



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DETECCIÓN MOLECULAR DE ARBOVIRUS POR RT-qPCR y HRM

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

CORTÉS GARCÍA ALBERTO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. SEVILLA REYES EDGAR ENRIQUE

COASESOR:

Q.F.B GUTIERREZ GARCÍA ALEJANDRO



Cd. Mx. 2024



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.

Abreviaturas y acrónimos

- RT- qPCR: PCR tiempo real
- HRM: High Resolution Melting
- DENV: Virus del dengue
- CHIKV: Virus Chikungunya
- ZIKV: Virus Zika
- YFV: Virus de la fiebre amarilla
- JEV: Virus de la encefalitis japonesa
- SLEV: Virus de la encefalitis de St. Louis
- MVEV: Virus de la encefalitis del valle de Murray
- USUV: Virus Usutu
- SPOV: Virus Spondweni
- ONNV: Virus O'nyong nyong
- RVFV: Virus de la fiebre del Valle del Rift
- MAYV: Virus Mayaro
- kb: kilobases
- ARN: Ácido Ribonucleico
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- C: Proteína de la cápside
- M: Proteína M
- E: Proteína E
- NS: Proteínas No Estructurales

Índice

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas y acrónimos | 2 |
| Índice de Tablas | 4 |
| Índice de Figuras | 5 |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 6 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 7 |
| 2.1. <i>¿Qué son los arbovirus?</i> | 8 |
| 3. ANTECEDENTES | 9 |
| 3.1. <i>Transmisión.....</i> | 10 |
| 3.2. <i>Principales arbovirus que afectan a humanos</i> | 12 |
| 3.2.1. <i>Familia Flaviviridae.....</i> | 12 |
| 3.2.1.1. <i>Genoma</i> | 13 |
| 3.2.1.2. <i>Virus del dengue (DENV)</i> | 14 |
| 3.2.1.3. <i>Virus del zika (ZIKV)</i> | 15 |
| 3.2.1.4. <i>Virus de la fiebre amarilla (YFV)</i> | 16 |
| 3.2.1.5. <i>VIRUS USUTU (USUV)</i> | 17 |
| 3.2.2. <i>Togaviridae</i> | 18 |
| 3.2.2.1. <i>Genoma</i> | 18 |
| 3.2.2.2. <i>Virus Chikungunya</i> | 20 |
| 3.2.2.3. <i>Virus Mayaro.....</i> | 20 |
| 4. JUSTIFICACIÓN..... | 27 |
| 5. HIPÓTESIS | 28 |
| 6. OBJETIVO GENERAL | 28 |
| 6.1 <i>Objetivos particulares.....</i> | 28 |
| 7. METODOLOGÍA..... | 29 |
| 7.1 <i>Diseño de primers.....</i> | 29 |
| 7.2 <i>Clonación de vector</i> | 29 |
| 7.3 <i>Preparación de medio de propagación para células competentes.....</i> | 30 |
| 7.4 <i>Transfección de bacterias con plásmido</i> | 30 |
| 7.5 <i>Extracción de mini preps.....</i> | 31 |
| 7.6 <i>Cuantificación de material genético.....</i> | 31 |
| 7.7 <i>Digestión enzimática.....</i> | 31 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 7.8 | <i>Electroforesis en gel de agarosa</i> | 32 |
| 7.9 | <i>Ensayos RT-PCR</i> | 32 |
| 7.10 | <i>Ensayos Fluidigm</i> | 35 |
| 7.10.1 | Cargado del control Line Fluid | 36 |
| 7.10.2 | Cargado de muestras y ensayos | 36 |
| 8. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 37 |
| 8.1 | <i>Diseño de primers</i> | 37 |
| 8.1.1 | Virus de Mayaro | 37 |
| 8.1.2 | Virus Usutu | 42 |
| 8.1.3 | Virus de Fiebre amarilla | 46 |
| 8.2 | <i>Clonación del vector</i> | 50 |
| 9. | CONCLUSIONES | 61 |
| 10 | REFERENCIAS | 62 |

Índice de Tablas

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabla 1. | Características de los miembros de la familia Flaviviridae | 13 |
| Tabla 2. | Características de los miembros de la familia Togaviridae | 18 |
| Tabla 3. | Condiciones de ensayo de PCR punto final | 29 |
| Tabla 4. | Protocolo de preparación para la ligación del vector | 30 |
| Tabla 5. | Protocolos de digestión para las enzimas de restricción Scal y EcoRI | 32 |
| Tabla 6. | Condiciones de reacción para el ensayo de RT-PCR + HRM..... | 33 |
| Tabla 7. | Protocolo de preparación de los gradientes de concentraciones | 34 |
| Tabla 8. | Condiciones preamplificado..... | 34 |
| Tabla 9. | Condiciones de amplificación del ensayo RT- PCR + HRM..... | 35 |
| Tabla 10. | Protocolo de preparación de solución mix de ensayos..... | 35 |
| Tabla 11. | Protocolo de preparación de solución Mix de muestras | 36 |
| Tabla 12. | Primers diseñados | 38 |
| Tabla 13. | Diluciones de la miniprep | 56 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Fig. 1. Principales mecanismos de infección de arbovirus en humanos | 11 |
| Fig. 2. Organización del genoma de un alfavirus (YFV).. | 14 |
| Fig. 3. Organización del genoma de un Alphavirus (CHIKV) | 19 |
| Fig. 4. Diagramas de curvas de fusión normalizada y diferencial. | 25 |
| Fig. 5. Cebadores diseñados para el virus de Mayaro. | 39 |
| Fig. 6. Representación visual y características de los primers May 1 | 40 |
| Fig. 7. Ubicación en donde se hibridan los primers May 1 y May 3.. | 41 |
| Fig. 8. Curvas diferenciales de disociación con respecto al cambio de temperatura.. | 42 |
| Fig. 9. Cebadores diseñados para el virus Usutu. | 43 |
| Fig. 10. Representación visual y características de los primers Us1 | 44 |
| Fig. 11. Ubicación en donde se hibridan los primers Us1 y Us2.. | 45 |
| Fig. 12. Curvas diferenciales de disociación con respecto al cambio de temperatura. | 46 |
| Fig. 13. Cebadores diseñados para el virus de la Fiebre Amarilla. | 47 |
| Fig. 14. Representación visual y características de los primers del virus de la fiebre amarilla. | 48 |
| Fig. 15. Ubicación en donde se hibridan los primers YFVC1, YFVNS5_C2 y YFVss_r1.. .. | 49 |
| Fig. 16. Curvas diferenciales de disociación con respecto al cambio de temperatura. | 49 |
| Fig. 17. Mapa del vector diseñado para clonar la secuencia de interés del virus Mayaro. 50 | |
| Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2% | 51 |
| Fig. 19. Secuencia del inserto del virus Mayaro (MayDuo1).. | 51 |
| Fig. 20. Mapa del vector comercial | 52 |
| Fig. 21. Restricción enzimática de Eco R1 y Sal I | 53 |
| Fig. 22. Secuenciación | 54 |
| Fig. 23. Comparación de curvas diferenciales..... | 55 |
| Fig. 24. Curvas de amplificación | 57 |
| Fig. 25. Curvas de amplificación. | 57 |
| Fig. 26. Ensayo con muestra positiva confirmada para arbovirus (Chikungunya), con el par de primers May1. | 58 |
| Fig. 27. Ensayo con muestra positiva confirmada para arbovirus (Chikungunya), con el par de primers May3. | 59 |
| Fig. 28. Comportamiento de cebadores de Mayaro en el pool de cebadores Arbomix. | 60 |

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inminente globalización no solamente ha permitido el intercambio de conocimientos, mercancía, tecnología, etc., sino también la aparición de ciertas enfermedades infecciosas donde antes no las había y también ha permitido el resurgimiento de enfermedades causadas por arbovirus. Actualmente se está viendo la aparición de arbovirosis que se consideraban típicas de Asia y África, tanto en Europa como en América, probablemente favorecidas por la migración humana y la adaptación del vector; sin embargo, también el cambio climático ha sido un detonador, aumentando la temperatura de climas que previamente eran fríos o no tropicales.

Dado lo anterior, es importante que los sistemas de salud estén al tanto de la aparición de las nuevas virosis, de la aparición de brotes epidémicos emergentes o reemergentes sin subestimar la incidencia de casos para una estadística confiable que ayude a generar protocolos de diagnóstico y tratamiento oportunos, así como a limitar el daño (prevención secundaria y terciaria). Es por ello que se requiere una técnica de diagnóstico rápida y específica, generar datos epidemiológicos y tratamientos confiables y adecuados, así como el control de los vectores. Algunas de las técnicas de diagnóstico que se utilizan actualmente son PCR tiempo real y *High Resolution Melting* (HRM).

2. INTRODUCCIÓN

Los virus que se transmiten entre los hospederos vertebrados mediante vectores artrópodos hematófagos (mosquitos y garrapatas) son conocidos como arbovirus. Por definición, los arbovirus deben replicarse en el vector artrópodo antes de la transmisión, en lugar de transmitirse mecánicamente. La transmisión biológica puede ser vertical e involucra el paso del virus de un vector femenino infectado a las crías masculinas y femeninas. La transmisión horizontal a través de un vector puede ser venérea, de un macho infectado directamente a un vector femenino, así como por vía oral desde un vector a un hospedero vertebrado a través de la saliva durante la hematofagia. Este último modo de transmisión horizontal es el más común para la mayoría de los arbovirus e involucra la infección del tracto alimentario del vector, la diseminación del virus en el vector y la eventual replicación del virus en las glándulas salivales, seguido de la inyección de virus a través de la saliva durante la alimentación con sangre (Kuno & Chang, 2005).

Los arbovirus son un grupo taxonómicamente diverso que incluye ocho familias y 14 géneros. La mayoría de estos virus (248), pertenecen a las familias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* y *Togaviridae*, que agrupan a muchos de los patógenos humanos más importantes desde la perspectiva de salud pública (Gubler, 2001).

La mayoría de los arbovirus causan una enfermedad febril inespecífica de aparición repentina con dolor de cabeza, mialgia, malestar general y ocasionalmente postración. La infección también puede conducir a una enfermedad más grave, que se presenta como fiebre hemorrágica o meningoencefalitis, que puede causar la muerte o secuelas neurológicas permanentes. En los últimos años del siglo XX, hubo un resurgimiento global de enfermedades arbovirales (Varghese et al., 2023).

Dado que las infecciones por arbovirus en humanos pueden dar como resultado un síndrome no específico, es difícil diagnosticar clínicamente estas infecciones. La detección del virus además se complica por la cocirculación de 2 arbovirus distintos en la misma área geográfica o por brotes sucesivos que involucran diferentes arbovirus. Además, en caso de una nueva emergencia, un panel extenso de pruebas de detección específicas del patógeno puede ser difícil de configurar (Wilder-Smith et al., 2017).

El diagnóstico diferencial a menudo es necesario para identificar el agente causal. Los amplicones de la Reacción en cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR, por sus siglas en inglés) viral pueden diferenciarse por varios métodos siendo uno de los más sencillos, la evaluación de los perfiles de disociación de alta resolución (HRM). El análisis de disociación de alta resolución (HRM) implica la incorporación de un colorante intercalante que se une al ADN bicatenario (es decir, producto de PCR) y presenta intensa fluorescencia cuando está unido. Posteriormente al incrementarse la temperatura y separarse las cadenas, el cambio en la fluorescencia va a ir cambiando, en función de su composición principalmente (Vali et al., 2014).

2.1.¿Qué son los arbovirus?

Según la publicación de la OMS: “Enfermedades virales transmitidas por artrópodos y roedores” los arbovirus se definen como: virus que comparten la característica de ser mantenidos naturalmente a través de la transmisión biológica entre hospedadores vertebrados susceptibles y artrópodos hematófagos o transmisión transovárica de artrópodos hembra infectados a su progenie”. Aunque los mosquitos son los principales responsables de la transmisión de arbovirus de importancia médica, otros taxones de artrópodos como las garrapatas juegan un papel importante en la vectorización de virus humanos (Huang et al., 2019).

3. ANTECEDENTES

Una gran cantidad de arbovirus son transmitidos por mosquitos. Las enfermedades causadas por los arbovirus han aumentado considerablemente en los últimos años y están extendiéndose hacia áreas previamente no afectadas. Algunos ejemplos de estos virus son:

- El virus del dengue (DENV; familia *Flaviviridae*, género *flavivirus*), que comenzó a reaparecer globalmente a fines del siglo XX, se cuadruplicó en la incidencia reportada entre las décadas de 1980 y 2000 y ahora causa aproximadamente 96 millones de casos sintomáticos al año. (Ali et al., 2017)
- En 2013, el virus chikungunya (CHIKV; familia *Togaviridae*, género *Alphavirus*) emergió por primera vez en las Américas en St. Martin, causando 1.8 millones de casos sospechosos y confirmados en la región. (*WHO | Chikungunya | Data, Maps and statistics*) (Consultado 18/09/20)
- En 2015, Brasil confirmó el primer caso de virus Zika adquirido localmente en el continente americano (ZIKV; familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*). Desde entonces, la epidemia de ZIKV ha causado más de 500.000 casos sospechosos y confirmados en 40 países y territorios de las Américas (Kindhauser et al., 2016)
- Durante los siglos XVI y XVII, *Aedes aegypti* y el virus de la fiebre amarilla (YFV; familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*), también transmitidos por este vector, se propagaron desde África Occidental a América con la trata y migración de esclavos. (Chippaux & Chippaux, 2018)
- Otros arbovirus transmitidos por mosquitos han surgido en regiones específicas del mundo, pero todavía no en ambos hemisferios. Estos incluyen el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV), el virus de la encefalitis del valle de Murray (MVEV), el virus Usutu (USUV), el virus Spondweni (SPOV), el virus O'nyong nyong (ONNV), virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV) y el virus Mayaro (MAYV) (Gould et al., 2017)

3.1. Transmisión

- 1) Los arbovirus han sido un problema conocido para la salud humana durante siglos, particularmente los transmitidos por mosquitos, que en muchos casos cuentan con ciclos de transmisión silvestres y urbanos. Los mosquitos del género *Culex* transmiten el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), virus de la encefalitis de St. Luis (SLEV) y el virus Usutu (USUV). Los mosquitos del género *Aedes* participa en la transmisión de YFV, DENV, CHIKV y MAYV. Algunos arbovirus que circulan entre los mosquitos *Aedes* y *Culex* afectan a hospederos no humanos, incluidos caballos, aves, roedores y otros pequeños mamíferos. Algunas especies pueden ser "Hospederos incidentales" o "callejones sin salida" es decir que el virus no amplifica lo suficiente y, por lo tanto, no participa en la transmisión a un nuevo mosquito vector, aunque la infección viral podría poner en peligro la vida en estas especies (Alonso-Palomares et al., 2018). Después de la ingestión de sangre de un hospedero infectado, los virus se multiplican en el intestino medio del insecto y luego invaden los tejidos subyacentes para causar una infección que se propaga particularmente en las glándulas salivales (denominada período de incubación extrínseca) que finalmente produce una carga viral de alto título. Luego se transmiten a los humanos u otros vertebrados durante la picadura de insectos hematófagos (Armstrong et al., 2020). Entre los virus transmitidos por mosquitos, la infección a humanos ocurre por 3 mecanismos principales: (Figura 1) Transmisión directa, es aquella donde un vector enzoótico o puente, transmite el virus desde un animal (hospedero enzoótico) a un ser humano; por ejemplo, la fiebre amarilla selvática.
- 2) Amplificación en animales domesticados, seguido de la transmisión a humanos; ejemplos de este mecanismo incluyen la encefalitis japonesa (JEV), un arbovirus aviar que se amplifica en los cerdos, que a menudo viven muy cerca de las personas, el virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV), que se amplifica en el ganado ovino y bovino domesticado y el virus del Oeste del Nilo que se propaga en caballos. En los mecanismos de propagación secundaria y amplificación en el ganado, los humanos generalmente no desarrollan viremia en magnitud suficiente para contribuir al curso de la transmisión.

3) Transición del ciclo enzoótico al ciclo humano-mosquito-humano, donde las personas sirven como hospederos de amplificación y mosquitos antropofílicos como *Aedes (Stegomyia)*, *A. aegypti*, *A. albopictus* entre otros que transmiten el virus, algo común en entornos urbanos. Los arbovirus con potencial de propagación urbana se encuentran entre los más importantes para la salud pública; por ejemplo, los virus del dengue, Zika, Chikungunya (Weaver et al., 2018).

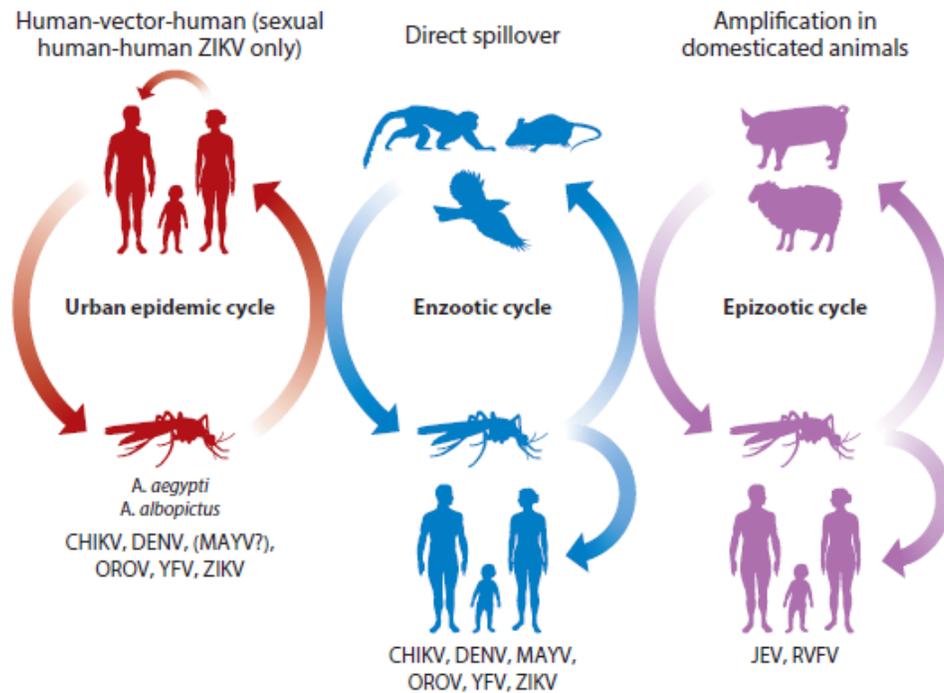


Fig. 1. Principales mecanismos de infección de arbovirus en humanos. Los virus con historia de emergencia urbana usan primates no humanos como hospedadores enzoóticos y también infectan a las personas a través de propagación directa. Abreviaturas: CHIKV, virus chikungunya; DENV, virus del dengue; JEV, virus de la encefalitis japonesa; MAYV, virus de Mayaro; OROV, virus Oropouche; RVFV, virus de la fiebre del Valle del Rift; YFV, virus de la fiebre amarilla; ZIKV, virus Zika. Imagen extraída de (Weaver et al., 2018)

3.2.Principales arbovirus que afectan a humanos

Hasta la fecha se han clasificado más de 500 arbovirus, las estimaciones sugieren que los arbovirus encontrados hasta la fecha pueden representar menos del 1% del total. De los arbovirus conocidos actualmente, 150 de ellos causan enfermedades en humanos. Algunos infectan a los humanos solo ocasionalmente o causan solo una enfermedad leve, mientras que otros son de gran importancia médica y provocan grandes epidemias (Young, 2018).

Los arbovirus son un grupo taxonómicamente diverso que incluye miembros de 8 familias y 14 géneros. La mayoría de estos virus pertenece a las familias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* y *Togaviridae* que agrupan a muchos de los patógenos humanos más importantes desde la perspectiva de la salud pública (Lorenz et al., 2017).

3.2.1. Familia *Flaviviridae*

La familia *Flaviviridae* se divide en tres géneros, de los cuales solo el género *Flavivirus* contiene arbovirus, ya que al igual que los virus pertenecientes a las familias *Bunyaviridae* y *Togaviridae* son los únicos que requieren vectores para la transmisión biológica a humanos. En la tabla 1 se muestran las características de los miembros de la familia *Flaviviridae*.

El género *Flavivirus* consta de más de 70 de virus de RNA monocatenario de sentido positivo, transmitidos por artrópodos, en particular mosquitos y garrapatas. Este género incluye patógenos humanos de importancia mundial como: (WNV), (DENV), (YFV), (JEV) y (ZIKV). Estos virus son responsables de algunas de las infecciones por arbovirus más graves que afectan a los seres humanos, representan una grave amenaza para la salud mundial y tienen el potencial de causar brotes graves. Las infecciones por flavivirus varían desde asintomáticas, pasando por fiebre leve y artralgia hasta enfermedades hemorrágicas o encefálicas potencialmente mortales. Los flavivirus también pueden persistir en los pacientes y pueden ser responsables de morbilidades a largo plazo (Laureti et al., 2018).

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA FLAVIVIRIDAE (TOMADA DE SIMMONDS ET AL., 2019)

| CARACTERÍSTICA | DESCRIPCIÓN |
|---------------------|--|
| Virión | Envuelto, 40-60nm con una proteína de cápside único y 2 o 3 glicoproteínas de la envoltura. |
| Genoma | Aproximadamente 9.0 - 13 kb de ARN sentido positivo, no segmentado. |
| Replicación | Citoplasmática, en vesículas de membrana derivadas del retículo endoplásmico, ensamblaje de viriones en el lumen del retículo endoplásmico, se secretan a través de la vía de transporte de vesículas. |
| Traducción | Directamente del ARN genómico que contiene un cap de tipo I (género <i>Flavivirus</i>) o un sitio interno de entrada al ribosoma (otros géneros). Se genera un solo ARN mensajero para la síntesis de una poliproteína viral. |
| Rango de hospederos | Mamíferos (todos los géneros); La mayoría de los miembros del género <i>Flavivirus</i> son transmitidos por artrópodos. |
| Taxonomía | Cuatro géneros que contienen 89 especies. |

3.2.1.1. Genoma

El genoma flaviviral consta de 11 kb y contiene un único marco de lectura abierto flanqueado por regiones no traducidas y codifica 3 proteínas estructurales (C, M y E) y 7 proteínas no estructurales (NS). El virión maduro presenta una superficie densamente cubierta con glicoproteínas E y proteínas M y un núcleo que consta de la proteína de la cápside (C) y el genoma del ARN. La entrada en la célula diana depende del contacto de la proteína E con su receptor afín. La proteína E se une inicialmente a factores de unión como los glicosaminoglicanos. Esto aumenta efectivamente la densidad viral en la superficie celular, lo que conduce a una unión al receptor de alta afinidad. Estudios recientes indican que los flavivirus pueden producir una variedad de viriones estructuralmente diferentes. Esta heterogeneidad estructural puede expandir el tropismo tisular y la capacidad de infectar diferentes tipos de células tanto en hospederos invertebrados como vertebrados (Rey et al., 2017).

3.2.1.2. Virus del dengue (DENV)

El dengue es una infección vírica transmitida por la picadura de las hembras infectadas de mosquitos del género *Aedes*. Hay cuatro serotipos de virus del dengue (DEN 1, DEN 2, DEN 3 y DEN 4). El dengue se presenta en los climas tropicales y subtropicales de todo el planeta, sobre todo en las zonas urbanas y semiurbanas. Los síntomas aparecen 3–14 días (promedio de 4–7 días) después de la picadura infectiva. El dengue es una enfermedad similar a la gripe que afecta a lactantes, niños pequeños y adultos (*Dengue - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*, s. f.) (Consultado 20/02/21).

Los síntomas son una fiebre elevada (40 °C) acompañada de dos de los síntomas siguientes: dolor de cabeza muy intenso, dolor detrás de los globos oculares, dolores musculares y articulares, náuseas, vómitos, agrandamiento de ganglios linfáticos o sarpullido. El dengue grave es una complicación potencialmente mortal porque cursa con extravasación de plasma, acumulación de líquidos, dificultad respiratoria, hemorragias graves o falla orgánica. No hay tratamiento específico del dengue ni del dengue grave, pero la detección oportuna y el acceso a la asistencia médica adecuada disminuyen las tasas de mortalidad por debajo del 1% (Muller et al., 2017).

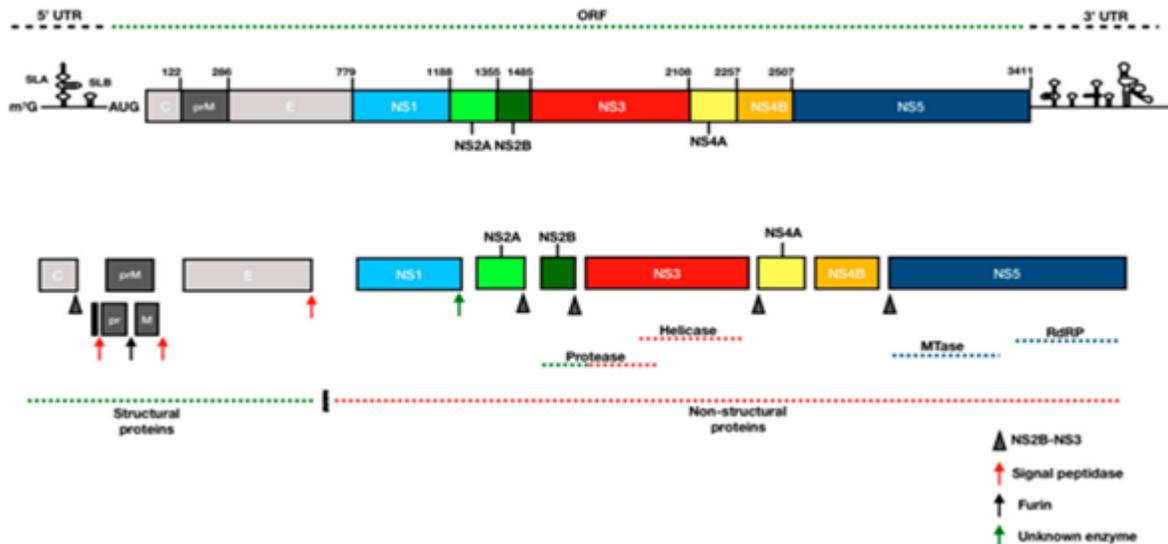


Fig. 2. Organización del genoma de un alfavirus (YFV). Representación esquemática del genoma YFV y la poliproteína codificada. El genoma de YFV es un ARN de cadena positiva monocatenario de aproximadamente 11 kb que codifica un ORF único que contiene tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). El genoma tiene una cap metilada de tipo 1 en el extremo 5' y no está poliadenilado. Se requieren estructuras secundarias (stem-loop A y B; SLA / SLB) en las UTR 5' y 3' para la traducción y la síntesis de ARN. La poliproteína se modifica postraduccionalmente por las proteasas virales y del huésped en 10 proteínas maduras que se incorporan a la membrana del retículo endoplásmico. Imagen extraída de (Kleinert et al., 2019).

Los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV 1, DENV 2, DENV 3 y DENV 4) están presentes en las Américas y en 2019 se detectó la circulación simultánea de todos ellos en Brasil, Guatemala y México; mientras que, en Colombia, Martinica, Panamá, República Dominicana y Venezuela, circulan los serotipos DENV 1, DENV 2 y DENV 3, en Paraguay y Perú, DENV 1, DENV 2 y DENV 4, y en Islas Caimán se reportó la circulación de los serotipos DENV 2, DENV 3 y DENV 4 (*Dengue - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*, s. f.). (Consultado 20/02/21)

3.2.1.3. Virus del zika (ZIKV)

El virus de Zika es un flavivirus transmitido por mosquitos que se identificó por vez primera en macacos (Uganda, 1947). Posteriormente, en 1952, se identificó en el ser humano en Uganda y la República Unida de Tanzania. Se han registrado brotes de enfermedad por este virus en África, las Américas, Asia y el Pacífico. Entre los años sesenta y los ochenta se detectaron infecciones humanas esporádicas raras en África y Asia, generalmente acompañadas de enfermedad leve. La enfermedad por el virus de Zika es causada por un virus transmitido principalmente por mosquitos del género *Aedes*. Los síntomas, generalmente leves y de 2 a 7 días de duración, consisten en fiebre, erupciones cutáneas, conjuntivitis, dolores musculares y articulares, malestar y cefaleas. La mayoría de las personas infectadas son asintomáticas (Musso & Gubler, 2016).

La infección el virus de Zika durante el embarazo puede causar microcefalia y otras malformaciones congénitas, que constituyen el síndrome congénito por el virus de Zika. La infección también se asocia a otras complicaciones del embarazo, como el parto prematuro y el aborto espontáneo. La infección se asocia en niños y adultos a un aumento del riesgo de complicaciones neurológicas, como el síndrome de Guillain-Barré, la neuropatía y la mielitis. No hay tratamiento para la infección por el virus de Zika ni para las enfermedades a las que se asocia (*Zika - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*, s. f.).

Hasta la fecha, 48 países y territorios de las Américas han confirmado la transmisión autóctona y transmitida por vectores de la enfermedad por el virus del Zika, mientras que cinco países han informado casos de Zika por vía transmisión sexual (*Zika - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*, s. f.).

3.2.1.4. Virus de la fiebre amarilla (YFV)

La fiebre amarilla sigue siendo un importante problema de salud pública en las Américas. A pesar de que ha mejorado la cobertura vacunal en las zonas endémicas, siguen surgiendo casos esporádicos y brotes limitados. Este surgimiento continuo de casos, sumado a la proliferación del mosquito vector *Aedes aegypti* en toda América, demuestra que sigue vigente el gran riesgo de reurbanización de la Fiebre amarilla (*Fiebre amarilla - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud, s. f.*).

La fiebre amarilla es una enfermedad vírica aguda, íctero-hemorrágica, causada por el virus del mismo nombre (YFV, Familia Flaviviridae, género Flavivirus), el cual fue aislado en 1927. Es transmitida a los humanos por picadura de mosquitos infectados de los géneros *Haemagogus spp.* y *Sabethes spp.* en el ciclo de transmisión selvático y por el *Aedes aegypti* en el ciclo urbano. Se distribuye principalmente en Sur América y África subsahariana. La Fiebre Amarilla es la única enfermedad respecto de la cual el Reglamento Sanitario Internacional (RSI, 2005) exige que presenten un certificado de vacunación a todos los viajeros que ingresan en algunos países que tienen disposiciones específicas sobre esta enfermedad (Chippaux & Chippaux, 2018).

Los síntomas aparecen entre 3 y 6 días después de la picadura de un mosquito infectado. En una fase inicial causa fiebre, dolor muscular y de cabeza, escalofríos, pérdida del apetito y náuseas o vómitos. Para la mayoría de los pacientes estos síntomas desaparecen después de 3 a 4 días. Sin embargo, el 15% entra en una segunda fase, más tóxica dentro de las 24 horas siguientes a la remisión inicial. En esta fase, vuelve la fiebre alta y varios sistemas del cuerpo son afectados. La función renal se deteriora. La mitad de los pacientes que pasan a la fase tóxica mueren a los 10 -14 días, el resto se recupera sin daño orgánico significativo. No existe un tratamiento específico para la fiebre amarilla. La vacuna es la medida preventiva más importante y es segura, asequible y muy eficaz. Proporciona inmunidad efectiva dentro de los 30 días para el 99% de las personas vacunadas y una sola dosis es suficiente para conferir inmunidad sostenida y proteger de por vida contra la enfermedad (Gianchecchi et al., 2022).

En 2019, tres países de la región (Bolivia, Brasil y Perú) notificaron casos confirmados de fiebre amarilla que ocurrieron entre diciembre de 2018 y febrero de 2019. En tanto que durante 2018 fueron cinco los países y territorios de la región de las

Américas que notificaron casos confirmados de fiebre amarilla: Bolivia, Brasil, Colombia, Guayana Francesa y Perú (*Fiebre amarilla - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*, s. f.) (Consultado 7/05/20)

3.2.1.5. VIRUS USUTU (USUV)

Se aisló por primera vez en 1959 en un mosquito *Culex spp.* en Sudáfrica en cercanías del río Usutu. Desde entonces el virus se ha detectado en varios países africanos como Senegal, Nigeria, Uganda, Burkina Faso, Costa de Marfil y Marruecos. La primera infección humana se describió en la República Centroafricana en un paciente con fiebre y exantema. Hasta principios de la década pasada el virus no se había asociado con enfermedad grave/mortal en animales, ni en humanos y se consideraba restringido a las zonas tropicales y subtropicales de África (Clé et al., 2019).

El ciclo de vida natural del USUV involucra a los mosquitos del género *Culex* como vectores y las aves como principal hospedero amplificador. El ciclo USUV es similar al de otros flavivirus que pertenecen al serocomplejo JEV, como ocurre con la transmisión de WNV, en el cual los humanos se consideran huéspedes accidentales. El reciente descubrimiento de murciélagos como potenciales huéspedes amplificadores ha planteado la preocupación de que USUV podría convertirse en un problema de salud pública (Sieg et al., 2017).

Los seres humanos, así como otros mamíferos, son hospedadores sin salida de USUV y muestran generalmente síntomas leves. Sin embargo, las complicaciones neurológicas en pacientes inmunodeprimidos podrían representar una preocupación creciente por la salud humana. Así, los signos y síntomas pueden ir desde fiebre, erupción cutánea y dolor de cabeza leve, hasta manifestaciones más graves. Las manifestaciones neurológicas dependen de qué parte del sistema nervioso está infectada: las meninges (causando meningitis), el parénquima cerebral (encefalitis) o la médula espinal (mielitis). La meningitis aséptica es menos común que la encefalitis. Las presentaciones severas (que a menudo se superponen) incluyen un nivel de conciencia reducido, que puede estar asociado con convulsiones, una parálisis flácida que se asemeja a la de la poliomielitis y trastornos del movimiento parkinsoniano (Caracciolo et al., 2020).

3.2.2. Togaviridae

Es una familia de virus pequeños con envoltura con genomas de ARN monocatenario de sentido positivo de 10 a 12 kb. Dentro de la familia, el género *Alphavirus* incluye una gran cantidad de especies que son en su mayoría transmitidas por mosquitos. Muchos son patógenos humanos y veterinarios importantes (por ejemplo, virus chikungunya, virus de la encefalitis equina oriental). En la tabla 2 se enlistan sus características.

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA TOGAVIRIDAE (TOMADA DE SIMMONDS ET AL., JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 2019;98:2-3)

| CARACTERÍSTICA | DESCRIPCIÓN |
|---------------------|--|
| Virión | Viriones esféricos envueltos de 65–70 nm de estructura regular con una sola proteína de cápside y 3 glicoproteínas de envoltura. |
| Genoma | 10-12 kb de ARN positivo, no segmentado. |
| Replicación | Citoplasmática, vesículas derivadas de la membrana citoplasmática / compartimento endosomal, ensamblaje en la membrana plasmática. |
| Traducción | Las proteínas no estructurales se traducen del ARN genómico y las proteínas estructurales del ARN subgenómico, tanto como precursores de poliproteína |
| Rango de hospederos | Humanos y primates no humanos, équidos, aves, anfibios, reptiles, roedores, cerdos, mamíferos marinos, salmónidos, mosquitos y algunos otros artrópodos; la mayoría de los alfavirus son transmitidos por mosquitos. |
| Taxonomía | Género <i>Alphavirus</i> que incluye más de 30 especies. |

3.2.2.1. Genoma

Los viriones de alfavirus tienen un tamaño de aproximadamente 70 nm y consisten en proteínas de la cápside que rodean un solo genoma de ARN y dos glicoproteínas transmembrana, E1 y E2, que facilitan la entrada en las células por endocitosis mediada por clatrina. El genoma varía de 11 a 12 kb de longitud y contiene un cap de guanilato de

metilo 5' y una cola poliadenilada 3' y codifica proteínas tanto estructurales como no estructurales. Las cuatro proteínas no estructurales (NSP1, NSP2, NSP3 y NSP4) están codificadas en el extremo 5'; las cinco proteínas estructurales, que incluyen la cápside y las glicoproteínas E1 y E2, se codifican en el extremo 3' y se traducen a partir de un ARN subgenómico (Figura 3). Como virus de ARN de sentido positivo, el genoma alfaviral es infeccioso, es decir, cuando se introduce en una célula permisiva, el ARN puede replicarse automáticamente y producir partículas de virus infecciosas (Baxter & Heise, 2018).

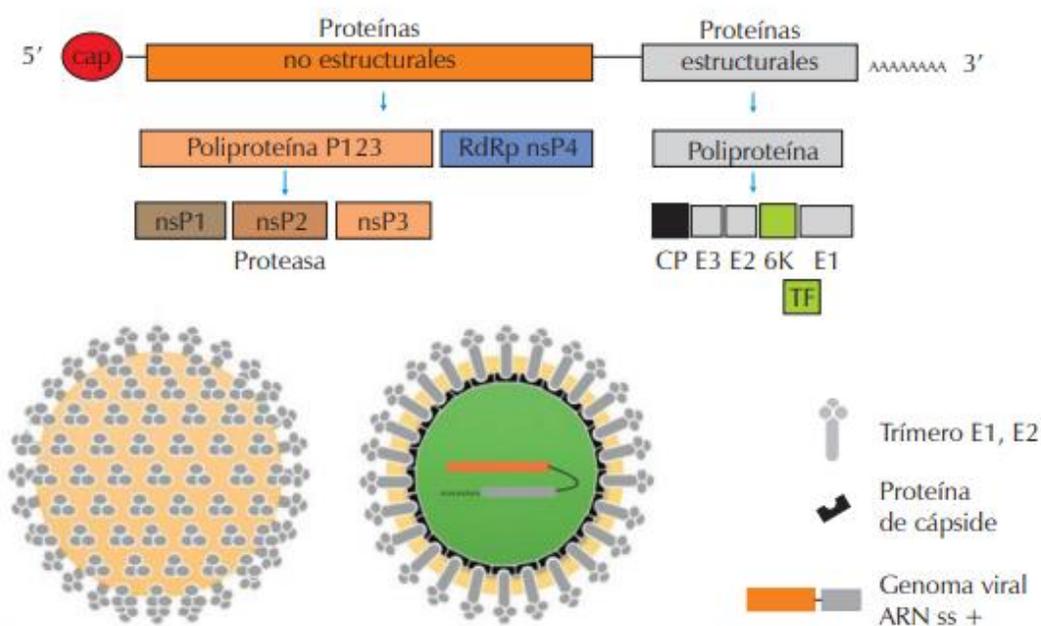


Fig. 3. Organización del genoma de un Alfvirus (CHIKV). Genoma y estructura del virus Chikungunya. El genoma viral de CHIKV es un ARN de cadena sencilla sentido positivo que contiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs); el primero codifica para una poliproteína que da origen a las proteínas no estructurales y el segundo a las estructurales. CHIKV es un virus envuelto cuya membrana contiene las glicoproteínas E1 y E2 formando espículas en trímeros en su superficie, la cápside es icosaédrica y está formada por la proteína denominada C. (Weaver et al., 2018)

La mayoría de los alfvirus son transmitidos por artrópodos, específicamente mosquitos, que hacen que los alfvirus sean una amenaza para la salud pública que vuelve a emerger a medida que los artrópodos vectores se expanden a nuevos territorios. Se ha informado que los *alfavirus* asociados con la artritis causan brotes en la mayor parte del mundo, a veces con un impacto severo en la salud humana. Las últimas dos décadas han experimentado epidemias de *alfavirus* de interés para la salud pública, como

el virus chikungunya (CHIKV), el virus Sindbis (SINV), el virus Ross River (RRV), el virus Mayaro (MAYV), el virus Barmah Forest (BFV) y Virus o'nyong'nyong (ONNV), que ha provocado una alta morbilidad en humanos (Brown et al., 2018).

3.2.2.2. Virus Chikungunya

El chikungunya es una enfermedad vírica transmitida a los seres humanos por mosquitos infectados con el virus chikungunya. Los mosquitos implicados son el *Aedes aegypti* y el *Aedes albopictus*. La enfermedad fue descrita por primera vez durante un brote en el sur de Tanzania en 1952, y actualmente se la ha identificado en Asia, África, Europa y, desde finales de 2013, en las Américas. Los síntomas comienzan generalmente de 4 a 8 días después de la picadura de mosquitos, pero pueden aparecer en cualquier momento entre el día 2 y el día 12. El síntoma más común es una aparición repentina de fiebre, a menudo acompañada de dolor en las articulaciones. Otros síntomas incluyen dolor muscular, dolor de cabeza, náuseas, fatiga y erupción cutánea. El dolor severo en las articulaciones por lo general dura unos pocos días, pero puede persistir durante meses o incluso años. Las complicaciones graves son poco frecuentes, pero en las personas mayores, la enfermedad puede contribuir a la causa de la muerte. No existe una vacuna o tratamiento con medicamentos antivirales para el chikungunya. El tratamiento se centra en aliviar los síntomas (*Chikungunya - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*, s. f.).

3.2.2.3. Virus Mayaro

El virus Mayaro (MAYV) se aisló por primera vez en Trinidad y Tobago en 1954. No obstante, un estudio retrospectivo evidenció infección por el virus en sueros recolectados durante la construcción de los canales en Panamá y Colombia que tuvieron lugar entre 1904 y 1914. Desde entonces se notificaron casos en América Central y América del Sur, en particular en las regiones alrededor de la cuenca amazónica. Subsecuente a los casos de Trinidad y Tobago, se reportaron casos de la enfermedad en Brasil (1955), Colombia (1958-1960), Bolivia (1959), Suriname (1964), Perú (1965), Estados Unidos de América (casos importados de Perú y Bolivia, 1997), Ecuador (1997), Guayana Francesa (1998),

Venezuela (2000), México (2001), Panamá (2010) y Haití (2015) (Acosta-Ampudia et al., 2018).

La fiebre de Mayaro es una zoonosis producida por un arbovirus del género *Alphavirus* (familia *Togaviridae*). Se ha documentado la transmisión por mosquitos *Haemagogus*. Los casos humanos se asocian con exposiciones recientes a ambientes húmedos boscosos donde habita el vector. En los primeros días presenta un cuadro clínico inespecífico similar al de otros arbovirus: fiebre, dolor de cabeza, mialgia, dolor retro ocular, escalofríos, fuerte artralgia, mareos, náuseas, fotofobia, anorexia, edema articular muchas veces incapacitante, erupción cutánea principalmente en el pecho, las piernas, la espalda, los brazos y con menor frecuencia en la cara, dolor abdominal, leucopenia y plaquetopenia y en algunos casos se ha descrito manifestaciones hemorrágicas. El período de incubación es relativamente corto, y se ha descrito que varía entre 1 a 12 días (Diagne et al., 2020).

3.3.Importancia del diagnóstico

Los arbovirus se han convertido en amenazas importantes y constantes en las regiones tropicales, debido al rápido cambio climático, la deforestación, la migración de la población, la ocupación desordenada de las áreas urbanas y las condiciones sanitarias precarias que favorecen la amplificación y transmisión viral. Las fluctuaciones climáticas producen condiciones que aceleran las epidemias de arbovirus, que afectan directamente a la salud pública mundial. Las temperaturas anormalmente altas, por ejemplo, afectan a las poblaciones de insectos vectores y enfermedades producidas por arbovirus, al influir en: la supervivencia y la replicación del virus, la susceptibilidad del vector a los virus, la distribución de vectores, el período de incubación extrínseca de un virus en el insecto y los patrones de transmisión de virus. Además de eso, los arbovirus son muy fáciles de propagar porque sus vectores se pueden transportar largas distancias, incluso entre países o continentes, lo que puede llevar a pandemias (Tajudeen et al., 2021).

Dado que las infecciones por arbovirus en humanos pueden dar como resultado un síndrome no específico, es difícil diagnosticar clínicamente estas infecciones y diferenciarlas de otras como por ejemplo infecciones bacterianas como *Leptospira*. La detección a veces se complica por la cocirculación de 2 arbovirus distintos que circulan

concomitantemente en la misma área geográfica o por brotes sucesivos que involucran diferentes virus del género *Alphavirus* o *Flavivirus* (Cardona-Ospina et al., 2018).

Los arbovirus se encuentran entre los agentes más comunes de la enfermedad febril humana en todo el mundo y los patógenos emergentes más importantes, causando múltiples epidemias notables de enfermedades humanas en las últimas décadas. A pesar de la relevancia de la salud pública, poco se sabe sobre la distribución geográfica, el impacto relativo y los factores de riesgo para la infección por arbovirus en muchas regiones del mundo (Kerkhof et al., 2020).

El diagnóstico clínico de los arbovirus puede ser un desafío, dependiendo en gran medida de la etapa del proceso de infección que presente el paciente y de la región geográfica del mundo, ya que puede haber varios patógenos causantes de enfermedades o estados patológicos que imiten la sintomatología como es el caso de los arbovirus.

Independientemente del arbovirus o de la especie del vector, un número significativo de infecciones por arbovirus en humanos son asintomáticas o causan solo una fiebre leve transitoria. Los arbovirus también pueden causar otros síntomas inespecíficos que se observan en la mayoría de las infecciones virales, como erupción cutánea y mialgia. Las manifestaciones clínicas específicas se pueden clasificar generalmente en distintas categorías de resultados clínicos: fiebre hemorrágica, encefalitis o afectación del sistema nervioso central, o artritis. La posibilidad de un mayor desarrollo de la enfermedad grave depende del arbovirus y del estado fisiológico e inmunológico del paciente. Varios grupos de arbovirus pueden causar fiebre hemorrágica viral (Huang et al., 2019)

Los biomarcadores que se han dirigido para el diagnóstico incluyen el virus en sí (aislamiento del virus en cultivo o mosquitos o la detección directa del ARN genómico viral), productos virales (captura y detección de la proteína NS1 secretada) o la respuesta inmune del hospedero a la infección por virus (mediante la medición de inmunoglobulina M [IgM] e inmunoglobulina G [IgG] específicas del virus) (Muller et al., 2017).

Las altas tasas de arbovirus plantean un problema único para la serología diagnóstica convencional, desde la inhibición de la hemaglutinina (HI), la fijación del complemento (CF) y las pruebas de neutralización por reducción de placa (PRNT) hasta los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas de captura de IgM (MAC-ELISA) y ELISA regular contra IgM o IgG. Debido a las similitudes en sus estructuras antigénicas,

los flavivirus reaccionan de forma cruzada en las pruebas serológicas.(Peters & Stevenson, 2019).

Existen métodos de diagnóstico adecuados para el diagnóstico de la mayoría de las infecciones virales agudas. Sin embargo, la aparición de virus patógenos o cepas de virus y nuevas asociaciones de enfermedades de virus conocidos requieren el establecimiento de nuevos métodos de diagnóstico, a veces muy rápidamente. En el campo de las enfermedades virales crónicas o persistentes, particularmente aquellas que involucran un potencial de desarrollo maligno o fatal, existe una necesidad constante de mejorar el diagnóstico diferencial, el monitoreo, el pronóstico y la evaluación de riesgos. Muy a menudo, las nuevas herramientas son ofrecidas por técnicas de diagnóstico molecular. (Auvinen, 2017).

Los métodos moleculares como la RT-PCR y la hibridación de ácidos nucleicos se han utilizado con gran eficacia en el diagnóstico de la infección por arbovirus. Los métodos basados en PCR proporcionan un diagnóstico el mismo día o al día siguiente durante la fase aguda de la enfermedad. Una ventaja importante de las técnicas basadas en PCR es que el ARN viral se puede detectar desde el inicio de la enfermedad y es sensible, específico, rápido, menos complicado y más económico que los métodos de aislamiento del virus. Aunque los métodos basados en PCR son rápidos y precisos, requieren un laboratorio con equipo especializado y personal capacitado para realizar el análisis. Los métodos no basados en PCR que imitan la amplificación de ácidos nucleicos in vitro, como la amplificación isotérmica (p. Ej., Amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa de un solo tubo), han mostrado altos niveles de sensibilidad y especificidad cuando se utilizan junto con otros métodos de diagnóstico. Las pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAAT) son el método de diagnóstico preferido. (Muller et al., 2017).

La principal meta del RT-PCR es distinguir de manera específica una secuencia de ácido nucleico en una muestra incluso cuando ésta se presenta en pequeñas cantidades. Durante la amplificación, la velocidad en que se llega a un nivel determinado de fluorescencia (umbral) correlaciona con la cantidad de ADN que tenemos al inicio. Además, el producto final puede ser caracterizado si se somete a incrementos de temperatura para determinar en qué momento la doble cadena se separa. Este punto de fusión es una propiedad única que depende de la longitud y de la secuencia nucleotídica del producto. Otra de las ventajas de la técnica de PCR en tiempo real es la cuantificación

de ARN. Esto es posible gracias al uso de las retro transcriptasas, enzimas que generan ADN complementario (ADNc) a partir de un templado de ARN. Bajo condiciones apropiadas, la cantidad de ADNc generado por retrotranscripción es proporcional al número de moléculas de ARN presente en una muestra dada. Entonces este ADNc puede ser el molde para una reacción de PCR en tiempo real, utilizando su sensibilidad y precisión para determinar cambios en la expresión de genes (Villinger et al., 2017).

Las técnicas de qPCR y RT - qPCR fueron los primeros métodos que prometen una cuantificación rápida y fácil de ácidos nucleicos y continúan siendo ampliamente utilizados. Recientemente, el desarrollo de sustancias químicas que intercalan el ADN, como *SYBR-green* y *EVA-green*, ha llevado al amplio desarrollo de diferentes técnicas basadas en PCR cuantitativa (qPCR). En el área del diagnóstico, el uso de curvas de fusión de alta resolución (HRM) después de qPCR ha demostrado tener éxito para una detección rápida y rentable de SNPs en humanos, animales, y la investigación de plantas (Escobar-Chaparro et al., 2017).

El análisis de fusión de alta resolución (HRM) genera perfiles de curva de fusión de ADN que son lo suficientemente específicos y sensibles para distinguir la variación del ácido nucleico en un entorno exploratorio (escaneo de mutación: descubrimiento de variación genética desconocida) y en la detección de rutina de variantes conocidas (genotipificación dirigida basada sondas o la técnica más insesgada de genotipado basado en curvas de referencia de polimorfismos de nucleótidos múltiples definidos (SNP). Estas curvas de HRM se adquieren cuando los amplicones de ADN cortos (<90 pb) obtenidos con cebadores que flanquean los SNP de interés se calientan en intervalos de temperatura pequeños pero constantes hasta que se desnaturalizan, momento en el que se libera la sustancia química intercalante, enviando menos señal fluorescente a un detector y graficando esta disminución contra el aumento de temperatura. (Muller et al., 2017).

Los amplicones de diferentes organismos con cambios de secuencia de incluso una sola base liberarán las sustancias químicas intercaladas a una temperatura diferente, lo que permitirá su detección. La mayoría de las máquinas qPCR modernas tienen características de aumento de temperatura tan cortas y finamente controladas (0.01–0.2 ° C, nombradas, por lo tanto, alta resolución) y software para realizar la genotipificación de HRM (Fig. 4) (Słomka et al., 2017).

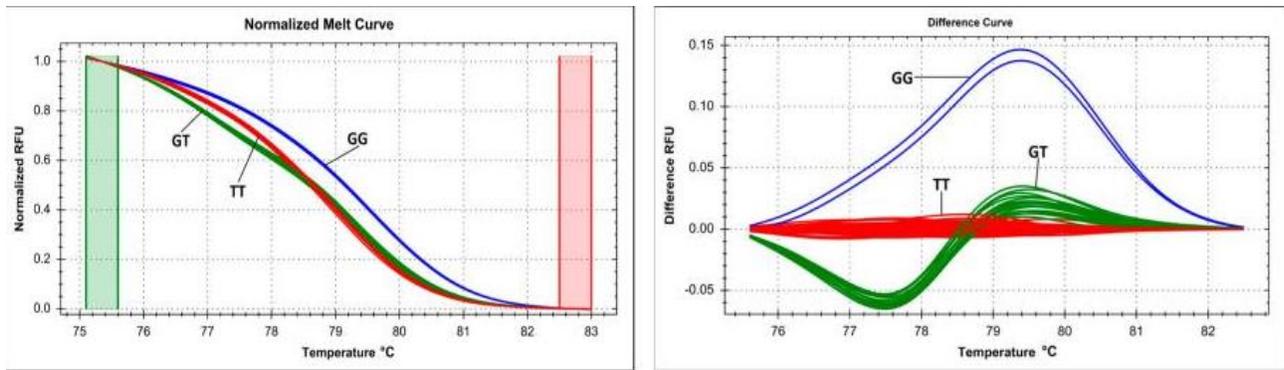


Fig. 4. Diagramas de curvas de fusión normalizada y diferencial. Fluorescencia expresada en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Tres grupos de curvas de fusión para muestras del método de aislamiento de ADN manual. Imagen extraída de (Słomka et al., 2017)

La microfluídica se refiere al comportamiento, control preciso y manipulación de fluidos que están restringidos geoméricamente a una escala pequeña (típicamente submilimétrica) en la que las fuerzas superficiales dominan las fuerzas volumétricas. Es un campo multidisciplinario que involucra ingeniería, física, química, bioquímica, nanotecnología y biotecnología. Tiene aplicaciones prácticas en el diseño de sistemas que procesan bajos volúmenes de fluidos para lograr multiplexación, automatización y cribado de alto rendimiento. La microfluídica surgió a principios de la década de 1980 y se utiliza en el desarrollo de cabezales de impresión de inyección de tinta, chips de ADN, tecnología *lab-on-a-chip*, micropropulsión y tecnologías microtérmicas (Wang et al., 2022).

El “*Fluidigm Digital Array*” (IFC) es un biochip de nanofluidos en el que se pueden realizar reacciones de PCR digitales con moléculas de plantilla de ADN individuales aisladas. Este chip es parte de una familia de circuitos fluidos integrados (IFC) y contiene una red de líneas de fluidos, válvulas y cámaras NanoFlex™. Las válvulas NanoFlex™ están hechas de un material elastomérico que se desvía bajo presión para crear un sello hermético y se utilizan para regular el flujo de líquidos en el IFC. Las matrices digitales han permitido un enfoque diferente a la PCR digital, al dividir las moléculas de ADN en lugar de diluirlas. Las moléculas de ADN individuales se distribuyen aleatoriamente en cámaras de reacción de volumen de nanolitros y luego se amplifican por PCR en presencia de una sonda que contiene fluoróforo. La señal fluorescente positiva indica la presencia de una molécula de ADN en una cámara de reacción, mientras que las cámaras negativas están en blanco. La tecnología IFC permite la entrega de volúmenes muy precisos de soluciones en un procedimiento simple y rápido, utilizando un mínimo de muestras y reactivos de ensayo. El desarrollo de la tecnología IFC y el chip *Digital Array*

ha revolucionado el campo de la biología y se ha utilizado en estudios de número de copias de genes, cuantificación absoluta (recuento de moléculas) de ADN genómico y ADNc, detección de mutaciones raras y haplotipado digital (Ramakrishnan et al., 2013).

4. JUSTIFICACIÓN

Los arbovirus se han convertido en amenazas importantes y constantes en las regiones tropicales, debido al rápido cambio climático, la deforestación, la migración de la población, la ocupación desordenada de las áreas urbanas y las condiciones sanitarias que favorecen la amplificación y transmisión viral. De hecho, los humanos han invadido cada vez más los hábitats silvestres donde los artrópodos interactuaban y evolucionaban con animales y plantas silvestres. En consecuencia, el entorno humano moderno, animales domésticos y el ganado están frecuentemente expuestos a los artrópodos, los cuales se adaptan rápidamente y esto aunado a la movilidad humana que permite su propagación. En algunos casos incluso se han observado mutaciones genéticas en los virus que han ampliado su rango de hospederos (Girard et al., 2020)

Es por estas razones que se requieren técnicas de detección para el mayor número posible de los virus emergentes que causan enfermedad en los humanos. En contraste los métodos y kits comerciales que existen actualmente son de costo elevado y solo están creados para detectar algunos de los principales virus. También algunos ensayos comerciales pueden presentar falsos positivos entre diferentes arbovirus (serología), es por ello que la detección de múltiples virus emergentes es de gran relevancia médica que otorguen información epidemiológica confiable, acerca de los virus nuevos encontrados o resurgimiento de otros que pudieran representar un riesgo para la salud pública mundial.

Es por ello por lo que el presente trabajo fue realizado con la finalidad de hacer más completo el panel de detección para arbovirus “Arbomix”, el cual cuenta actualmente con detección para virus como: DNV, WNV, ZIKA y CHICKV, ya que se realizará el diseño de cebadores específicos para los virus de YFV, MAYV y USUV y se estandarizarán las condiciones para que los cebadores de MAYV se integren al pool de detección de “Arbomix”, ofreciendo una detección más completa a través del ensayo de qPCR+HRM.

5. HIPÓTESIS

Si el diseño de cebadores cumple con las condiciones de especificidad para los arbovirus seleccionados (YFV, USUV y MAYV), se podrán estandarizar las condiciones de trabajo adecuadas para integrar los cebadores del virus Mayaro asegurando que no se presentarán productos inespecíficos que puedan interferir con el ensayo o la lectura del mismo y finalmente integrarlos al ensayo de qPCR+HRM para el sistema de detección de arbovirus “Arbomix”, previamente creado en el laboratorio.

6. OBJETIVO GENERAL

Complementar el panel de detección para arbovirus “Arbomix”, añadiendo los cebadores para el virus de la Fiebre Amarilla, Mayaro y Usutu al ensayo, estandarizando las condiciones de trabajo para los cebadores del virus de Mayaro, expandiendo el alcance del panel de detección y ofrecer así un diagnóstico más rápido y eficiente.

6.1 Objetivos particulares

- ❖ Diseñar cebadores específicos para los virus de Fiebre amarilla, Usutu y Mayaro, en base a todas las secuencias completas existentes en la base de datos bioinformática GeneBank y con el apoyo de bases de datos y herramientas bioinformáticas.
- ❖ Realizar ensayos bioinformáticos para dar un preámbulo del posible comportamiento de los cebadores diseñados para los virus de Fiebre Amarilla, Usutu y Mayaro.
- ❖ Estandarizar las condiciones de trabajo y protocolos necesarios para la detección viral con los cebadores diseñados de Mayaro, mediante la combinación de las técnicas RT-qPCR y HRM.
- ❖ Estandarizar las condiciones de trabajo para integrar los cebadores de Mayaro al panel de detección de múltiples arbovirus “Arbomix”, desarrollado previamente en el laboratorio.

7. METODOLOGÍA

7.1 Diseño de primers

Diseño de *primers* específicos para los virus de Mayaro, Fiebre amarilla y Usutu, con la ayuda de herramientas bioinformáticas como: PrimerBlast (propuestas de cebadores basadas en especificaciones), Blast (poder confirmar que se hibridan los *primers* diseñados para evitar futuras complicaciones), Mafft (alineamiento de secuencias) Poland (ensayo virtual de PCR, NCBI) (base de datos para poder utilizar secuencias en formato FASTA).

7.2 Clonación de vector

El vector pUCIDT-AMP: MayDuo1 presentaba un inserto con la secuencia del virus Mayaro (3229 pb). (Fig. 19). La clonación del vector se llevó a cabo mediante la transformación de células competentes. Alternativamente se realizó un ensayo de PCR punto final con los primers de May 1 *forward*/ May 3 *reverse* para amplificar el inserto del virus Mayaro (477 pb). (Figura 18). En la tabla 3 se muestran las condiciones experimentales para llevar a cabo la PCR.

TABLA 3. CONDICIONES DE ENSAYO DE PCR PUNTO FINAL

| Fase | Condiciones |
|--------------------------|--|
| Activación de polimerasa | 95°C, 15min |
| PCR | 16 ciclos (94°C, 30s; 60°C, 60s; 72°C, 60 s) 72°C, 10min + 4°C |

Posterior a la PCR se corrieron los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2% + Gel red, en buffer TBE con un marcador de peso molecular de 1 kb. El gel se observó en la cámara de luz UV VIS para identificar el inserto equivalente a 477 pb.

Una vez asegurando que amplificó el inserto, se cortó cuidadosamente el cuadro de la banda donde se encontraba el fragmento de interés y se extrajo el material genético de la banda cortada por medio de QIAquick *gel extraction kit* (QIAGEN), el cual consiste en una serie de buffers de elución para disolver el gel sin dañar el material, su posterior precipitación y su eventual purificación por medio de una columna de sílica.

Obtenido el material genético de la banda, se realizó la posterior ligación al vector pGEMT-easy (Clonetech) por medio del siguiente protocolo (Tabla 4).

Tabla 4. Protocolo de preparación para la ligación del vector

| Reactivo | Proporción |
|---------------------|------------|
| 2X T- Ligase Buffer | 5µL |
| Ligasa | 1 µL |
| pGEM-T easy | 1 µL |
| Agua | 1 µL |
| Producto de PCR | 2 µL |

7.3 Preparación de medio de propagación para células competentes

Para la propagación de células competentes (cepa *Escherichia coli* TOP 10), se utilizó medio Luria Broth (líquido y sólido) suplementado con ampicilina (100µg/mL). Previo al sembrado de las bacterias transformadas (30 minutos antes), se agregaron 40µL de X-Gal al medio LB-Amp sólido y se esparció sobre toda la placa.

La selección de células transformadas se llevó a cabo por medio de un gen de resistencia a Ampicilina dentro del vector y el uso de β-galactosidasa (X-Gal).

7.4 Transfección de bacterias con plásmido

Se descongelaron las células competentes por cada transformación (10-20 min). Posteriormente se agregaron 3µL de la ligación o plásmido (25 ng) y se mezcló mediante un golpeteo suave.

La inserción del plásmido se realizó por choque térmico, los viales que contenían la mezcla anteriormente mencionada, se colocaron en hielo durante 15 min, posteriormente se pasaron a un baño de agua a 42 °C durante 30 s y finalmente, se regresaron a hielo

durante 2-5 min. Adicionalmente, se agregaron 250µL de medio SOC sin antibiótico. Los viales se incubaron en agitación horizontal a 37°C durante 60min/225 rpm. Seguidamente se sembraron en caja Petri con medio LB-Amp + 40µL de X-Gal y se incubaron a 37°C toda la noche. Para la propagación de las colonias viables, se resembraron en caldo LB + Ampicilina y se incubaron 16 hr a 37°C.

7.5 Extracción de mini preps

La extracción de material genético se llevó a cabo acorde con las especificaciones de *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QUIAGEN), el cual consiste en una serie de centrifugaciones con diferentes buffers para lograr la lisis celular y liberar el material genético (plásmido) para su posterior purificación a través de una columna de afinidad.

7.6 Cuantificación de material genético

El material genético extraído se cuantificó por medio de espectrofotómetro de UV VIS de espectro completo de micro volúmenes (NanoDrop 2000). Se colocó 1µL directamente de la muestra extraída sobre el pedestal del sistema NanoDrop 2000 y se realizó cuantificación por duplicado. Una vez realizadas las cuantificaciones se revisaron los parámetros de absorción 260/230 y 260/280 para verificar la calidad del material genético extraído.

7.7 Digestión enzimática

Se realizó digestión enzimática con las enzimas de restricción EcoR1 y SacI para corroborar el tamaño del plásmido y su presencia dentro del inserto en las clonas seleccionadas de acuerdo con su pureza y calidad del material genético extraído. En la tabla 5 se muestran las condiciones para la digestión enzimática.

TABLA 5. PROTOCOLOS DE DIGESTIÓN PARA LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN SCAL Y EcoRI

| Reactivos | Estándar | Utilizado |
|-------------------------|----------|-----------|
| Agua libre de nucleasas | 16µL | 7.5µL |
| 10x Buffer O | 2µL | 2 µL |
| ADN (0.5-1 µg/ µl) | 1µL | 10 µL |
| Scal | 0.5-2 µL | 0.5 µL |
| Reactivos | Estándar | Utilizado |
| Agua libre de nucleasas | 16µL | 7.5µL |
| 10x Buffer H | 2µL | 2 µL |
| ADN (0.5-1 µg/ µl) | 1µL | 10 µL |
| EcoRI | 0.5-2 µL | 0.5 µL |

Se preparó un “*master mix*” con el agua, buffer y ADN (plásmidos seleccionados) y con la ayuda de un vórtex se homogenizó durante unos segundos levemente. Posteriormente se agregó la enzima de restricción y mediante pipeteo suave se integró. Finalmente, se dejó en refrigeración durante toda la noche.

7.8 Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó gel de agarosa 1 % con Gel red. Se cargaron las muestras (digestiones enzimáticas) en el gel colocado en la cámara de electroforesis con un marcador de peso molecular de 1 Kb y buffer TBE, las condiciones utilizadas fueron 30-45 min a 89 volts. Posteriormente se visualizó el gel en cámara de luz UV VIS.

Los productos esperados fueron a) Mayaro 1 + Mayaro 3 con un peso molecular de 477pb y b) plásmido linealizado de 3015 pb.

7.9 Ensayos RT-PCR

Se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR + HRM con los plásmidos seleccionados para corroborar que los productos deseados con los *primers* de May 1 y May 3 hubiesen amplificado (Tabla 6). Posteriormente, se corroboraron y compararon la T_m experimental y la T_m teórica obtenida con la herramienta bioinformática *Poland*.

Los productos esperados de los cebadores diseñados fueron los siguientes:

- May 1: 246 pb
- May 3: 222 pb

TABLA 6. CONDICIONES DE REACCIÓN PARA EL ENSAYO DE RT-PCR + HRM

| Fase | Condiciones |
|-------------------|----------------------------------|
| Desnaturalización | 95°C, 3min |
| Ciclado | 30 ciclos (95°C, 30s; 62°C, 60s) |
| “Curva melt” | 70-90°C , 0.3% |

Se realizó la secuenciación de las clonas seleccionadas después de la digestión enzimática y los ensayos con los primers diseñados de May 1/ May 3 para corroborar que realmente se trataba del virus Mayaro. La secuencia obtenida se comparó contra la esperada con la ayuda de herramientas como *Blast* y *Stadent*.

Aunado a lo anterior, se realizaron diluciones seriadas de las miniprep del plásmido seleccionado a una concentración inicial de a 500pg/μl, para tener un gradiente de diluciones 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰ copias.

Con las diluciones y los cebadores de May1 y May3, se corrieron ensayos RT-PCR + HRM, para determinar cuál era la concentración que amplificaba de mejor manera sin la formación de productos inespecíficos (Tabla 7).

Cómo forma de control, se realizó un posterior ensayo RT-PCR+HRM con los cebadores de May 1 y 3 en conjunto con el *pool* de cebadores del panel Arbomix (Dengue, WNV, Zika, Chikungunya), para corroborar que no hubiese formación de productos inespecíficos con otros cebadores, los cuáles pudiesen interferir con el ensayo y observar su comportamiento.

Una vez agregados los cebadores May 1 y 3 al *pool* de cebadores de Arbomix, se probó frente a muestras positivas de otros arbovirus (para observar su comportamiento, asegurando así, que los cebadores son específicos para el virus de Mayaro). En la tabla 8 se enlistan las condiciones para el preamplificado.

TABLA 7. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE LOS GRADIENTES DE CONCENTRACIONES CON LA CLONA A5 QUE CONTIENE EL INSERTO DE INTERES Y EL LAYOUT DEL ENSAYO MONTADO. EN LA PRESENTE TABLA (A) EN LA CUAL ES UTILIZADO COMO AGENTE INTERCALANTE Eva Green Y SIN CONDICIONES DE PREAMPLIFICADO DEL PLÁSMIDO Y (B) EL ENSAYO EN EL CUAL ES UTILIZADO COMO AGENTE INTERCALANTE SsoFast EvaGreen SUPERMIX Y APLICANDO CONDICIONES DE PRE AMPLIFICADO AL PLÁSMIDO Y POR ÚLTIMO (C) ES LA REPRESENTACIÓN VISUAL DEL ACOMODO DE LA PLACA MONTADA EN AMBOS CASOS.

| 7A | | | | 7B | | | |
|---|---------------------|-----------------------|-------|-----------------------|---------------------|--------------------------------|--------|
| MIX PCR-Preamplificado | Vol. final 20uL | | rxn | MASTER MIX | | Mix * | |
| Master mix | Concentración Final | Vol. X Rxn(μL) 0.2 μM | 17 | Master mix | Concentración Final | Volumen por cada reacción (μL) | 17.0 |
| Agua | | 9.4 | 159.8 | SsoFast with low ROX. | 1X | 12.50 | 212.50 |
| 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer | 1x | 4.0 | 68.0 | Primer 2 μM F-R | 0.5 μM | 6.26 | 106.42 |
| dNTP Mix (conteniendo 10 mM de cada dNTP) | 400μM | 0.8 | 13.6 | Agua | | 2.24 | 38.08 |
| Primer May 1F/R2μM primer | 0.2μM | 2.0 | 34.0 | | | 21.00 | 21.00 |
| QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix | | 0.8 | 13.6 | cDNA 4 μl | | | |
| EvaGreen 20X | 1X | 1.0 | 17.0 | | | | |
| Total | | 18.0 | 8.0 | | | | |
| pDNA | | 2.0 | | | | | |

7C

| | May1 0.2 | | May1 0.4 | | May1 0.6 | | May3 0.2 | | May3 0.4 | | May3 0.6 | |
|---|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | NTC | NTC |
| B | A2 10*4 | A2 10*4 |
| C | A2 10*3 | A2 10*3 |
| D | A2 10*2 | A2 10*2 |
| E | A2 10*1 | A2 10*1 |
| F | A2 10*0 | A2 10*0 |

TABLA 8. CONDICIONES PREAMPLIFICADO PARA ESTANDARIZAR CONDICIONES DE ENSAYO DE PCR PUNTO FINAL PARA LOS CEBADORES DE MAY 1 / MAY 3

| | |
|---|---|
| Condiciones de reacción RT | 30min, 50°C |
| Activación de polimerasa | 95°C, 15min |
| PCR | 16 ciclos (94°C, 30s; 60°C, 60s; 72°C, 60 s) 72°C, 10min + 10°C |
| Al finalizar la reacción hacer una dilución 1:8 en buffer TE (queda lista para qPCR-HRM) | |

Una vez realizado el preamplificado, se realizaron diluciones 1:8 de los productos amplificados en la PCR, junto con los controles positivos, para poder llevar a cabo el ensayo de RT-PCR + HRM.

7.10 Ensayos Fluidigm

Una vez realizado el pre amplificado de muestras y ensayos de acuerdo a las condiciones antes mencionadas, se procedió a la amplificación de los productos para realizar los ensayos *fluidigm*. En la tabla 9 se muestran las condiciones para la amplificación del ensayo RT-PCR + HRM requeridas para los ensayos de nanofluidos

TABLA 9. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DEL ENSAYO RT- PCR + HRM REQUERIDAS PARA EL ENSAYO DE LA PLATAFORMA DE NANOFUIDOS

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| Desnaturalización | 95°C, 3min |
| Ciclado | 30 ciclos (95°C, 30s; 62°C, 60s) |
| Curva melt | 70-90°C, 0.3% |

Para la preparación de las soluciones mix de ensayos y muestras se procedió con los protocolos indicados en las tablas 10 y 11 respectivamente.

TABLA 10. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MIX DE ENSAYOS

| Componente | Vol. por reacción | Vol. Exceso | Vol. 55 ensayos |
|--|-------------------|-------------|-----------------|
| 2X Assay Loading Reagent | 2.5 µL | 3.5 µL | 192.5 µL |
| 1X DNA Suspension Buffer (buffer TE) | 1.25 µL | 1.75 µL | 96.25 µL |
| 20µM primer pair mix Forward and Reverse | 1.25 µL | 1.75 µL | - |
| Total | 5 µL | 7 µL | - |

TABLA 11. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MIX DE MUESTRAS

| Componente | Vol. por reacción | Vol. Exceso | Vol. 55 ensayos |
|--|-------------------|-------------|-----------------|
| 2X Master Mix SSoFast BioRad | 2.5 µL | 3.5 µL | 192.5 µL |
| 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent | 0.25 µL | 0.35 µL | 19.25 µL |
| Se añaden 24.6µL a cada primer pozo y se alícuota 3.85µL con multicanal a los 6 siguientes | | | |
| cDNA | 2.25 µL | 3.15 µL | - |
| Total | 5 µL | 7 µL | - |

7.10.1 Cargado del control Line Fluid

Se inyectó el *control Line Fluid* dentro de cada acumulador de *Control Line Fluid* que se encuentra en los extremos del chip. Posteriormente se colocó el chip dentro del *IFC controller MX* y en el software se seleccionó *PRIME (113 X)* para preparar el *control line fluid* dentro del chip.

7.10.2 Cargado de muestras y ensayos

Una vez finalizado el protocolo del Prime (113X), se retiró el chip del *IFC controller MX* y se añadieron 5.5µL de cada control y muestra dentro de los respectivos pozos del chip. Finalmente, se colocó nuevamente el chip en el controlador. En el software se seleccionó la opción *Load Mix (113X) script* para realizar el mix de las muestras y los ensayos, una vez finalizado el protocolo, se retiró el chip del equipo y de manera cuidadosa se eliminó cualquier partícula de polvo que pudiera estar en la superficie para evitar interferencias.

Con lo anterior, el chip quedó listo para realizar corridas, con ello, los ensayos de PCR en *chips Fluidigm* se estandarizaron.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Diseño de *primers*

Los *primers* diseñados para los virus Usutu, de la fiebre amarilla y de Mayaro se muestran en la tabla 11. La selección de *primers* estuvo basada tanto a su especificidad como a sus características intrínsecas.

8.1.1 Virus de Mayaro

Los *primers* diseñados para el virus de Mayaro nombrados como May1 y May3 se seleccionaron debido a su especificidad, como se observa en la figura 5 (secuencias de color amarillo) y a sus características para así asegurar las condiciones óptimas de trabajo. Para el caso del primer *forward* (May 1, Fig. 5a) se hibrida a 33 de 36 de las secuencias totales y completas encontradas en *GenBank* y con ayuda del software <https://www.megasoftware.net/> el cual nos permitió visualizar y realizar el alineamiento de las secuencias utilizadas. Por otro lado, el primer *reverse* (May 1, Fig. 5a) se hibrida con 26 de 36 secuencias completas encontradas en *GenBank*. Mientras que para May 3, la cantidad de secuencias que se hibridan a los cebadores diseñados *forward* (Fig. 5b) y *reverse* (Fig. 5b) tienen una alta especificidad ya que *reverse* se hibridan con 36 de 36 de las secuencias totales y completas encontradas en *GenBank*.

TABLA 12. PRIMERS DISEÑADOS. CONGLOMERADO DE LOS DISTINTOS PARES DE PRIMERS DISEÑADOS PARA LOS VIRUS USUTU, VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA Y EL VIRUS DE MAYARO, ASÍ COMO LA UBICACIÓN Y TAMAÑO DEL FRAGMENTO A AMPLIFICAR DENTRO DEL GENOMA DE CADA UNO DE LOS VIRUS INTERÉS DEL PRESENTE PROYECTO.

| Nombre del Primer | Primers 5' → 3' | Posición en Genoma | Tamaño del producto | Tm (°C) Predicha (Poland) |
|-------------------|---|---------------------------|---------------------|---------------------------|
| Us1 | AAAGCCACAAGAACACGACA CAACGCCATCACTCCAAAGA | 3083-3184 NS1 | 102 nt | 78.7 |
| Us2 | TGTGGTAGATGGTTTGGTGG GTTGTCCCAGAGAGTCAGGA | 7365-7554 NS4b | 190 nt | 81.5 |
| YFVC1 | GCGGTATCTTGAGTTTGAGGC GAATCCACCACCATCCATTGC | 9082-9229 NS5 | 148 nt | 78.5 |
| YFVNS5_C2 | AACATGGTCGATTCATGGAAAG CGCACAGCTTGTCTTGTCTC | 10027-10190 NS5 | 164 nt | 77.5 |
| YFVss_r1 | GGTTGCTCCACTTTATGGCA TTTGCGGTCATTGGTCTTCA | 6085-6256 NS3 | 172 nt | 79.7 |
| May 1 | GCATTCTCGCATCTGGCTAC GGGTCGCCATCACTGACT | 200-452 nsP1 | 253 nt | 83.9 |
| May 3 | CGATAAACGTGGGAGCAAAAGA GTCGTGATCTCAGCCATGTCA | 4510-4731 nsP3 | 222 nt | 81.1 |

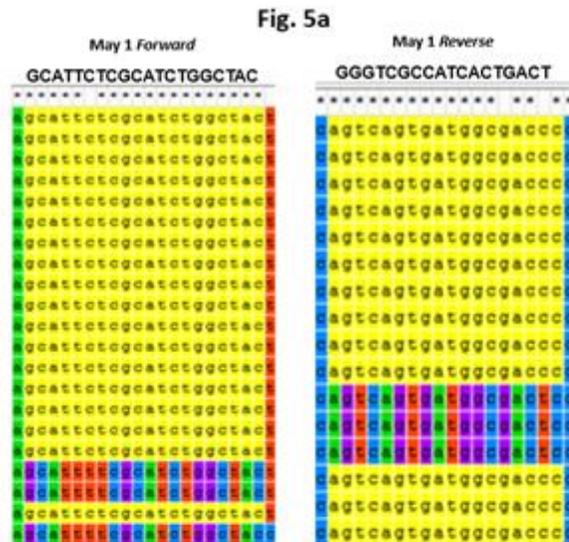


Fig. 5. Cebadores diseñados para el virus de Mayaro. Representación visual y relación de la cantidad de secuencias completas que se encuentran en GenBank y la cantidad de secuencias a las que se pegan específicamente los cebadores forward y reverse diseñados. En el panel a, se muestran para el primer May 1, mientras que en el b, para May 3.

Otra de las características por las cuales los *primers* diseñados fueron seleccionados fue debido a la composición de los nucleótidos que los conforman así como a la baja probabilidad de la formación de productos inespecíficos que pudieran interferir con la interpretación de la PCR (figura 6a y 6b) su ubicación exacta dentro del genoma del virus (Figura 7a y 7b).

Fig. 6a (May 1)

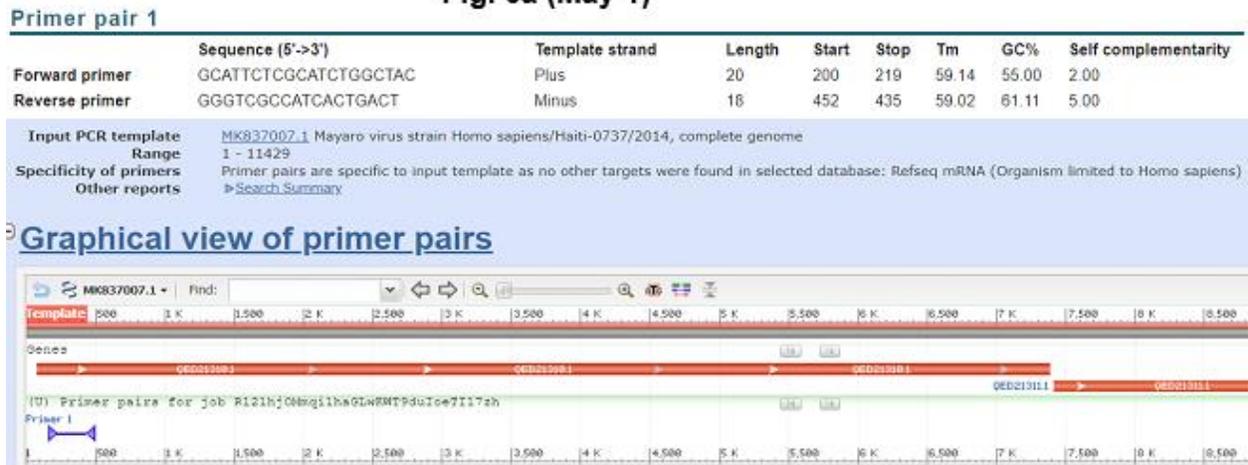


Fig. 6b (May 3)

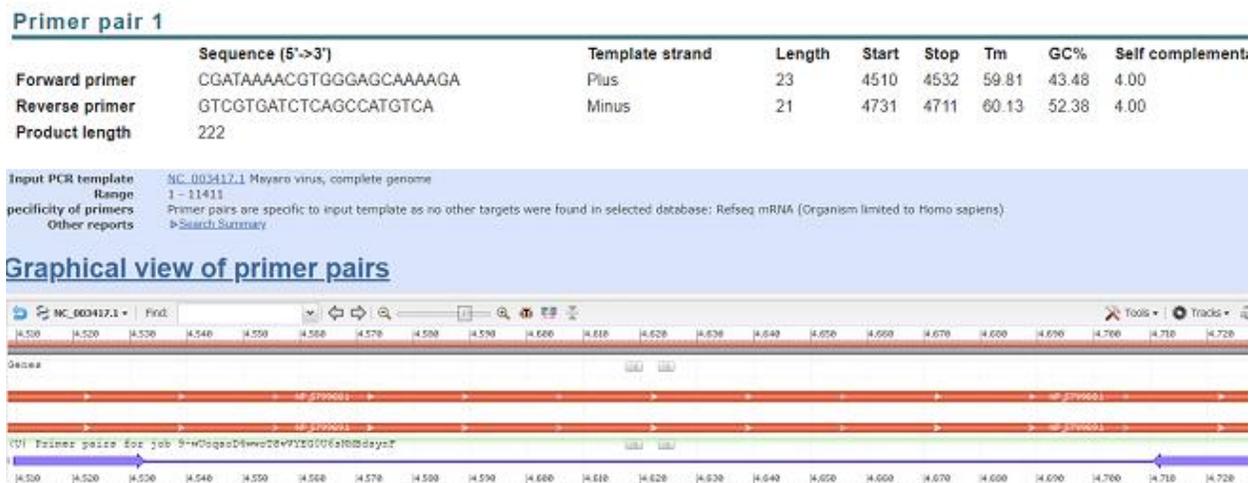


Fig. 6. Representación visual y características de los primers May 1 (6a) en la plataforma PrimerBlast, obteniendo un producto de amplificación de 253 nucleótidos, y May 3 (6b) obteniendo un producto de amplificación de 222 nucleótidos.

Fig. 7a May 1

| | Gene Symbol | Protein Product Name | ViPR Locus ID | CDS Start | CDS End |
|----------------------|-------------|----------------------------|---------------|-----------|---------|
| GenBank | | | | | |
| View | -N/A- | nonstructural protein | MV-1 | 37 | 7350 |
| View | -N/A- | structural polyprotein | MV-2 | 7377 | 11105 |
| ViPR-generated | | | | | |
| View | nsP1 | nonstructural protein nsP1 | nsP1 | 37 | 1644 |
| View | nsP2 | nonstructural protein nsP2 | nsP2 | 1645 | 4038 |
| View | nsP3 | nonstructural protein nsP3 | nsP3 | 4039 | 5493 |
| View | nsP4 | nonstructural protein nsP4 | nsP4 | 5494 | 7326 |
| View | C | capsid protein | C | 7377 | 8150 |
| View | E3 | envelope glycoprotein E3 | E3 | 8151 | 8348 |
| View | E2 | envelope glycoprotein E2 | E2 | 8349 | 9614 |
| View | 6K | 6k protein | 6K | 9615 | 9794 |
| View | E1 | envelope glycoprotein E1 | E1 | 9795 | 11102 |

Fig. 7b May 3

Protein Information ([SOP](#))

| | Gene Symbol | Protein Product Name | ViPR Locus ID | CDS Start | CDS End |
|----------------------|-------------|----------------------------|---------------|-----------|---------|
| GenBank | | | | | |
| View | -N/A- | nonstructural protein | MV-1 | 37 | 7350 |
| View | -N/A- | structural polyprotein | MV-2 | 7377 | 11105 |
| ViPR-generated | | | | | |
| View | nsP1 | nonstructural protein nsP1 | nsP1 | 37 | 1644 |
| View | nsP2 | nonstructural protein nsP2 | nsP2 | 1645 | 4038 |
| View | nsP3 | nonstructural protein nsP3 | nsP3 | 4039 | 5493 |
| View | nsP4 | nonstructural protein nsP4 | nsP4 | 5494 | 7326 |
| View | C | capsid protein | C | 7377 | 8150 |
| View | E3 | envelope glycoprotein E3 | E3 | 8151 | 8348 |
| View | E2 | envelope glycoprotein E2 | E2 | 8349 | 9614 |
| View | 6K | 6k protein | 6K | 9615 | 9794 |
| View | E1 | envelope glycoprotein E1 | E1 | 9795 | 11102 |

Fig. 7. Ubicación en donde se hibridan los primers May 1 y May 3. En la Fig. 7a el par de primers May1 hibrida con en el gen que codifica para la proteína no estructural nsP1. Para el caso de May 3, la ubicación en donde se unen los primers es en el gen que codifica para la proteína no estructural nsP3.

También se comprobó el funcionamiento *in silico* de los *primers* diseñados de la qPCR, lo cual, nos ayudó a tener un preámbulo sobre el comportamiento de la reacción a través de la plataforma *Poland* dándonos como resultado una curva diferencial de disociación aproximada (Figura 8a y 8b).

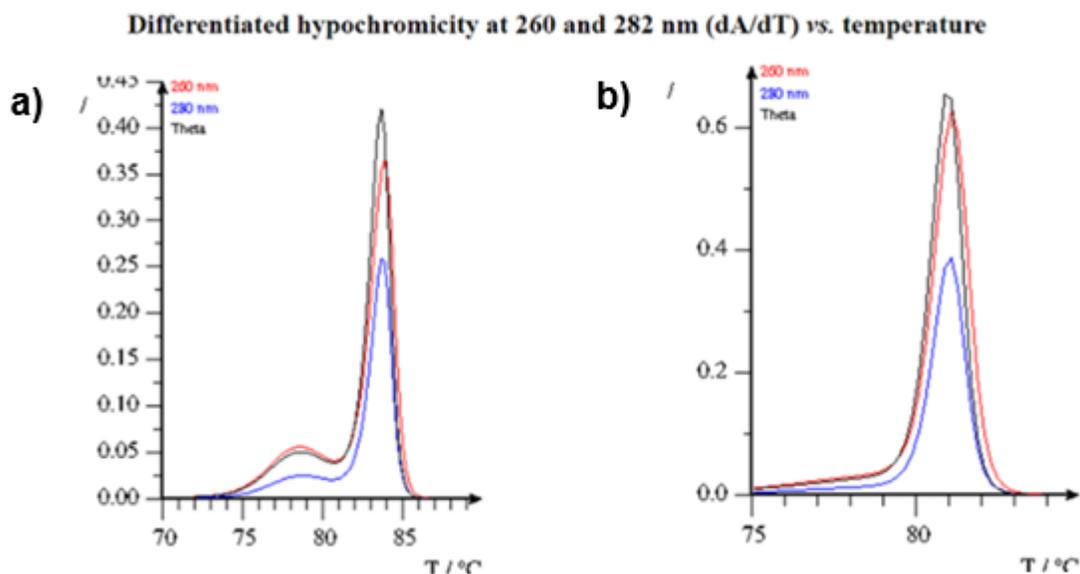


Fig. 8. Curvas diferenciales de disociación con respecto al cambio de temperatura. En la imagen a, se muestra la curva diferencial del producto de acuerdo con el modelado bioinformático realizado en la plataforma *Poland* para el par de primers May 1. La temperatura arrojada producto del ensayo bioinformático de la qPCR es de 83.9°C. En el panel b, se muestra la curva para el par de primers May 3 donde la temperatura es de 81.1°C.

8.1.2 Virus Usutu

Los *primers* diseñados para el virus Usutu fueron nombrados como Us1 y Us2. En la figura 9a se muestran en color amarillo aquellas secuencias de que hibridan para Us1, el *primer forward* se hibrida a 120 de 123 y para el caso del *primer reverse*, se hibrida con 116 de 123 de las secuencias totales y completas encontradas en GenBank, y con ayuda del software <https://www.megasoftware.net/> el cual nos permitió visualizar y poder realizar el alineamiento de las secuencias utilizadas. Por otro lado, los primers para Us2 hibridan a 112 de 123 de las secuencias totales para el caso del *forward*, mientras que para el *reverse*, se hibrida a 119 de 123 secuencias (Fig. 9b) Lo anterior nos indica una alta especificidad en los primers diseñados.

Fig 9a

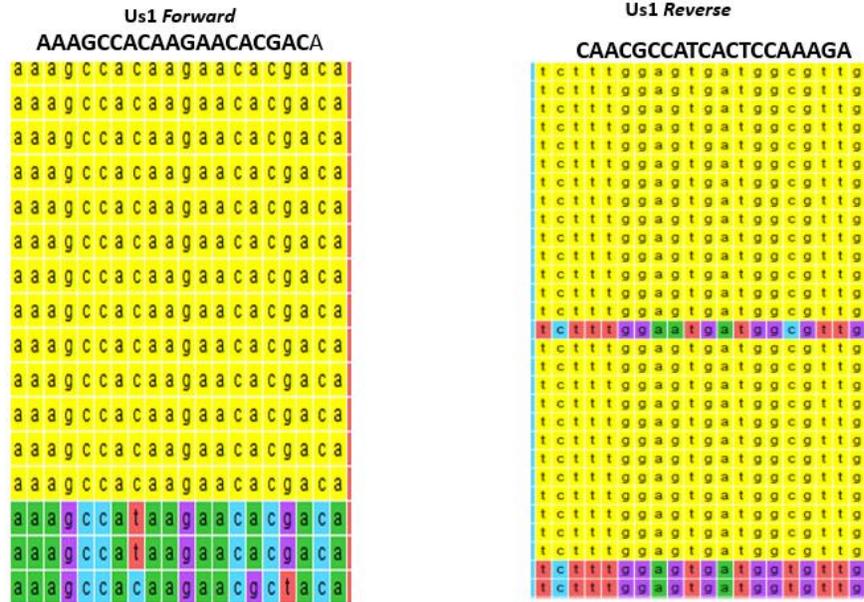


Fig. 9 b

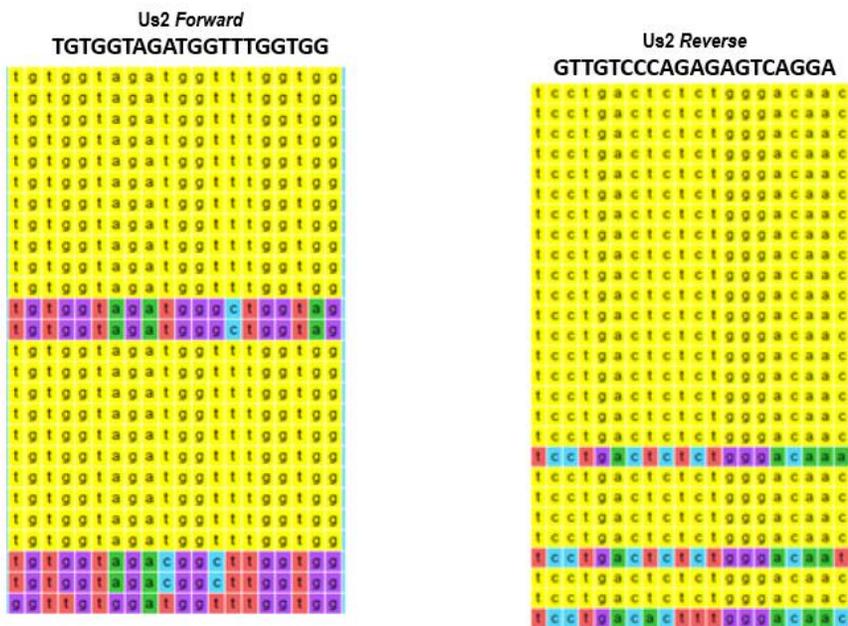


Fig. 9. Cebadores diseñados para el virus Usutu. Representación visual y relación de la cantidad de secuencias completas que se encuentran en GenBank y la cantidad de secuencias a las que se unen específicamente los cebadores forward y reverse diseñados. En el panel a, se muestran para el primer Us 1, mientras que en el b, para Us2.

La composición de los nucleótidos que conforman a los *primers* se muestra en la Fig. 10, mientras que su ubicación exacta dentro del genoma del virus en la Fig. 11. Se comprobó el funcionamiento *in silico* de los *primers* diseñados de la qPCR, las curvas diferenciales de disociación aproximada se muestran en la Figura 12.

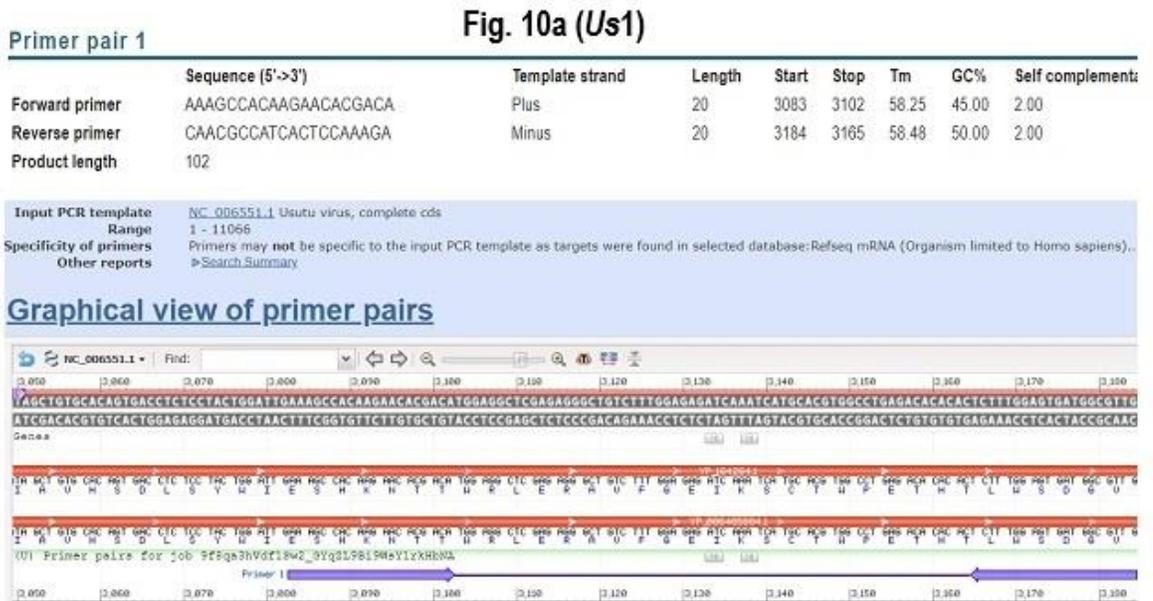


Fig. 10. Representación visual y características de los primers Us1 (10a) en la plataforma PrimerBlast, obteniendo un producto de amplificación de 102 nucleótidos, y Us2 (10b) obteniendo un producto de amplificación de 190 nucleótidos.

Fig. 11a (Us1)

Protein Information (SOP)

| | Gene Symbol | Protein Product Name | ViPR Locus ID | CDS Start | CDS End |
|----------------------|-------------|-------------------------|---------------|-----------|---------|
| GenBank | | | | | |
| View | -N/A- | polyprotein | UV-1 | 97 | 10401 |
| ViPR-generated | | | | | |
| View | ancC | anchored core protein C | ancC | 97 | 474 |
| View | C | core protein C | C | 97 | 408 |
| View | preM | PreM | preM | 475 | 975 |
| View | M | matrix protein M | M | 751 | 975 |
| View | E | envelope protein | E | 976 | 2475 |
| View | NS1 | NS1 | NS1 | 2476 | 3531 |
| View | NS2a | NS2a | NS2a | 3532 | 4212 |
| View | NS2b | NS2b | NS2b | 4213 | 4605 |
| View | NS3 | NS3 | NS3 | 4606 | 6462 |
| View | NS4a | NS4a | NS4a | 6463 | 6840 |
| View | 2k | 2K protein | 2k | 6841 | 6909 |
| View | NS4b | NS4b | NS4b | 6910 | 7683 |
| View | NS5 | NS5 | NS5 | 7684 | 10398 |

Fig. 11b (Us2)

Protein Information (SOP)

| | Gene Symbol | Protein Product Name | ViPR Locus ID | CDS Start | CDS End |
|----------------------|-------------|-------------------------|---------------|-----------|---------|
| GenBank | | | | | |
| View | -N/A- | polyprotein | UV-1 | 97 | 10401 |
| ViPR-generated | | | | | |
| View | ancC | anchored core protein C | ancC | 97 | 474 |
| View | C | core protein C | C | 97 | 408 |
| View | preM | PreM | preM | 475 | 975 |
| View | M | matrix protein M | M | 751 | 975 |
| View | E | envelope protein | E | 976 | 2475 |
| View | NS1 | NS1 | NS1 | 2476 | 3531 |
| View | NS2a | NS2a | NS2a | 3532 | 4212 |
| View | NS2b | NS2b | NS2b | 4213 | 4605 |
| View | NS3 | NS3 | NS3 | 4606 | 6462 |
| View | NS4a | NS4a | NS4a | 6463 | 6840 |
| View | 2k | 2K protein | 2k | 6841 | 6909 |
| View | NS4b | NS4b | NS4b | 6910 | 7683 |
| View | NS5 | NS5 | NS5 | 7684 | 10398 |

Fig. 11. Ubicación en donde se hibridan los primers Us1 y Us2. En la Fig. 11a el par de primers Us1 hibrida con en el gen que codifica para la proteína no estructural NS1. Para el caso de Us2, la ubicación en donde se unen los primers es en el gen que codifica para la proteína no estructural NS4b.

Differentiated hypochromicity at 260 and 282 nm (dA/dT) vs. temperature

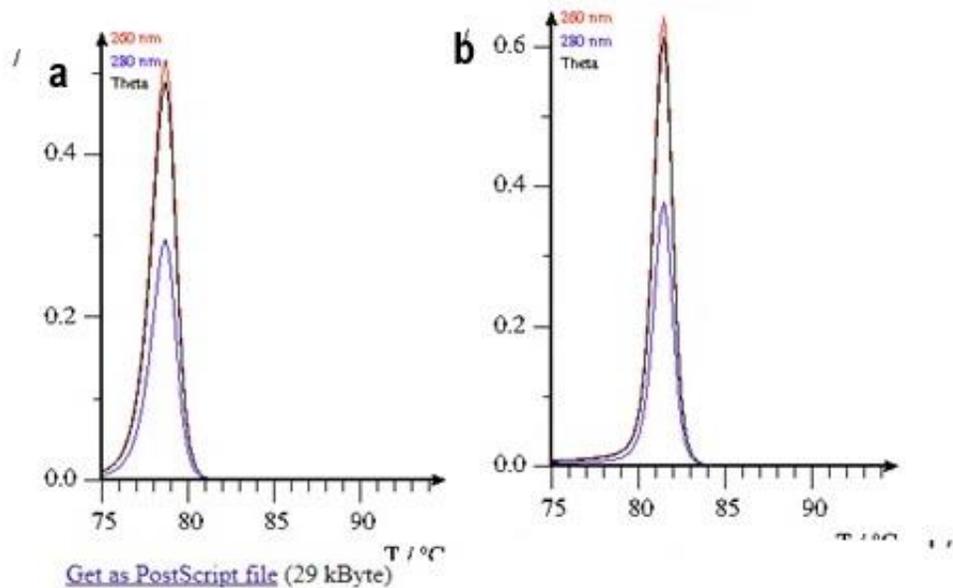


Fig. 12. Curvas diferenciales de disociación con respecto al cambio de temperatura. En la imagen a, se muestra la curva diferencial del producto de acuerdo con el modelado bioinformático realizado en la plataforma Poland para el par de primers Us1. La temperatura arrojada producto del ensayo bioinformático de la qPCR es de 78.7°C. En el panel b, se muestra la curva para el par de primers Us2 donde la temperatura es de 81.5°

8.1.3 Virus de Fiebre amarilla

Los pares de primers diseñados para el virus de la Fiebre Amarilla nombrados como YFVC1 (Figura 13a), YFVNS5_C2 (Figura 13b) y YFVss_r1 (Figura 13c). En comparación con Mayaro y Usutu, se diseñaron un par de cebadores extra denominado YFVss_1, ya que se observó que de las 71 secuencias totales encontradas en *GenBank*, 31 de ellas presentaban una alta variabilidad en su genoma en comparación con las 40 restantes que presentaban regiones más conservadas. Es por ello que, para abarcar la mayor cantidad de los genomas secuenciados, se diseñaron 2 pares para las regiones más conservadas (YFVC1 y YFVNS5_C2) para hacer un diagnóstico más certero y completo.

Para YFVC1, el *primer forward* se hibrida a 40 de 71 y para el caso del *primer reverse* se hibrida con 37 de 71 de las secuencias totales y completas. En el caso de YFVNS5_C2, los *primers* tienen una especificidad regular ya que el *primer forward* se hibrida en 40 de 71 de las secuencias y el *primer reverse* con 42 de 71 secuencias. Los

primers YFVss_r1 se hibridan en 17 de 31 secuencias para el *forward*, mientras que para el *reverse*, tan solo en 9 de 31.

Al igual que el resto de *primers* utilizados, se tomaron en cuenta criterios como la especificidad, la composición de los nucleótidos que la conforman y la baja probabilidad de la formación de productos inespecíficos que pudieran interferir con la interpretación de la qPCR (Figura 14), su ubicación exacta dentro del genoma del virus (Figura 15). También se comprobó el funcionamiento de los *primers* diseñados *in silico* de la qPCR, lo cual nos ayudó a tener un preámbulo y un comportamiento de la reacción a través de la plataforma Poland (Figura 16) para poder realizar el estudio *in silico*, dándonos como resultado una curva diferencial de disociación aproximada.

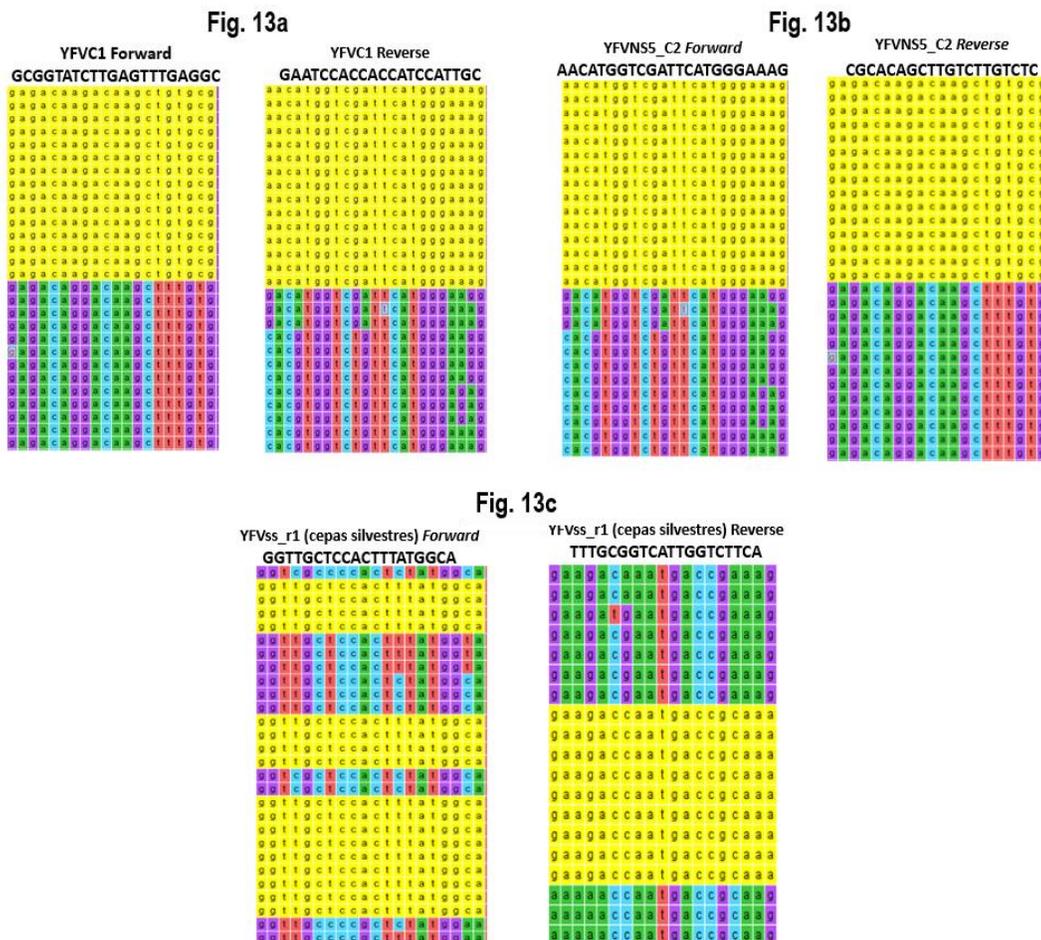


Fig. 13. Cebadores diseñados para el virus de la Fiebre Amarilla. Representación visual y relación de la cantidad de secuencias completas que se encuentran en GenBank y la cantidad de secuencias a las que se unen específicamente los cebadores forward y reverse diseñados. En el panel a, se muestran para el primer YFVC1, mientras que en el b y c, para YFVNS5_C2 y YFVss_r1, respectivamente.

Fig. 14a (YFVC1)

| Primer pair 1 | | | | | | | | |
|----------------|-----------------------|-----------------|--------|-------|------|-------|-------|----------|
| | Sequence (5'→3') | Template strand | Length | Start | Stop | Tm | GC% | Self cor |
| Forward primer | GCGGTATCTTGAGTTGAGGC | Plus | 21 | 9082 | 9102 | 59.33 | 52.38 | 2.00 |
| Reverse primer | GAATCCACCACCATCCATTGC | Minus | 21 | 9229 | 9209 | 59.59 | 52.38 | 3.00 |
| Product length | 148 | | | | | | | |

Input PCR template: NC_002031.1 Yellow fever virus, complete genome
 Range: 1 - 10862
 Specificity of primers: Primers may not be specific to the input PCR template as targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)...
 Other reports: Search Summary

Graphical view of primer pairs



Fig. 14b (YFVNS5_C2)

| Primer pair 1 | | | | | | | | |
|----------------|------------------------|-----------------|--------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | Sequence (5'→3') | Template strand | Length | Start | Stop | Tm | GC% | Self cor |
| Forward primer | AACATGTCGATTCATGGGAAAG | Plus | 23 | 10027 | 10049 | 59.30 | 43.48 | 6.00 |
| Reverse primer | CGCACAGCTTGCTGTCTC | Minus | 20 | 10190 | 10171 | 59.49 | 55.00 | 4.00 |
| Product length | 164 | | | | | | | |

Input PCR template: NC_002031.1 Yellow fever virus, complete genome
 Range: 1 - 10862
 Specificity of primers: Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports: Search Summary

Graphical view of primer pairs



Fig. 14c (YFVss_r1)

| Primer pair 1 | | | | | | | |
|----------------|----------------------|-----------------|--------|-------|------|-------|-------|
| | Sequence (5'→3') | Template strand | Length | Start | Stop | Tm | GC% |
| Forward primer | GGTTGCTCCACTTTATGGCA | Plus | 20 | 6085 | 6104 | 58.46 | 50.01 |
| Reverse primer | TTTCCGGTCATTGGTCTTCA | Minus | 20 | 6256 | 6237 | 58.03 | 45.01 |

Input PCR template: KU949599.1 Yellow fever virus isolate Shanghai01, complete genome
 Range: 1 - 10759
 Specificity of primers: Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports: Search Summary

Graphical view of primer pairs



Fig. 14. Representación visual y características de los primers del virus de la fiebre amarilla en PrimerBlast. En el panel a, se muestra el resultado de la amplificación de YFVC1 (148 nucleótidos), en el b la amplificación de YFVNS5_C2 (164 nucleótidos) y en el c, la amplificación de YFVss_r1 (172 nucleótidos).

Fig. 15a (YFVC1)

Protein Information (SQP)

| Gene Symbol | Protein Product Name | VIPR Locus ID | CDS Start | CDS End |
|----------------------|----------------------|------------------------------|-----------|---------|
| GenBank | | | | |
| View | -N/A- | YFV-1 | 1 | 10239 |
| VIPR-generated | | | | |
| View | ancC | anchored core protein C | ancC | 1 |
| View | C | core protein C | C | 1 |
| View | preM | M protein precursor | preM | 364 |
| View | M | matrix protein M | M | 631 |
| View | E | envelope protein | E | 856 |
| View | NS1 | non-structural protein NS1 | NS1 | 2335 |
| View | NS2a | non-structural protein NS2a | NS2a | 3391 |
| View | NS2b | non-structural protein NS2b | NS2b | 4063 |
| View | NS3 | non-structural protein NS3 | NS3 | 4453 |
| View | NS4a | non-structural protein NS4a | NS4a | 6322 |
| View | 2k | 2K protein | 2k | 6700 |
| View | NS4b | non-structural protein NS4b | NS4b | 6769 |
| View | NS5 | RNA-dependent RNA polymerase | NS5 | 7519 |

Fig. 15b (YFVNS5_C2)

Protein Information (SQP)

| Gene Symbol | Protein Product Name | VIPR Locus ID | CDS Start | CDS End |
|----------------------|----------------------|------------------------------|-----------|---------|
| GenBank | | | | |
| View | -N/A- | YFV-1 | 1 | 10239 |
| VIPR-generated | | | | |
| View | ancC | anchored core protein C | ancC | 1 |
| View | C | core protein C | C | 1 |
| View | preM | M protein precursor | preM | 364 |
| View | M | matrix protein M | M | 631 |
| View | E | envelope protein | E | 856 |
| View | NS1 | non-structural protein NS1 | NS1 | 2335 |
| View | NS2a | non-structural protein NS2a | NS2a | 3391 |
| View | NS2b | non-structural protein NS2b | NS2b | 4063 |
| View | NS3 | non-structural protein NS3 | NS3 | 4453 |
| View | NS4a | non-structural protein NS4a | NS4a | 6322 |
| View | 2k | 2K protein | 2k | 6700 |
| View | NS4b | non-structural protein NS4b | NS4b | 6769 |
| View | NS5 | RNA-dependent RNA polymerase | NS5 | 7519 |

Fig. 15c (YFVss_r1)

Protein Information (SQP)

| Gene Symbol | Protein Product Name | VIPR Locus ID | CDS Start | CDS End |
|----------------------|----------------------|------------------------------|-----------|---------|
| GenBank | | | | |
| View | -N/A- | YFV-1 | 110 | 10348 |
| VIPR-generated | | | | |
| View | ancC | anchored core protein C | ancC | 110 |
| View | C | core protein C | C | 110 |
| View | preM | M protein precursor | preM | 473 |
| View | M | matrix protein M | M | 740 |
| View | E | envelope protein | E | 965 |
| View | NS1 | non-structural protein NS1 | NS1 | 2444 |
| View | NS2a | non-structural protein NS2a | NS2a | 3500 |
| View | NS2b | non-structural protein NS2b | NS2b | 4172 |
| View | NS3 | non-structural protein NS3 | NS3 | 4562 |
| View | NS4a | non-structural protein NS4a | NS4a | 6431 |
| View | 2k | 2K protein | 2k | 6809 |
| View | NS4b | non-structural protein NS4b | NS4b | 6878 |
| View | NS5 | RNA-dependent RNA polymerase | NS5 | 7631 |

Fig. 15. Ubicación en donde se hibridan los primers YFVC1, YFVNS5_C2 y YFVss_r1. En la Fig. 15a el par de primers YFVC1 hibrida con en el gen que codifica para la proteína no estructural NS5. Para el caso de YFVNS5_C2, la ubicación en donde se unen los primers es en el gen que codifica para la proteína no estructural NS3 y para el par de primer de YFVss_r1, su ubicación es en el gen NS3.

Differentiated hypochromicity at 260 and 282 nm (dA/dT) vs. temperature

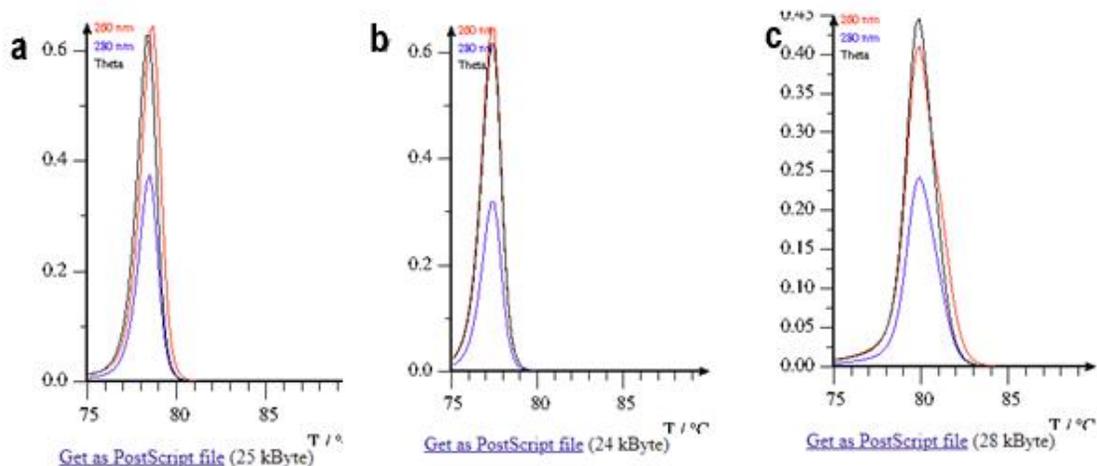


Fig. 16. Curvas diferenciales de disociación con respecto al cambio de temperatura. En la imagen a, se muestra la curva diferencial del producto de acuerdo con el modelado bioinformático realizado en la plataforma Poland para el par de primers YFVC1. La temperatura arrojada producto del ensayo bioinformático de la qPCR es de 78.5°C. En el panel b, se muestra la curva para el par de primers YFVNS5_C2 donde la temperatura es de 77.5°, mientras que en el panel c, la temperatura es de 79.7°C para los primers YFVss_r1.

8.2 Clonación del vector

Para comprobar el funcionamiento de los *primers* diseñados, se utilizó un vector diseñado “pUCIDT-AMP: May Duo 1” que contenía las secuencias del virus Mayaro a amplificar, este vector se clonó en células de *E. coli* químicamente competentes (*One Shot TOP10*), con una eficacia de transformación de 1×10^9 UFC/ μ g de ADN plasmídico, los cuales resultan ideales para la clonación y la propagación plasmídica de alta eficacia.

Para poder diferenciar las clonas positivas (aquellas que fueron transformadas exitosamente) se utilizó un gen de resistencia a la ampicilina y el método de X-Gal dentro del medio LB (Figura 17). El sustrato cromogénico X-gal es hidrolizado por la β -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. De este modo, si X-gal y un inductor de la β -galactosidasa (normalmente IPTG) son disueltos en el medio con agar de una placa de cultivo, las colonias crecidas en la placa que posean el gen *lacZ* funcional (colonias que no se transformaron exitosamente) podrán ser claramente distinguidas por su coloración azul, ya que las colonias transformadas exitosamente serán blancas.

Originalmente se diseñó este vector con la secuencia de interés incluida puesto que conseguir muestras del virus no era tan viable en México, ya que hasta el momento no había datos epidemiológicos de casos confirmados de Mayaro.

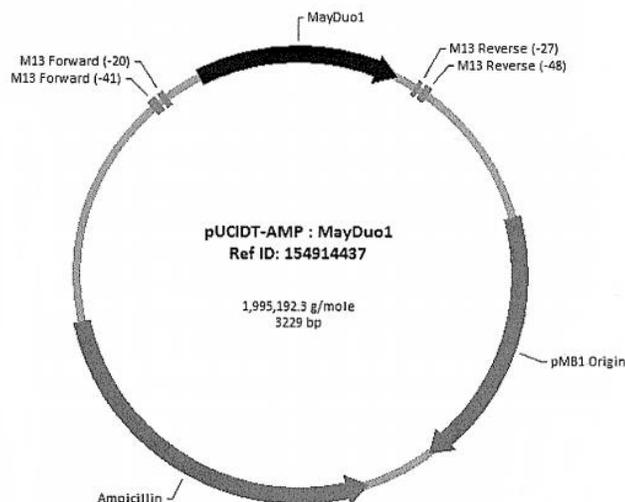


Fig. 17. Mapa del vector diseñado para clonar la secuencia de interés del virus Mayaro. Plásmido: pUCIDT-AMP: MayDuo1

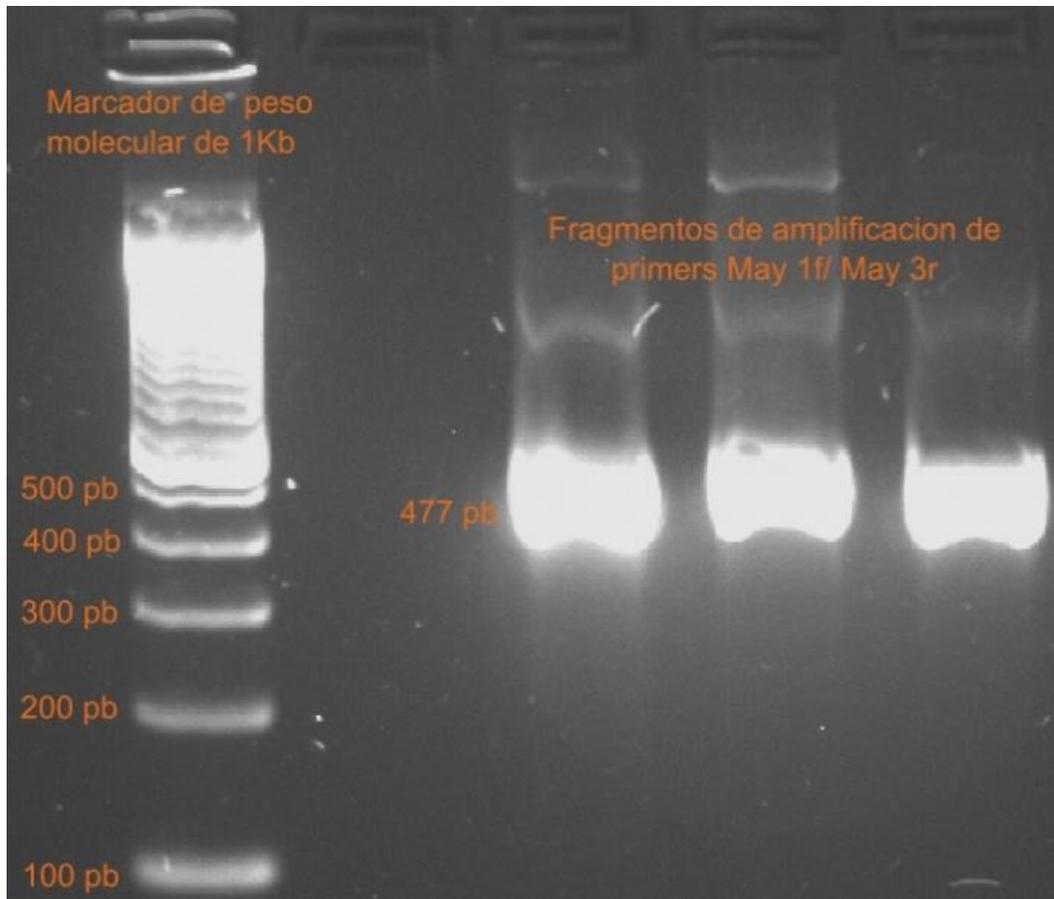


Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación de la PCR con los primers May1 Forward y May3 Reverse.

En la figura 18 se observa el gel de agarosa posterior a la electroforesis, dónde se obtuvo el fragmento deseado de 477 pb correspondiente a la secuencia del virus Mayaro (Figura 19) que contenía el plásmido pUCIDT-AMP: MayDuo1.

```

GCATTCTC GCATCTGGCT ACTAAATTGA TAGAGCAAGA GACCGAAAAA GACACACTCA TCCTGGATAT CGGCAGTGCC
CCTGCCAGGA GAATGCTGTC TGAGCACACG TACCATTGTG TGTGCCCAAT GCGCAGCGCT GAGGACCCAG AGCGTCTGCT
GTATTATGCC AGGAAGTTGG CCAAGGCATC AGGCGAAGTC GTTGACAGAA ACATTGCAGC GAAGATAGAC GACCTGCAGT
CAGTGATGGC GACCCAACGA TAAAACGTGG GAGCAAAAAGA TTAAAACCGT CCTGCAAAAAC CGCAGTGCCA CTGAACTGGT
GTCAGATGAA TTACAGTTTG AAGTCAACCT GACTAGAGTC CATCCGGACA GTAGCCTGGT GGGACGTCCG GGGTACAGCA
CTACCGATGG GACTCTGTAC TCCTACATGG AAGGTAATAA GTTCCACCAG GCGGCTCTTG ACATGGCTGA GATCACGAC

```

Fig. 19. Secuencia del inserto del virus Mayaro (MayDuo1). Tamaño del inserto 477 pb.

La transformación con el vector diseñado (Figura 17) no fue tan exitosa como se esperaba, ya que al momento de extraer y cuantificar el material genético de las clonas seleccionadas, la concentración del mismo era baja para realizar los ensayos de PCR.

Posteriormente, se procedió a extraer el fragmento que contenía las secuencias del virus Mayaro, por medio de una PCR punto final, para la cual se utilizó la combinación del primer May1 forward y May3 reverse para obtener el inserto del virus Mayaro completo (Figura 19). Finalizada la PCR, se realizó electroforesis en un agarosa al 2% con los productos de amplificación para corroborar que se obtuvo el fragmento de interés de una longitud de 477 pb. En la imagen 18 se observa el producto amplificado de interés correspondiente a las secuencias del virus Mayaro para su posterior ligación a otro vector comercial (pGEM®-T Easy).

Se optó por utilizar el vector prelinealizado por la practicidad que presenta el mismo, contiene salientes 3'-T en el sitio de inserción para proporcionar un saliente compatible para productos de PCR. Se utilizaron los mismos métodos de clonación del vector: células competentes aunado a un choque térmico y propagación de células competentes (Tabla 4) y los criterios de exclusión para las clonas seleccionadas (crecidas en el medio solido LB con ampicilina 100µg/ml y que no tuvieran pigmentación azul debido al 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol), ya que los promotores de la ARN polimerasa T7 y SP6 flanquean una región de clonación múltiple dentro de la región codificante del péptido α para la β-galactosidasa.

La inactivación por inserción del péptido α permite identificar directamente los clones recombinantes mediante detección azul/blanca en placas indicadoras (Figura 20).

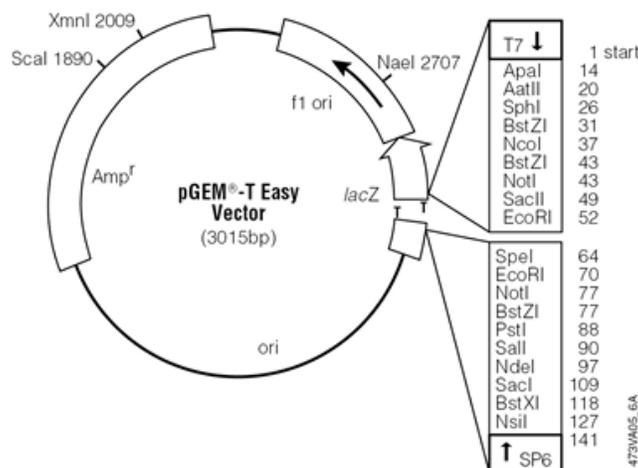


Fig. 20. Mapa del vector comercial utilizado para la ligación del producto de PCR extraído de las bandas correspondientes a la figura 17 y la secuencia del inserto en formato FASTA ligado al vector.

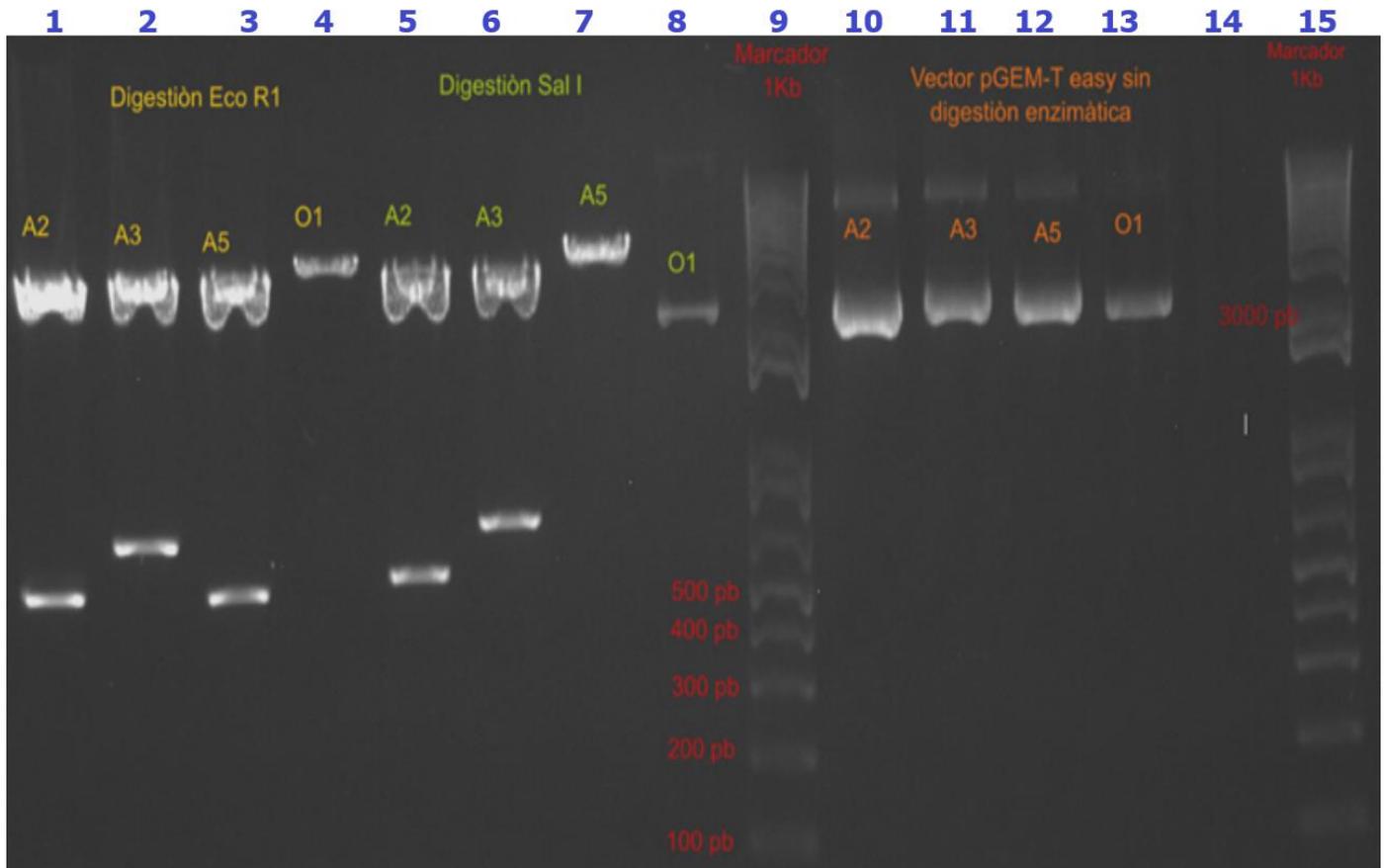


Fig. 21. Restricción enzimática de Eco R1 y Sal I de las ligaciones.

Se realizó electroforesis con gel de agarosa 1% para comprobar que las colonias seleccionadas presentaran el plásmido, para ello se utilizaron las enzimas de restricción Sall (verde) que tiene un sitio de corte y linealizar el plásmido, por lo cual solo se esperaba observar una única banda. Mientras que la enzima EcoRI (amarillo) presenta dos sitios de corte dentro del vector, lo cual da como resultado 2 bandas, una perteneciente al fragmento de interés (477 pb) y otra al vector linealizado sin el inserto (3015pb). Por último, como controles positivos se corrieron las muestras sin digestión enzimática (naranja) y para ubicar las bandas se utilizó un marcador de peso molecular de 1Kb (rojo).

En la Figura 21 se muestran los resultados de la digestión enzimática con EcoRI y Sall. En los pozos 1-4 se colocaron muestras de diferentes colonias (A2, A3, A4 y O1), digeridas con EcoRI y fue posible observar dos bandas, una de aproximadamente 3000

pb, lo cual corresponde con el peso molecular del vector linealizado (3015 pb) y una banda más de aproximadamente 400 pb, la cual corresponde al fragmento que contiene las secuencias del virus Mayaro (477 pb),

Para las muestras digeridas con Sall (pozos 5-8), se esperaba observar una única banda correspondiente al vector linealizado, sin embargo, para las muestras de las colonias A2 y A3 se obtuvieron productos inesperados.

Con lo anterior, se descartaron las clonas A2 y A3, ya que, aunque con EcoRI se observaron las bandas esperadas, indicando que el inserto había ligado exitosamente, tras la digestión con Sall, se observó una banda extra, la cual, posiblemente, se tratará de genoma bacteriano. Por lo tanto, se optó por trabajar con la clona A5 y para corroborar que se tratara de Mayaro, se procedió a secuenciar su genoma (Fig. 22)

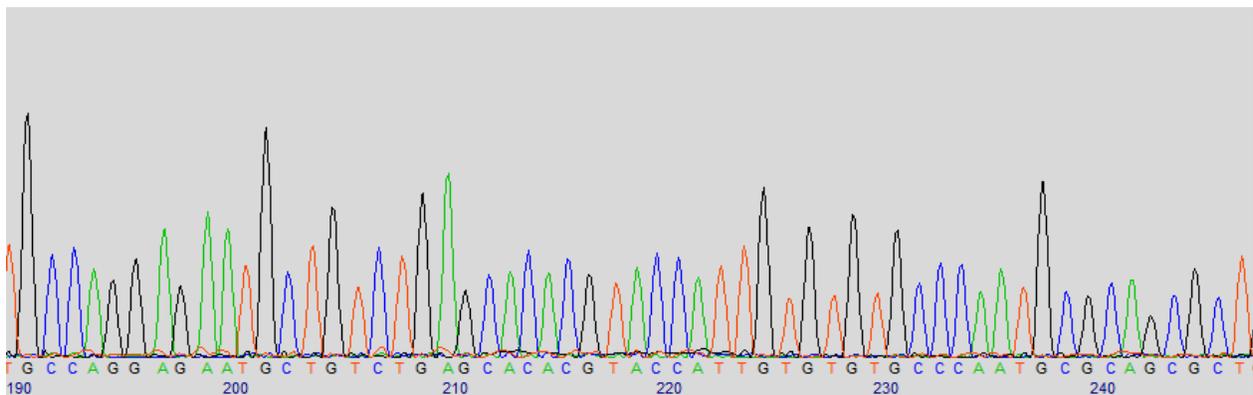


Fig. 22. Secuenciación del inserto de la extracción de las minipreps por el método de Sanger. Fragmento de la secuenciación realizada al material genético de la clona seleccionada "A5".

Gracias a esta secuenciación se pudo corroborar que las secuencias que ligaron al vector realmente pertenecían al virus de Mayaro para el caso de la clona "A5" ya que al comparar la secuencia resultante del ensayo se mapeó la secuencia en *Blastn* contra todo aquello que tuviera similitud en la secuencia, arrojando que la secuenciación era compatible con las secuencias de Mayaro que existían en la base de la herramienta *Blastn*. Lo cual también apoya el hecho de que el resto de las clonas seleccionadas aparte del material genético de interés también contenían posible material genético bacteriano.

Una vez que se comprobó que el fragmento aislado del plásmido de la clona A5 pertenecía al virus Mayaro, se obtuvieron las curvas diferenciales de disociación de los productos obtenidos de los cebadores de May1 y May3.

Las T_m experimentales obtenidas de la qPCR de los productos distan 3°C en promedio con respecto a las obtenidas en los ensayos *in silico* de la plataforma bioinformática Poland.

En la figura 23 se muestran las curvas diferenciales de cada uno de los productos. El par de *primers* May1, da como resultado un producto con una curva diferencial de disociación con una $T_m = 86.92$ °C y, para el caso de May3, una $T_m = 84.77$ °C, la diferencia es de casi 2 °C entre productos del mismo virus, asimismo, no se observaron productos inespecíficos que pudieran interferir con la interpretación de resultados.

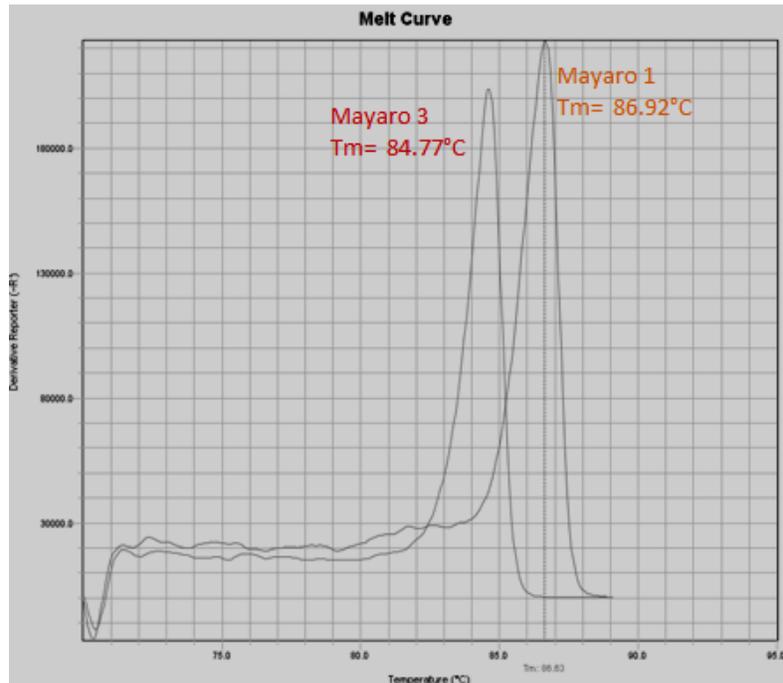


FIG. 23. Comparación de curvas diferenciales de disociación obtenidas de forma experimental con los primers diseñados May1 y May3 posterior a la corrida de qPCR.

Una vez que conocíamos los valores de T_m para los *primers* May1 y May3, se realizaron ensayos de amplificación. Para ello, se llevaron a cabo una serie de diluciones para determinar la concentración ideal para realizar las PCR. El stock que se utilizó tenía una concentración de 500 pg/μl y posteriormente se realizó una dilución con una concentración final de 10^7 copias/ 2 μl para realizar el gradiente de dilución del plásmido

(10^7 a 10^0 copias) y así determinar el nivel de detección del ensayo y de esa manera estandarizarlo.

Tabla 13. Diluciones de la miniprep seleccionada que contenía el inserto de Mayaro

| STOCK | | | | | |
|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---|
| Sample ID | Concentración inicial [Pg/ μ L] | Vol. Plásmido DNA (μ L) | Vol. Buffer DP (μ L) | Vol. Final (μ L) | Concentración final [Pg/ μ L] |
| pMay-A5 | 223850 | 2,23 | 997,77 | 1000 | 500 |
| DILUCIÓN | | | | | |
| Pg de plásmido (1 copia) | Concentración inicial [Pg/ μ L] | Copias plásmido totales | Vol. stock (μ L) | Vol. Buffer EB (μ L) | Concentración final [copias plásmido/2 μ L] |
| 3.539E-06 | 500 | 1,41E+08 | 35,39 | 964,61 | 1.00E+07 |

Se realizaron ensayos de amplificado para los pares de primers May1 y May3 en dos situaciones: (a) sin condiciones de pre amplificado empleando *EvaGreen* como intercalante, en éste, el límite de detección fue de 10^3 copias (1000 copias/ 2 μ l de muestra), este fue el mismo resultado posterior a realizar el mismo ensayo por triplicado, donde el límite de detección se alcanza entre los ciclos 26 al 30 de la reacción (Fig. 24); (b) con condiciones de pre amplificado usando como agente intercalante *SSoFast*, el límite de detección entre réplicas (3) fue de 10^1 (10 copias/2 μ l), alcanzando éste límite entre los ciclos 16 – 20 de la reacción (Fig. 25).

Comparando ambos resultados, es notable qué los ensayos con condiciones de pre amplificado tuvieron un mayor rendimiento y un límite de detección 100 veces mayor que sin pre amplificado.

Dentro de las variables utilizadas en este ensayo se utilizó la concentración de *primers* donde se observó que la amplificación y el tamaño de las curvas eran similar para ambos ensayos, pero se observó que a mayor concentración de cebadores observábamos algunos productos inespecíficos.

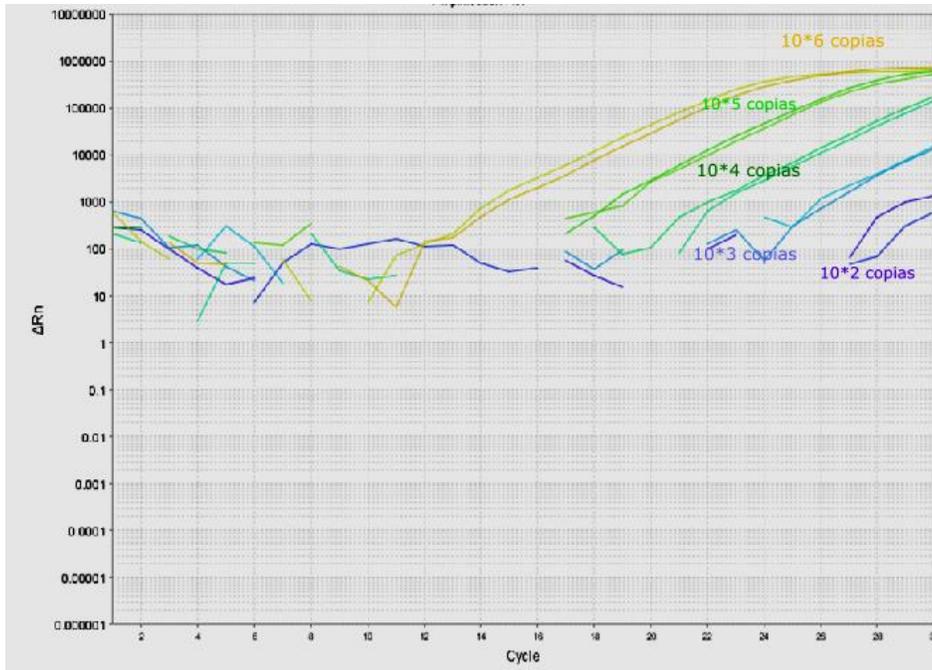


Fig. 24. Curvas de amplificación resultantes del ensayo de gradiente de concentración de la clona A5 utilizando EvaGreen como agente intercalante y sin condiciones de preamplificado de la muestra.

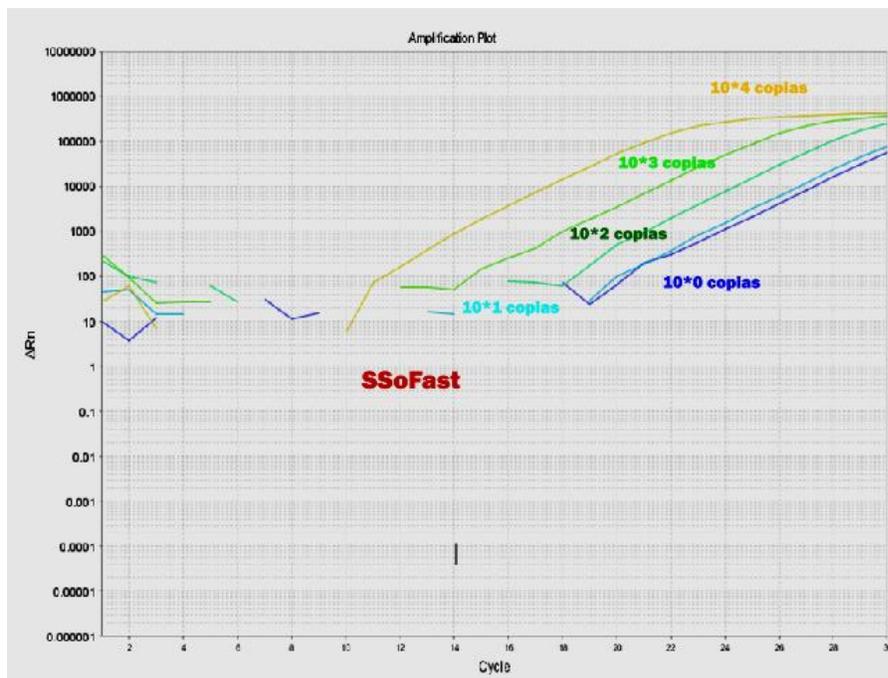


Fig. 25. Curvas de amplificación resultantes del ensayo de gradiente de concentración de la clona A5 utilizando SsoFast EvaGreen Supermix como agente intercalante y aplicando condiciones de preamplificado de la clona.

Una vez comprobado el límite y rendimiento de la reacción a través de gradientes de concentración de la clona A5 (Tabla 13 y figura 25) se observó el comportamiento *in vitro* del ensayo dando óptimos resultados, el siguiente paso fue comprobar la especificidad de los *primers* diseñados, por lo cual se llevó a cabo el ensayo de qPCR +HRM con condiciones de pre amplificación de una muestra positiva para otro arbovirus, que en este caso fue una muestra positiva para el virus Chikungunya. Esta muestra fue proporcionada por el CIENI para poder comprobar la especificidad de los *primers* diseñados y asegurar que estos cumplirían su función dentro del panel de detección que se pretendía ampliar. En la figura 26a podemos observar la curva diferencial de disociación, en la cual se observan dos picos correspondientes a May1, con su respectivo control positivo que fue el material obtenido de la clona A5 con una $T_m = 86.89\text{ }^{\circ}\text{C}$, los cual corresponde con la temperatura obtenida en el ensayo de comparación de las curvas diferenciales obtenidas del ensayo con ambos pares de *primers* (Fig, 23).

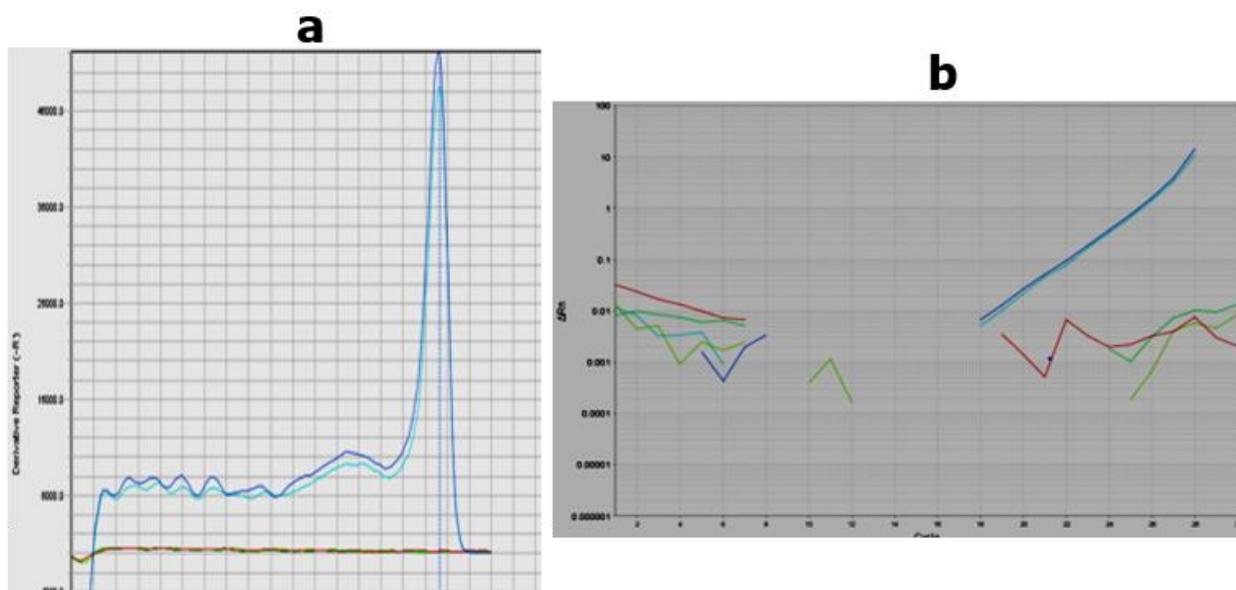


Fig. 26. Ensayo con muestra positiva confirmada para arbovirus (Chikungunya), con el par de *primers* May1.

En las figuras 26 y 27 se puede observar que los *primers* para Mayaro funcionan de manera adecuada ya que, dentro del ensayo solo se observan las curvas correspondientes a los controles positivos de ambos pares de *primers* (Figuras 26 y 27),

las cuales podemos observar claramente en ambos ensayos como las líneas de color azul no amplificaron ningún producto inespecífico que pudiera interferir con la interpretación de resultados o con la reacción misma. Gracias a este ensayo, se pudo corroborar la especificidad *in vitro* de los *primers* diseñados para el virus de Mayaro, ya que al incluir en el ensayo una muestra confirmada para otro arbovirus de la misma familia y solamente se obtuvieran las curvas correspondientes a los controles positivos, habla del óptimo funcionamiento de los mismos.

Una vez determinada la especificidad de los *primers*, se procedió a colocar los pares de May1/May3 en el panel de detección para arbovirus “*Arbomix*,” para corroborar que el ensayo funcionara de manera adecuada sin la formación de productos inespecíficos entre cebadores, los cuales pudieran interferir con la lectura de los resultados del ensayo o disminuir el rendimiento de la reacción, ya que al coexistir distintos pares de *primers* en el mix de reacción, existe la posibilidad de que al ser secuencias cortas de material genético, éstas puedan ser complementarias entre sí, dando lugar a productos inespecíficos, los cuales pudiesen confundirse con las curvas de amplificación esperadas para cada una de los controles positivos de cada uno de los virus conforman el panel de detección.

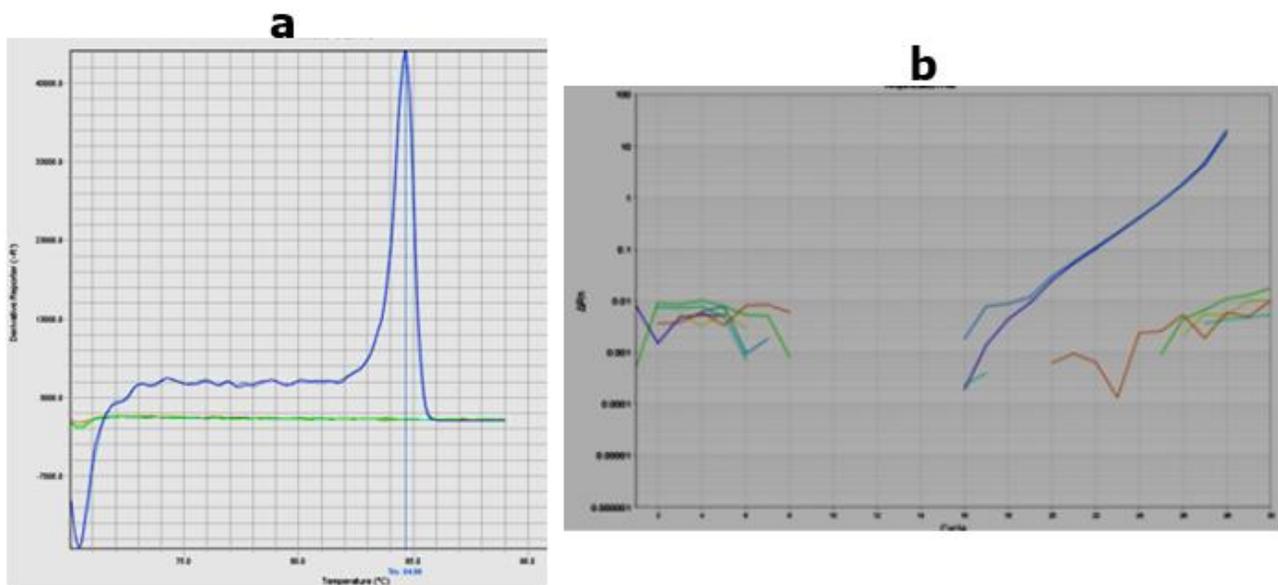


Fig. 27. Ensayo con muestra positiva confirmada para arbovirus (Chikungunya), con el par de primers May3.

El ensayo de *Arbomix* cuenta actualmente con una plataforma de detección para virus del Dengue en sus diversos serotipos, virus de la fiebre del Nilo (WNV), virus del Zika, virus de Chikungunya y Mayaro, recientemente añadido.

En la figura 28 podemos observar la amplificación de las curvas de disociación con sus respectivos controles positivos de A) Dengue1/Tm= 78.61°C, B) WNV/ Tm= 79°C, C) Zika/ Tm= 80.32°C, D) Dengue4/Tm=81.45, E) May3/ Tm=84.56°C, F) Chikungunya/Tm=85.46 y G) May1/ Tm= 86.68. En la imagen se pueden observar siete picos correspondientes a las curvas diferenciales de disociación de cada uno de los virus que conforman el panel, se llevó a cabo de esa manera para que se pudieran observar de manera adecuada que cada una de las curvas tiene una Tm específico y son perfectamente diferenciables, lo cual facilita el diagnóstico. Dentro del mismo ensayo se incluyeron muestras de pacientes aleatorias para de la misma forma evaluar la reacción de manera adecuada, funcionando como el panel de detección ampliado, en la parte derecha de la imagen se muestra el *layout* del ensayo.

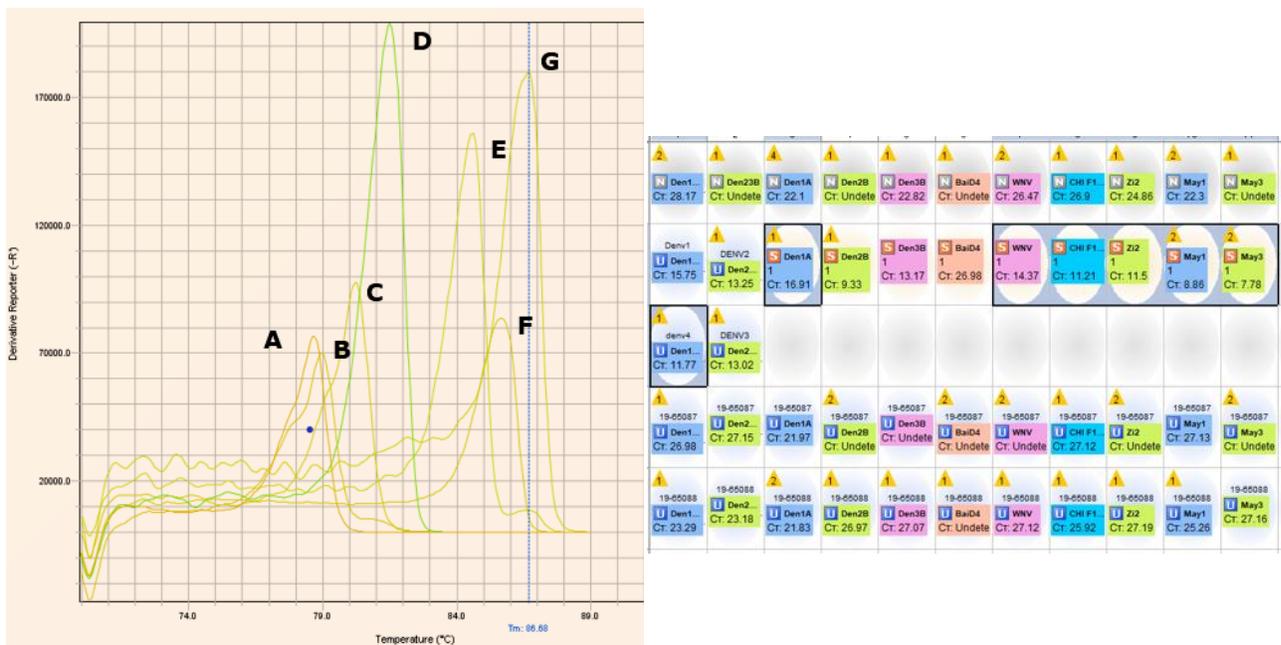


Fig. 28. Comportamiento de cebadores de Mayaro en el pool de cebadores Arbomix.

9. CONCLUSIONES

Los arbovirus están entre los agentes más comunes de la enfermedad febril humana en todo el mundo y los patógenos emergentes más importantes que han causado epidemias notables de enfermedades humanas en las últimas décadas. Es por ello que, en un mundo globalizado, donde la movilidad humana a través de todo el mundo, la deforestación para satisfacer necesidades humanas y demás actividades es inevitable, permite cada vez más la interacción entre virus que permanecían en forma silvestre, vectores y humanos, lo que hace de una epidemia una posibilidad latente como se vivió en los años recientes.

A pesar de la relevancia de salud pública de los arbovirus, poco se sabe de su distribución geográfica, el impacto relativo y los factores de riesgo para la infección por arbovirus en muchas regiones del mundo. Es por ello que proyectos como este, tienen gran relevancia, ya que es de suma importancia la rápida y precisa detección del agente infeccioso, para poder brindar datos epidemiológicos lo más exactos posibles y así poder ofrecer un esquema de tratamiento adecuado además de promover la investigación en torno a agentes emergentes y la posibilidad de una pandemia derivada de estos.

Por lo tanto, es de relevancia médica y epidemiológica la constante ampliación de este panel de arbovirus “Arbomix”, por la emergencia y reemergencia siempre latente de enfermedades humanas causadas por arbovirus, en países como México es vital métodos de detección, rápidos, de menor costo y específicos, para poder mejorar los datos epidemiológicos en un país donde no existe la cultura de la prevención y la salud. Es por ello por lo que el panel de detección fue actualizado con los virus de Fiebre Amarilla, Usutu y Mayaro donde el diseño de primers se llevó a cabo de manera satisfactoria, donde en los ensayos bioinformáticos para evaluar el comportamiento de los mismos resultado de forma satisfactoria.

Para integrar los primers de Mayaro al panel de detección se estandarizaron las condiciones necesarias de funcionamiento para el ensayo de RT-qPCR + HRM en el cual está basado el panel de detección “Arbomix”, resultando de forma exitosa la ampliación del panel con el virus Mayaro, para los ensayos *in vitro* para la ampliación del panel se utilizaron únicamente los primers de Mayaro, debido al material y tiempo disponible en el laboratorio. Pero eso no exime que el panel siga en ampliación para así poder brindar un método eficiente y preciso de detección de arbovirus, como el del presente trabajo.

10 REFERENCIAS

- Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J.-M., & Ramírez-Santana, C. (2018). Mayaro: An emerging viral threat? *Emerging Microbes & Infections*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>
- Ali, S., Gugliemini, O., Harber, S., Harrison, A., Houle, L., Ivory, J., Kersten, S., Khan, R., Kim, J., LeBoa, C., Nez-Whitfield, E., O'Marr, J., Rothenberg, E., Segnitz, R. M., Sila, S., Verwillow, A., Vogt, M., Yang, A., & Mordecai, E. A. (2017). Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), e0005135. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005135>
- Alonso-Palomares, L. A., Moreno-García, M., Lanz-Mendoza, H., & Salazar, M. I. (2018). Molecular Basis for Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Intervirology*, 61(6), 255-264. <https://doi.org/10.1159/000499128>
- Armstrong, P. M., Ehrlich, H. Y., Magalhaes, T., Miller, M. R., Conway, P. J., Bransfield, A., Misencik, M. J., Gloria-Soria, A., Warren, J. L., Andreadis, T. G., Shepard, J. J., Foy, B. D., Pitzer, V. E., & Brackney, D. E. (2020). Successive Bloodmeals Enhance Virus Dissemination within Mosquitoes and Increase Transmission Potential. *Nature microbiology*, 5(2), 239-247. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0619-y>
- Auvinen, E. (2017). Diagnostic and Prognostic Value of MicroRNA in Viral Diseases. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 21(1), 45-57. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0236-x>
- -Baxter, V. K., & Heise, M. T. (2018). Genetic control of alphavirus pathogenesis. *Mammalian Genome*, 29(7), 408-424. <https://doi.org/10.1007/s00335-018-9776-1>
- -Brown, R. S., Wan, J. J., & Kielian, M. (2018). The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew. *Viruses*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/v10020089>
- Caracciolo, I., Mora-Cardenas, E., Aloise, C., Carletti, T., Segat, L., Burali, M. S., Chiarvesio, A., Totis, V., Avšič-Županc, T., Mastrangelo, E., Manfroni, G., D'Agaro, P., & Marcello, A. (2020). Comprehensive response to Usutu virus following first isolation in blood donors in the Friuli Venezia Giulia region of Italy: Development of recombinant NS1-based serology and sensitivity to antiviral drugs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(3), e0008156. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008156>
- Cardona-Ospina, J. A., Jiménez-Canizales, C. E., Vásquez-Serna, H., Garzón-Ramírez, J. A., Alarcón-Robayo, J. F., Cerón-Pineda, J. A., & Rodríguez-Morales, A. J. (2018). Fatal Dengue, Chikungunya and Leptospirosis: The Importance of Assessing Co-infections in Febrile Patients in Tropical Areas. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 3(4), 123. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3040123>
- *Chikungunya—OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. (s. f.). Recuperado 15 de enero de 2024, de <https://www.paho.org/es/temas/chikungunya>
- Chippaux, J.-P., & Chippaux, A. (2018). Yellow fever in Africa and the Americas: A historical and epidemiological perspective. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 24, 20. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0162-y>
- Clé, M., Beck, C., Salinas, S., Lecollinet, S., Gutierrez, S., Van de Perre, P., Baldet, T., Foulongne, V., & Simonin, Y. (2019). Usutu virus: A new threat? *Epidemiology and Infection*, 147, e232. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001213>
- *Dengue—OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. (s. f.). Recuperado 15 de enero de 2024, de <https://www.paho.org/es/temas/dengue>

- Diagne, C. T., Bengue, M., Choumet, V., Hamel, R., Pompon, J., & Missé, D. (2020). Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. *Pathogens*, 9(9), 738. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090738>
- Escobar-Chaparro, R. A., Guillén, G., Espejo-Galicia, L. U., Meza-Villalvazo, V. M., Peña-Castro, J. M., & Abad-Zavaleta, J. (2017). qPCR and HRM-based diagnosis of SNPs on growth differentiation factor 9 (GDF9), a gene associated with sheep (*Ovis aries*) prolificacy. *3 Biotech*, 7(3), 204. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0837-z>
- *Fiebre amarilla—OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. (s. f.). Recuperado 15 de enero de 2024, de <https://www.paho.org/es/temas/fiebre-amarilla>
- Giancchetti, E., Cianchi, V., Torelli, A., & Montomoli, E. (2022). Yellow Fever: Origin, Epidemiology, Preventive Strategies and Future Prospects. *Vaccines*, 10(3), 372. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030372>
- Girard, M., Nelson, C. B., Picot, V., & Gubler, D. J. (2020). Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine*, 38(24), 3989-3994. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.04.011>
- Gould, E., Pettersson, J., Higgs, S., Charrel, R., & de Lamballerie, X. (2017). Emerging arboviruses: Why today? *One Health*, 4, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>
- Gubler, D. J. (2001). Human arbovirus infections worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951, 13-24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x>
- Huang, Y.-J. S., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2019). Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00022>
- Kerkhof, K., Falconi-Agapito, F., Van Esbroeck, M., Talledo, M., & Ariën, K. K. (2020). Reliable Serological Diagnostic Tests for Arboviruses: Feasible or Utopia? *Trends in Microbiology*, 28(4), 276-292. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.11.005>
- Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. S., & Dye, C. (2016). Zika: The origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bulletin of the World Health Organization*, 94(9), 675-686C. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.171082>
- Kleinert, R. D. V., Montoya-Diaz, E., Khera, T., Welsch, K., Tegtmeyer, B., Hoehl, S., Ciesek, S., & Brown, R. J. P. (2019). Yellow Fever: Integrating Current Knowledge with Technological Innovations to Identify Strategies for Controlling a Re-Emerging Virus. *Viruses*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/v11100960>
- Kuno, G., & Chang, G.-J. J. (2005). Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 608-637. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.608-637.2005>
- Laureti, M., Narayanan, D., Rodriguez-Andres, J., Fazakerley, J. K., & Kedzierski, L. (2018). Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Frontiers in Immunology*, 9, 2180. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02180>
- Lorenz, C., Azevedo, T. S., Virginio, F., Aguiar, B. S., Chiaravalloti-Neto, F., & Suesdek, L. (2017). Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(9), e0005959. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005959>
- Muller, D. A., Depelseñaire, A. C. I., & Young, P. R. (2017). Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(suppl_2), S89-S95. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw649>
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 487-524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>

- Peters, R., & Stevenson, M. (2019). Zika virus diagnosis: Challenges and solutions. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(2), 142-146. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.12.002>
- Ramakrishnan, R., Qin, J., Jones, R. C., & Weaver, L. S. (2013). Integrated Fluidic Circuits (IFCs) for digital PCR. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 949, 423-431. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-134-9_27
- Rey, F. A., Stiasny, K., & Heinz, F. X. (2017). Flavivirus structural heterogeneity: Implications for cell entry. *Current opinion in virology*, 24, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.009>
- Sieg, M., Schmidt, V., Ziegler, U., Keller, M., Höper, D., Heenemann, K., Rückner, A., Nieper, H., Muluneh, A., Groschup, M. H., & Vahlenkamp, T. W. (2017). Outbreak and Cocirculation of Three Different Usutu Virus Strains in Eastern Germany. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 17(9), 662-664. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2096>
- -Słomka, M., Sobalska-Kwapis, M., Wachulec, M., Bartosz, G., & Strapagiel, D. (2017). High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping—Limitations and Caveats in Practical Case Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112316>
- Tajudeen, Y. A., Oladunjoye, I. O., Mustapha, M. O., Mustapha, S. T., & Ajide-Bamigboye, N. T. (2021). Tackling the global health threat of arboviruses: An appraisal of the three holistic approaches to health. *Health Promotion Perspectives*, 11(4), 371-381. <https://doi.org/10.34172/hpp.2021.48>
- Vali, Z., Raz, A., Bokharaei, H., Nabavi, M., Bemanian, M. H., Yazdi, M. S., & Djadid, N. D. (2014). Development of a High-resolution Melting Analysis Method Based on SYBR Green-I for rs7216389 Locus Genotyping in Asthmatic Child Patients. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 6(2), 72-80.
- Villinger, J., Mbaya, M. K., Ouso, D., Kipanga, P. N., Lutomiah, J., & Masiga, D. K. (2017). Arbovirus and insect-specific virus discovery in Kenya by novel six genera multiplex high-resolution melting analysis. *Molecular Ecology Resources*, 17(3), 466-480. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12584>
- Wang, T., Yu, C., & Xie, X. (2022). Microfluidics for Environmental Applications. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 179, 267-290. https://doi.org/10.1007/10_2020_128
- Weaver, S. C., Charlier, C., Vasilakis, N., & Lecuit, M. (2018). Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annual Review of Medicine*, 69, 395-408. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>
- Wilder-Smith, A., Gubler, D. J., Weaver, S. C., Monath, T. P., Heymann, D. L., & Scott, T. W. (2017). Epidemic arboviral diseases: Priorities for research and public health. *The Lancet. Infectious Diseases*, 17(3), e101-e106. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30518-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30518-7)
- Young, P. R. (2018). Arboviruses: A Family on the Move. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1062, 1-10. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_1
- Zika—OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. (s. f.). Recuperado 15 de enero de 2024, de <https://www.paho.org/es/temas/zika>