NC_000008.11	13	36350342	36350330
Cromosoma 8; NC_000008.11	14	80293878	80293891
Cromosoma 8; NC_000008.11	13	133535451	133535439
Cromosoma 8; NC_000008.11	13	143808099	143808111
Cromosoma 9; NC_000009.12	13	11886025	11886013
Cromosoma 9; NC_000009.12	13	92945128	92945140
Cromosoma 9; NC_000009.12	15	97845638	97845624
Cromosoma 9; NC_000009.12	13	116619995	116620007
Cromosoma 10; NC_000010.11	13	46272009	46271997
Cromosoma 10; NC_000010.11	13	47405055	47405067
Cromosoma 10; NC_000010.11	13	50160021	50160033
Cromosoma 10; NC_000010.11	13	50780265	50780253
Cromosoma 10; NC_000010.11	13	86846438	86846426
Cromosoma 11; NC_000011.10	14	3206223	3206210
Cromosoma 11; NC_000011.10	13	34015805	34015793
Cromosoma 11; NC_000011.10	13	128539141	128539129
Cromosoma 11; NC_000011.10	13	134558699	134558687
Cromosoma 12; NC_000012.12	14	3944421	3944408
Cromosoma 12; NC_000012.12	15	12108489	12108503
Cromosoma 12; NC_000012.12	14	28000718	28000705
Cromosoma 12; NC_000012.12	13	49913701	49913689
Cromosoma 12; NC_000012.12	13	51588717	51588705
Cromosoma 14; : NC_000014.9	13	84579387	84579399

Secuencia genómica humana y Accession number	Longitud de la alineación	Posición inicial de la alineación en la secuencia	Posición terminal de la alineación en la secuencia
Cromosoma 14; : NC_0000014.9	14	100699017	100699004
Cromosoma 15; NC_0000015.10	14	26260760	26260747
Cromosoma 15; NC_0000015.10	13	54034291	54034279
Cromosoma 15; NC_0000015.10	14	57290691	57290678
Cromosoma 16; NC_0000016.10	13	10908192	10908180
Cromosoma 16; NC_0000016.10	13	49403754	49403766
Cromosoma 16; NC_0000016.10	14	66847297	66847284
Cromosoma 20; NC_0000020.11	14	55983953	55983966
Cromosoma X; NC_0000023.11	13	82372618	82372630
Cromosoma X; NC_0000023.11	13	102138561	102138549

Tabla 33. Secuencias humanas con identidad del 100% al extremo 3' de ZIKV1162c

Secuencia genómica humana y Accession number	Longitud de la alineación	Posición inicial de la alineación en la secuencia	Posición terminal de la alineación en la secuencia
Cromosoma 1; NC_000001.11	14	55330573	55330560
Cromosoma 1; NC_000001.12	14	72566940	72566953
Cromosoma 1; NC_000001.13	14	88685456	88685443
Cromosoma 1; NC_000001.14	15	100505058	100505072
Cromosoma 1; NC_000001.15	15	114866627	114866641
Cromosoma 1; NC_000001.16	15	114870582	114870596
Cromosoma 1; NC_000001.17	14	151387955	151387942
Cromosoma 1; NC_000001.18	14	245323254	245323267
Cromosoma 2; NC_000002.12	14	185752140	185752127
Cromosoma 2; NC_000002.13	15	186081427	186081413
Cromosoma 2; NC_000002.14	15	191296100	191296114
Cromosoma 2; NC_000002.15	14	228116444	228116457
Cromosoma 3; NC_000003.12	16	56170287	56170272
Cromosoma 3; NC_000003.13	14	100355926	100355913
Cromosoma 3; NC_000003.14	14	112744493	112744480
Cromosoma 3; NC_000003.15	14	176290120	176290133
Cromosoma 4; NC_000004.12	14	90612732	90612745
Cromosoma 4; NC_000004.13	14	121047935	121047922
Cromosoma 4; NC_000004.14	15	150384864	150384878
Cromosoma 4; NC_000004.15	15	153536281	153536295
Cromosoma 5; NC_000005.10	15	15383747	15383761
Cromosoma 5; NC_000005.11	14	51215973	51215960
Cromosoma 5; NC_000005.12	14	63247885	63247872
Cromosoma 5; NC_000005.13	14	140619066	140619053

Secuencia genómica humana y Accession number	Longitud de la alineación	Posición inicial de la alineación en la secuencia	Posición terminal de la alineación en la secuencia
Cromosoma 6; NC_000006.12	15	19033354	19033368
Cromosoma 6; NC_000006.13	15	49562351	49562365
Cromosoma 6; NC_000006.14	14	56670758	56670771
Cromosoma 7; NC_000007.14	16	105649572	105649557
Cromosoma 7; NC_000007.14	16	125417015	125417030
Cromosoma 8; NC_000008.11	16	18036323	18036338
Cromosoma 8; NC_000008.11	14	35060321	35060308
Cromosoma 8; NC_000008.11	14	35211510	35211497
Cromosoma 8; NC_000008.11	14	51244435	51244422
Cromosoma 8; NC_000008.11	14	68540277	68540264
Cromosoma 8; NC_000008.11	14	93894157	93894144
Cromosoma 9; NC_000009.12	15	73896506	73896520
Cromosoma 9; NC_000009.12	14	101710405	101710418
Cromosoma 9; NC_000009.12	14	126925741	126925728
Cromosoma 10; NC_000010.11	15	4216583	4216569
Cromosoma 10; NC_000010.11	14	27052051	27052064
Cromosoma 10; NC_000010.11	14	74736129	74736116
Cromosoma 10; NC_000010.11	14	84132096	84132109
Cromosoma 10; NC_000010.11	14	105083311	105083324
Cromosoma 11; NC_000011.10	14	115734631	115734644
Cromosoma 12; NC_000012.12	15	97422377	97422363
Cromosoma 14; NC_000014.9	14	37901063	37901050
Cromosoma 15; NC_000015.10	14	21766632	21766619
Cromosoma 15; NC_000015.10	14	22209197	22209184
Cromosoma 15; NC_000015.10	14	46318311	46318324
Cromosoma 16; NC_000016.10	15	62790753	62790767
Cromosoma 16; NC_000016.10	16	73406812	73406797
Cromosoma 20; NC_000020.11	14	57956210	57956197
Cromosoma X; NC_000023.11	14	80956398	80956411

También se muestran las secuencias de DENV cuya secuencia codificante de la proteína E difirió en un nucleótido del primer ZIKV1086 (Tabla 34).

Tabla 34. Secuencias de DENV con identidad del 94.11% al primer ZIKV1086.

Accession number y serotipo de DENV	Longitud de la alineación	Posición inicial de la alineación en la secuencia	Posición terminal de la alineación en la secuencia
KX270815.1; (DENV-2)	16	217	232
KX270814.1; (DENV-2)	16	217	232
KX270812.1; (DENV-2)	16	217	232

Accession number y serotipo de DENV	Longitud de la alineación	Posición inicial de la alineación en la secuencia	Posición terminal de la alineación en la secuencia
KU291816.1; (DENV-2)	16	217	232
KU291815.1; (DENV-2)	16	217	232
KU291814.1; (DENV-2)	16	217	232
KU291813.1; (DENV-2)	16	217	232
KU291811.1; (DENV-2)	16	217	232
KU291810.1; (DENV-2)	16	217	232
KU291809.1; (DENV-2)	16	217	232
KU291807.1; (DENV-2)	16	217	232
KU291804.1; (DENV-2)	16	217	232
KU291803.1; (DENV-2)	16	217	232
KU291800.1; (DENV-2)	16	217	232
KR029570.1; (DENV-1)	16	217	232
KR029569.1; (DENV-1)	16	217	232
KR029568.1; (DENV-1)	16	217	232
KR029567.1; (DENV-1)	16	217	232
KR029566.1; (DENV-1)	16	217	232
KR029565.1; (DENV-1)	16	217	232
KR604819.1; (DENV-2)	16	1057	1072
KP979770.1; (DENV-2)	16	280	295
KT232052.1; (DENV-2)	16	217	232
KT232051.1; (DENV-2)	16	217	232
KT232043.1; (DENV-2)	16	217	232
KT232042.1; (DENV-2)	16	217	232
KT232044.1; (DENV-2)	16	217	232
KT232041.1; (DENV-2)	16	217	232
DQ364566.1; (DENV-2)	16	1054	1069
DQ364564.1; (DENV-2)	16	1041	1056
DQ364563.1; (DENV-2)	16	1054	1069
DQ364562.1; (DENV-2)	16	1054	1069
DQ364561.1; (DENV-2)	16	133	148
DQ364558.1; (DENV-2)	16	1054	1069
DQ364546.1; (DENV-2)	16	1054	1069
DQ364534.1; (DENV-2)	16	1054	1069
DQ364532.1; (DENV-2)	16	1054	1069
AJ574886.1; (DENV-2)	16	785	800

GLOSARIO

Agente etiológico: Factor externo capaz de causar alguna enfermedad.

Artralgia: Dolor articular causado por procesos no inflamatorios.

Células primarias: Células tomadas directamente de un individuo.

Competencia vectorial: Capacidad intrínseca de un vector para transmitir un patógeno particular a un hospedero susceptible.

Conjuntivitis: Inflamación de la mucosa interior de los párpados y la región anterior del globo ocular.

Cultivo celular primario: Cultivo de células primarias, las cuales suelen tener un período de vida limitado con la excepción de algunas derivadas de tumores.

Dolor retroorbital: Dolor ubicado en la parte posterior de los ojos

Eficiencia de reacción (qPCR): Valor que indica el aumento de producto de PCR entre ciclo y ciclo del qPCR. Cuando el valor es igual a 1 (100%) la cantidad de producto de PCR aumenta el doble con respecto al ciclo anterior.

Exantema maculopapular cutáneo: Erupción cutánea consistente en lesiones coloreadas planas no palpables (máculas) acompañadas de lesiones elevadas (pápulas).

Hospedero: Organismo que acarrea a otro dentro o sobre de él, donde este último desarrolla una relación simbiótica de comensalismo, mutualismo o parasitismo.

Límite de detección: Es la menor cantidad de un analito detectable en el 95% de las repeticiones de un ensayo.

Mialgia: Dolor muscular provocado por esfuerzo excesivo, lesiones o enfermedades específicas.

Microcefalia: Malformación neonatal caracterizada por presentar un perímetro craneal muy inferior al de otros individuos de la misma edad y sexo.

Reservorio: Organismo que puede albergar una infección y mantenerla por períodos de tiempo en que el hospedero principal no está disponible.

Sensibilidad (PCR): Es la capacidad de un ensayo para detectar concentraciones muy bajas de la sustancia de interés y suele reportarse como el límite de detección. También existe el concepto de sensibilidad diagnóstica, la cual se refiere a la capacidad del ensayo para detectar una condición o una enfermedad en muestras clínicas.

Signos patognomónicos: Signos clínicos (manifestaciones físicas comprobables) y síntomas (manifestaciones subjetivas percibidas por el paciente) que al estar presentes aseguran que un individuo sufre de determinado trastorno.

Síndrome de Guillain-Barré: Afección en la que el sistema inmune ataca al sistema nervioso periférico produciendo debilidad muscular y pérdida de sensibilidad particularmente en brazos y piernas; en casos graves el habla, la deglución y la respiración se ven afectados.

Subtropical (Clima): Caracterizado por veranos cálidos e inviernos leves, con época de lluvias en los meses de verano o de invierno.

Subtropical (Región): Zona encontrada entre las latitudes 23.5° y 40°

Transmisión autóctona: Transmisión que ocurre cuando el afectado se encuentra dentro del país en que reside.

Transmisión congénita: Transmisión vertical que ocurre hasta la semana 23 de gestación.

Transmisión perinatal: Transmisión vertical que ocurre a partir de la semana 24 de gestación al séptimo día posterior al parto.

Vector: Organismo que permite la transmisión de alguna enfermedad infecciosa entre miembros de otra especie susceptible a ésta.

Viremia: Presencia de virus en el torrente sanguíneo.

Virus emergente: Virus cuya incidencia va en aumento o con el potencial de aumentar.