



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Comparación de la sensibilidad de pruebas de tipificación molecular por RT-PCR a partir de muestras clínicas de zonas endémicas en México con diagnóstico presuntivo a Flavivirus”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

JOSÉ CARLOS GONZALEZ ARCE

ASESOR:

M. en C. Tannya Karen Castro Jiménez

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2022



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.

A la UNAM, por recibirme y darme la oportunidad de superarme, a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por ser parte de mi formación durante 4 años en los cuales conocí a muchas personas que se volvieron importantes para mí, al Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Arbovirus y a todos los que lo conforman, por haberme formado académicamente, gracias por sus enseñanzas, su tiempo y paciencia al Doctor José Bustos y a la maestra Karen. Al apoyo financiero de PAPIIT, DGAPA, UNAM proyectos: IN200821, IA209017, IA204119 y al Programa de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales, CONACYT con el proyecto PN2029.

A mis padres Zenaida Arce Velázquez y José Juan Gonzalez Mendoza, que siempre han sido un apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida, a Neidy, por amarme tanto y siempre estar a mi lado, alentándome a ser mejor e inspirándome a seguir aun cuando sentía que ya no podía, a todos mis familiares y seres queridos que siempre me apoyaron, incluyendo aquellos que por circunstancias del pasar de la vida no pudieron estar en este plano existencial llegado este momento.

De todo corazón gracias.

Abreviaturas

ALT Alanina-aminotransferasa

AST Aspartato-aminotransferasa

BHQ-1 Black Hole Quencher-1 (Extintor de señal de fluorescencia-1)

BHQ-2 Black Hole Quencher-2 (Extintor de señal de fluorescencia-2)

bp Base Pairs (Pares de Bases)

C Proteína de cápside de los *Flavivirus*

Cap Protector de RNA consistente en un 7-metilguanilato unido al primer nucleótido del RNA por un enlace 5'-5' trifosfato

CDC Centers of Disease Control and Prevention (Centro de control y prevención de enfermedades de E.E.U.U.)

cDNA DNA complementario

CHIKV Virus del Chikungunya

CPE Citopathic effect (Efecto citopático)

DENV Virus del dengue

DENV-1 WP Virus del dengue serotipo 1 *Western Pacific*

DENV-2 NG Virus del dengue serotipo 2 New Guinea

DENV-3 Virus del dengue serotipo 3

DENV-4 Virus del dengue serotipo 4

DNA Ácido desoxirribonucleico

dpi días post infección

ds-RNA RNA de doble cadena

E Proteína de envoltura flaviviral

ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)

ER Endoplasmic reticulum (Retículo endoplásmico)

GBS Guillain-Barré Syndrome (Síndrome de Guillain-Barré)

IFNAR Human type Interferon Receptor (Receptor de interferón humano de tipo I)

IL-6 Interleukin-6 (Interleucina-6)

IL-8 Interleukin-8 (Interleucina-8)

INF- α Interferon-alpha (Interferón alfa)

INF- β Interferon-beta (Interferón beta)

| | |
|--------------------------------|---|
| INF-γ | Interferon-gamma (Interferón gamma) |
| kDa | Kilo Daltons |
| M | Proteína de membrana de los <i>Flavivirus</i> |
| prM | Proteína de membrana de los <i>Flavivirus</i> inmadura |
| MOI | Multiplicidad de Infección |
| Nm | Nanómetros |
| NS | Proteína no estructural |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud |
| ORF | Open Reading Frame (Marco de lectura abierto) |
| PFU's | Plaque-Forming Units (Unidades formadoras de placa) |
| PRNT | Plaque Reduction Neutralization Test (Prueba de neutralización por reducción de placa) |
| RdRp | RNA-dependent RNA polymerase (RNA polimerasa dependiente de RNA) |
| RC | Replicative Complex (Complejo replicativo) |
| RCF | Fuerza centrífuga relativa o fuerza g |
| RNA | Ribonucleic acid (Ácido Ribonucleico) |
| RPMI | Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute |
| RT-PCR | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa por Transcriptasa inversa) |
| SINAVE | Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica |
| SLA | Stem Loop A (Estructura secundarias del extremo 5' del genoma de los <i>Flavivirus</i>) |
| SLB | Stem Loop B (Estructura secundarias del extremo 5' del genoma de los <i>Flavivirus</i>) |
| ss-RNA | RNA de cadena sencilla |
| TNF-α | Tumor Necrosis Factor alpha (Factor de necrosis tumoral alfa) |
| UTR | UnTranslated Region (Regiones no codificantes del genoma viral) |
| YFV | Virus de la Fiebre Amarilla |
| ZIKV | Virus del Zika |
| ZIKV PR | Virus del Zika aislado Puerto Rico |

ÍNDICE

| | | |
|--------|---|----|
| 1 | Introducción | 9 |
| 2 | Marco teórico | 11 |
| 2.1 | Generalidades de Flavivirus..... | 11 |
| 2.2 | Características estructurales de los Flavivirus..... | 11 |
| 2.2.1 | Partícula viral..... | 11 |
| 2.3 | Características del genoma de los Flavivirus | 12 |
| 2.4 | Proteínas flavivirales..... | 13 |
| 2.4.1 | Proteína de cápside (C) | 13 |
| 2.4.2 | Proteína precursora de membrana (prM) y proteína de membrana (M) | 14 |
| 2.4.3 | Proteína de envoltura (E) | 15 |
| 2.5 | Proteínas no estructurales (NS)..... | 15 |
| 2.5.1 | Proteína NS1..... | 15 |
| 2.5.2 | Proteína NS2..... | 16 |
| 2.5.3 | Proteína NS3..... | 16 |
| 2.5.4 | Proteína NS4..... | 16 |
| 2.5.5 | Proteína NS5..... | 17 |
| 3 | Ciclo replicativo | 18 |
| 4 | Taxonomía del género Flavivirus..... | 19 |
| 5 | Técnicas para la detección e Identificación de Flavivirus..... | 20 |
| 5.1 | La Reacción en Cadena de la Polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) para la identificación de virus..... | 22 |
| 5.2 | PCR tiempo real para la identificación de virus..... | 23 |
| 6 | Panorama Epidemiológico de DENV y ZIKV en México | 25 |
| 6.1 | Transmisión del virus del dengue | 29 |
| 6.2 | Cuadro clínico del Dengue | 30 |
| 6.3 | Cuadro clínico de ZIKV | 32 |
| 6.4 | Variabilidad de Flavivirus..... | 33 |
| 7 | Antecedentes directos y justificación | 34 |
| 8 | Hipótesis..... | 35 |
| 9 | Objetivos | 35 |
| 9.1 | Objetivo general | 35 |
| 9.2 | Objetivos particulares..... | 35 |
| 10 | Materiales y Métodos | 35 |
| 10.1 | Aislados de Flavivirus..... | 35 |
| 10.2 | Amplificación y cosecha de preparaciones virales | 36 |
| 10.2.1 | Línea celular Aedes albopictus clona C6/36 CRL-1660..... | 36 |
| 10.2.2 | Línea celular Vero C1008 clona E6 | 37 |
| 10.3 | Infección de células Vero con aislados virales previamente titulados..... | 38 |

| | | |
|--------|--|----|
| 10.4 | Extracción de RNA de células infectadas con aislados virales y virus referencia | 38 |
| 10.4.1 | Retrotranscripción con oligonucleótido VD8 | 39 |
| 10.4.2 | Retrotranscripción y amplificación con oligonucleótidos hexámeros aleatorios .. | 39 |
| 10.4.3 | Confirmación de la presencia de RNA viral por la estrategia de biología molecular de Pierre y colaboradores 1994. | 41 |
| 10.4.4 | Detección e Identificación viral por PCR punto final VD8 y EMF1 Pierre..... | 45 |
| 10.4.5 | Detección e Identificación viral por PCR punto final de gradientes..... | 45 |
| 10.4.6 | Detección e Identificación viral por PCR anidadaD1-D2 Lanciotti | 46 |
| 10.5 | Electroforesis | 46 |
| 11 | Resultados | 47 |
| 11.1 | Identificación por PCR tiempo real..... | 47 |
| 11.2 | Identificación por PCR punto final con gradientes de temperatura..... | 53 |
| 12 | Discusión | 59 |
| 13 | Conclusión | 64 |
| 14 | Anexo I..... | 65 |
| 15 | Referencias | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación del virión de los Flavivirus | 12 |
| Figura 2. Organización del genoma de los Flavivirus | 13 |
| Figura 3. Topología de la poliproteína de los Flavivirus insertada en el retículo endoplásmico..... | 14 |
| Figura 4. Ciclo replicativo de los Flavivirus. | 19 |
| Figura 5. Algoritmo de diagnóstico para infección por DENV | 21 |
| Figura 6. Algoritmo de diagnóstico para infección por ZIKV..... | 22 |
| Figura 7. Gráfica comparativa entre el serotipo predominante DENV-1 y DENV-2 en la república mexicana..... | 27 |
| Figura 8. Canal endémico de 6 años, correspondiente a los casos de dengue en México del periodo 2014-2020..... | 28 |
| Figura 9. Clasificación clínica de la enfermedad del dengue. | 31 |
| Figura 10. Gráfica de amplificación por PCR tiempo real utilizando SYBR-Green de virus referencia y oligonucleótidos de Fajardo 2016..... | 48 |
| Figura 11. Gráfica de amplificación por PCR tiempo real de aislados virales utilizando SYBR-Green y oligonucleótidos de Fajardo 2016..... | 49 |
| Figura 12. Gráfica de amplificación por PCR tiempo real de virus referencia utilizando SYBR-Green y oligonucleótidos de Pierre y colaboradores 1994. | 51 |
| Figura 13. Gráfica de amplificación por PCR tiempo real de virus aislados utilizando SYBR-Green y oligonucleótidos de Pierre y colaboradores 1994. | 52 |
| Figura 14. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de virus aislados de Yucatán usando 0.2μ, 0.5μL y 1μL de cDNA..... | 53 |
| Figura 15. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de virus referencia y aislados de Yucatán. | 54 |
| Figura 16. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de virus referencia y aislados de Yucatán. | 55 |
| Figura 17. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de virus referencia. | 56 |
| Figura 18. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de aislado 47 de Yucatán. | 57 |
| Figura 19. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de aislado 100 de Yucatán. | 58 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Muestras de pacientes con cuadro clínico presuntivo para Flavivirus. | 36 |
| Tabla 2. Lista de los virus referencia utilizados. | 36 |
| Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos VD8 y EMF1. | 39 |
| Tabla 4. Secuencia de hexámeros aleatorios. | 40 |
| Tabla 5. Etapas y condiciones de retrotranscripción usando oligonucleótido VD8. | 40 |
| Tabla 6. Etapas y condiciones de PCR usando oligonucleótido VD8. | 40 |
| Tabla 7. Etapas y condiciones de retrotranscripción usando hexámeros aleatorios. | 40 |
| Tabla 8. Etapas y condiciones de PCR usando hexámeros aleatorios. | 41 |
| Tabla 9. Secuencias de los primers propuestos por Fajardo 2016. | 42 |
| Tabla 10. Secuencias de los primers propuestos por Lanciotti 1992. | 43 |
| Tabla 11. Etapas y condiciones para PCR en tiempo real. | 44 |
| Tabla 12. Etapas y condiciones para PCR punto final. | 45 |

1 Introducción

Los *Flavivirus* son virus envueltos con genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. Los virus del dengue (DENV) y Zika (ZIKV) son especies clasificadas en este género relacionadas filogenéticamente y con importancia médica en todo el mundo (Velandia & Castellanos, 2011). El dengue es una enfermedad ocasionada por los virus del dengue (DENV), los cuales son transmitidos por los mosquitos del género *Aedes*, especies *aegypti* y *albopictus*. La enfermedad es un importante problema de salud pública con un efecto social y económico sustancial, ya que su incidencia se ha multiplicado por 30 en los últimos 50 años.

Los DENV son endémicos en el sudeste de Asia, del continente americano, el Pacífico occidental, África y regiones del Mediterráneo oriental, pertenecen a la familia *Flaviviridae*. Hasta la fecha se han identificado cuatro serotipos de DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. La infección por un serotipo produce inmunidad permanente contra la reinfección por este serotipo, sin embargo, una infección secundaria con un serotipo heterólogo, es un factor de riesgo para desarrollar las formas graves de la enfermedad.

Esta enfermedad reemergió a finales del siglo XX y principios del XXI debido al aumento de la distribución geográfica de sus vectores, hoy en día, el DENV circula en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo, causando aproximadamente 100 millones de casos anuales (Arredondo-García et al., 2016; Bhatt et al., 2013; Guzman et al., 2015; OPS/OMS, 2019). En México, el patrón de diseminación ha sido de Sur a Norte, a lo largo de los estados del sureste y el golfo hacia la mayoría de las entidades de la república, sobre todo, aquellas que por sus características geográficas, demográficas y sociales propician la presencia del vector y, por tanto, de la enfermedad. Actualmente, en algunas entidades cocirculan dos o más serotipos, este fenómeno ha favorecido la permanencia de una epidemia por DENV y el incremento de casos graves en nuestro país. El virus circula en 29 estados de la República Mexicana, donde residen más de 50 millones de personas y se localizan grandes urbes, centros agrícolas, ganaderos, industriales, pesqueros, petroleros y los sitios turísticos más importantes del país. El

comportamiento epidemiológico del dengue en México ha mostrado un perfil irregular, con incrementos y disminuciones de las tasas anuales de morbilidad. Acorde al Panorama epidemiológico de dengue en México, del año 2014 al 2018 los casos se mantuvieron por debajo de 40,000 disminuyendo hasta menos de 20,000 para el año 2018. En los años 2019 y 2020 las cifras fueron de 41,505 casos y 24,313 respectivamente (Arredondo-García et al., 2020; Comisión de Salud, 2016; Fajardo-Dolci et al., 2012; Gubler & Clark, 1995; Salud, 2019, 2020).

Al igual que el dengue, el virus del Zika (ZIKV) es otro agente viral que se distribuye en las regiones tropicales debido a mosquitos vectores. Fue aislado inicialmente en África, sin embargo, en 2007 surgió un brote al sur del Océano Pacífico que dio paso a su propagación al continente americano. En 2015 en Brasil se originó la primera epidemia que se extendió a América Central, América del Sur y el Caribe. Las infecciones por el virus Zika se han relacionado con trastornos neurológicos como el síndrome de Guillain-Barré (GBS por sus siglas en inglés) y malformaciones congénitas producto de infecciones con este virus durante el embarazo como microcefalia. Estudios de modelado estiman que cerca de 2,170 millones de personas viven en regiones propicias para la transmisión del virus del Zika, condición que incrementa el riesgo de infección (Heinz & Stiasny, 2017).

La detección y serotipificación del DENV y ZIKV han cobrado relevancia para la vigilancia epidemiológica con la finalidad de contabilizar los casos y prevenir brotes epidemiológicos que afecten a poblaciones vulnerables. El aislamiento del virus mediante cultivo celular seguido de tinción indirecta con anticuerpos o identificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) contra regiones altamente conservadas entre los *Flavivirus* se considera como un estándar para el diagnóstico del dengue, dicha caracterización para virus circulantes en zonas endémicas, no se realizan en nuestro país de manera cotidiana y oportuna, lo que podría comprometer la eficacia de la vigilancia y el control de los brotes epidémicos anuales en nuestro país (Bhatnagar et al., 2012; NOM-032-SSA2-2014, 2014; Álvarez-Díaz et al., 2019). En el presente trabajo, se identificaron *Flavivirus* circulantes en México, aislados a partir de muestras de suero de pacientes que presentaron el cuadro clínico presuntivo para dengue provenientes del estado de Yucatán del

año 2016 por medio de PCR tiempo real. Estas muestras no contaban con diagnóstico confirmativo, por lo cual era relevante realizar y confirmar su tipificación por PCR punto final.

2 Marco teórico

2.1 Generalidades de *Flavivirus*

Los *Flavivirus* son uno de los cuatro géneros que comprenden a la familia *Flaviviridae*. Dicho género contiene alrededor de 53 especies de virus, de los cuales una gran parte han sido identificados como patógenos virales con mayor impacto sobre la salud humana. Con base en el vector que los transmite, también se clasifican en dos grupos principales: Los *Flavivirus* transmitidos por garrapatas y aquellos transmitidos por mosquitos. Los *Flavivirus* transmitidos por garrapatas suelen ser un grupo monofilético que consiste en un solo “serocomplejo”, sin embargo, aquellos transmitidos por mosquitos tienden a ser más diversos genética y antigénicamente. Dentro de este último grupo se encuentran los cuatro virus del dengue (DENV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del Nilo occidental (WNV) y el virus del Zika (ZIKV) (Holbrook, 2017). Los mosquitos transmisores de estos virus, en especial DENV y ZIKV, son mosquitos hembra hematófagos del género *Aedes*, siendo las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* las más importantes durante la transmisión horizontal en ciclos urbanos (Patterson et al., 2016).

2.2 Características estructurales de los *Flavivirus*

2.2.1 Partícula viral

El virión de los *Flavivirus* mide entre 35 y 50 nm de diámetro, es de simetría icosaédrica imperfecta y consta de 30 “Balsas”, cada una formada por tres dímeros E (Figura 1). La capa más externa del virión está constituida por 180 copias de proteína de envoltura (E) en configuración de homodímeros, en combinación con la proteína M y la proteína C. La proteína E de los *Flavivirus* se encuentra en la capa más externa y está compuesta por el dominio de la membrana del tallo y otros tres dominios, denominados DI, DII y DIII. Posee un péptido de fusión que se ubica en la punta del DII y es importante para la interacción y fusión de la partícula viral

con la membrana de las células del hospedero. (Fibriansah et al., 2015; Knipe et al., 2007; Zhang et al., 2013).

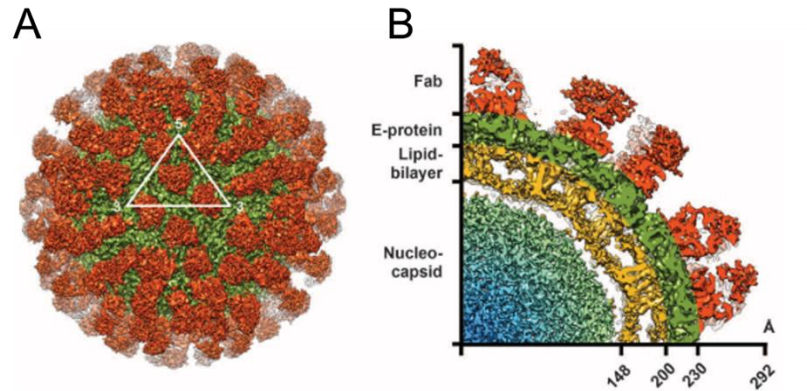


Figura 1. Representación del virión de los Flavivirus

Cristalografía de una partícula viral rodeada de anticuerpos mediante microscopía crioelectrónica. A) se señala con un triángulo la unidad básica de la cápside B) se muestran la región Fab unida a anticuerpos; la proteína E (verde), bicapa lipídica (amarillo), nucleocápside (azul). (Fibriansah et al., 2015).

2.3 Características del genoma de los Flavivirus

El genoma de los *Flavivirus* (gRNA) consta de una cadena sencilla de RNA con polaridad positiva de aproximadamente 10 a 11 kb que varía dependiendo de la especie. Contiene un cap de tipo I ($m^7GpppAmpN1$) en su extremo 5' y carece de una cola poliadenilada (poliA). Las zonas UTR promueven la interacción entre el extremo 3' y el 5' debido a la presencia de secuencias complementarias, permitiendo procesos de circularización del gRNA durante la replicación, como lo es el reclutamiento y correcto posicionamiento de la RNA polimerasa viral.

El gRNA cuenta con un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una poliproteína, que es procesada co- y postraduccionalmente por la proteasa viral y proteasas celulares en el retículo endoplásmico (ER por su acrónimo en inglés) en 10 proteínas virales, 3 estructurales (Cápside (C), Membrana (M) y Envoltura (E)) y 7 no estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) que intervienen durante los procesos de ensamblaje y replicación del RNA viral. En los extremos del genoma viral hay dos regiones no traducidas (UTRs por sus siglas en

inglés), la 5'UTR y 3'UTR donde se generan estructuras secundarias y terciarias a partir de múltiples secuencias con hibridación parcial, dichas estructuras son esenciales para la replicación y traducción del genoma viral (Figuras 2 y 3) (Barrows et al., 2018; Gebhard et al., 2011; Lindenbach et al., 2007).

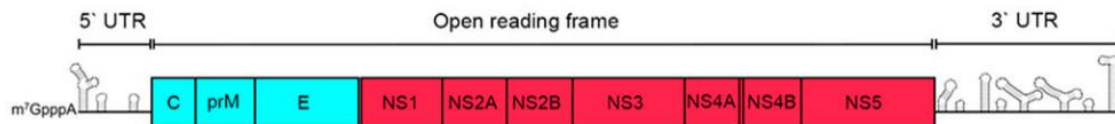


Figura 2. Organización del genoma de los Flavivirus

Organización del genoma de los *Flavivirus*, flanqueado por las regiones 5' UTR y 3' UTR, de manera lineal de un solo marco de lectura abierto (ORF por su acrónimo en inglés); las proteínas estructurales C, prM y E están en color azul y las proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 en color rojo (Barrows et al., 2018).

2.4 Proteínas flavivirales

Las proteínas virales se producen a partir de la traducción del ORF, en una poliproteína conformada por más de 3000 aminoácidos, la cual es procesada proteolíticamente por proteasas virales y celulares (Figura 2). El extremo amino terminal de la poliproteína, codifica para las tres proteínas estructurales que constituyen a la partícula viral (Proteína C, prM y E). El resto de la poliproteína, es procesada en siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, que son esenciales durante la replicación viral (Mukhopadhyay et al., 2005).

2.4.1 Proteína de cápside (C)

La proteína de la cápside (C) pesa aproximadamente 11 kDa, su estructura secundaria consiste en cuatro hélices alfa que cumplen las siguientes funciones: La hélice 1 posee aminoácidos de carácter básico que se asocian y unen fuertemente al RNA genómico recién sintetizado; de esta manera, se forma el complejo riboprotéico o nucleocápside que protege al RNA viral de la degradación y promueve la organización del RNA en el interior de la partícula viral en formación. La hélice 2 interviene durante el ensamblaje de la ribonucleoproteína y de la partícula viral favoreciendo el acercamiento del RNA viral al resto de la proteína C anclada en la membrana del

ER, también recluta gotas lipídicas presentes en el citoplasma que promueven la formación de una nueva partícula viral. Las hélices 3 y 4 son hidrofóbicas y anclan a la proteína C a la membrana del ER, una vez anclada en el ER interactúa con la proteína precursora de membrana (prM) y la proteína de envoltura (E), para favorecer y completar el ensamblaje de las partículas virales (figura 3) (Barrows et al., 2018; Lindenbach et al., 2007; Samsa et al., 2009; Schneemann, 2006).

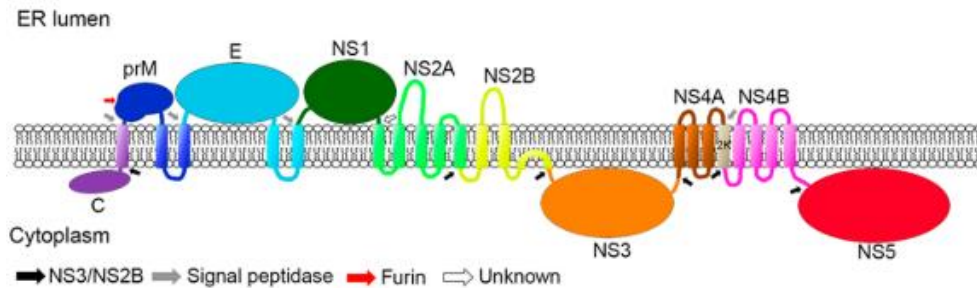


Figura 3. Topología de la poliproteína de los Flavivirus insertada en el retículo endoplásmico.

Representación esquemática de la organización tridimensional de la poliproteína flaviviral (C-prME-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) y su acomodo transmembranal en el retículo endoplásmico; las proteínas NS3 y NS2B actúan en donde las flechas negras indican para poder establecer un reacomodo de las proteínas, mientras que la señalización de la peptidasa ocurre en donde las flechas grises (prM-E); mientras que furina interactúa con prM como lo indica la flecha roja (Barrows et al., 2018).

2.4.2 Proteína precursora de membrana (prM) y proteína de membrana (M)

La proteína precursora de membrana (prM) tiene un peso molecular de 26 kDa, está presente en los viriones inmaduros y participa en el proceso de maduración de la partícula viral. Esta proteína es procesada después de la traducción por la proteasa celular furina, lo que libera el péptido *pr* en la red trans-Golgi desencadenando el reordenamiento, la homodimerización de la proteína E y la formación de nuevas partículas virales. (Catteau et al., 2003; Gebhard et al., 2011; Lindenbach et al., 2007; Velandia & Castellanos, 2011; Zhang et al., 2003).

2.4.3 Proteína de envoltura (E)

La proteína de envoltura (E) tiene un peso molecular de 50 kDa, posee tres dominios (I, II y III) y se distribuye sobre la superficie del virus, formando complejos homodiméricos. Los dominios II y III de cada una de las proteínas de los homodímeros, son determinantes para las interacciones entre el virus y los receptores celulares. También, la proteína E es el principal blanco antigénico de la partícula viral, ya que estimula la respuesta antiviral del individuo e induce la producción de citocinas inflamatorias, en especial interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), también propicia un aumento en el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interferón gama (IFN- γ); así como la producción anticuerpos IgM neutralizantes para el serotipo del DENV con el que ocurrió la primoinfección e IgG en el caso de una segunda infección con un serotipo heterólogo. Se sabe que las mutaciones y modificaciones postraduccionales que sufre esta proteína en cada ciclo de replicación, pueden afectar directamente la eficiencia de infección, la virulencia; así como impactar el tropismo del DENV, al igual que puede regular el establecimiento y el control de la infección por parte del sistema inmunitario (Castro Mussot et al., 2013; McBride et al., 2000; Perera et al., 2008).

2.5 Proteínas no estructurales (NS)

2.5.1 Proteína NS1

La proteína NS1 tiene un peso aproximado de 46 kDa, forma dímeros o hexámeros asociados a balsas lipídicas de la membrana plasmática. También, se puede hallar soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular; por esta razón, la NS1 puede estimular al sistema inmunitario y ser detectado en muestras de pacientes. Se ha demostrado que en el suero de pacientes infectados con DENV existe la presencia de inmunoglobulinas dirigidas contra la proteína NS1. Estos sueros se han evaluado *in vitro* y se ha demostrado que las IgM contra la proteína NS1 pueden estimular la lisis mediada por el sistema de complemento, tanto en células infectadas como no infectadas. Este último fenómeno podría explicar, por lo menos en parte, los daños funcionales del endotelio, que conducen al sangrado y a la extravasación plasmática, como se ha demostrado en los pacientes con diagnóstico de dengue grave (Avirutnan et al., 2006; Krishna et al., 2009; Lin et al., 2002).

2.5.2 Proteína NS2

La proteína NS2 comprende 2 proteínas; NS2A y NS2B.

La proteína NS2A tiene un peso de aproximadamente 22 kDa; *in vitro*, promueve el ensamblaje y la replicación viral. También participa en la selección de función del RNA genómico producido en cada ciclo de replicación y se utiliza como molde para generar las formas replicativas y los intermediarios replicativos o si se asocia dentro de la nucleocápside durante el ensamblaje viral. Por su parte, la proteína NS2B pesa aproximadamente 14 kDa y posee una región hidrofóbica que ancla el complejo NS2B/NS3 a la membrana del retículo endoplásmico (Bollati et al., 2010; Lindenbach et al., 2007).

2.5.3 Proteína NS3

La proteína NS3 pesa aproximadamente 70 kDa, posee en su extremo N-terminal un dominio proteasa similar a tripsina (NS3pro) y en el extremo C-terminal presenta un dominio con diferentes actividades enzimáticas, que actúa como trifosfatasa de nucleótidos estimulada por RNA (NTPasa) y como helicasa del RNA (NS3Hel); ambas funciones son indispensables en la replicación viral. El dominio NS3Pro actúa hidrolizando los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 de la poliproteína viral. La función del dominio NS3Pro depende de su asociación con la proteína NS2B; ya que es la encargada de generar el ambiente lipídico apropiado alrededor del retículo endoplásmico, al reclutar enzimas celulares de la vía de síntesis de lípidos, lo cual garantiza el inicio del ensamblaje (Velandia & Castellanos, 2011).

2.5.4 Proteína NS4

La proteína NS4 comprende dos proteínas de membrana; NS4A y NS4B (de 127 y 248 residuos respectivamente), enlazadas por el extremo C-terminal de NS4A (denominado "fragmento 2K"). La región C-terminal de la proteína contiene tres Dominios Trans Membranales (TMDs por su acrónimo en inglés). El dominio transmembranal 1 es esencial para la oligomerización de NS4A y la remodelación de la membrana del hospedero, así como para la síntesis de RNA viral, NS4A se localiza en paquetes de vesículas derivadas del ER, junto con las proteínas virales E y NS3 en conjunto con RNA de doble cadena (dsRNA por su acrónimo en inglés), donde forma parte del complejo de replicación viral. También participa en la regulación de la respuesta inmunitaria del

hospedero frente a virus como en DENV1. Se ha demostrado que NS4A inhibe al factor TANK-kinasa de unión 1 (TBK1) y, por lo tanto, previene la inducción de IFN- α e IFN- β (Interferón alfa e interferón beta) (Dalrymple et al., 2015; Gopala Reddy et al., 2018).

Por otro lado, la NS4B, es una proteína de membrana de 27 kDa involucrada en la replicación e inmunomodulación de la respuesta inmune del hospedero. Después de la escisión de NS4A, NS4B se dirige al lumen del ER mediante la interacción con el fragmento 2K derivado del C-terminal de NS4A. Los extremos terminales N y C de NS4B están localizados en el ER y el citoplasma, respectivamente. Se predice que el C-terminal de NS4B, así como su región terminal, sufren cambios conformacionales para pasar al lumen del ER, donde interactúa con NS5 (Li et al., 2016; Miller et al., 2006).

2.5.5 Proteína NS5

La proteína NS5 es una proteína conservada entre los *Flavivirus*, también es la proteína más grande (con 900 aminoácidos). Juega un papel importante durante la replicación viral, ya que tiene actividad enzimática requerida para la protección y síntesis del RNA viral. También puede modular la señalización de interferón y la producción de citocinas. El análisis de su secuencia ha sugerido que NS5 se compone de un dominio metiltransferasa (MTasa). El dominio MTasa N-terminal cataliza la protección del RNA viral mientras que el dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp por su acrónimo en inglés) se encarga de generar RNA de doble hebra mediante la síntesis de RNA de sentido negativo como intermediario por medio del RNA molde de sentido positivo que posee la partícula viral por la asociación de las proteínas no estructurales NS5 y NS3 para formar el complejo replicativo. Este suceso ocurre por una interacción entre la región C-terminal de NS3 con la región N-terminal región de NS5 la importancia del dominio RdRp es que se encarga de generar copias del material genético del virus por lo que genera progenie viral, sin embargo, durante el proceso también va generando mutaciones en el genoma (Davidson, 2009; Gebhard et al., 2011; Wang et al., 2020).

3 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo de los *Flavivirus* inicia con la entrada del virus a células permisivas donde la proteína E interactúa con proteínas o proteoglicanos de la membrana celular que median la unión y la posterior endocitosis del virus. Las partículas de los *Flavivirus* entran principalmente a través de endocitosis dependiente de clatrina, una vez dentro, la acidificación del pH endosomal desencadena reordenamientos conformacionales de las glicoproteínas de la envoltura que exponen al péptido de fusión del DII permitiendo la fusión de la membrana viral y la membrana endosomal, lo que resulta en la liberación del RNA viral al citoplasma (Figura 4). La entrada también puede darse por medio de proteoglicanos como el heparán sulfato, debido a su alta carga negativa actúa como un receptor primario al favorecer la adhesión de las partículas virales a la superficie celular, lo que facilita la interacción de la proteína E con los receptores de alta afinidad favoreciendo la endocitosis mediada por receptor (Germi et al., 2002; Laureti et al., 2018; Modis et al., 2005; Zhang et al., 2013). Una vez liberado gRNA es reconocido por los ribosomas, iniciando la traducción en la membrana del ER produciendo una sola poliproteína. La proteasa viral y proteasas celulares catalizan la escisión cotraduccional y postraduccional de la poliproteína en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B Y NS5). Mientras que las proteínas estructurales son constituyentes del virión, las proteínas no estructurales dirigen las invaginaciones de la membrana del ER, que son el sitio de replicación del genoma viral a través de la síntesis de RNA intermediario de sentido negativo (RNA (-)) el cual es posteriormente utilizado como molde. Las moléculas de RNA (+) que son generadas por el complejo de replicasa viral son encapsidadas en nuevas partículas virales (inmaduras) en la región opuesta al sitio de replicación, a la luz del ER. El proceso de maduración de las partículas virales de DENV ocurre a lo largo de la vía secretora, por la escisión mediada por furina del péptido *pr* de la proteína de membrana (M) (Neufeldt et al., 2018; Yu et al., 2008; Zhang et al., 2013).

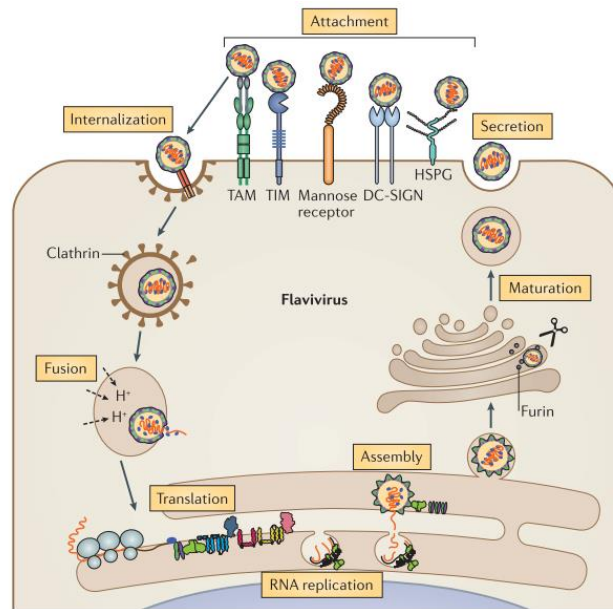


Figura 4. Ciclo replicativo de los *Flavivirus*.

Diagrama de las etapas del ciclo de replicación de los *Flavivirus*, comenzando con el reconocimiento de su receptor hasta la liberación de las partículas virales maduras infecciosas (Neufeldt et al., 2018).

4 Taxonomía del género *Flavivirus*

La familia *Flaviviridae* incluye a más de 60 especies clasificadas en cuatro géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus*. El género *Flavivirus* incluye a más de 50 especies de entre las cuales la mayoría son arbovirus (virus transmitidos por artrópodos ya sean mosquitos o garrapatas) cuyos hospederos primarios son mamíferos y aves. Entre los *Flavivirus* con importancia médica en humanos se encuentran el virus de la fiebre amarilla (YFV), virus del dengue (DENV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus del Nilo Occidental (WNV) y virus del Zika (ZIKV). Las infecciones con éstos *Flavivirus* en su mayoría son asintomáticas, sin embargo, también pueden generar cuadros clínicos leves o formas severas como fiebres hemorrágicas o enfermedades neurológicas que ponen en riesgo la vida del paciente (Simmonds et al., 2017).

Las especies del género *Flavivirus* se clasifican con base en la homología en la secuencia de la proteína de envoltura (E) cuya secuencia de aminoácidos puede variar entre 40-60% entre las especies de *Flavivirus* (Heinz & Stiasny, 2017).

El DENV se subclasifica en cuatro serotipos genética y serológicamente diversos. La capacidad de neutralización cruzada es la base de la clasificación del serocomplejo de DENV en: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Adicionalmente, cada serotipo se subclasifica en genotipos (Weaver & Vasilakis, 2009). El DENV-1 se subclasifica en los genotipos I, II, III, IV, y V; el DENV-2 se subclasifica en los genotipos Americano, Asiático I, Asiático II, Americano-Asiático, Cosmopolita y Selvático; el DENV-3 se subclasifica en los genotipos I, II, III, IV y V y el DENV-4 se subclasifica en los genotipos I, II (dividido en IIa y IIb), III, IV (o selvático) y V (Weaver et al., 2021).

En cuanto al ZIKV únicamente se ha identificado un serotipo, el cual se subclasifica en tres principales linajes genéticos o genotipos: el Africano oriental, Africano occidental y Asiático que presentan aproximadamente un 6% de divergencia en su secuencia de la proteína E (Heinz & Stiasny, 2017).

5 Técnicas para la detección e Identificación de *Flavivirus*

La detección viral temprana y la serotipificación viral a partir de muestras de suero de pacientes infectados con los virus del dengue pueden proporcionar información importante para los estudios epidemiológicos de diferentes brotes, esta información nos arroja datos de cuáles son los virus que se encuentran en circulación cada año en nuestro país, entre otras características intrínsecas de los *Flavivirus*. Para lograrlo existen métodos de amplificación como la PCR para la detección y serotipificación del DENV, aunque posee una sensibilidad razonable para la detección de los productos amplificados; también existe la PCR en tiempo real, la cual tiene una alta sensibilidad en comparación con la PCR de punto final ya que en cada ciclo de amplificación se emite fluorescencia, la cual es directamente proporcional a la cantidad de copias del genoma viral amplificado. También se pueden observar estos datos en forma de gráfica dependiendo del número de ciclos (Islam et al., 2020; Wilder-Smith et al., 2018).

En México, la secretaria de salud recomienda como pruebas confirmatorias de infección por DENV, ELISA para IgG y para IgM (Figura 5), mientras que para el diagnóstico de ZIKV se recomienda descartar primero DENV y Chikungunya (CHIKV), recomendación que también da la organización panamericana de la salud (OPS) (Figura 6). Con base en la presentación clínica se recomienda realizar el diagnóstico mediante PCR en tiempo real o en su defecto, una vez transcurridos 6 días de los síntomas tomar muestra sanguínea para detectar anticuerpos.

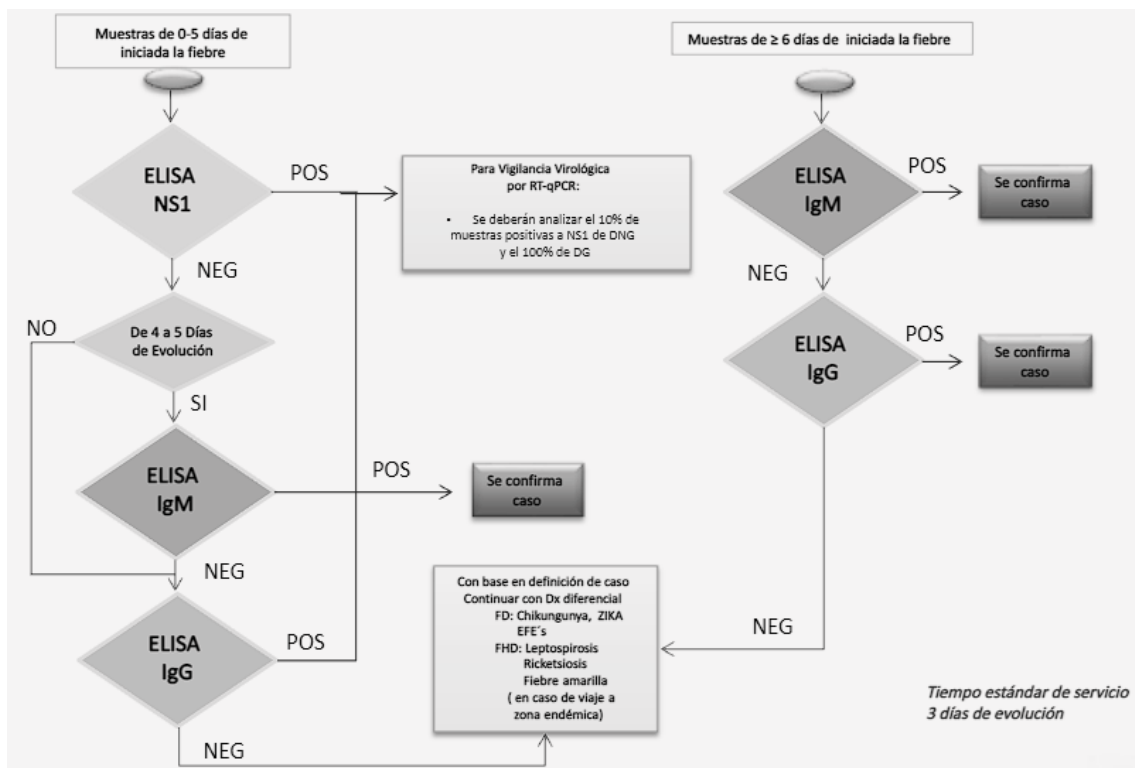


Figura 5. Algoritmo de diagnóstico para infección por DENV

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

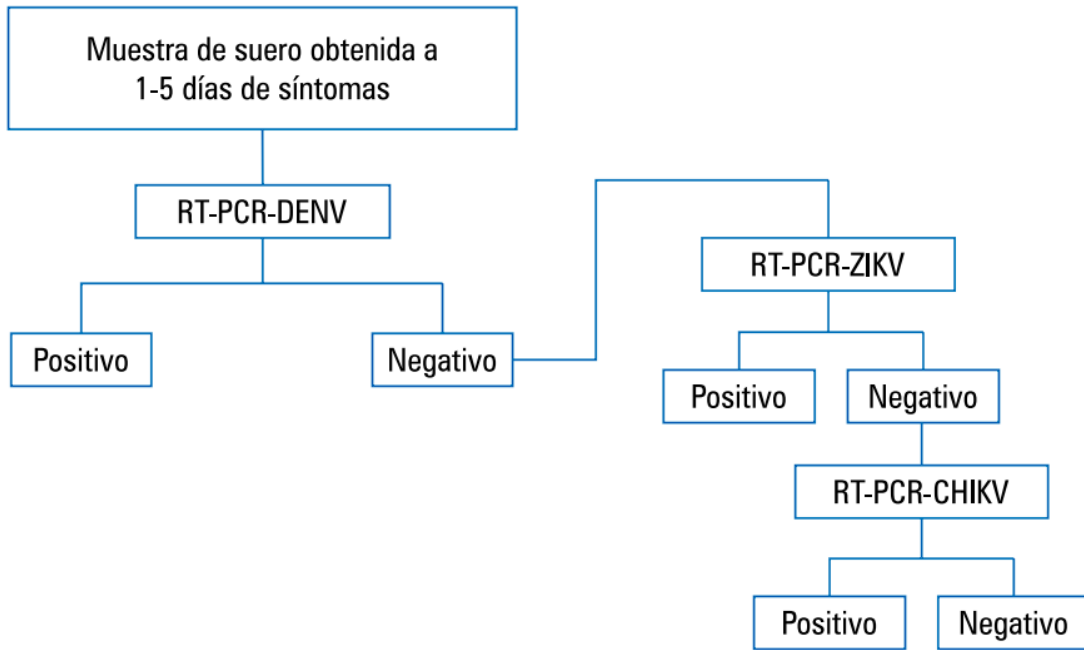


Figura 6. Algoritmo de diagnóstico para infección por ZIKV

El algoritmo recomienda realizar la detección del virus por medio de pruebas de biología molecular (RT-PCR), y en caso de ser negativo, realizar un diagnóstico diferencial con otros arbovirus (OMS, 2016).

5.1 La Reacción en Cadena de la Polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR) para la identificación de virus

La Reacción en Cadena de la Polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR), consiste en transcribir de manera inversa al dogma central de la biología molecular el RNA del *Flavivirus* utilizándolo como molde para la síntesis de una cadena complementaria de DNA complementario (cDNA por su acrónimo en inglés) utilizando la enzima transcriptasa inversa (RT) recombinante. Las moléculas de cDNA se usan como molde para la reacción en cadena de la polimerasa mediada por la DNA polimerasa (*Taq polimerasa*) y oligonucleótidos amplifican la molécula de DNA de interés. Históricamente se han diseñado oligonucleótidos para la amplificación de secuencias del genoma de DENV dirigidas a regiones del genoma del virus altamente conservadas y

fundamentalmente necesarias para que el virus pueda replicarse, como las que se ubican en el extremo 3'UTR, C-prM, NS1 y NS5 por ejemplo (Tabla 3).

La reacción de retrotranscripción se puede realizar con hexámeros aleatorios (Tabla 4), o bien con oligonucleótidos específicos complementarios al genoma viral dirigidos al extremo 3' UTR del genoma del *Flavivirus* de interés, como es el caso del oligonucleótido para DENV denominado VD8 reportado por Pierre y colaboradores (Pierre et al., 1994). El cDNA retrotranscrito se utiliza como molde para la amplificación de regiones del genoma viral específicas de género o especie y se resuelven en geles de agarosa mediante electroforesis y el patrón de migración se compara el tamaño del amplicón obtenido con el tamaño esperado mediante un marcador de tamaño molecular (Harris et al., 1999; Lanciotti et al., 1992).

5.2 PCR tiempo real para la identificación de virus

La PCR tiempo real, es un ensayo que tiene la capacidad de monitorear durante cada ciclo el progreso de la amplificación de la secuencia específica del material genético mediante la medición de la emisión de fluorescencia emitida por moléculas con afinidad al DNA. Los datos obtenidos permiten realizar cuantificación relativa y absoluta de la carga viral presente en la muestra dependiendo de la estrategia de detección (Santiago et al., 2018; Wilder-Smith et al., 2018).

En México, el laboratorio de Arbovirus y virus hemorrágicos del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la secretaría de salud ha implementado varias metodologías para la serotipificación del DENV; como el diagnóstico serológico mediante la detección del antígeno NS1 mediante el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA por su acrónimo en inglés), así como por estrategias moleculares como PCR punto final y PCR en tiempo real.

La prueba de elección para el diagnóstico depende principalmente del tiempo de duración de los signos y síntomas en los pacientes. Los algoritmos para el diagnóstico diferencial de arbovirosis fueron definidos en 2012-2015, y en 2017 se implementó el panel de detección simultanea de los

arbovirus dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV) mediante RT-qPCR (InDRE, 2021).

En la república mexicana, el diagnóstico del dengue se realiza con base en procedimientos establecidos por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), los cuales consisten en determinación de antígeno NS1 por ELISA o la detección del genoma viral por RT-qPCR (RT-PCR en tiempo real) utilizando el protocolo de diagnóstico TRIOPLEX desarrollado por centros para el control de enfermedades de Estados Unidos de América (CDC por sus siglas en inglés) (CDC, 2013). El diseño del protocolo TRIOPLEX permite la diferenciación de los genomas de los virus DENV, CHIKV y ZIKV. Para serotipificar, este kit utiliza una sonda dirigida a la región 5'-UTR del DENV (región 5' no traducida de todos los genotipos de virus del dengue sin discriminación de serotipos); la sonda está marcada con 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5' y se apaga con BHQ-1 (extintor de señal de fluorescencia-1) en el final del extremo 3'. Por otro lado, para serotipificar a CHIKV la sonda es complementaria a la secuencia que codifica para la proteína NS1 de los genotipos de asiático y del Este, centro y sur de África (ECSA), la sonda está marcada con 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX) en el extremo 5' y se apaga con BHQ-1 en el final del extremo 3'. Por último, la sonda para Zika está dirigida hacia el gen de la envoltura del genotipo asiático, y está marcada con Cal fluor red 610 (Texas Red) en el extremo 5' y apagada por BHQ-2 (extintor de señal de fluorescencia-2) en el extremo 3'. Se utiliza PCR en tiempo real, porque es un ensayo altamente sensible que tiene la capacidad de monitorear en cada ciclo el progreso de la amplificación de material genético viral (la fluorescencia es proporcional a la cantidad de copias de material genético) y por el uso de sondas hidrolizables. Mientras que la detección de IgM mediante ELISA está sujeta únicamente en casos probables de DCSA (Dengue con signos de alarma) y DG (Dengue grave).

Dichos procedimientos fueron validados y avalados por los Centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en 2017 para la vigilancia epidemiológica de enfermedades virales y zoonóticas (InDRE, 2021; Islam et al., 2020; Santiago et al., 2018).

6 Panorama Epidemiológico de DENV y ZIKV en México

La circulación del DENV en México está reflejada en la prevalencia de la enfermedad del dengue, considerada un problema de salud pública persistente ya que cocirculan los 4 serotipos del DENV, con una incidencia de casos variable entre estados, y con la prevalencia del serotipo 1 en los últimos años (Figura 7) la incidencia de la enfermedad del dengue se presenta como brotes epidémicos anuales llegando al número máximo de casos entre octubre y diciembre (Figura 8). El sistema de vigilancia epidemiológica (SINAVE) es la entidad gubernamental encargada de la vigilancia y registro de los casos anuales de dengue, que trabaja en conjunto con la secretaria de salud pública, que se encarga del procesamiento de las muestras para poder realizar el diagnóstico de la enfermedad utilizando la técnica de RT-PCR o búsqueda del antígeno viral NS1 en sangre, dependiendo de la evolución de la enfermedad con base en los “Lineamientos de vigilancia dengue y otras arbovirosis” (InDRE, 2021).

La NOM-032-SSA2-2014 para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores, establece que la vigilancia virológica para identificar los serotipos circulantes se debe hacer mediante aislamiento viral en el 10% de las muestras positivas a la proteína NS1 de los casos de DNG (Dengue no grave o sin signos de alarma) mientras que, para DCSA y DG se seleccionará el 100% de las muestras positivas a NS1. En todas las formas graves, además de aislamiento viral, se debe realizar RT-PCR e identificación de los serotipos.

Los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) deben enviar todas las muestras de pacientes con formas graves de la enfermedad al InDRE. Adicionalmente, el Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vectores establece la identificación viral del DENV y de otros arbovirus que potencialmente cocirculan con los virus DENV como lo son el virus chikungunya (CHIKV), virus del Zika (ZIKV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV). Pese a que toda acción de vigilancia permite establecer niveles de riesgo

presentes en las localidades de alta transmisión o baja transmisión epidemiológica para monitorear poblaciones y medir riesgos de transmisión (NOM-032-SSA2-2014, 2014; Salud, 2015, 2020).

A la semana epidemiológica 52 del 2021, se reportaron 6,746 casos confirmados de dengue no grave (DNG), dengue con signos de alarma (DCSA) y dengue grave (DG); el 70% de estos casos corresponden a los estados de Sinaloa, Coahuila, Veracruz, Morelos y Oaxaca, donde se reportan las tasas de incidencia más altas. Durante el año 2021 se identificó la cocirculación de los cuatro serotipos en Veracruz, Chiapas, y Michoacán y de al menos tres serotipos en Sinaloa, Coahuila, Nuevo León, Guerrero, Oaxaca, Tabasco y Zacatecas comúnmente los serotipos 1, 2 y 3 (DVEET, 2021b). El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reportó que para el año 2019 en México se registraron 41,505 casos totales confirmados de dengue, de los cuales 27,884 (67.18%) correspondieron a DNG y 13,621 (32.81%) a DCSA y DG. El 69% de los casos correspondieron a los estados de Jalisco, Veracruz, Chiapas, Quintana Roo y Oaxaca. Particularmente, este año se reportó el mayor aumento del número de casos de los últimos 5 años.

El estado de Oaxaca se ha caracterizado por la cocirculación de múltiples serotipos de DENV, en 2019 se registraron 1,678 casos confirmados de dengue de los cuales 1,054 fueron DNG, 513 DCSA y 111 DG, con una tasa de incidencia de 40.86 y letalidad de 0.96. De los casos reportados, 895 fueron serotipificados como DENV-1, 488 como DENV-2 y 3 como DENV-3, sin registro de DENV-4 (DVEET, 2021b).

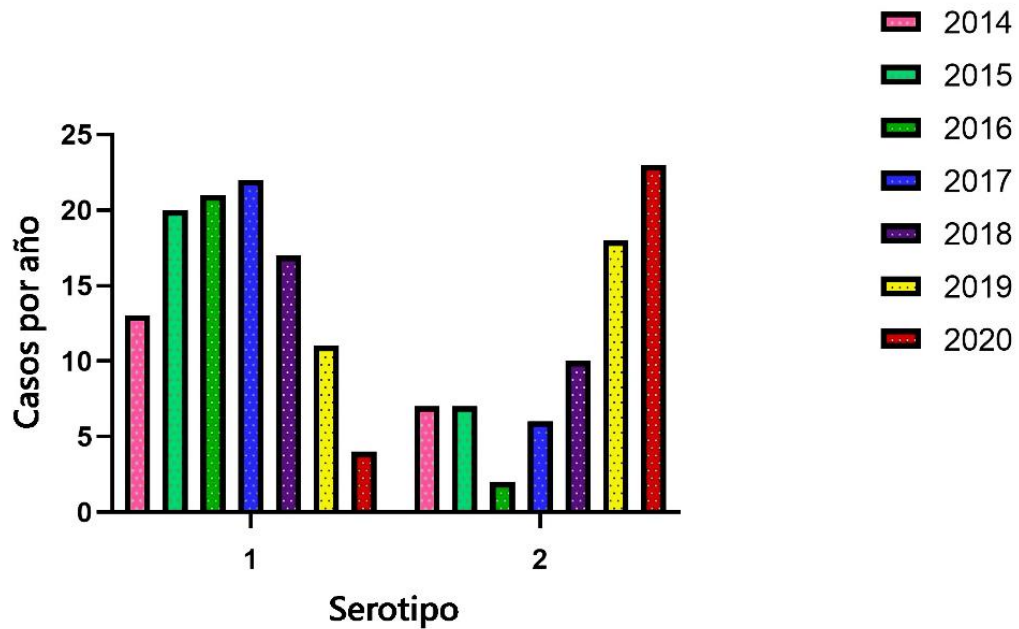


Figura 7. Gráfica comparativa entre el serotipo predominante DENV-1 y DENV-2 en la república mexicana.

En esta gráfica podemos observar desde el año 2014 en color rosa hasta el año 2020 en color rojo el cambio de intraserotipo para DENV, (cada barra tiene un color correspondiente al año y representa el número de casos correspondientes al serotipo 1 o 2 dependiendo del lado de la gráfica) A la izquierda, los datos correspondientes al número de casos por año del serotipo 1, en el lado derecho los datos correspondientes al número de casos por año del serotipo 2. Estos datos fueron recabados de los panoramas epidemiológicos de los años correspondientes y graficados para poder observar el cambio de serotipo que ocurrió a través de los años 2014-2020 (Gonzalez Arce, 2021).

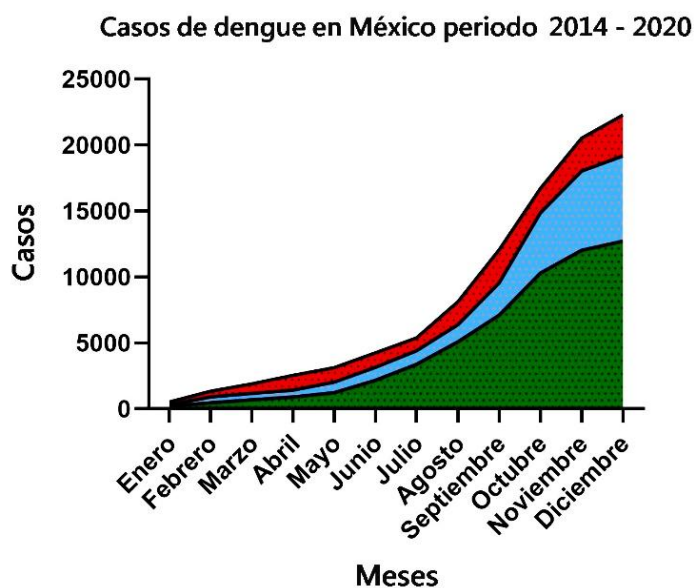


Figura 8. Canal endémico de 6 años, correspondiente a los casos de dengue en México del periodo 2014-2020.

En esta gráfica de cuartiles se observa el aumento de los casos de dengue a partir del mes de agosto hasta diciembre, en verde los casos correspondientes al periodo de 2014 a 2016, en azul los casos correspondientes al periodo de 2017 a 2019 y en rojo los casos correspondientes al año 2020, se denota el aumento en el número de casos acumulados. (Gonzalez Arce, 2021).

El ZIKV fue aislado inicialmente en África, sin embargo, en 2007 surgió un brote al sur del Océano Pacífico que dio paso a su propagación al continente americano. En 2015 en Brasil se originó la primera epidemia que se extendió a América Central, América del Sur y el Caribe (Song et al., 2017). En este mismo año se identificó por primera vez en México, pero el registro máximo de casos confirmados ocurrió durante la epidemia de 2016 con 7,560 casos; a partir de entonces el número de casos ha disminuido progresivamente cada año hasta registrarse apenas 35 casos en 2021. A la semana epidemiológica 52 de 2021 el número de casos confirmados acumulados ha sido de 12,991. Con respecto a las formas severas de la presentación clínica por la infección con el ZIKV, en México, de 2016 a 2021 se han reportado 56 casos de síndrome congénito asociado a Zika y 19 casos confirmados de síndrome Guillain-Barré asociado a Zika (DVEET, 2021a).

6.1 Transmisión del virus del dengue

El vector del DENV son los mosquitos hembra hematófagos de las especies *Aedes aegypti* y *A. albopictus*, los cuales se reproducen y crecen en cuerpos de agua principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, donde su número aumenta durante periodos de lluvia. El periodo de maduración es entre 7-10 días y viven generalmente de 4 a 6 semanas. Los arbovirus del género *Flavivirus* se mantienen en la naturaleza a través de dos ciclos de transmisión evolutivos y ecológicos distintos: Un ciclo selvático; donde el virus se transmite entre primates no humanos por varios mosquitos *Aedes spp* arbóreos y el ciclo urbano, donde la transmisión del virus ocurre entre humanos y mosquitos *A. aegypti* (Gubler & J., 2014; Mayer et al., 2017; OPS/OMS, 2019).

La infección con los arbovirus del género *Flavivirus*, inicia cuando el mosquito hembra se infecta al ingerir sangre de un primate infectado en etapa febril de la enfermedad. En el mosquito, el virus infecta las células del intestino medio y se disemina para replicarse en numerosos tejidos del mosquito, infectando finalmente las glándulas salivales entre 8 y 10 días, este proceso determina la transmisibilidad y está influenciado por la temperatura ambiental, la especie del virus, la variante y la competencia del mosquito. Una vez que se infectan las glándulas salivales, el mosquito es capaz de transmitir el virus a otro hospedero durante su alimentación. El mosquito sigue siendo infeccioso de por vida y puede infectar a múltiples hospederos potenciales de los que se alimenta o sondea mientras intenta alimentarse. El tiempo desde la infección hasta el inicio de la enfermedad en humanos (el período de incubación) varía de 3 a 14 días, con un promedio de 4 a 7 días. La enfermedad se presenta con mayor frecuencia como una infección subclínica, o como un cuadro autolimitante caracterizado por fiebre alta, dolores severos, y otros síntomas similares a los de la gripe. Rara vez se da la progresión a un caso severo el cual puede provocar una fuga de plasma que conduce a enfermedades respiratorias, sangrado severo, choque anafiláctico y la muerte (Gubler, 2014; Guzman et al., 2016).

6.2 Cuadro clínico del Dengue

En 2009 la OMS actualizó la clasificación de las presentaciones clínicas de la enfermedad del dengue, definiéndolas en las siguientes categorías: dengue sin signos de alarma (DSSA), dengue con signos de alarma (DCSA) y dengue grave (DG). Esta clasificación fue incorporada a los reportes epidemiológicos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) en México en el año 2016 por lo que los casos reportados en el país previo a la actualización pueden encontrarse clasificados como DF (Fiebre por dengue) o DHF/DSS (Fiebre hemorrágica por dengue y Síndrome de choque por dengue), esta clasificación fue propuesta en 1997 por la OMS. Sin embargo; en nuestro grupo de trabajo consideramos que la clasificación más reciente es más adecuada, ya que la clasificación previa sólo se basaba en dos fenómenos patológicos asociados con la enfermedad (Guzman et al., 2016). Se sabe que el virus del dengue presenta un patrón cíclico de brotes, por lo cual es importante actualizar y reforzar las estrategias de vigilancia epidemiológica, el diagnóstico y su control, ya que con esto se puede mitigar el impacto que provocan los brotes y podrían ayudar en la prevención de epidemias (CDC, 2013; OPS/OMS, 2010, 2020).

A partir de la aparición del primer síntoma comienza la etapa febril con duración de 3-7 días, los síntomas pueden incluir cefalea, dolor retroorbital, mialgia, artralgia, erupción macular o maculopapular; y manifestaciones hemorrágicas menores como petequia, equimosis (hematomas púrpuras), epistaxis, sangrado en las encías, hematuria, o un resultado positivo de la prueba del torniquete. En esta etapa es donde se detecta la viremia, hay mayor evidencia de inflamación y ocurre la seroconversión. Los signos que apoyan a diagnóstico y evaluación de la severidad del cuadro clínico incluyen leucopenia, trombocitopenia, hiponatremia, incremento de las enzimas hepáticas aspartato-aminotransferasa (AST) y alanina-aminotransferasa (ALT), y una tasa de sedimentación eritrocítica normal; cómo se describe en la Figura 9 (CDC, 2019).

Cuando la fiebre disminuye a 38°C o menos es indicador de la evolución hacia la etapa crítica, normalmente de 3 a 7 días de inicio de la enfermedad, los signos de alarma de la evolución hacia el dengue grave incluyen vómitos persistentes, dolor abdominal intenso, acumulación de líquido,

hemorragia de mucosas, dificultad para respirar, letargo, inquietud, hipotensión postural, hepatomegalia y un incremento progresivo de hematocrito, el cuadro clínico puede evolucionar a choque por la extravasación de plasma; hemorragias graves y compromiso serio de órganos. Cuando la extravasación del plasma baja, el paciente entra en la fase de convalecencia y comienza a reabsorber los líquidos extravasados, los derrames pleurales y abdominales. A medida que mejora el bienestar de un paciente, se estabiliza el estado hemodinámico (aunque podría presentar bradicardia). El hematocrito del paciente puede estabilizarse o disminuir debido al efecto de dilución del líquido reabsorbido; el recuento de glóbulos blancos generalmente comienza a aumentar, seguido de una recuperación del recuento de plaquetas. (CDC, 2019).

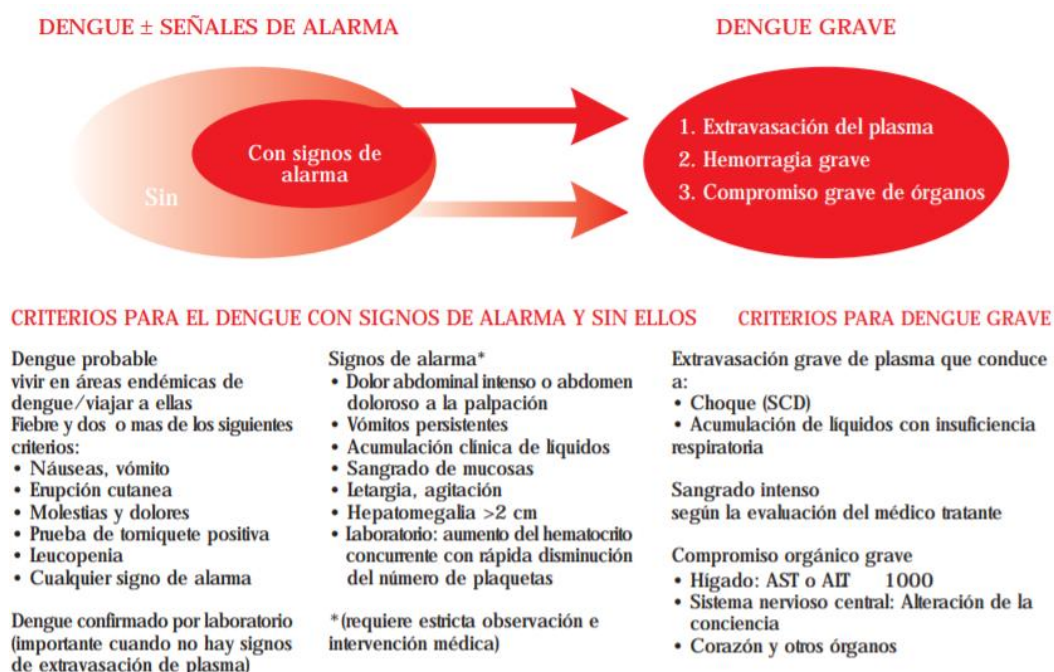


Figura 9. Clasificación clínica de la enfermedad del dengue.

De acuerdo a las guías sugeridas por la OMS, en 2009 se propuso esta actualización a la clasificación del cuadro clínico del dengue, la cual nos permite clasificar de acuerdo a criterios obtenidos en los laboratorios clínicos (OMS/TDR, 2009).

En la fase febril se recomienda la RT-PCR para el diagnóstico de dengue, debido a que en esta etapa la viremia es alta; de igual manera se puede hacer uso de inmunocromatografía o ELISA del antígeno viral NS1, el cual se mantiene presente en sangre hasta la fase crítica donde disminuye la viremia e inicia la producción de Inmunoglobulinas de clase M en infecciones primarias o IgG en infecciones secundarias. El estado de viremia puede durar hasta 2 semanas, sin embargo, comienza a disminuir a partir del día 6 de la enfermedad. Una muestra positiva de suero único en fase aguda es considerado presuntivo, por lo que se recomienda la toma de una segunda muestra entre una y dos semanas después de la primera muestra, en búsqueda de seroconversión o incremento hasta cuatro veces del título de anticuerpos. (CDC, 2019; Krishna et al., 2009; OPS/OMS, 2019, 2020).

6.3 Cuadro clínico de ZIKV

La infección por ZIKV presenta un periodo de incubación de 3 hasta 14 días. Puede ocasionar un amplio espectro de manifestaciones clínicas como fiebre, eritema, conjuntivitis no purulenta, mialgia, artralgia y cefaleas con una duración de 2 a 7 días, aunque la mayoría de los casos son asintomáticos o autolimitantes. Durante el periodo sintomático los títulos de viremia alcanzan su máximo, por lo que en este periodo se recomienda su diagnóstico mediante RT-PCR. Cuando la toma de muestra es posterior a los 7 días de iniciados los síntomas, es recomendable el diagnóstico mediante la detección de anticuerpos IgM acompañado de una prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT por sus siglas en inglés), ambos en caso de ser positivos para ZIKV son útiles para su confirmación y diagnóstico diferencial del DENV (OMS, 2016).

La infección por ZIKV se ha asociado con presentaciones más severas de la enfermedad como GBS y el síndrome congénito asociado a Zika. El GBS es una neuropatía autoinmune, el cual puede manifestarse clínicamente como parálisis muscular y síntomas como dolor, entumecimiento u hormigueo. El GBS después de la infección por el virus del Zika presenta una progresión rápida a partir de los 6 días iniciada la infección, desarrollando una neuropatía axonal motora aguda que, en el peor pronóstico, puede derivar en cuadriplejía o necesidad de soporte de ventilador.

El síndrome congénito asociado a Zika ocurre cuando una mujer embarazada se infecta con ZIKV durante el primer y segundo trimestre del embarazo, el virus puede transmitirse de la madre al feto, el neurotropismo de este virus desencadena la apoptosis de células progenitoras neuronales afectando el desarrollo de este tejido, pero también ocasiona otras malformaciones congénitas como contracturas de los miembros, hipertonía muscular, alteraciones oculares, sordera e incluso microcefalia (Oeser & Ladhani, 2018).

6.4 Variabilidad de *Flavivirus*

Durante la replicación del RNA viral, se producen mutaciones que dan lugar a la generación de nuevas variantes o “cuasiespecies virales” de *Flavivirus*. Las mutaciones producen una diversa cantidad de variantes genéticas, cuya variación depende de la cantidad de mutaciones puntuales durante de los ciclos de replicación (Selisko et al., 2018). Se ha descrito que la generación de cuasiespecies virales o “nubes de mutantes”, depende de la fidelidad de la replicación del RNA viral, la cual es calculada por el número de mutaciones introducidas por una cantidad específica de nucleótidos, durante los ciclos de replicación. Esta frecuencia de mutaciones se produce debido a la adición de pares de bases incorrectos por la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) durante la replicación del genoma viral. Las mutaciones producidas por *Flavivirus* se deben a la baja fidelidad de su RdRp, la proteína NS5, cuya tasa de mutación es de 1/34,000 por UTP, 1/59,000 por ATP y 1/135,000 por CTP (Selisko et al., 2018). Además de sintetizarse copias del RNA viral, debe de generarse una cantidad definida de mutaciones en el genoma, con el fin de proporcionar al virus la capacidad de adaptarse a las presiones evolutivas y cambios en las condiciones ambientales presentes en los hospederos, esta capacidad se conoce como “*fitness*”. Por lo tanto, las variantes genéticas seleccionadas que presenten mejor *fitness* ante la respuesta inmunológica, la variabilidad genética del hospedero, la afinidad al vector, entre otros factores, serán capaces de producir infecciones productivas y permanecer en las poblaciones (Filomatori et al., 2017; Guzman et al., 2016).

7 Antecedentes directos y justificación

En México, la vigilancia epidemiológica del DENV inició en 1995 con la red para el diagnóstico del Dengue. Sin embargo, dado que los virus DENV y ZIKV presentan una alta homología en la secuencia de la proteína E, genera reactividad cruzada de los anticuerpos en los pacientes seropositivos, dificultando el diagnóstico diferencial por pruebas serológicas. La estrategia diagnóstica más sensible para diferenciar a DENV de ZIKV es la RT PCR semicuantitativa. La estrategia aprobada por la secretaría de Salud es la denominada “TRIOPLEX” que incluye sondas hidrolizables complementarias a los genomas de DENV, ZIKV y CHIKV (InDRE, 2021).

La estrategia de diagnóstico diferencial TRIOPLEX es la mejor opción, sin embargo, la accesibilidad de equipos y de insumos necesarios para realizarla, no está al alcance de la mayoría de los laboratorios de diagnóstico que brindan servicio a la población habitante de regiones endémicas, por lo que dependen de pruebas de inmunocromatografía para IgM, IgG y NS1 para el diagnóstico diferencial, lo cual limita el consejo y manejo médico hacia el paciente, al no poder diferenciar entre DENV y ZIKV por este tipo de pruebas. El diseño de nuevas estrategias accesibles para la identificación de *Flavivirus* podría impactar en el control epidemiológico de los brotes anuales ocasionados por ZIKV y DENV, por lo que proponemos las siguientes estrategias: utilizar oligonucleótidos aleatorios para la retrotranscripción, que junto con primers serotipo específicos para DENV permitirá la correcta identificación de virus en los aislados, utilizando RT-PCR de punto final, técnica que es más accesible para la mayoría de laboratorios, la cual compararemos con RT-PCR en tiempo real.

Los resultados obtenidos pueden proporcionar la identificación del serotipo del DENV en los aislados. Cabe destacar que mediante el uso de los propuestos oligonucleótidos universales de DENV, la estrategia puede escalar su aplicación a la identificación del genotipo del virus por medio de secuenciación en casos de interés epidemiológico. Adicionalmente, al utilizar hexámeros aleatorios durante la retrotranscripción, se disminuirá el riesgo de falsos negativos por hibridación incompleta al genoma de potenciales variantes emergentes de *Flavivirus*.

8 Hipótesis

La retrotranscripción dirigida de muestras de RNA de aislados clínicos de *Flavivirus* optimizará la tipificación por PCR tiempo real.

9 Objetivos

9.1 Objetivo general

Comparar dos estrategias moleculares de tipificación de aislados virales provenientes de muestras con diagnóstico presuntivo para *Flavivirus* de zonas endémicas en México.

9.2 Objetivos particulares

1. Aislar y amplificar virus provenientes de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo para *Flavivirus* en zonas endémicas en México tanto en células del vector (C6/36) y/o células de mamífero (Vero).
2. A partir de los virus aislados, confirmar la presencia de RNA viral por dos estrategias de biología molecular en PCR tiempo real.
3. Comparar dos estrategias de biología molecular para la tipificación de *Flavivirus* por PCR punto final.

10 Materiales y Métodos

10.1 Aislados de *Flavivirus*

Para el presente trabajo se utilizaron *Flavivirus* que fueron aislados por el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Arbovirus de la UBIMED, FES Iztacala, a partir de muestras de suero de pacientes con diagnóstico presuntivo a infección por *Flavivirus*. Dichas muestras provienen de donadores y fueron recolectadas en los estados de Yucatán durante el año 2016 y Tabasco durante el 2018. Los aislados fueron denominados 2016.YUC.47, 2016.YUC.76, 2016.YUC.96 y 2016.YUC.100. y 2018.TAB.1, 2018.TAB.2, 2018.TAB.6, 2018.TAB.7, 2018.TAB.8 y 2018.TAB.20. El proceso de aislamiento viral se realizó a través de pases ciegos en las líneas celulares C6/36 y Vero en ambos casos.

Tabla 1. Muestras de pacientes con cuadro clínico presuntivo para *Flavivirus*.

| Muestras | Estado | Año | Código de muestra | Clasificación |
|----------|---------|------|-------------------|---------------|
| 1 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.1 | ZIKV |
| 2 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.2 | DNG |
| 3 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.6 | DCSA |
| 4 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.7 | DNG |
| 5 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.8 | DNG |
| 6 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.20 | DNG |
| 7 | Yucatán | 2016 | 2016.Yuc.47 | N/A |
| 8 | Yucatán | 2016 | 2016.Yuc.76 | N/A |
| 9 | Yucatán | 2016 | 2016.Yuc.96 | N/A |
| 10 | Yucatán | 2016 | 2016.Yuc.100 | N/A |

Tabla 2. Lista de los virus referencia utilizados.

| Virus | Código de GenBank | Aislado en |
|-----------------------------|-------------------|---------------------|
| DENV-1 Western Pacific | AY145121.1 | Pacifico Occidental |
| DENV-2 NGC | AB189124.1 | Nueva Guinea |
| DENV-3 Sleman 78 | AY648961.1 | Indonesia |
| DENV-4 Dominica/81466971981 | LC069810.1 | Dominica |
| ZIKV PRVABC-59 | KX377337.1 | Puerto Rico |

(Donados por el Dr. Stephen Whitehead, National Institutes of Health, Maryland, USA).

10.2 Amplificación y cosecha de preparaciones virales

10.2.1 Línea celular *Aedes albopictus* clona C6/36 CRL-1660

Para la propagación y cultivo de los aislados virales durante este proyecto se utilizó la línea celular C6/36. Para el mantenimiento de esta línea celular se utilizó medio MEM (Gibco ®) (medio

mínimo esencial) suplementado con piruvato de sodio (Biowest ®) (1%), vitaminas (Biowest ®) (1%) aminoácidos no esenciales (Biowest ®) (1%), L-glutamina (Biowest ®) (1%), antibiótico (Biowest ®) (1%) y suero fetal bovino (SFB) (Gibco ®) al 10%, manteniendo en incubación a una temperatura de 33°C, en ausencia de CO₂ (Medina et al., 2012; Salas Benito et al., 2008).

10.2.2 Línea celular Vero C1008 clona E6

La línea celular Vero también fue utilizada para el aislamiento de virus y su titulación. Para el mantenimiento de esta línea celular se utilizó medio RPMI (Instituto Conmemorativo del Parque Roswell) suplementado con 1% de antibiótico y antimicótico (Biowest ®); y 3% de suero fetal bovino (Biowest ®), se incubaron a 37°C con atmosfera de 5% de CO₂ y 5% de humedad relativa a la temperatura.

Para el aislamiento de los virus se inocularon monocapas de células C6/36 al estar a un 80% de confluencia (ocupaban un 80% del espacio del interior de la base de la botella) con 50 µL de una dilución en medio sin suplementar MEM 1:40 del suero de pacientes con diagnóstico clínico presuntivo para dengue y/o Zika; las células se mantuvieron en íntimo contacto con el virus al colocar los 50 µL de la dilución en dos mL de medio durante 1h a 37°C y 5% de CO₂ y humedad relativa, posteriormente se volvió a completar la cantidad de medio inicial que poseía el cultivo con medio de mantenimiento y se monitorearon durante los siguientes días en búsqueda de indicios de infección viral (células despegadas de la monocapa). Al término de tres pases en la línea celular C6/36 se recolectó del 20-30% de sobrenadante, se centrifugó a 440 RCF (fuerza centrífuga relativa o fuerza g) durante 5 min a 4°C, se fraccionó y se criopreservó con buffer de sacarosa-fosfato-glutamato SPG 1x, a -70 °C. Al realizar la cosecha y criopreservación de alícuotas virales, se utilizó hielo durante toda la manipulación para evitar la desnaturalización de las partículas virales como se menciona en “Evaluación de la acumulación del RNA subgenómico flaviviral de aislados mexicanos de virus zika”. (Crespo Ortiz, 2000; Martínez Torres, 2019).

Simultáneamente para el aislamiento de los virus se inocularon monocapas de células Vero al estar a un 80% de confluencia (ocupaban un 80% del espacio del interior de la base de la botella) con 50 µL de una dilución en medio sin suplementar RPMI 1:40 del suero de pacientes con diagnóstico clínico presuntivo para dengue y/o Zika; las células se mantuvieron en íntimo contacto con el virus al colocar los 50 µL de la dilución en dos mL de medio durante 1h a 37°C y 5% de CO₂ y humedad relativa, posteriormente se volvió a completar la cantidad de medio inicial que poseía el cultivo con medio de mantenimiento y se monitorearon durante los siguientes días en búsqueda de indicios de infección viral (células despegadas de la monocapa). Al término de tres pases en la línea celular Vero se recolectó del 20-30% de sobrenadante, se centrifugó a 440 RCF durante 5 min a 4°C, se fraccionó y se criopreservó con buffer de sacarosa-fosfato-glutamato SPG 1x, a -70 °C. Al realizar la cosecha y criopreservación de alícuotas virales, se utilizó hielo durante toda la manipulación para evitar la desnaturalización de las partículas virales como se menciona en “Evaluación de la acumulación del RNA subgenómico flaviviral de aislados mexicanos de virus zika”. (Crespo Ortiz, 2000; Martínez Torres, 2019).

10.3 Infección de células Vero con aislados virales previamente titulados

Las células Vero se utilizaron a una confluencia de 90%, posteriormente, se infectaron las células con los aislados amplificados y cuantificados, así como los virus referencia, ambos a 0.1 MOI. Finalmente se extrajo RNA a los 2 días post infección (dpi).

10.4 Extracción de RNA de células infectadas con aislados virales y virus referencia

La extracción de RNA se realizó a los dos dpi mediante la técnica de fenol-cloroformo (Trizol®). Se agregó 1mL del reactivo sobre la monocapa celular, dicha mezcla se transfirió a un tubo de 1.5mL y se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos, se centrifugó a 12,000 RCF durante 15 min a 4°C. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo y se agregaron 500 µL de isopropanol, se centrifugó a 12,000 RCF durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregó etanol al 75%, se centrifugó a 7,500 RCF durante 5 min a 4°C por duplicado. Después el RNA se homogenizó en

30 µL de agua libre de nucleasas y se cuantificó para determinar su pureza y concentración con el equipo Nano Photometer NP80 (IMPLEN®).

10.4.1 Retrotranscripción con oligonucleótido VD8

El RNA que se obtuvo de la extracción, fue utilizado para sintetizar cDNA, utilizando el oligonucleótido VD8 para retrotranscribir de manera enriquecida (Tabla 3). (Pierre et al., 1994). En un microtubo se agregaron 5 µg de RNA del virus aislado y 1 µL del oligonucleótido VD8 [100µM], se incubó a 90°C durante 2 min. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 5 µL de Buffer 5x, 1 µL del primer EMF1 [100µM], 0.5 µL de inhibidor de RNAsa, 2 µL de dNTPs y 1 µL de RevertAid RT (enzima retrotranscriptasa). Posteriormente se incubaron en el termociclador (Techne®) con las condiciones de las Tablas 5 y 6.

10.4.2 Retrotranscripción y amplificación con oligonucleótidos hexámeros aleatorios

El RNA que se obtuvo de la extracción, también fue utilizado para sintetizar cDNA utilizando el oligonucleótido de hexámeros aleatorios para retrotranscribir (Tabla 4).

En un microtubo se agregaron 5 µg de RNA del aislado, 2 µL de hexámeros aleatorios (Thermo Scientific®), y agua DEPC hasta completar un volumen de 12.5 µL, esta mezcla se incubó a 90°C por 2 mins. Posteriormente se agregó una segunda mezcla de reacción la cual incluyó 4 µL del buffer 5X, 0.5 µL de inhibidor de RNAsa, 2 µL de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP) y 1 µL de la transcriptasa reversa (RevertAid) (Thermo Scientific®), quedando un volumen final de 20 µL que fue incubado en el termociclador con las condiciones de las Tablas 7 y 8.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos VD8 y EMF1.

| Nombre del oligonucleótido | Secuencia |
|----------------------------|---------------------------------------|
| VD8 | GGGTCTCCTCTAACCTCTAG |
| EMF1 | TGGATGAC(C,G)AC(G,T)GA(A,G)GA(C,T)ATG |

(Pierre et al., 1994).

Tabla 4. Secuencia de hexámeros aleatorios.

| Nombre del oligonucleótido | Secuencia |
|----------------------------|---------------------------|
| Hexámeros aleatorios | d (NNNNNN) N= G, A, T o C |

Tabla 5. Etapas y condiciones de retrotranscripción usando oligonucleótido VD8.

| Etapa | Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|-----------------------|------------------|--------|--------|
| 1. Retrotranscripción | 42 | 60 min | 1 |

Tabla 6. Etapas y condiciones de PCR usando oligonucleótido VD8.

| Etapa | Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|----------------------|------------------|---------------|--------|
| 1. Desnaturalización | 95 | 5 min | |
| 2. Alineamiento | 95 | 30 seg | 30 |
| | 53 | 90 seg | |
| | 72 | 60 seg | |
| 3. Extensión | 72 | 10 min | |
| 4. Mantenimiento | 4 | mantenimiento | |

Tabla 7. Etapas y condiciones de retrotranscripción usando hexámeros aleatorios.

| Etapa | Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|-----------------------|------------------|--------|--------|
| 1. Retrotranscripción | 42 | 60 min | 1 |

Tabla 8. Etapas y condiciones de PCR usando hexámeros aleatorios.

| Etapa | Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|----------------------|------------------|---------------|--------|
| 1. Desnaturalización | 94 | 30 seg | |
| 2. Alineamiento | 55 | 1 min | 35 |
| 3. Extensión | 72 | 2 min | |
| 4. Mantenimiento | 4 | mantenimiento | |

10.4.3 Confirmación de la presencia de RNA viral por la estrategia de biología molecular de Pierre y colaboradores 1994.

Para la confirmación de la presencia de RNA viral, detección e identificación de los aislados por PCR en tiempo real se utilizaron ambas estrategias (utilizando SYBR green), oligonucleótidos específicos VD8 y EMF1 con la metodología de retrotranscripción enriquecida por RT-PCR de Pierre 1994. Y hexámeros aleatorios, propuesta por Lanciotti y colaboradores, así como Álvaro Fajardo para la detección y serotipificación de *Flavivirus* con los oligonucleótidos D1 y D2, de igual forma se usó el oligonucleótido D1 en conjunto con los primers TS1, TS2, TS3 y D4 para serotipificar DENV (Tabla 9). Se utilizó un equipo LightCycler® 480 II (Roche®), la metodología por la que se usan VD8 y EMF1 se modificó de manera breve para poder utilizar SYBR green que es una mezcla de reacción utilizada para PCR en tiempo real diseñada para amplificar la región objetivo de nuestro interés al utilizar fluoróforos en conjunto con los primers específicos (en este caso dirigidos al extremo 3'UTR y NS5) (Fajardo, 2016; Lanciotti et al., 1992; Pierre et al., 1994).

Tabla 9. Secuencias de los primers propuestos por Fajardo 2016.

| Primer | Secuencia de primer | Ubicación en el genoma | Tamaño de amplicón esperado |
|--------|--|------------------------|-----------------------------|
| D1 | 5'- TCA ATA TGC TGA AAC GCG HGA GAA ACC G -3' | 134-161 | 511 pb |
| D2 | 5'- TTR CAC CAR CAR TCW AYR TCH TCW GGT TC -3' | 616-644 | 511 pb |
| TS1 | 5'- YGC CTC AGT RAT CYG GGG R -3' | 568-586 | 482 pb D1+TS1 |
| TS2 | 5'- YGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG 3' | 232-252 | 119 pb D1+TS2 |
| TS3 | 5'- YAA YAT CAT CAT GAG ACA GAG C -3' | 400-421 | 290 pb D1+TS3 |
| D4 | 5'- TGT TGT CTT AAA CAA GAG AGG TC -3' | 506-527 | 389 pb D1+D4 |

Tabla 10. Secuencias de los primers propuestos por Lanciotti 1992.

| Primer | Secuencia de primer | Ubicación en el genoma | Tamaño de amplicón esperado |
|--------|--|------------------------|-----------------------------|
| D1 | 5'- TCA ATA TGC TGA AAC GCG HGA GAA ACC G -3' | 134-161 | 511 pb |
| D2 | 5'- TTR CAC CAR CAR TCW AYR TCH TCW GGT TC -3' | 616-644 | 511 pb |
| TS1 | 5'- CGT CTC AGT GAT CCG GGG G -3' | 568-586 | 482 pb D1+TS1 |
| TS2 | 5'- CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG- 3' | 232-252 | 119 pb D1+TS2 |
| TS3 | 5'-TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C-3' | 400-421 | 290 pb D1+TS3 |
| TS4 | 5'-CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A-3' | 506-527 | 392 pb D1+TS4 |

Utilizando la metodología de Fajardo 2016, se realizó una mezcla de reacción conteniendo para cada reacción: 7.5 µL de SYBR Green Master Mix; 3.5 µL de agua libre de nucleasas (H₂O DEPC); 1 µL de primer D1; 1 µL de primer reverso TS1, 2 µL de cDNA de cada muestra (15 µL por reacción en total). Para las reacciones subsecuentes se utilizaron las mismas cantidades de SYBR Green Master Mix, H₂O DEPC, Buffer 5X y primer D1, sin embargo, el primer reverso se cambió por TS1, TS2, TS3 y D4 resultando un total de 96 reacciones. Los 20 µL de reacción resultantes por cada pozo, fueron incubados a: 94°C por 2 min; 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 55°C, 2 mins a 72°C; y 72 °C durante 10 mins (Tabla 10). Se utilizó el cDNA de los virus DENV-1, DENV-2, DENV-3 DENV-4 y ZIKV Puerto Rico (ZIKV PR) como controles positivos.

Por otro lado se utilizó la misma metodología pero adaptada para el protocolo de Pierre, 1994 para poder utilizar PCR en tiempo real; se realizó una mezcla de reacción con 15 µL de H₂O DEPC, 25 µL de SYBR Green, 3 µL del oligonucleótido VD8 y 3 µL del primer EMF1, para cada reacción con volumen de 50 µL en cada uno de los 27 pozos de reacción ya que al ser 8 virus en total más los controles negativos y al utilizar tiempo real se manejan las muestras por triplicado, resultaron en total 27 reacciones, finalmente se adicionaron 4 µL de cDNA de cada muestra para cada reacción y fueron incubados a: 94°C por 2 min; 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 55°C, 2 mins a 72°C; y 72 °C durante 10 mins (Tabla 11). Se utilizó el cDNA de los virus DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 y ZIKV PR como controles positivos.

Tabla 11. Etapas y condiciones para PCR en tiempo real.

| Etapa | Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|-------------------|------------------|--------|--------|
| Desnaturalización | 94 | 2 min | |
| Alineamiento | 94 | 30 seg | 40 |
| | 55 | 60 seg | |
| | 72 | 2 min | |
| Extensión | 72 | 10 min | |
| Mantenimiento | 4 | | |

Elaborada por Gonzalez Arce, 2021.

10.4.4 Detección e Identificación viral por PCR punto final VD8 y EMF1 Pierre

Para realizar la identificación por PCR punto final se utilizó la enzima GoTaq® Green Master mix 2X. Se utilizaron 0.4 µL del oligonucleótido VD8 y 0.4 µL del primer EMF1, 600ng de cDNA de los aislados (sintetizado por el método de Pierre) para cada reacción, 7.5 µL de GoTaq® Green Master mix 2X y H₂O DEPC para completar un volumen final de reacción de 15 µL. Posteriormente se incubaron a: 95°C por 5 min; 95°C durante 30 seg, 53°C por 90 seg, 72°C durante 60 seg y 72°C por 10 min como se indica en la Tabla 12. Se utilizó cDNA de los virus referencia DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 y ZIKV PR como controles positivos.

Tabla 12. Etapas y condiciones para PCR punto final.

| Etapa | Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|-------------------|------------------|--------|--------|
| Desnaturalización | 95 | 5 min | |
| Alineamiento | 95 | 30 seg | 40 |
| | 53 | 90 seg | |
| | 72 | 60 seg | |
| Extensión | 72 | 10 min | |
| Mantenimiento | 4 | | |

Elaborada por Gonzalez Arce, 2021.

10.4.5 Detección e Identificación viral por PCR punto final de gradientes

Para realizar la identificación por PCR punto final de gradientes se utilizó la enzima GoTaq® Green Master mix 2X. Se utilizaron 0.4 µL del oligonucleótido VD8 y 0.4 µL del primer EMF1, 0.5 µL y 1 µL de cDNA de los aislados (sintetizado por el método de Pierre) para cada reacción, 7.5 µL de GoTaq® Green Master mix 2X y H₂O DEPC para completar un volumen final de reacción de 15 µL. Posteriormente se incubaron a: 95°C por 5 min; 95°C durante 30 seg, 53°C, 55°C y 60°C respectivamente por 90 seg, 72°C durante 60 seg y 72°C por 10 min. Se utilizó cDNA de los virus referencia DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 y ZIKV PR como controles positivos.

10.4.6 Detección e Identificación viral por PCR anidada D1-D2 Lanciotti

Para realizar la identificación por PCR punto final de Lanciotti se utilizó la enzima GoTaq® Green Master mix 2X. Se utilizaron 0.4 µL del oligonucleótido D1 y 0.4 µL del oligonucleótido D2, 600 ng de cDNA de los aislados (sintetizado por el método de Pierre) para cada reacción, 7.5 µL de GoTaq® Green Master mix 2X y H₂O DEPC para completar un volumen final de reacción de 15 µL. Posteriormente se incubaron a: 95°C por 5 min; 95°C durante 30 seg, 55°C por 90 seg, 72°C durante 60 seg y 72°C por 10 min.

10.5 Electroforesis

Los productos de las PCR se revelaron en geles de agarosa al 1%, se utilizó el marcador de tamaño molecular Gen Ruler Mix (Thermo Scientific®) de 100-10,000 pares de bases (bp por su acrónimo en inglés) y se cargaron 10 µL de cada muestra por pozo, los geles se corrieron a 90 volts durante 30 minutos. La electroforesis es una técnica de revelado para los fragmentos amplificados por PCR, los cuales migran a través de un gel de agarosa de acuerdo a su tamaño y por la carga que tienen, indicándonos así el posible serotipo del DENV de la muestra que se está determinando al comparar el tamaño del amplicón revelado con el de un amplicón esperado (amplicón referencia). Los utilizamos para revelar los productos de PCR por el método de Pierre; también fueron de utilidad al finalizar las PCR en tiempo real ya que se utilizó electroforesis para corroborar los resultados obtenidos en el equipo, pasando las muestras de la placa de PCR tiempo real a los geles de agarosa para de esta manera corroborar que el tamaño de los amplicones coincidían con los esperados (Fajardo, 2016; Lanciotti et al., 1992).

11 Resultados

11.1 Identificación por PCR tiempo real

Se evaluó la presencia de RNA viral por dos estrategias de RT-PCR reportadas previamente por Fajardo y colaboradores en 2016 y Pierre y colaboradores en 1994. Se utilizó cDNA de los virus referencia de ZIKV PRVABC-59, DENV1 WestPac, DENV2 New Guinea C, DENV3 Sleman 78, DENV4-Dominica 1981 y virus aislados por nuestro grupo de trabajo provenientes de muestras del brote epidémico de 2016.Yuc.47, 2016.Yuc.76, 2016.Yuc.96 y 2016.Yuc.100.

Inicialmente se realizó la metodología propuesta por Fajardo con los virus referencia. En la Figura 10 podemos observar la amplificación de DENV2-New Guinea C con TS2 a un Ct de 20 y DENV4-Dominica 1981 con D4 a un Ct de 30. El resto de las muestras de cDNA no presentaron amplificación detectable, lo que sugiere sensibilidad limitada de los oligonucleótidos utilizados.

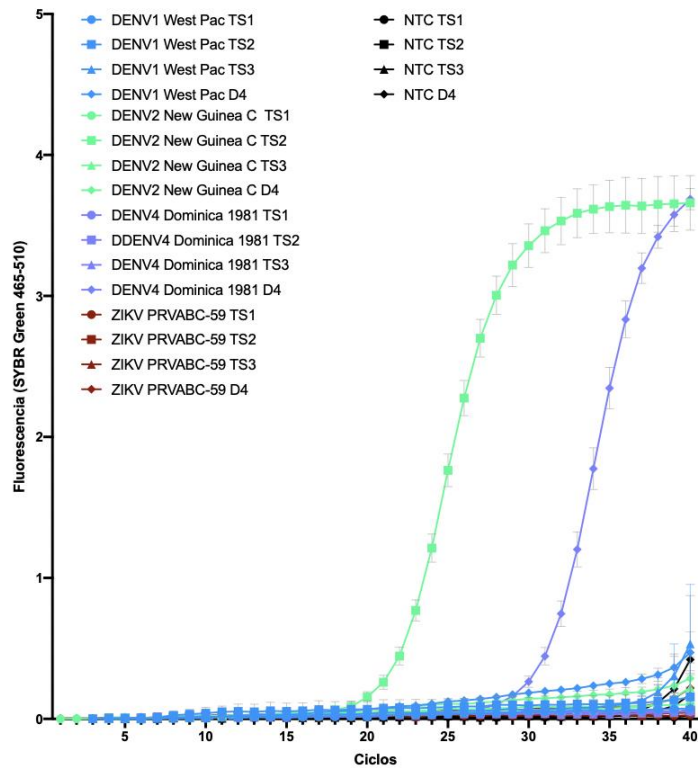


Figura 10. Gráfica de amplificación por PCR tiempo real utilizando SYBR-Green de virus referencia y oligonucleótidos de Fajardo 2016.

Las líneas color azul corresponde a el virus referencia DENV-1 West Pac y el símbolo de círculo corresponde a el par de oligonucleótidos D1+TS1 correspondiente a la segunda ronda de amplificación, en color verde corresponde a el virus referencia DENV-2 New Guinea C y el símbolo de cuadrado corresponde a el par de oligonucleótidos D1+TS2, en color morado corresponde a el virus referencia DENV4 Dominica 1981 y el símbolo de triángulo corresponde a el par de oligonucleótidos D1+TS3, en color rojo corresponde a el virus referencia ZIKV PRVABC-59 y el símbolo de rombo corresponde a el par de oligonucleótidos D1+D4. En color negro corresponde a el control negativo.

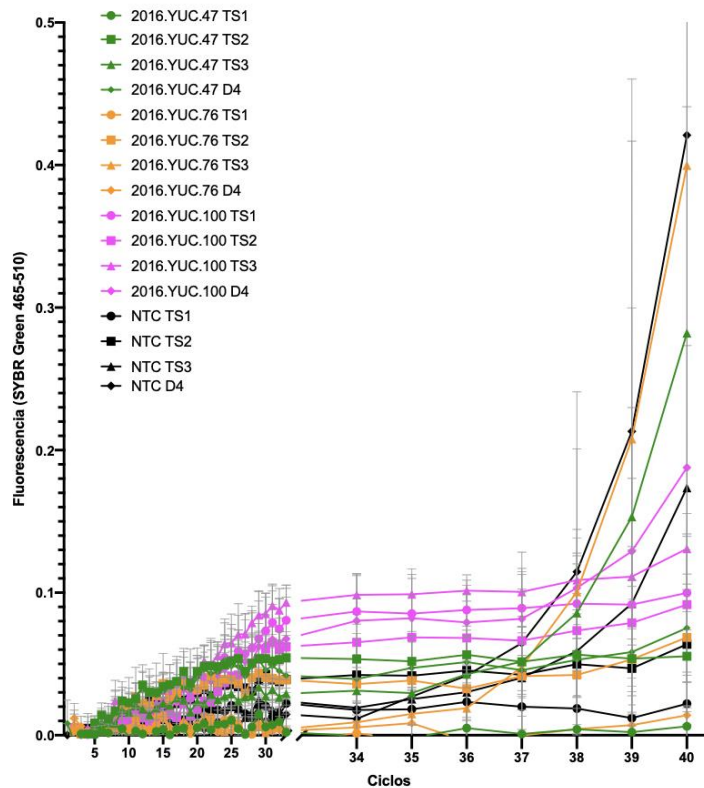


Figura 11. Gráfica de amplificación por PCR tiempo real de aislados virales utilizando SYBR-Green y oligonucleótidos de Fajardo 2016.

Las líneas color verde corresponde a el virus aislado 2016.Yuc.47 y el símbolo de círculo corresponde a el par de oligonucleótidos D1+TS1 correspondiente a la segunda ronda de amplificación, en color amarillo corresponde a el virus 2016.Yuc.47 y el símbolo de cuadrado corresponde a el par de oligonucleótidos D1+TS2, en color magenta corresponde a el virus 2016.Yuc.100 y el símbolo de triángulo corresponde a el par de oligonucleótidos D1+TS3, el símbolo de rombo corresponde a el par de oligonucleótidos D1+D4. En color negro corresponde a el control negativo.

En la Figura 11 se observa que las muestras de cDNA de los aislados 2016-Yuc.76, 2016-Yuc.47 y 2016-Yuc.100, muestran tendencia a la amplificación, sin embargo, la señal de fluorescencia es muy cercana al límite de detección.

Los resultados obtenidos con la estrategia de Fajardo muestran que, a pesar de que iniciamos con *Flavivirus* aislados y confirmados, el cDNA no presentó amplificación en todos los virus, lo que sugiere que, aunque existe el potencial de su implementación, la sensibilidad es muy reducida y podría generar falsos negativos.

Posteriormente evaluamos la amplificación por la estrategia propuesta por Pierre y colaboradores, inicialmente se realizó la amplificación del cDNA proveniente de aislados referencia. En la Figura 12 podemos observar ausencia de amplificación para los cuatro virus DENV de referencia, sin embargo, al incrementar 10 ciclos la reacción de amplificación, como se muestra en la Figura 13, podemos observar que la amplificación de las muestras tanto de virus referencia, como de los aislados, es satisfactoria. Nuestros resultados sugieren que la estrategia propuesta por Pierre y colaboradores cuenta con mejor sensibilidad para la detección de *Flavivirus* que circulan en regiones endémicas de México.

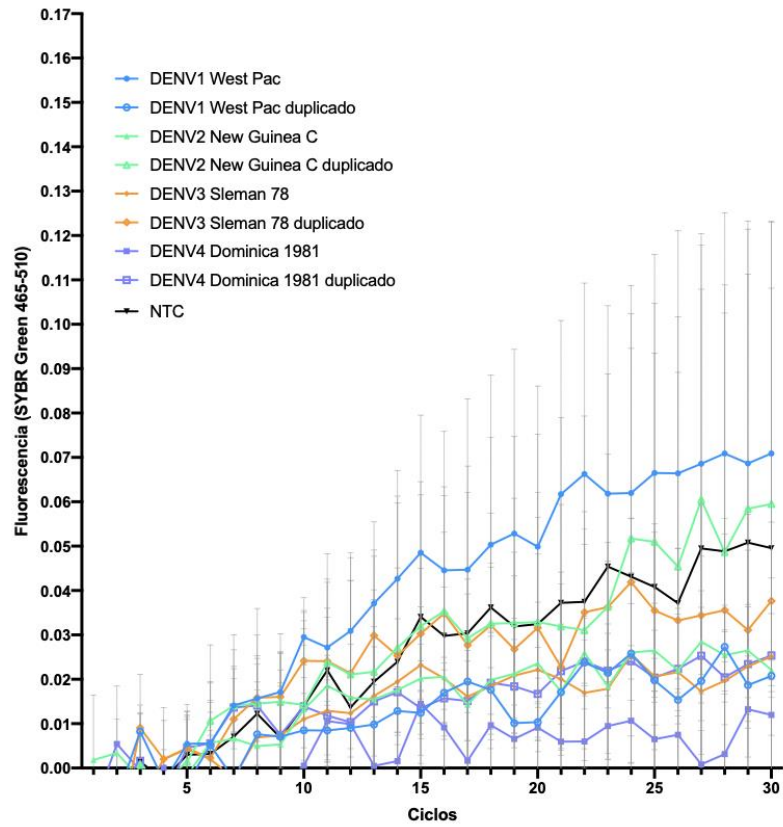


Figura 12. Gráfica de amplificación por PCR tiempo real de virus referencia utilizando SYBR-Green y oligonucleótidos de Pierre y colaboradores 1994.

La línea color azul corresponde a el virus referencia DENV-1 West Pac y los símbolos no sólidos corresponden al duplicado, en color verde corresponde a el virus referencia DENV-2 New Guinea C, en color morado corresponde a el virus referencia DENV4 Dominica 1981. En color negro corresponde a el control negativo.

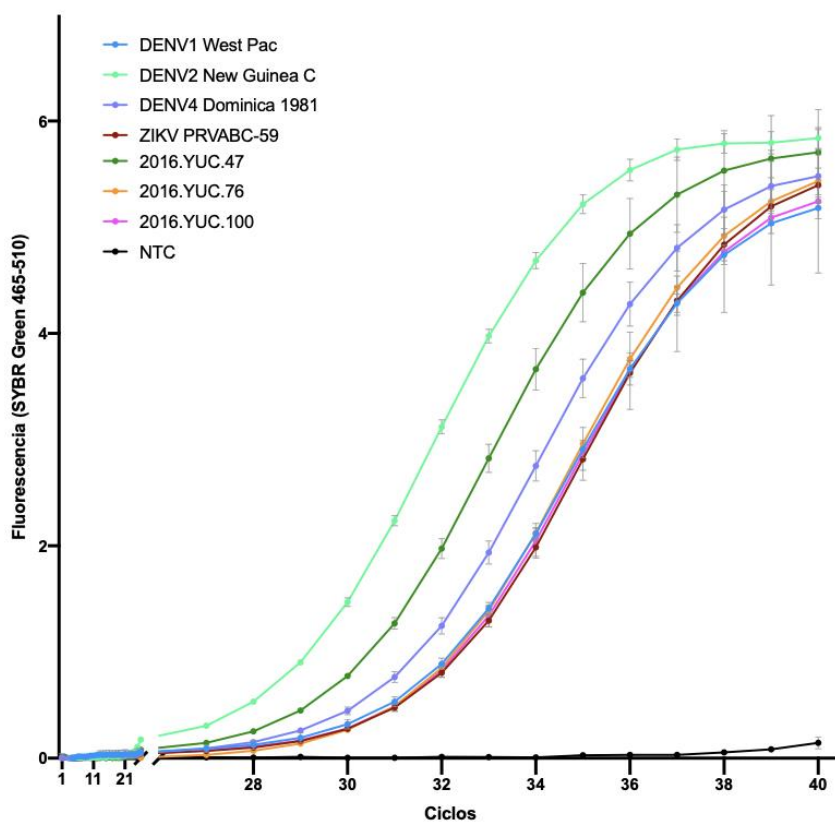


Figura 13. Gráfica de amplificación por PCR tiempo real de virus aislados utilizando SYBR-Green y oligonucleótidos de Pierre y colaboradores 1994.

La línea color azul corresponde a el virus referencia DENV-1 West Pac, en color verde limón corresponde a el virus referencia DENV-2 New Guinea C, en color morado corresponde a el virus referencia DENV4 Dominica 1981, en color rojo corresponde a el virus referencia ZIKV PRVABC-59, en color verde corresponde a el virus aislado 2016.Yuc.47, en color amarillo corresponde a el virus aislado 2016.Yuc.76, en color magenta corresponde a el virus aislado 2016.Yuc.100. En color negro corresponde a el control negativo.

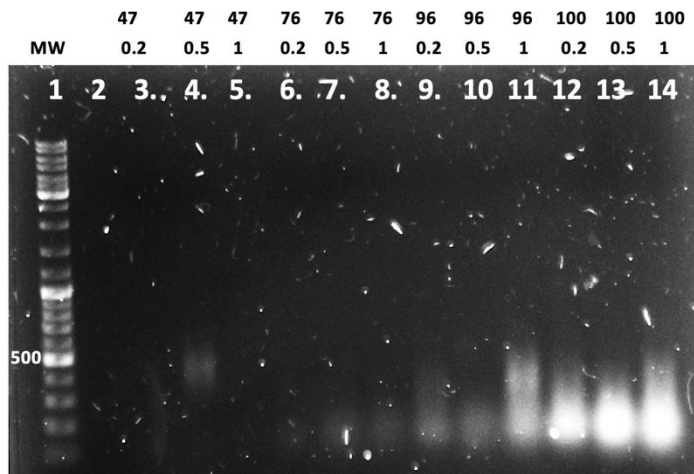


Figura 14. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de virus aislados de Yucatán usando 0.2 μ L, 0.5 μ L y 1 μ L de cDNA.

Una vez comparadas las estrategias de amplificación por RT-PCR tiempo real, comparamos su sensibilidad en PCR punto final, de manera inicial realizamos ensayos para determinar la cantidad de cDNA óptima para la amplificación por la estrategia reportada por Pierre y colaboradores. En la Figura 14 podemos observar que los productos de amplificación esperados entre 500 y 700 bp, se observaron más claramente al usar 0.5 μ L y 1 μ L de cDNA, por lo que se utilizó esta cantidad en los experimentos consecuentes.

11.2 Identificación por PCR punto final con gradientes de temperatura

Posteriormente realizamos las reacciones de RT-PCR con cDNA de dos virus referencia y 2 aislados de DENV caracterizados. En la Figura 15 podemos observar amplicones en el rango de tamaño esperados principalmente a una T_m de 55°C, sin embargo, dichos productos no fueron amplificados en todos los cDNAs.

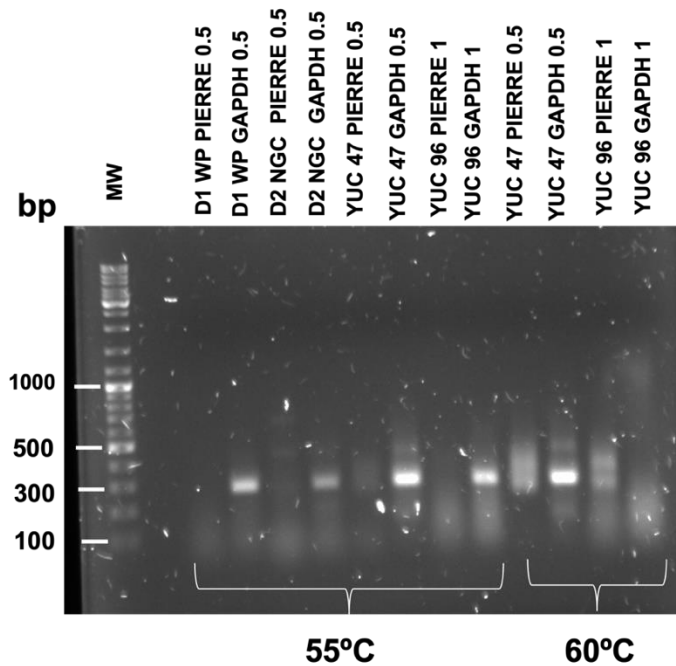


Figura 15. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de virus referencia y aislados de Yucatán.

Carril 1: marcador de peso molecular en bp, carril 3, 5, 7 amplificación con oligonucleótidos de Pierre y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 55°C, carril 4, 6, 8 amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 55°C, carril 9 amplificación con oligonucleótidos de Pierre y 1 μ L del cDNA a una temperatura de 55°C, carril 10 amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 1 μ L del cDNA a una temperatura de 55°C, carril 11 amplificación con oligonucleótidos de Pierre y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 60°C, carril 12 amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 60°C, carril 13 amplificación con oligonucleótidos de Pierre y 1 μ L del cDNA a una temperatura de 60°C, carril 14 amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 1 μ L del cDNA a una temperatura de 60°C, amplificación con oligonucleótidos EMF1 y VD8 y Go Taq 2x. Las doce reacciones se realizaron su retrotranscripción con oligonucleótido VD8 y PCR punto final.

Gel para la identificación de las muestras y los *Flavivirus* referencia de DENV por PCR de gradientes, se puede observar que en su mayoría las muestras que amplificaron son las que están en 55°C y tienen 0.5 μ L de cDNA para GAPDH mientras que las muestras con oligos de Pierre para la identificación de DENV son tenues (carriles 7, 9, 11 y 13).

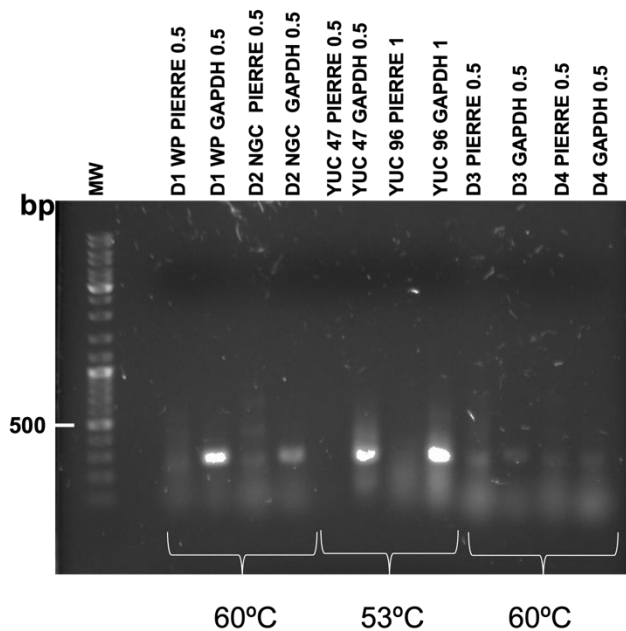


Figura 16. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de virus referencia y aislados de Yucatán.

Carril 1: marcador de peso molecular en bp, carril 3, 5, 7 amplificación con oligonucleótidos de Pierre y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 60°C, carril 4, 6, amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 60°C, carril 8 amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 53°C, carril 9 amplificación con oligonucleótidos de Pierre y 1 μ L del cDNA a una temperatura de 53°C, carril 10 amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 1 μ L del cDNA a una temperatura de 53°C, carril 11 y 13 amplificación con oligonucleótidos de Pierre y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 60°C, carril 12 y 14 amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 60°C, amplificación con oligonucleótidos EMF1 y VD8 y Go Taq 2x. Las doce reacciones se realizaron su retrotranscripción con oligonucleótido VD8 y PCR punto final.

En este gel se logran observar nuevamente bandas de amplificación muy tenues para los aislados con la diferencia de que también para GAPDH solamente 4 se visualizan de manera correcta en los carriles 4, 6, 8 y 10.

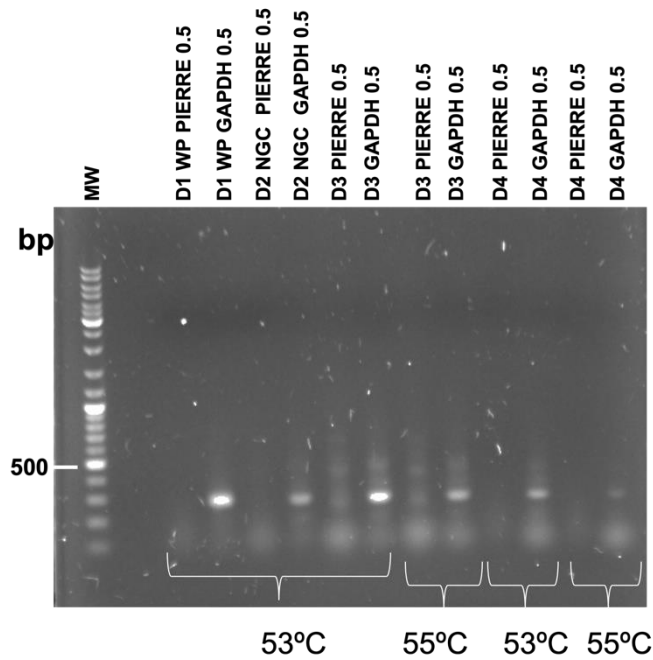


Figura 17. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de virus referencia.

Carril 1: marcador de peso molecular en bp, carril 3, 5, 7 amplificación con oligonucleótidos de Pierre y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 53°C, carril 4, 6, 8 amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 53°C, carril 9 amplificación con oligonucleótidos de Pierre y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 55°C, carril 10 amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 55°C, carril 11 amplificación con oligonucleótidos de Pierre y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 53°C, carril 12 amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 53°C, carril 13 amplificación con oligonucleótidos de Pierre y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 55°C, carril 14 amplificación con oligonucleótidos de GAPDH y 0.5 μ L del cDNA a una temperatura de 55°C, amplificación con oligonucleótidos EMF1 y VD8 y Go Taq 2x. Las doce reacciones se realizaron su retrotranscripción con oligonucleótido VD8 y PCR punto final.

En este patrón por gradientes con muestras control de virus referencia utilizando los oligonucleótidos de Pierre, y GAPDH como control. Una vez más se observa que solamente los controles de GAPDH amplificaron en la mayoría de las muestras, mientras que las bandas más tenues corresponden a los oligonucleótidos de Pierre, por lo que presuntamente puede haber una menor cantidad de cDNA.

A pesar de que la estrategia de Pierre y colaboradores mostró amplificación por RT-PCR tiempo real, los resultados en punto final fueron modestos, por lo que nos dimos a la tarea de comparar la eficiencia de las dos estrategias de PCR anidada inicialmente propuesta por Lanciotti y colaboradores en 1992 y posteriormente actualizada por Fajardo y colaboradores en 2016. En las Figuras 18 y 19 podemos observar que las reacciones de RT-PCR con los oligonucleótidos serocomplejo específicos para DENV D1-D2 produjeron la amplificación del producto de tamaño esperado tanto para el aislado 47 (Figura 18), como para el aislado 100 (Figura 19).

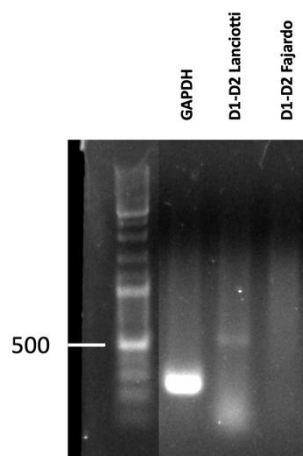


Figura 18. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de aislado 47 de Yucatán.

Carril 1: marcador de peso molecular en bp, carril 2: amplificación con oligonucleótidos GAPDH a una temperatura de 55°C, carril 3: amplificación con oligonucleótidos D1-D2 de Lanciotti a una temperatura de 55°C, carril 4: amplificación con oligonucleótidos de Fajardo a una temperatura de 55°C. Se realizó la retrotranscripción para las tres reacciones con oligonucleótidos de hexameros aleatorios y PCR punto final.

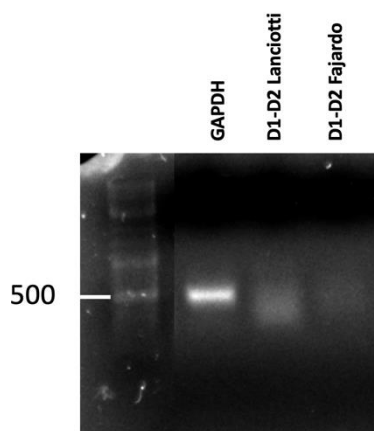


Figura 19. Patrón de amplificación en gel de agarosa al 1% de aislado 100 de Yucatán.

Carril 1: marcador de peso molecular en bp, carril 2: amplificación con oligonucleótidos GAPDH a una temperatura de 55°C, carril 3: amplificación con oligonucleótidos D1-D2 de Lanciotti a una temperatura de 55°C, carril 4: amplificación con oligonucleótidos de Fajardo a una temperatura de 55°C. Se realizó la retrotranscripción para las tres reacciones con oligonucleótidos de hexámeros aleatorios y PCR punto final.

En las figuras 18 y 19 podemos observar la presencia del amplicón de alrededor de 500 pb tanto para el aislado 47, como para el aislado 100, que fueron los aislados que por el método de Pierre (oligonucleótidos VD8 y EMF1) en conjunto con PCR tiempo real podrían ser presuntamente DENV-2 y DENV-1 respectivamente (serotipos de DENV que predominan en México probablemente debido a su alta tasa de replicación), razón por la cual se corrieron estos gels. Tanto el carril 3 y 4 para la figura 18 y 19 fueron retrotranscritos con hexámeros aleatorios, durante la PCR lo que se cambió fueron los oligonucleótidos correspondientes a los artículos citados por Lanciotti y por Fajardo. Observamos que cuando se utilizaron los oligonucleótidos de Lanciotti y colaboradores, el amplicón obtenido es más nítido en comparación con el obtenido con los oligonucleótidos de Fajardo independientemente de haber realizado la retrotranscripción en ambos casos con hexámeros aleatorios.

Con base en los resultados al comparar ambas estrategias, se puede proponer la estrategia utilizando los oligonucleótidos originales de Lanciotti como la más favorable para la identificación de *Flavivirus* por punto final y la estrategia de Pierre por RT-PCR tiempo real para la identificación de *Flavivirus*.

12 Discusión

En este estudio se aislaron 4 virus provenientes de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo para *Flavivirus* de la región de Yucatán en células de mamífero mediante pases ciegos altos; estos virus fueron titulados por la técnica de PFU's mediante inmunocitoquímica, a través de esta técnica evidenciamos la obtención de los aislados virales mencionados los cuales podemos observar en el Anexo I, Figura 1.

No se lograron aislar virus provenientes de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo para *Flavivirus* de la región de Tabasco en células de mamífero mediante pases ciegos, cuando estos fueron titulados, no obtuvimos PFU's en comparación con los aislados de la región de Yucatán, como se observa en el Anexo I, Tabla 1; sin embargo, es importante mencionar que con estos virus se llegó hasta pase 4. Comparando el número de pase en el cual se obtuvieron virus de las muestras provenientes de la región de Yucatán con el número de pase de las muestras provenientes de la región de Tabasco, podemos observar que en número de pases altos como 10 hasta 13 se logró el aislamiento viral en las muestras de Yucatán como observamos en el Anexo I, Tabla 1, no siendo este panorama para las muestras de Tabasco a las cuales consideramos que tienen pases jóvenes lo cual nos lleva a hipotetizar que podría ser una de las causas por las cuales no se logró aislar virus de esta región (Yamada et al., 2002).

Consideramos que la metodología para el aislamiento de los virus provenientes de muestras de pacientes puede ser optimizado, ya que acorde a lo encontrado en la literatura, se considera en el gremio de la virología más adecuado trabajar con aislados virales con pases jóvenes o lo más cercano a las muestras originales para intentar tener una diversidad menor de cuasiespecies (Domingo et al., 2006; Steinhauer et al., 1992).

En efecto, los virus aislados de la región de Yucatán son provenientes de países ciegos altos, lo cual podría estar generando una mayor nube de mutantes. Como se describe en la literatura la elección de la retrotranscriptasa influye en la variabilidad de la secuencia consenso del genoma (Orton et al., 2015).

Además, hay que tener en cuenta que estos *Flavivirus* cuentan con un material genético de RNA, por lo que, la síntesis de su genoma se lleva a cabo mediante una RdRp la cual genera mutaciones durante el ciclo replicativo, descritas anteriormente como cuasiespecies, lo que propicia la necesidad de diseñar nuevos oligonucleótidos en cada brote epidemiológico significativo para obtener una correcta tipificación de los aislados virales de cierta región geográfica (Usme-ciro, et al. Detección molecular y tipificación del virus dengue por RT-PCR y PCR anidada usando oligonucleótidos mejorados (Bhatnagar et al., 2012; Domingo et al., 2006). Considerando lo antes expuesto estamos trabajando en mejorar el aislamiento de estos virus en países no mayores a 5. Por otro lado, las células de mamífero en las que se logró aislar a los virus, tienen la característica de ser susceptibles y permisivas a la infección por *Flavivirus in vitro* ya que cuentan con una delección aproximadamente de 9 Mb en el cromosoma 12, lo cual generó la pérdida de los genes de Interferones de tipo I (IFNs-I), que son moléculas que propician el estado antiviral en las células; sin embargo, expresan el receptor compartido de interferón humano de tipo I (IFNAR), por lo que estas células pueden entrar en un estado antiviral inducido (Chew et al., 2009; Osada et al., 2014).

Por su parte, en las células provenientes del vector, no se logró aislar a los virus, a pesar de que presentan alta permisividad a la infección por DENV y CHIKV y de ser células establecidas a partir de células provenientes de intestino medio de mosquitos *Aedes* (Castañeda et al., 2007; Igarashi, 1978; Sydow et al., 2000).

Es importante mencionar que el éxito del aislamiento de estos virus es bajo, a pesar de contar con criterios de inclusión de las muestras, tales como: realizar la toma de la muestra durante los primeros cinco días de la viremia, conservar la cadena fría, tomar las muestras en zonas endémicas

para DENV y ZIKV (Yamada et al., 2002); lo cual dificulta el aislamiento de los virus provenientes de muestras y dificulta su aislamiento en países jóvenes en células susceptibles y permisivas para la infección.

Se sabe, que una de las desventajas del aislamiento viral es el tiempo, ya que este procedimiento requiere al menos 7 días para poder obtener resultados contundentes, lo cual desafortunadamente no es de gran ayuda para obtener un diagnóstico en la fase aguda de la enfermedad. A diferencia de las pruebas serológicas a partir de sangre, éstas se realizan con el plasma sanguíneo; sin embargo, la identificación de estos virus utilizando oligonucleótidos universales y específicos resulta más barata y rentable para laboratorios en desarrollo en comparación del uso de sondas como se realiza en dependencias como el InDRE con el mismo fin, que es obtener datos de los serotipos circulantes en nuestro país cada año para la vigilancia y control epidemiológico de las enfermedades arbovirales. Considerando lo antes expuesto, en este estudio se compara la capacidad de detección de virus aislados en Yucatán y de virus referencia entre dos estrategias de retrotranscripción para la síntesis de cDNA. En primer lugar, la estrategia descrita por Pierre y colaboradores hace uso de retrotranscripción enriquecida con los oligonucleótidos VD8 y EMF1 los cuales son complementarios a elementos altamente conservados entre *Flavivirus* como CS2 en el extremo 3'UTR y la región que codifica para la RdRp NS5; en cuanto a la segunda estrategia se utilizaron oligonucleótidos hexámeros aleatorios (Figuras 18 y 19).

Al realizar RT-PCR en tiempo real, observamos que el rendimiento fue notablemente mayor con los oligonucleótidos VD8 y EMF1 en comparación con la RT-PCR tiempo real usando la metodología de hexámeros aleatorios y los primers TS1, TS2, TS3 y D4 con los aislados de Tabasco, para corroborar si había sido porque estos virus necesitan de más pases y no era una falla de los oligonucleótidos, se utilizaron los aislados de Yucatán 47 y 100 y como se pudo observar en las figuras 18 y 19, se observa evidencia sutil de amplificación para *Flavivirus*, sin embargo, no fue igual de nítido que cuando se corrieron con los oligonucleótidos VD8 y EMF1 lo cual refuerza la hipótesis de que los aislados no contaban con el número suficiente de pases para que

el material genético sintetizado de estos (cDNA) pudiera ser detectable, en contraste con los de aislados de Yucatán que tenían 13 pases cuando fueron aislados por el laboratorio de inmunología y biología molecular de arbovirus.

Los resultados obtenidos demostraron que ambas estrategias de síntesis de cDNA son implementables ya que como se muestra en la Figura 13, la retrotranscripción enriquecida y posterior amplificación con la estrategia de Pierre, demostró amplificación, sin embargo, ésta solo fue evidente después del ciclo 30. Esta observación posiciona a la estrategia de retrotranscripción enriquecida como factible únicamente por RT-PCR tiempo real. Ésta limitante descarta su potencial uso en condiciones accesibles de punto final, lo que no permitiría su uso en la vigilancia de *Flavivirus* en regiones de escasos recursos. Por otro lado, evaluamos la retrotranscripción generalizada por hexámeros aleatorios y posterior amplificación con oligonucleótidos serocomplejo específicos por PCR anidada. A pesar de que la actualización de los oligonucleótidos realizada por Fajardo y colaboradores se basó en la optimización de la hibridación con secuencias de variantes de *Flavivirus* que circulan en años más recientes y en países de América del Sur, no observamos amplificación clara tanto por PCR en tiempo real, como en punto final (Fajardo, 2016; Pierre et al., 1994). Es probable que las variantes que circulan en países como Uruguay, no recapitulen las secuencias de los que circulan en nuestro país, estos *Flavivirus* cuentan con un material genético de RNA, por lo que, la síntesis de su genoma se lleva a cabo mediante una RdRp la cual genera mutaciones durante el ciclo replicativo. Las cuasiespecies generadas serán seleccionadas por presiones evolutivas que propiciarán que las variantes más aptas para la propagación, se mantengan en circulación en la región endémica. La presión evolutiva más determinante para la selección de virus RNA en humanos es la respuesta inmunológica, es probable que el aporte genético de la población humana de países como Uruguay, cuente con variabilidad propia de su historia migratoria o incluso de selección por otros patógenos geográficos que impacten en el tipo de variantes de virus RNA seleccionados en sus países correspondientes. En México, la variabilidad genética es elevada, por lo que es probable que sea recomendable la actualización de la estrategia de PCR anidada, usando secuencias de *Flavivirus* identificados en la

población mexicana. Por otro lado, observamos que los oligonucleótidos de Lanciotti fueron capaces de amplificar el producto esperado a partir del cDNA de dos aislados mexicanos, a pesar de que fueron diseñados en 1992 (Lanciotti et al., 1992). Se requiere un análisis detallado del ajuste de las regiones seleccionadas para el diseño de los oligonucleótidos, lo que permitiría la identificación de potenciales regiones clave para el diseño de oligonucleótidos para variantes mexicanas.

Las técnicas de identificación más actualizadas hacen uso de fluoróforos, sondas y equipos de RT-PCR en tiempo real, lo cual aumenta la sensibilidad de la técnica; en este estudio se utilizaron tanto la técnica de RT-PCR de punto final, como la técnica de RT-PCR tiempo real para poder compararlas, esperando que los resultados fueran óptimos por ambas técnicas, ya que en países que se encuentran en vías de desarrollo la RT-PCR tiempo real no está al alcance de todos los laboratorios de diagnóstico e investigación (CDC, 2013; Harapan et al., 2020; Mamani Z. et al., 2005; Mayer et al., 2017; OPS/OMS, 2019).

Consideramos que los resultados obtenidos podrían considerarse como el primer acercamiento de una estrategia accesible para la vigilancia de *Flavivirus*, principalmente en regiones remotas y de bajos recursos, en las cuales habita población vulnerable. El incremento de cobertura de vigilancia epidemiológica tiene el potencial de generar información vital para el diseño de estrategias efectivas de control de vectores y otras medidas de prevención direccionada a zonas geográficas de alto riesgo de brotes epidémicos.

13 Conclusión

Hubo diferencias entre las estrategias de retrotranscripción de aislados Flavivirales, por lo que existe la posibilidad de implementar estrategias que incorporen retrotranscripción enriquecida, ya que presenta el potencial de incrementar la sensibilidad, principalmente en muestras con títulos virales bajos. A pesar de que existe oportunidad de optimización, observamos que es posible la amplificación de regiones conservadas en el genoma de los virus DENV por RT-PCR punto final. La implementación de estrategias complementarias a el TRIOPLEX y otras herramientas moleculares poco accesibles en regiones endémicas de bajos recursos, permitiría una mejor vigilancia epidemiológica de los brotes, así como una toma de decisiones fundamentadas para el uso de los limitados recursos para el control de vectores.

Perspectivas

- 1.- Optimización de la estrategia de identificación de *Flavivirus* por RT-PCR anidada basada en secuencias de virus DENV de aislados circulantes en México con posibilidad a retrotranscripción enriquecida.
- 2.- Implementación de estrategias Multiplex en punto final para la incorporación de oligonucleótidos para los virus ZIKV y CHIKV a partir de secuencias de aislados circulantes en México.
- 3.- Comparación en la sensibilidad de los protocolos de RT-PCR entre aislados mexicanos con aislados de otras regiones endémicas.

14 Anexo I

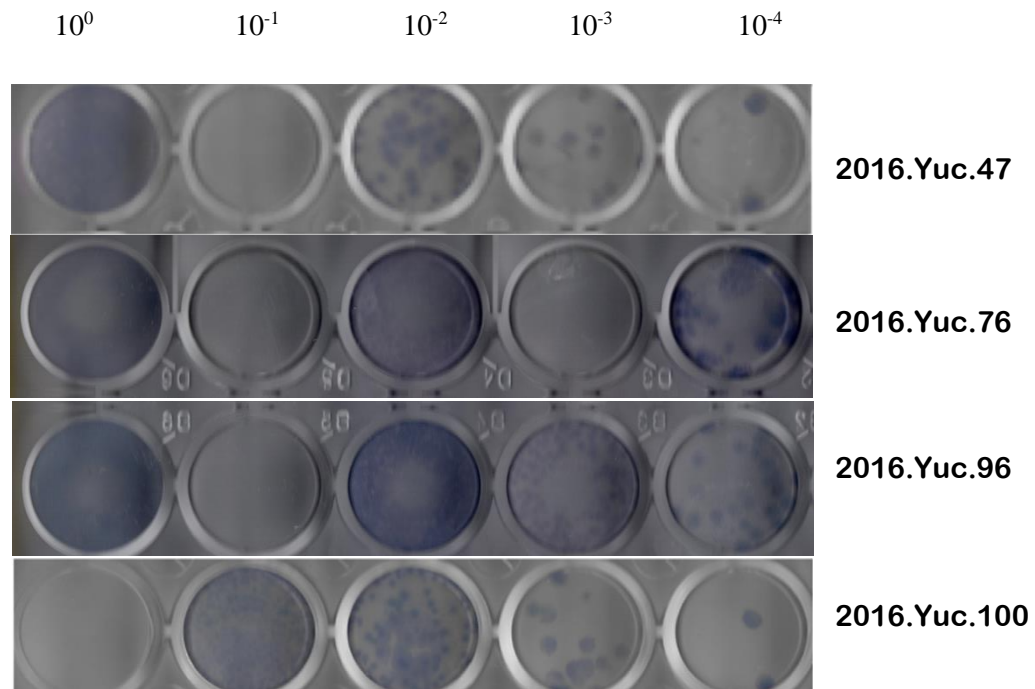


Figura 1. Unidades Formadoras de Placa de aislados virales por inmunocitoquímica.

Se observó la formación de placas (PFU's) en las preparaciones virales a partir de las muestras 2016.Yuc.47, 2016.Yuc.76, 2016.Yuc.96 y 2016.Yuc.100. Los títulos virales obtenidos fueron: 7.14, 7.17, 7.44 y 7.11 respectivamente.

A partir de suero proveniente de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo a infección por *Flavivirus*, se realizaron múltiples pases ciegos del virus tanto en células Vero como en células C6/36.

Tabla 1. Lista general de total de las muestras de donadores con diagnóstico presuntivo para Flavivirus de acuerdo con el número de pase ciego manipulado.

| Muestras | Estado | Año | Código de muestra | Pase ciego |
|----------|---------|------|-------------------|------------|
| 1 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.1 | 4 |
| 2 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.2 | 4 |
| 3 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.6 | 4 |
| 4 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.7 | 4 |
| 5 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.8 | 4 |
| 6 | Tabasco | 2018 | 2018.Tab.20 | 4 |
| 7 | Yucatán | 2016 | 2016.Yuc.47 | 13 |
| 8 | Yucatán | 2016 | 2016.Yuc.76 | 13 |
| 9 | Yucatán | 2016 | 2016.Yuc.96 | 10 |
| 10 | Yucatán | 2016 | 2016.Yuc.100 | 13 |

15 Referencias

- Arredondo-García, J. L., Aguilar-López Escalera, C. G., Aguilar Lugo-Gerez, J. J., Osnaya-Romero, N., Pérez-Guillé, G., & Medina-Cortina, H. (2020). Panorama epidemiológico de dengue en México 2000-2019.
- Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus en Latinoamérica. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111&lng=es&tlng=es.
- Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S., Komoltri, C., Thiemmea, S., Auethavornanan, K., . . . Malasit, P. (2006). Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis*, 193(8), 1078-1088. <https://doi.org/10.1086/500949>
- Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K. C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S. C., . . . Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev*, 118(8), 4448-4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>
- Bhatnagar, J., Blau, D. M., Shieh, W. J., Paddock, C. D., Drew, C., Liu, L., . . . Zaki, S. R. (2012). Molecular detection and typing of dengue viruses from archived tissues of fatal cases by rt-PCR and sequencing: diagnostic and epidemiologic implications. *Am J Trop Med Hyg*, 86(2), 335-340. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0346>
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., . . . Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504-507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., . . . Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res*, 87(2), 125-148. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009>
- Castañeda, N., Castellanos, J., Zapata, A., & Bello, F. (2007). Línea celular de aedes aegypti (diptera: culicidae) aegy28 refractaria a la infección con los virus dengue 2 y fiebre amarilla. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2007000200004
- Castro Mussot, M. E., Machain Williams, C., Loroño Pino, M. A., & Isabel Salazar, M. (2013). Respuesta inmune e inmunopatogénesis en las infecciones

- con el virus del dengue.
https://www.anmm.org.mx/GMM/2013/n5/GMM_149_2013_5_531-540.pdf
- Catteau, A., Kalinina, O., Wagner, M. C., Deubel, V., Courageot, M. P., & Desprès, P. (2003). Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J Gen Virol*, 84(Pt 10), 2781-2793. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19163-0>
- CDC. (2013). *Ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC*
- CDC. (2019). Cuadro clínico de Dengue. <https://www.cdc.gov/dengue/es/healthcare-providers/clinical-presentation.html>
- Chew, T., Noyce, R., Collins, S. E., Hancock, M. H., & Mossman, K. L. (2009). Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Mol Immunol*, 46(3), 393-399. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.010>
- Comisión de Salud, d. c. d. e. d. S. (2016). Ley para la Prevención y Control del Dengue-Chikungunya para el Estado de Sonora. In.
- Crespo Ortiz, M. P. (2000). El diagnóstico viral por el laboratorio. <https://www.redalyc.org/pdf/283/28331306.pdf>
- Dalrymple, N. A., Cimica, V., & Mackow, E. R. (2015). Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *mBio*, 6(3), e00553-00515. <https://doi.org/10.1128/mBio.00553-15>
- Davidson, A. D. (2009). Chapter 2 New Insights into Flavivirus Nonstructural Protein 5. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065352709740023?via%3Dihub>
- Domingo, E., Martín, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J., & Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 299, 51-82. https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_3
- DVEET. (2021a). *Casos Confirmados Autóctonos de Enfermedad por Virus del Zika por Entidad Federativa Semana Epidemiológica 52 del 2021*
- DVEET. (2021b). *Panorama epidemiológico de dengue. Semana epidemiológica 52 de 2021*
- Fajardo, A. (2016). *Epidemiología molecular de flavivirus emergentes en Uruguay y las Ámericas: virus dengue y zika* <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/17196>
- Fajardo-Dolci, G., Meljem-Moctezuma, J., Vicente-González, E., Venegas-Páez, F. V., Mazón-González, B., . . . G., H. (2012). El dengue en México Conocer para mejorar la calidad de la atención. <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2012/im126i.pdf>

- Fibriansah, G., Ibarra, K. D., Ng, T. S., Smith, S. A., Tan, J. L., Lim, X. N., . . . Lok, S. M. (2015). DENGUE VIRUS. Cryo-EM structure of an antibody that neutralizes dengue virus type 2 by locking E protein dimers. *Science*, *349*(6243), 88-91. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8651>
- Filomatori, C. V., Carballeda, J. M., Villordo, S. M., Aguirre, S., Pallarés, H. M., Maestre, A. M., . . . Gamarnik, A. V. (2017). Dengue virus genomic variation associated with mosquito adaptation defines the pattern of viral non-coding RNAs and fitness in human cells. *PLoS Pathog*, *13*(3), e1006265. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006265>
- Gebhard, L. G., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2011). Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*, *3*(9), 1739-1756. <https://doi.org/10.3390/v3091739>
- Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W., . . . Drouet, E. (2002). Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*, *292*(1), 162-168. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1232>
- Gonzalez Arce, J. C. (2021). Canal endémico abordando 6 años de la epidemiología del dengue en México 2014-2020. In.
- Gopala Reddy, S. B., Chin, W. X., & Shivananju, N. S. (2018). Dengue virus NS2 and NS4: Minor proteins, mammoth roles. *Biochem Pharmacol*, *154*, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.04.008>
- Gubler, & J., D. (2014). *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*
- Gubler, D. J. (2014). *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*
- Gubler, D. J., & Clark, G. G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis*, *1*(2), 55-57. <https://doi.org/10.3201/eid0102.952004>
- Guzman, G., M., & Harris, E. (2015). Dengue.
- Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers*, *2*, 16055. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A Minireview. *Viruses*, *12*(8). <https://doi.org/10.3390/v12080829>
- Harris, E., Sandoval, E., Xet-Mull, A. M., Johnson, M., & Riley, L. W. (1999). Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR. *Virology*, *253*(1), 86-95. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9481>
- Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2017). The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.00055-16>

- Holbrook, M. R. (2017). Historical Perspectives on Flavivirus Research. *Viruses*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/v9050097>
- Igarashi, A. (1978). Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol*, 40(3), 531-544. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-40-3-531>
- InDRE. (2015). *Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de dengue por laboratorio*
- InDRE. (2021). *Lineamientos para la vigilancia por laboratorio Dengue y otras arbovirosis*
- Islam, M. A., El Zowalaty, M. E., Islam, S., Sharif, M., Rahman, M. R., Amin, M. R., . . . Ashour, H. M. (2020). A Novel Multiplex RT-PCR Assay for Simultaneous Detection of Dengue and Chikungunya Viruses. *Int J Mol Sci*, 21(21). <https://doi.org/10.3390/ijms21218281>
- Knipe, M., D., & Howley, P. M. (2007). *Fields Virology*
- Krishna, V. D., Rangappa, M., & Satchidanandam, V. (2009). Virus-specific cytolytic antibodies to nonstructural protein 1 of Japanese encephalitis virus effect reduction of virus output from infected cells. *J Virol*, 83(10), 4766-4777. <https://doi.org/10.1128/JVI.01850-08>
- Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., & Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30(3), 545-551. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.3.545-551.1992>
- Laureti, M., Narayanan, D., Rodriguez-Andres, J., Fazakerley, J. K., & Kedzierski, L. (2018). Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol*, 9, 2180. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02180>
- Li, Y., Wong, Y. L., Lee, M. Y., Li, Q., Wang, Q. Y., Lescar, J., . . . Kang, C. (2016). Secondary Structure and Membrane Topology of the Full-Length Dengue Virus NS4B in Micelles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 55(39), 12068-12072. <https://doi.org/10.1002/anie.201606609>
- Lin, Y. W., Wang, K. J., Lei, H. Y., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, H. S., . . . Chen, S. H. (2002). Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virol*, 76(23), 12242-12249. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.23.12242-12249.2002>
- Lindenbach, B. D., Thiel, H. J., & Rice, M. C. (2007). *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In *Fields Virology* (5 ed.).
- Mamani Z., E., García M., M., Gutiérrez P., V., Cabezas S., C., & Harris, E. (2005). Tipificación molecular del virus dengue 3 durante el brote epidémico de dengue clásico en Lima, Perú, 2005.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000300002

- Martínez Torres, V. (2019). *Evaluación de la acumulación del RNA subgenómico flaviviral de aislados mexicanos de virus zika* Facultad de estudios superiores Iztacala (FESI)].
- Mayer, S. V., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop*, 166, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020>
- McBride, H., W. J., & Bielefeldt-Ohmann, H. (2000). Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology.
- Medina, F., Medina, J. F., Colón, C., Vergne, E., Santiago, G. A., & Muñoz-Jordán, J. L. (2012). Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 15, Unit 15D.12. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc15d02s27>
- Miller, S., Sparacio, S., & Bartenschlager, R. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem*, 281(13), 8854-8863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512697200>
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2005). Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol*, 79(2), 1223-1231. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1223-1231.2005>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*, 3(1), 13-22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat Rev Microbiol*, 16(3), 125-142. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>
- NOM-032-SSA2-2014. (2014). NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. http://diariooficial.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5389045&fecha=16/04/2015
- Oeser, C., & Ladhani, S. (2018). An update on Zika Virus and Congenital Zika Syndrome. [https://www.paediatricsandchildhealthjournal.co.uk/article/S1751-7222\(18\)30211-7/fulltext](https://www.paediatricsandchildhealthjournal.co.uk/article/S1751-7222(18)30211-7/fulltext)
- OMS. (2016). *Guidelines for surveillance of Zika virus disease and its complications*
- OMS/TDR. (2009). *Dengue Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control*
- OPS/OMS. (2010). *Guías de atención para enfermos de Dengue en la región de las Américas*.

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=1123

OPS/OMS. (2019). Actualización epidemiológica:
Dengue.

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_s_lug=dengue-2158&alias=50965-11-de-noviembre-de-2019-dengue-actualizacion-epidemiologica-1&Itemid=270⟨=es

OPS/OMS. (2020). Actualización
Epidemiológica Dengue <https://www.paho.org/sites/default/files/2020-02/2020-feb-7-phe-actualizacion-epi-dengue.pdf>

Orton, R. J., Wright, C. F., Morelli, M. J., King, D. J., Paton, D. J., King, D. P., & Haydon, D. T. (2015). Distinguishing low frequency mutations from RT-PCR and sequence errors in viral deep sequencing data. *BMC Genomics*, *16*, 229. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1456-x>

Osada, N., Kohara, A., Yamaji, T., Hirayama, N., Kasai, F., Sekizuka, T., . . . Hanada, K. (2014). The genome landscape of the african green monkey kidney-derived vero cell line. *DNA Res*, *21*(6), 673-683. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>

Patterson, J., Sammon, M., & Garg, M. (2016). Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med*, *17*(6), 671-679. <https://doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904>

Perera, R., Khaliq, M., & Kuhn, R. J. (2008). Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res*, *80*(1), 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.05.004>

Pierre, V., Drouet, M. T., & Deubel, V. (1994). Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction.

Salas Benito, J., Vega, & Almeida, T. O. (2008). CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS PROTEÍNAS gp45 Y p74 DE LAS CÉLULAS C6/36 QUE INTERACCIONAN CON EL VIRUS DEL DENGUE. http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos_anexo/20070712_4839.pdf

Salud, S. d. (2015). NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. http://diariooficial.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5389045&fecha=16/04/2015

Salud, S. d. (2019). *Boletín Epidemiológico*. Retrieved from <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2019>

- Salud, S. d. (2020). *Boletín Epidemiológico*. Retrieved from <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2020>
- Samsa, M. M., Mondotte, J. A., Iglesias, N. G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A. T., . . . Gamarnik, A. V. (2009). Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000632>
- Santiago, G. A., Vázquez, J., Courtney, S., Matías, K. Y., Andersen, L. E., Colón, C., . . . Muñoz-Jordan, J. L. (2018). Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. *Nat Commun*, 9(1), 1391. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03772-1>
- Schneemann, A. (2006). The structural and functional role of RNA in icosahedral virus assembly. *Annu Rev Microbiol*, 60, 51-67. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142304>
- Selisko, B., Papageorgiou, N., Ferron, F., & Canard, B. (2018). Structural and Functional Basis of the Fidelity of Nucleotide Selection by Flavivirus RNA-Dependent RNA Polymerases. *Viruses*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/v10020059>
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., . . . Stapleton, J. T. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae.
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. [https://www.jni-journal.com/article/S0165-5728\(16\)30483-0/fulltext](https://www.jni-journal.com/article/S0165-5728(16)30483-0/fulltext)
- Steinhauer, D. A., Domingo, E., & Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, 122(2), 281-288. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90216-c](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90216-c)
- Sydow, F. F., Santiago, M. A., Neves-Souza, P. C., Cerqueira, D. I., Gouvea, A. S., Lavatori, M. F., . . . Kubelka, C. F. (2000). Comparison of dengue infection in human mononuclear leukocytes with mosquito C6/36 and mammalian Vero cells using flow cytometry to detect virus antigen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95(4), 483-489. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762000000400007>
- Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral.
- Wang, B., Thurmond, S., Zhou, K., Sánchez-Aparicio, M. T., Fang, J., Lu, J., . . . Song, J. (2020). Structural basis for STAT2 suppression by flavivirus NS5.
- Weaver, S. C., Forrester, N. L., Liu, J., & Vasilakis, N. (2021). Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00482-8>
- Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contribution of Phyloge-Netics to Understanding the History and Epidemiology

- of the Preeminent Arboviral Disease.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134809000367?via%3Dihub>
- Wilder-Smith, A., Tissera, H., AbuBakar, S., Kittayapong, P., Logan, J., Neumayr, A., . . . Preet, R. (2018). Novel tools for the surveillance and control of dengue: findings by the DengueTools research consortium. *Glob Health Action*, *11*(1), 1549930. <https://doi.org/10.1080/16549716.2018.1549930>
- Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., & Kurane, I. (2002). Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *J Clin Virol*, *24*(3), 203-209. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(01\)00250-5](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(01)00250-5)
- Yu, I. M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., . . . Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, *319*(5871), 1834-1837. <https://doi.org/10.1126/science.1153264>
- Zhang, X., Ge, P., Yu, X., Brannan, J. M., Bi, G., Zhang, Q., . . . Zhou, Z. H. (2013). Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol*, *20*(1), 105-110. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2463>
- Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P. R., Zhang, W., Pletnev, S. V., Sedlak, D., . . . Rossmann, M. G. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J*, *22*(11), 2604-2613. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg270>
- Álvarez-Díaz, D. A., Quintero, P. A., Peláez-Carvajal, D., Ajami, N. J., & Usme-Ciro, J. A. (2019). Novel pan-serotype control RNA for dengue virus typing through real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, *271*, 113677. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113677>