



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

**SOLICITUD DE TÉRMINO
DE SERVICIO SOCIAL**

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : Maetzin Villafranca Martínez	
Matrícula : 2123075296	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica <input type="checkbox"/>
Domicilio : Av San Pablo #396 B3 Dep 403 Col. San Martín Xochinahuac 02120	
Teléfono : 5518280714	Celular :
Correo Electrónico : maetzinvillafranca@outlook.com	CURP : VIMM930617MDFLRT08

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Diagnóstico Diferencial de Dengue, Chikungunya y Zika mediante RT-PCR genéricos durante el año 2016 en México							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos							
Dependencia : Gobierno							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Alvaro Obregón	Localidad : Francisco de P.Miranda 177, Lomas de Plateros						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	21	2	2018		21	8	2018

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 3.- Público <input type="checkbox"/>	Tipo: 1.- Externo <input type="checkbox"/>
Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición <input type="checkbox"/>	

FIRMAS

Dra. Ana Laura Esquivel Campos No. Eco.33148

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Maet

Villafranca Martínez Maetzin

Alumno
Nombre, firma

Vázquez Pichardo Mauricio

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Se Lipo

Felipe MendozaPérez

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE)

CARTA TÉRMINO SERVICIO SOCIAL

Ciudad de México, a 5 de marzo del 2021

A QUIEN CORRESPONDA

C.D.E. PATRICIA ENZALDO DE LA CRUZ

P R E S E N T E

Por este conducto hacemos constar que la alumna Maetzin Villafranca Martínez, estudiante de la carrera de Químico Fármaco Biólogo, con número de matrícula 2123075296, ha concluido satisfactoriamente el servicio social, en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE), con el programa Sistema para el Diagnóstico de Laboratorio con Impacto en salud Pública, se realizó en un periodo comprendido del 21 de febrero del 2018 al 21 de agosto del 2018, con un horario de 8:00 a 12:00, cubriendo un total de 480 horas efectivas de trabajo.

Atentamente



Edgar Adrián Ponce Lerma
Responsable de Gestión para la Capacitación



M. en C. Mauricio Vázquez Pichardo
Jefe del Laboratorio de Arbovirus

Sección/Serie: 153

FJMP/eapl

Francisco de P. Miranda No. 177, Col. Lomas de Plateros, D.T. Álvaro Obregón, CP. 01480, Ciudad de México
Tel: (55) 5342 7550 y (55) 5062 1600 Ext. 59342 www.gob.mx/salud





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

Ciudad de México, 9 de junio de 2021

C.D.E Patricia Enzaldo de la Cruz
Coordinadora de Servicio Social

Por medio de la presente informo a usted que la alumna Maetzin Villafranca Martínez con número de matrícula 2123075296, quién cursó la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica ha concluido satisfactoriamente su servicio social en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico en el laboratorio de Arbovirus y virus hemorrágicos, con el proyecto denominado, “Diagnóstico Diferencial de Dengue, Chikungunya y Zika mediante RT-PCR genéricos durante el año 2016 en México”, en el periodo comprendido del 21 de febrero de 2018 al 21 de agosto de 2018, cumpliendo con un total de 480 horas como marca el reglamento de Servicio Social.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

M en C Mauricio Vázquez Pichardo

Dra. Ana Laura Esquivel Campos
No. Eco. 33148

Ciudad de México, 01 de febrero del 2021

C.D.E Patricia Enzaldo de la Cruz

Coordinadora de servicio social de la DCBS

Por medio de la presente me permito comunicarle que la Maetzin Villafranca Martínez, matrícula 2123075296 de Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica quien registró el proyecto servicio social "Referencia diagnóstica de Arbovirus en México durante 2016-2017, para coadyuvar en la oportuna aplicación de medidas de prevención y control de vectores". Del 21 de febrero al 21 de agosto 2018 cubriendo un total de 480 horas. Por falta de la infraestructura necesaria para la realización del proyecto antes mencionado, se decidió cambiar el tema del proyecto a "Diagnóstico Diferencial de Dengue, Chikungunya y Zika mediante RT-PCR".

ATENTAMENTE



Dra. Ana Laura Esquivel Campos

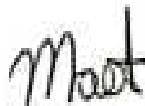
No. Econ. 33148

Asesora Interna



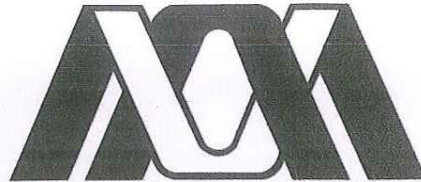
M. en C. Mauricio Vázquez Pichardo

Asesor externo



Maetzin Villafranca Martínez

2123075296



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco**

Departamento de Sistemas Biológicos.

Carrera: Químico Farmacéutico Biólogo.

**Diagnóstico Diferencial de Dengue, Chikungunya y Zika mediante RT-PCR
genéricos durante el año 2016 en México**

Alumna: Villafranca Martínez Maetzin

Matricula: 2123075296

Asesores:

**Dra. Ana Laura Esquivel Campos
No. Eco. 33148**

M. en C. Mauricio Vázquez Pichardo

Índice

1. Introducción	7
2. Marco teórico	7
2.1 Arbovirus.....	7
2.2 Flavivirus.....	8
2.2.2 Dengue	11
2.3 Alfavirus	12
2.3.1 Chikungunya.....	13
2.4 Datos epidemiológicos.....	15
3. Justificación.....	17
4. Objetivos	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares	18
5. Desarrollo experimental	19
5.1 Selección de las muestras	19
5.2 Extracción de ácidos nucleicos totales	19
5.3 RT-q PCR tioplex CDC.....	20
5.6 RT-PCR Genérico flavivirus punto final	23
5.7 RT/PCR genérico Alfavirus / PCR genérico Alfavirus (anidado)	23
5.8 Electroforesis.....	24
5.9 RT-qPCR múltiplex (detección de otros Flavivirus)	24
5.10 RT-qPCR múltiplex (detección de otros Alfavirus).....	25
5.11 RT-q PCR con SYBER Green (MAYV).....	26
6. Resultados.....	26
7. Discusión	30
8. Conclusiones.....	33
9. Recomendaciones.....	34
10. Bibliografía	35
11. Resumen.....	38

1. Introducción

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) son padecimientos causados por agentes patógenos¹. Las ETV representan más del 17% de las enfermedades infecciosas a nivel mundial¹, especialmente en regiones tropicales y subtropicales, donde son consideradas enfermedades endémicas. Se distinguen entre 300 a 400 especies de las cuales un tercio afecta al ser humano y 40% causan cuadros clínicos definidos².

Las enfermedades producidas por arbovirus son un problema muy grave a nivel mundial, debido a que su vigilancia y prevención implica también la vigilancia de sus vectores, lo que hace difícil su control y casi imposible evitar su expansión a cualquier país tropical o subtropical, e incluso algunas regiones templadas³. En México el Dengue, la fiebre Chikungunya y la enfermedad por virus Zika, son consideradas entre las más importantes, son reconocidas como prioritarias para la vigilancia epidemiológica y los programas de control de vectores⁴.

Las enfermedades causadas por estos arbovirus suelen presentarse de forma epidémica y su manifestación clínica es muy similar, lo que favorece las complicaciones de un diagnóstico preciso. La introducción de nuevos arbovirus al país puede causar problemas en su manejo apropiado, puesto que éstos pueden generar cuadros clínicos similares, lo que puede representar un reto para el diagnóstico clínico, la confirmación por laboratorio y la vigilancia epidemiológica⁵.

Para ello se requiere contar con herramientas que permitan la detección de varios virus que se encuentran en un mismo grupo, posibilitando el diagnóstico de un número mayor de infecciones. Las técnicas utilizadas para diagnóstico y vigilancia deben ser rápidas, simples y deben detectar un amplio número de patógenos con elevada sensibilidad⁶.

2. Marco teórico

2.1 Arbovirus

Los arbovirus es el nombre mnemónico que se le ha dado a un conjunto de virus transmitidos por artrópodos, hematófagos; de ahí su nombre del inglés "Arthropod-Borne Viruses" o "Virus llevados (transmitidos) por artrópodos". Son un grupo taxonómicamente heterogéneo de más de 500 virus; de éstos, aproximadamente 150 causan enfermedades al hombre³. Se dividen en 3 familias principalmente y otra manera de clasificarlos es de acuerdo al tipo de síndrome que ocasionan al ser humano² (ver Figura 1 y 2).

Las enfermedades causadas por estos arbovirus suelen presentarse de forma epidémica y su manifestación clínica es muy similar, lo que favorece las complicaciones de un diagnóstico preciso⁵.

Es precisamente debido a que su vigilancia requiere la guardia de los vectores; las enfermedades causadas por arbovirus son difíciles de prevenir y controlar.

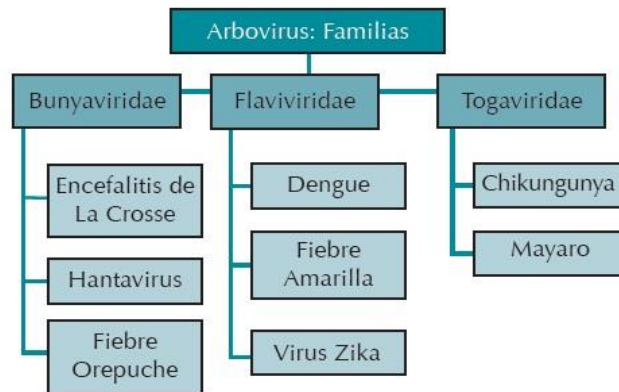


Figura1. Familias pertenecientes al grupo Arbovirus².

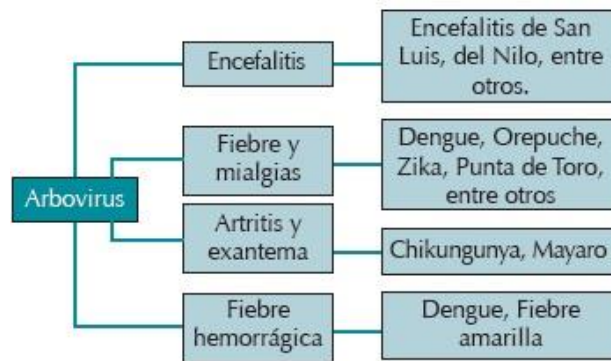


Figura 2. Clasificación según el síndrome que causa².

2.2 Flavivirus

El género *Flavivirus* está conformado por 53 especies virales, entre ellos, el virus del dengue (DENV), el virus Zika (ZIKV), el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del Nilo Occidental (WNV) y el virus de la encefalitis japonesa (JEV)⁷, (ver tala 1 y 2).

La mayoría de los miembros del género flavivirus son arbovirus transmitidos a hospederos vertebrados por un artrópodo vector, bien mosquitos (27 de ellos) o bien garrapatas (12 de ellos), en la cual el virus se replica activamente⁸. Morfológicamente son virus icosaédricos, envueltos, de tamaño pequeño (30-40 nm). Poseen un ARN monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 11.000 nucleótidos que codifica una única poliproteína que da lugar a tres proteínas estructurales (C, M y E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B,

NS5)2. Son responsables de una considerable morbi-mortalidad que puede causar en humanos desde cuadros febriles hasta afecciones graves como encefalitis, fiebres hemorrágicas y hepatitis⁷.

Tabla 1. Flavivirus de mayor importancia para el hombre⁸.

Género / Virus	Hospedador	Modo de transmisión	Enfermedad	Distribución
Flavivirus				
Dengue 1-4	Humano	Mosquito	Fiebre, hemorragia	Mundial
Fiebre Amarilla	Primate/Humano	Mosquito	Hemorragia, hepatitis	África, América
Encefalitis Japonesa	Mamíferos, cerdo	Mosquito	Encefalitis	Asia, Australia
Encefalitis de Saint Louis	Mamíferos, aves	Mosquito	Encefalitis	América
Encefalitis de Murray Valley	Mamíferos, aves	Mosquito	Encefalitis	Australia
West Nile	Aves, humanos, mamíferos grandes y pequeños, ganado	Mosquito garrapatas	Fiebre, encefalitis, meningitis, hemorragia, hepatitis.	África, Europa, Asia, América, Australia, Oriente Medio.
Encefalitis transmitida por garrapata	Mamíferos	Garrapata	Encefalitis	Europa, Asia

2.2.1 Zika características

El Virus Zika se trata de un virus ARN no segmentado monocatenario de polaridad positiva, de aproximadamente 11kb, con una nucleocápside icosaédrica de alrededor de 40-60 nanómetros de diámetro, rodeada de una envuelta⁹. El virus de Zika tiene un marco de lectura abierto (ORF) único, el cual codifica para una poliproteína que da lugar a proteínas tanto estructurales como no estructurales¹⁰:

- 3 proteínas estructurales: C, M y E
- 7 proteínas no estructurales: (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5).

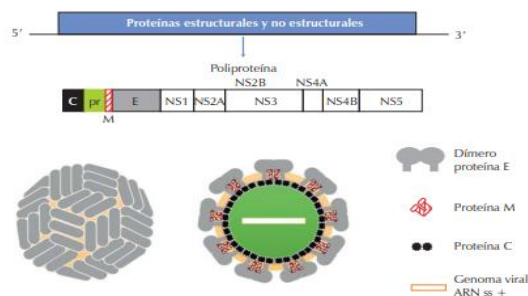


Imagen 1. Genoma y estructura del virus Zika¹⁰.

Mecanismo de replicación

La patogenia de la enfermedad por virus Zika es poco conocida, pero se ha descrito que tiene un fuerte tropismo cutáneo (ectodermo). El virus se replica inicialmente en las células dendríticas, cerca del sitio de inoculación y posteriormente se disemina a los ganglios linfáticos y al torrente sanguíneo¹⁰.

La entrada del virus Zika a la célula hospedera está principalmente mediada por la proteína E, presente en la envoltura viral, que se une a receptores específicos (los posibles receptores celulares son DC-SIGN, AXL, Tyro-3 y TIM-1) y permite la fijación y fusión de la partícula viral a la célula del huésped. Mediante el proceso de endocitosis, el virión entra en el citoplasma de las células. La replicación se produce principalmente en el citoplasma; sin embargo, se ha detectado ARN viral en el núcleo de la célula¹¹. Posteriormente la molécula de ARN es traducida por las enzimas de la célula huésped, para hacer una proteína larga la cual, por un corte proteolítico, da lugar a las proteínas estructurales y no estructurales¹¹.

Las proteínas no estructurales se unen al retículo endoplásmico (RE), donde forman un complejo que permite la replicación del ARN viral, las nuevas partículas virales brotan hacia el interior del RE y toman un pedazo pequeño de la membrana del RE, la cual formara parte de la envoltura viral. A continuación, las partículas viajan a través del aparato de Golgi, donde son procesadas todavía más antes de ser liberadas hacia la superficie de la célula¹¹. La replicación viral desencadena una respuesta inmune antiviral innata con producción de interferón de tipo 1. El resultado de la infección está dado por la competencia entre la replicación viral y la respuesta inmune del hospedero¹¹.

Trasmisión

El virus de Zika se transmite a las personas por la picadura de mosquitos infectados, los mosquitos son principalmente del género *Aedes* y sobre todo de *Aedes aegypti* que se encuentran regiones tropicales¹².

Además, el virus puede transmitirse de la madre al feto durante el embarazo, también por transfusiones de sangre y trasplantes de órganos¹², de igual manera se ha reportado casos en Texas y Colorado que se transmite por vía sexual, no obstante, se desconoce la dosis infectiva mínima.

Las manifestaciones clínicas son: fiebre moderada 37.8°C a 38°C, artralgias en manos y pies, dolor de cabeza, conjuntivitis no purulenta, erupción cutánea maculopapular, mialgias, dolor retroorbital y vómito. Las complicaciones neurológicas son Síndrome Guillain-Barré: la cual es una enfermedad del sistema nervioso en el que el propio sistema inmunitario de la persona daña las neuronas y causa debilidad muscular y a veces parálisis y la microcefalia que es un defecto congénito que causa que la cabeza de los bebés de desarrolló a un tamaño menor a lo esperado.

2.2.2 Dengue

Características

El virus del dengue pertenece al género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*, existen 4 serotipos (DENV-1, DEN-2, DENV-3 y DENV-4), se ha identificado 5 distintos genotipos en cada uno de los serotipos 1, 2 y 3. La partícula viral del DENV tiene un diámetro de 40-60nm. La parte externa del dengue está formada por una nucleocápside esférica de 30nm, la cual deriva de la bicapa lipídica de la célula hospedera¹³. La nucleocapside recubre la membrana lipídica y esta a su vez rodea a la cápside viral, que protege al material genético del virus.

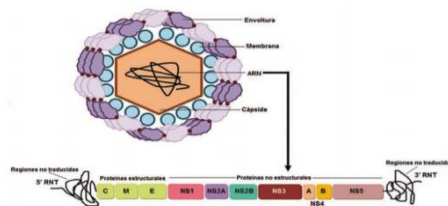


Imagen 2. Genoma y estructura del virus Dengue¹⁴

Mecanismo de replicación

La infección por dengue comienza cuando el vector (mosquito) se alimenta de la sangre del hospedero, el virus se introduce a la célula por endocitosis. Posteriormente la vesícula endocítica se acidifica, la nucleocapside entra al citoplasma y el genoma del RNA viral es liberado, el cual es traducido a una poliproteína sencilla que sufre modificaciones por los componentes celulares del hospedero y las proteasas virales^{13,15}.

La finalidad es producir en la célula hospedera proteínas para la replicación viral y empaquetamiento. La replicación viral se lleva a cabo en las membranas intracelulares, las partículas virales se unen al retículo endoplásmico, para ser transportadas por el aparato de Golgi, por último las partículas maduras del virus son liberadas por exocitosis^{13,15}.

Transmisión

El Dengue es una enfermedad febril, transmitida por el mosquito hembra hematófaga del género *Aedes* de las especies *aegypti* y *albopictus*. También se transmite de manera transovarica, en la cual los mosquitos transmiten el virus a los huevos sin la participación de una persona, conocida como transmisión vertical. Cuando el mosquito se infecta de virus pasan aproximadamente unos 8 días para que transmita el virus, además permanece infectante el resto de su vida¹⁶.

La enfermedad NO se transmite de una persona a otra.

Manifestaciones clínicas

El dengue es una enfermedad causada por infección con cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1, 2, 3 y 4). La infección por un serotipo del DENV proporciona inmunidad a largo plazo para ese serotipo, pero no para los otros tres. Por lo tanto, en los países donde el dengue es endémico, es probable que los habitantes se infecten más de una vez durante su vida¹⁶.

La infección por este virus puede ser asintomática en la mayoría de los casos o resultar en un amplio espectro de síntomas clínicos que van desde una fiebre hasta una enfermedad potencialmente mortal.

- Síntomas: pueden ser fiebre, dolor de cabeza, dolor de músculos y articulaciones, erupciones cutáneas.
- En casos grave: se presentan manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia y fuga de plasma como resultado del incremento del vaso de permeabilidad y anomalías en la hemostasia.
- Síntomas de alarma: dolor abdominal intenso, vómito incoercible y sangrado de mucosas.

2.3 Alfavirus

El género Alphavirus incluye a 31 especies virales. Se clasifican basados en las características fenotípicas y filogenéticas que los dividen en dos grupos: los virus artríticos o del viejo mundo, donde resaltan los virus O'nyong nyong (ONNV), Sindbis (SINV), chikungunya (CHIKV), Semliki Forest (SFV) y Ross River (RRV). Y, por otro lado, los virus encefalíticos o del nuevo mundo con referentes como el virus Mayaro (MAYV), virus de encefalitis equina venezolana (VEEV), virus de encefalitis equina del este (EEEV) y el virus de encefalitis equina occidental (WEEV). Los síntomas clínicos de las alfaviriosis varían de fiebre y sarpullidos a patologías inflamatorias significativas incluyendo encefalitis y artritis severa¹⁷.

El virión, se caracteriza por ser esférico con un diámetro entre 60 y 70 nm. Su estructura está compuesta por una nucleocápside dentro de una envoltura lipoproteica. El genoma está constituido por una cadena de ARN de sentido positivo con un tamaño de 9,7 a 11,8 kb; de aproximadamente 11.400 nucleótidos que codifica para las proteínas estructurales y no estructurales. La cápside tiene forma de ostra; posee dos glicoproteínas virales denominadas E1 (de 50 kd) y E2 (de 45 kd) las que son de gran importancia al estar relacionadas con el reconocimiento del virus¹⁸.

Tabla 3. Alfavirus de mayor importancia para el hombre¹⁹

Virus	Vector	Huésped	Clínica	Distribución geográfica
Chikungunya	Mosquitos	Humanos, primates	SF, PA	Af, As
Ross River	Mosquitos	Humanos, marsupia	SF, PA	O
Mayaro	Mosquitos	Aves	SF	AS
O'nyong-nyong	Mosquitos	¿?	SF	Af
Sindbis	Mosquitos	Aves	SF	As,Af,O,E,A
Barmah Forest	Mosquitos	¿?	SF, PA	O
Encefalitis esquina oriental	Mosquitos	Aves	SF, ME	A
Encefalitis esquina occidental	Mosquitos	Aves, conejos	SF, ME	A
Encefalitis esquina de Venezuela	Mosquitos	Roedores	SF, ME	A

Síndrome Febril; PA: Poliartitis; Meningitis. Af: África; A: América; As: América del sur; O: Oceanía; E: Europa

Tabla 4. Alfavirus de mayor importancia para el hombre²⁰.

Cuadro clínico	Virus	Epidemias
Artropatía aguda	Chikungunya	+
	Mayaro	+
	O'nyong-nyong	+
	Igbo Ora	+
	Ross River	+
	Sindbis	+
	Barmah Foress	+
Enfermedad febril	Semliki Foress	
	Encefalitis esquina venezolana	+
Sistémica (encefalitis)	Encefalitis esquina del este	+
	Encefalitis esquina del oeste	+
	Highlands	
No reconocida enfermedad en humanos	Aura	
	Cabassou	
	Fort Morgan	
	Pixuna	

2.3.1 Chikungunya

El nombre de este virus deriva del makonde, lengua bantú hablada en Tanzania y Mozambique. Significa “el hombre que camina encorvado”, en alusión al dolor articular provocado por la infección²⁰

Características del virus

Se conocen 3 cepas: asiático, del africano occidental y del africano del este/centro/sur (ECSA9)²¹.

Estructuralmente es un virus esférico, envuelto de aproximadamente 65-70 nm de diámetro, la envoltura contiene 80 espículas que corresponden cada una a un trímero de las glicoproteínas transmembranales tipo I, (E1 y E2), las cuales forman proyecciones y median el reconocimiento del receptor para el virus en la célula diana, además que poseen gran capacidad antigénica. En la región central se localiza la cápside viral, de simetría icosaédrica y formada por alrededor de 240 copias de

la proteína C, la cual contiene un genoma de ARN de cadena sencilla de sentido positivo de entre 11 y 12 kb¹⁰.

El genoma contiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican cada uno para una poliproteína.

1. La primera poliproteína se procesa en cuatro proteínas no estructurales: (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4) y
2. La segunda da origen a las cinco proteínas estructurales: (C, E3, E2, 6K, E1)

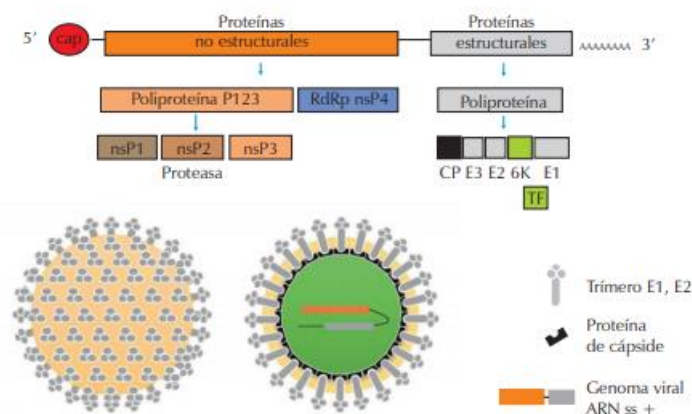


Imagen 3. Genoma y estructura del virus Chikungunya¹⁰.

Mecanismo de replicación

El CHIKV entra directamente a los capilares subcutáneos en donde inicia la replicación viral, las glicoproteínas E1 y E2 permiten la entrada del virus a la célula por endocitosis mediada por clatrina. Una vez que el ARN viral se libera en el citoplasma, se traduce el primer marco de lectura, para producir una poliproteína que se procesa proteolíticamente, dando lugar a las proteínas no estructurales, necesarias para la transcripción y la replicación del ARN viral¹⁰. Una vez que se obtienen las proteínas estructurales y la producción del genoma viral, el ensamblaje de la partícula viral se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y la progenie viral sale de la célula por la vía secretora²¹.

Transmisión

El virus se transmite de una persona a otras por la picadura de mosquitos hembra infectados. Generalmente los mosquitos implicados son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Es posible que haya transmisión vertical (materno-fetal) con mayor riesgo de infección severa para el neonato en el período al parto.

Las manifestaciones clínicas: fiebre 39 a 40°C, dolores articulares poliartralgias (manos, muñecas, tobillos y pies), cefalea, mialgias, dolor de espalda y de cabeza, secreción nasal, náuseas, vómitos, rash, poliartritis, conjuntivitis, fotofobia y linfadenopatías

La enfermedad subaguda se da después de los 10 días, los síntomas son: dolor exacerbado en articulaciones, huesos previamente lesionados, tenosinovitis, hipertrofia subaguda en muñecas y tobillos, síndrome de Raynaud. Y la enfermedad crónica se da por más de 3 meses, el síntoma más frecuente es la artralgia inflamatoria en las mismas articulaciones que fueron afectadas en la etapa aguda.

2.4 Datos epidemiológicos

Dengue

El Dengue es una enfermedad febril, causada por 4 serotipos de virus DENV1, DENV 2, DENV 3, DENV4, y cada uno de ellos concentra varios genotipos²². Los primeros registros de epidemias por DENV aparecieron en el sureste de Asia, propagándose debido al traslado inter-continental, el cual facilitó la dispersión del vector¹³.

En el año 2010 se reportaron 1663,276 casos de dengue en la región de las Américas. En 2012, un brote de dengue en el archipiélago de Madeira (Portugal) ocasionó más 2000 casos, y se registraron casos importados en otros 10 países europeos²³. En el año 2015 se notificaron 2,35 millones de casos tan solo en la Región de las Américas, de los cuales más de 10 200 casos fueron diagnosticados como dengue grave y provocaron 1181 defunciones²⁴.

En el año 2016 se caracterizó por grandes brotes de dengue en todo el mundo. La Región de las Américas notificó más de 2 380 000 casos ese año, y solo en Brasil hubo poco menos de 1 500 000 casos, en este año la Región del Pacífico Occidental, se notificaron más de 375 000 casos, de los cuales 176 411 fueron en Filipinas y 100 028 en Malasia²⁴.

En México del año 2000-2009 se observó una tendencia ascendente y posteriormente un decremento al año 2011 seguido de un nuevo incremento al 2013 y nuevo decremento hasta el año 2016¹³. En el año 2014 se presentaron 32,616 casos confirmados de dengue y 124,505 de casos probables, en el año 2015 se reportaron 32,021 casos confirmados y 219,593 casos probables²⁵; durante el cierre del 2016 se confirmaron 17,795 casos de dengue y 130,069 casos probables. En el año 2017 se notificaron 16,932 casos confirmados y 89,893 casos probables²⁶. Durante los años 2016-2017 el porcentaje de positividad fue del 46%.

Chikungunya

La fiebre Chikungunya es una enfermedad vírica transmitida al ser humano por mosquitos. En el 2013 hizo su aparición en forma de brote epidémico en las Islas San Martín, considerándose un arbovirus emergente, encontrado en África y con casos reportados en Asia y Oceanía, éste se diseminó por Sudamérica y Centroamérica alcanzando la región de Norteamérica en 2014⁵. En 2006 y 2010 se detectaron 106 casos de Chikungunya probables y confirmados por laboratorio en viajeros que regresaban a Estados Unidos²⁴.

En las Américas, en 2015 se notificaron a la Organización Panamericana de la Salud 693 489 casos sospechosos y 37 480 confirmados de CHIKV, de los cuales se reportaron 356 079 casos sospechosos en Colombia. La cifra es inferior a la de 2014, cuando en la región se notificaron más de 1 millón de casos sospechosos. En el año 2016 se reportaron 660,494 casos sospechosos de los cuales 31,871 fueron confirmados. En 2017, en las Américas se reportaron un total de 73,928 casos sospechosos de CHIKV de los cuales 67,490 fueron confirmados²⁷.

En México entre los años el 2014 y enero del 2018 se han registrado 13,630 casos autóctonos confirmados y 38 casos importados. En el 2014, se reportaron 432 casos probables y 222 confirmados, en el 2015 se presentaron 115, 488 casos probables y 12,588 confirmados; en el año 2016 se confirmaron 759 casos de 21,078 probables y en el 2017 se reportaron 3,024 casos probables de los cuales 61 fueron confirmados. El porcentaje de positividad de Chikungunya en el año 2014 fue de 51%, del año 2015 se obtuvo un porcentaje del 11% y de los años 2016 y 2017 se obtuvo un porcentaje de positividad del 3.6% y 2.07% respectivamente.

Zika

Siguiendo la misma ruta de diseminación del CHIKV, apareció otro arbovirus, denominado virus del Zika, oriundo de África, habiendo migrado a Asia y Oceanía⁵. En octubre de 2013 se presentó un brote en la Polinesia Francesa, reportándose 10 mil casos, llegando a tierras americanas en el año 2014 con casos reportados en Chile y Brasil²⁸; En las Américas durante el 2016 se notificaron 227,929 casos sospechosos de enfermedad por ZIKV, de los cuales 7,689 han sido confirmados por laboratorio. A este periodo se reportan 35 países afectados, cuatro de ellos notificaron la transmisión por vía sexual²⁹.

El virus de Zika es un flavivirus que se identificó por vez primera en primates no humanos (Uganda, 1947), a través de una red de monitoreo de la fiebre amarilla. Posteriormente, en 1952, se identificó en el ser humano en Uganda. El primer gran brote se registró en la Isla de Yap (Estados Federados de Micronesia) en 2007 y de ahí se diseminó a la Polinesia Francesa y a diferentes islas de Oceanía. El ZIKV se reportó por primera vez en América en febrero de 2014 en la isla de Pascua en Chile y

hasta mayo 2015 se habló de los primeros casos de transmisión autóctona de ZIKV en Brasil, más tarde se detectaron en Colombia, Salvador, Guatemala, Paraguay, Surinam y Venezuela¹⁰.

El primer caso de ZIKV en México se reportó en noviembre del 2015. Hasta el momento en el país desde octubre de 2015 hasta el cierre de 2016, se tiene confirmados 8,573 casos de enfermedad por el virus del Zika. Durante los años 2015-2016 se reportaron 5,065 casos confirmados de Zika en embarazadas. Durante estos años solo se presentaron 19 casos de síndrome de Guillan de los cuales 6 de ellos se reportaron en Guerrero³⁰.

3. Justificación

Los Arbovirus se caracterizan por ser transmitidos de los animales al hombre, a través de vectores artrópodos hematófagos⁵. Existen más de 80 virus infecciosos transmitidos por artrópodos vectores, de los cuales cerca de 15 arbovirus son de importancia en salud pública¹¹. En México el Dengue, la fiebre Chikungunya y la enfermedad por virus Zika, son consideradas entre las más importantes, debido a la carga de enfermedad que generan³¹.

De acuerdo al porcentaje de positividad que se reporta en México ante los casos sospechosos por cualquiera de los tres arbovirus en los últimos años, es importante identificar que agente etiológico afecta a la población, ya que está relacionado con la presencia de cuadros clínicos similares que se confunden con los antes mencionados.

Si bien en muchas ocasiones es difícil identificar las causas que ocasionan un brote en una localidad específica. La introducción de nuevos arbovirus puede causar problemas para su manejo apropiado, ya que los arbovirus pueden generar cuadros clínicos similares, esto representa un reto para el diagnóstico clínico, la confirmación por laboratorio y la vigilancia epidemiológica.

La enfermedad causada por virus Mayaro, se considera como una enfermedad tropical desatendida, debido al diagnóstico erróneo de casos, ya que comparte signos clínicos y síntomas que se confunden con dengue, Chikungunya y Zika, y en caso particular con Chikungunya por la artralgia prolongada³². Los síntomas de la fiebre de Oropouche son similares a los de Dengue (inicio súbito de fiebre elevada, cefaleas, mialgias, artralgias y vómitos)³³.

El InDRE como órgano rector en la Vigilancia de Arbovirus a nivel nacional e internacional, cuenta con la infraestructura necesaria para la identificación de patógenos de importancia en salud pública, además cuenta con procedimientos homogéneos y estandarizados que permiten el control de los procesos. Por lo cual tiene la capacidad de realizar el diagnóstico diferencial considerando otros arbovirus, los cuales pueden ser los responsables de promover cuadros clínicos similares a Dengue,

Zika y Chikungunya, con la finalidad de poder dar respuesta a las necesidades SINAVE desde una perspectiva integral

El presente trabajo tiene como propósito la búsqueda y detección de arbovirus que no han sido identificados por el SINAVE, lo cual permitirá a futuro desarrollar estructuras de planificación para el control de vectores y toma de decisiones en los centros de salud para responder a un probable brote por estos agentes etiológicos.

4. Objetivos

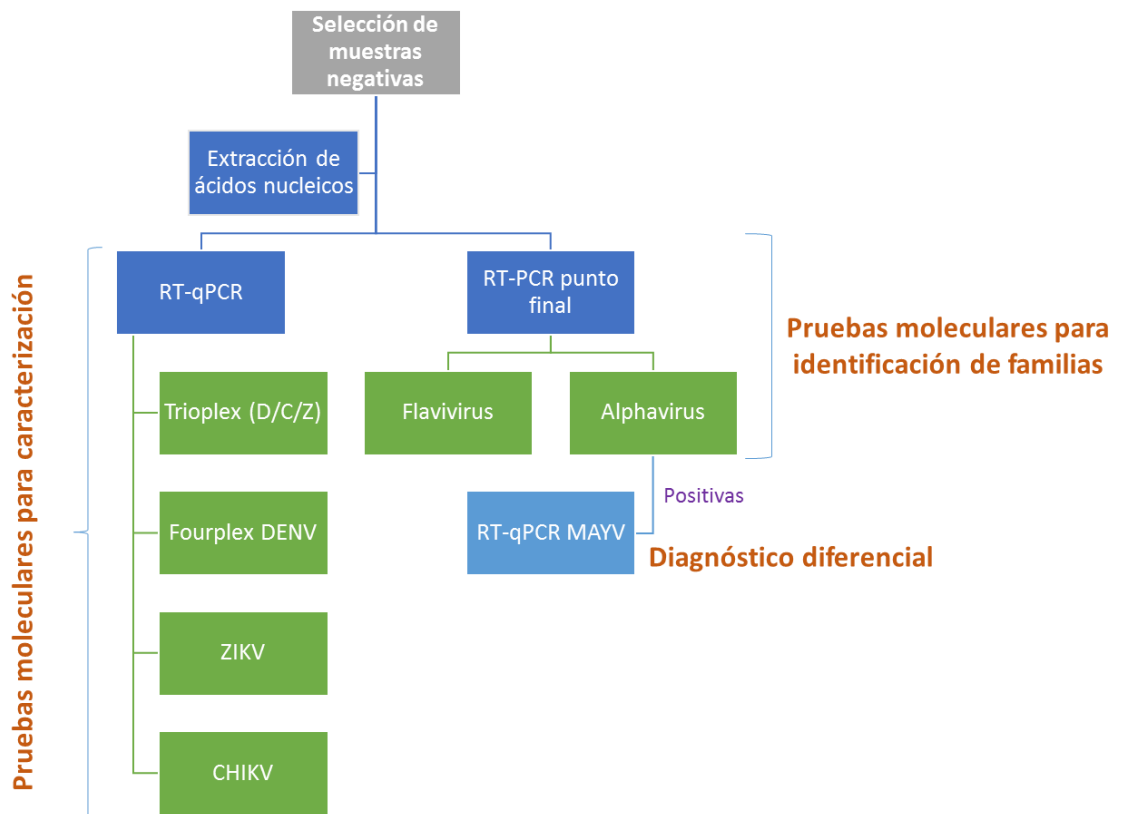
4.1 Objetivo general

Realizar la búsqueda intencionada de {14 Arbovirus y 21 Flavivirus} en México durante el año 2016, para coadyuvar en la oportuna aplicación de medidas de prevención y control de vectores.

4.2 Objetivos particulares

- Seleccionar las muestras negativas a DENV, CHIKV y ZIKV del año 2016.
- Obtener ácidos nucleicos totales, mediante el uso del robot MAGNA PURE LC 2.0.
- Realizar el diagnóstico de las muestras de sueros mediante RT-PCR triplex.
- Amplificar material genético de otros arbovirus mediante RT-PCR punto final (Pan-Flavi y Pan-Alfa).
- Analizar amplicones obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa.
- Amplificar material genético de virus mayaro mediante PCR tiempo real en muestras positivas para Pan-Alfa.
- Analizar los resultados para contribuir al conocimiento de agentes patógenos que no han sido identificados.

5. Desarrollo experimental



5.1 Selección de las muestras

Se seleccionaron 90 sueros del banco de sueros del año 2016:

- 36 sueros negativos a Zika (RT-qPCR individual Zika),
- 27 sueros negativos a Dengue (Detección antígeno NS1)
- 27 sueros negativos a Chikungunya (RT-qPCR individual chikungunya).

Se seleccionaron 30 clarificados de moscos del género *Culex* y *Aedes aegypti* negativos a Dengue, Zika y Chikungunya del año 2016.

5.2 Extracción de ácidos nucleicos totales

Se realizó la obtención de ácidos nucleicos totales de las 130 muestras, mediante el uso del robot PURE 2.0.

En tubos eppendorf de 1.7mL se agregaron 200µL de solución buffer de lisis, de inmediato se cerraron y rotularon con el número de folio de cada muestra. Se abrieron los tubos uno por uno,

agregándoles 200µL de la muestra correspondiente a cada uno. Posteriormente, se tomó una alícuota de 350 µL de cada solución preparada y se añadieron a los pocillos de cartucho.

Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ácidos nucleicos totales de acuerdo a las instrucciones del fabricante del equipo. Finalmente, se tomó una alícuota de 100µL y se traspasaron a tubos eppendorf de 1mL. Se conservaron a -20°C para su posterior uso.

5.3 RT-q PCR tioplex CDC

Se realizó la amplificación de los 90 sueros, se trabajó con el estuche del CDC, los primers utilizados cuales amplifican un gen conservado del virus dengue (5'URT), un fragmento de gen del virus chikungunya (NSP1) y la envoltura E del virus zika. La sonda utilizada fue la TaqMan 1107, además se incluyeron los iniciadores y sonda para la detección del ARN de la RNasa P, presente en el suero humano incluida en el estuche.

Como controles positivos se utilizaron:

- Chikungunya: cepa 628 (cultivo aislado)
- Zika: cepa1234 (cultivo aislado)
- Dengue-1: cepa Hawaii (cultivo)
- Dengue 2 cepa Nueva Guinea (cultivo)
- Dengue 3 cepa H-87 (cultivo)
- Dengue 4 cepa H-241 (cultivo)
- RNasa P CDC

El ciclo programado: fue de 30min a 50°C, 2min a 95°C, posteriormente 45 ciclos de 0:15min a 95°C y 1min a 60°C.

Nota: De las muestras positivas a zika y chikungunya se utilizaron protocolos individuales, para confirmar el resultado y las muestras positivas a dengue se utilizó protocolo individual para poder saber a qué serotipo correspondían. De las 90 muestras procesadas por este método, se seleccionaron 60, aquellas que dieron negativas a Dengue, Zika y Chikungunya y que obtuvieron un Cq de RNasa P de 22 a 29 y 30 clarificados de moscos, para poder realizar la detección de otros arbovirus, por el método RT-PCR genérico Flavivirus punto final y RT-PCR genérico Alfavirus punto final /PCR anidado punto final

5.4 RT-qPCR ZIKV

Para la confirmación de las muestras positivas a ZIKV, se utilizó el protocolo individual el cual se basa en la amplificación de un fragmento del gen de la envoltura E, dominio conservado del virus Zika. Para este protocolo se utilizaron los siguientes indicadores y sondas (ver tabla 2).

Tabla 2. Iniciadores y sondas RT-qPCR ZIKV

Iniciador F-1086 5'CCG CTG CCC AAC ACA AG 3' Concentración en escala de 200 nmoles, desalado y purificado por HLPC
Iniciador R-1162 : 5'CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT 3' Concentración en escala de 200 nmoles, desalado y purificado por HLPC
Sonda 1107-R: 5' TEXAS RED-AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA A-BHQ13' Concentración en escala de 200 nmoles, desalado y purificado por HLPC
Sonda 1107-Q: 5' QUASAR 705-AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA A-BHQ13' Concentración en escala de 200 nmoles, desalado y purificado

Como control positivo se utilizó:

- Zika: cepa1234 (cultivo aislado)

El programa del termociclador fue de 30min a 50°C, 10min a 95°C, posteriormente 45 ciclos de 0:15 min a 95°C y 1min a 60°C.

5.5 RT-qPCR Dengue Fourplex Degenerado

Este método es de formato RT-PCR fourplex y se basa en el uso de un par de iniciadores y una sonda específica para cada serotipo en una sola mezcla de reacción en tiempo real, los cuales amplifican segmentos específicos del genoma de cada serotipo de dengue: para DENV-1(NS5), DENV-2 (E), DENV-3 (preM) y para DENV-4 (preM y E) (ver tabla 4).

Tabla 4. Iniciadores y sondas RT-qPCR Dengue Fourplex Degenerado

Iniciador DEN-1 F: 5' CAAAAGGAAGTCGTGCAATA 3'
Iniciador DEN-1 C: 5' CTGAGTGAATTCTCTCTACTGAACC 3'
Sonda DENV-1: 5' FAM-CATGTGGTTGGGAGCACGC- BHQ1 3'
Iniciador DEN-2 F: 5' CAGGTTATGGCACTGTCACGAT 3'
Iniciador DEN-2 C: 5' CCATCTGCAGCAACACCATCTC 3'
Sonda DENV-2: 5' Texas Red -CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA - BHQ2 3'
Iniciador DEN-3 F: 5' GGACTGGACACACGCACTCA 3'
Iniciador DEN-3 C: 5' CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT 3'
Sonda DENV-3: 5' Cy5-ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG- BHQ3 3'
Iniciador DEN-4 F: 5' TTGTCCTAATGATGCTGGTCG 3'
Iniciador DEN-4 C: 5' TCCACCTGAGACTCCTTCCA 3'
Sonda DENV-4: 5' HEX -TTCTACTCCTACGCATCGCATTCCG- BHQ1 3'

Como controles positivos se utilizaron:

- Dengue 1 cepa Hawaii (cultivo)
- Dengue 2 cepa Nueva Guinea (cultivo)
- Dengue 3 cepa H-87 (cultivo)
- Dengue 4 cepa H-241 (cultivo)

La plataforma que se utilizó fue la de Real Time Systems CFX96/1000 Touch Biorad

El programa del termociclador fue de 30min a 50°C, 10min a 95°C, posteriormente 45 ciclos de 0:15 min a 95°C y 1min a 60°C.

5.6 RT-PCR Genérico flavivirus punto final

Para la detección del género flavivirus, se utilizaron los siguientes primers, los cuales amplifican la región NS5:

- Flavivirus-1 (5´AATGTACGCTGATGACACAGCTGGCTGGGACAC-3´)
- Flavivirus-2 (5´TCCAGACCTTCAGCATGTCTTCTGTTGTCATCCA-3´)

Como controles positivos: se utilizó DENV-1 (suero), DEN (CDC) y YAV (cepa 17 D).

El programa del termociclador: fue de 30min a 50°C, 15min a 94°C, posteriormente 40 ciclos de 30segundos a 94°C y 1min a 55°C y 1min a 72°C. Se espera obtener bandas de 854-863 pares de bases nitrogenadas.

5.7 RT/PCR genérico Alfavirus / PCR genérico Alfavirus (anidado)

Para la detección de flavivirus., se utilizaron los primers F-1 y R-1 y F-2 y R-2, los cuales amplifican la región NSp4:

- Alfa F-1:
5´-GAYGCITAYYTIGAYATGGTIGAIGG-3´
- Alfa R-1:
5´- KYTCYTCIGTRTGYYTIGTICCI GG-3´
- Alfa F-2:
5´- GIAAYTGAAAYGTIACICARATG-3´
- Alfa R-2:
5´ GCRAAIARIGCIGCIGCYTYIGGICC-3´

Como controles positivos se utilizaron:

- ✓ CHIKV cepa (628) cultivo
- ✓ Mayaro cepa donación Panamá cultivo
- ✓ EEEV cepa donación CDC cultivo
- ✓ OEEV cepa donación CDC cultivo
- ✓ VEEV cepa donación CDC cultivo

El programa del termociclador fue de 30min a 50°C, 15min a 94°C, posteriormente 40 ciclos de 30 segundos a 94°C y 1min a 55°C y 1 min a 72°C. Se esperó obtener fragmentos de ADN de 500-520 pares de bases nitrogenadas.

Se realizó el mismo procedimiento para el PCR anidado utilizando como muestras problema los ADN´s obtenidos de la primera amplificación, el ciclo utilizado fue el mismo descrito anteriormente, solo se omitió la parte de la transcripción. Se esperó obtener fragmentos de ADN de 200 pares de bases nitrogenadas.

5.8 Electroforesis

Los productos obtenidos mediante las metodologías descritas, fueron identificadas electroforéticamente en geles de agarosa al 1.5%, los geles se dejaron correr a 90v durante una hora y media, posteriormente para poder teñir los geles se colocaron en una solución de 100mL de TBE previamente preparada con 20 µL de gel red (revelador), se sumergió el gel durante 15min, por último se colocó en un foto documentador para la obtención de la foto del gel de agarosa.

Nota: Para verificar el resultado en los protocolos por PCR punto final por familia, se utilizaron los protocolos RT-qPCR múltiplex (Flavivirus, Alfavirus) y RT-q PCR con SYBER Green (MAYV).

5.9 RT-qPCR múltiplex (detección de otros Flavivirus)

Este método es de formato RT-PCR múltiplex en tiempo real, utilizado en el laboratorio de arbovirus, se basa en la amplificación de un fragmento del gen de la proteína no estructural 5 (NS5), éste gen codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN, que es un dominio altamente conservado entre los virus del género flavivirus (ver tabla 6).

Tabla 6. Iniciadores y sondas RT-PCR simplex o multiplex en tiempo real Detección de otros flavivirus (WNV, YAV, EESLV)

Iniciador mFU1: 5' TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAA AA 3'
Iniciador CFD2: 5' GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC 3'
Sonda ESL: 5' Cy5 -TGCAAGAAATCTCCCAAATCCCAGGAGGA-BHQ3 3'
Sonda FA: 5' TEX- TCAGAGACCTGGCTGCAATGGATGGT-BHQ2 3'
Sonda VON: 5' 6FAM-TGC GTG AAG TTG GCA CCC GGC CT-BHQ1 3'

Como controles positivos:

- YFV (Cepa 17 D)
- WNV (dato desconocido)
- EESLV (no se contó con el control)

El programa del termociclador fue de 15 min a 50°C, 2min a 95°C y 45 ciclos de 0:15min de 95°C y 0:30min a 63°C.

5.10 RT-qPCR múltiplex (detección de otros Alfavirus).

Este método es de formato RT-PCR en tiempo real, se basa en la amplificación de fragmentos específicos para cada uno de estos Alfavirus, para EEE (gen E2), para EEO (gen E1), ambos genes codifican para las proteínas de la envoltura viral; para EEV se amplifica un fragmento del gen de Cápside (C).

En este protocolo se amplifican de manera simultánea los tres virus, para ello se utilizan los siguientes iniciadores y sondas (ver tabla 9).

Tabla 9. Primers y sondas RT-PCR tiempo real detección de otros Alfavirus (EEEV, EEVV, EEOV).

EEE Iniciador (9391): 5' ACA CCG CAC CCT GAT TTT ACA 3'
EEE Iniciador (9459): 5' CTT CCA AGT GAC CTG GTC <u>GTC</u> 3'
EEE Sonda (9414): 5' 6FAM –TGC ACC CGG ACC ATC CGA CCT-BHQ1 3'
EEO Iniciador (10,248): 5' CTG AAA GTC GGC CTG CGT AT 3'
EEO Iniciador (10,314c): 5' CGC CAT TGA CGA ACG TAT CC 3'
EEO Sonda (10,271): 5' TEX-ATA CGG CAA TAC CAC CGC GCA CC-BHQ2 3'
EEVF Iniciador: 5' CAT AGT CTA GTC CGC CAA GAT GTT 3'
EEVR Iniciador: 5' CGA TAG GGC ATT GGC TGC AT 3'
EEV Sonda RC: 5' Cy5 –GGA TAC ATT GGT TGG AAC GGG A BBQ 3'

Como control positivo se utilizó:

- EEEV cepa donación CDC cultivo
- OEEV cepa donación CDC cultivo
- VEEV cepa donación CDC cultivo

El programa del termociclador: fue de 15 min a 50°C, 2min a 95°C y 45 ciclos de 0:15min de 95°C y 0:30min a 63°C

5.11 RT-q PCR con SYBER Green (MAYV).

Este método, se basa en la amplificación de un fragmento del gen de la envoltura (E), porciones E2 y E3, dominio conservado del virus. Para este protocolo se utilizan los iniciadores:

- Iniciador MayF1 - 8235: 5' CTT CCC ATG TTT CCA ACC GAG 3'
- Iniciador MayB2 8696: 5' GCC AGG ATA AAG TGT CCC ATT GTG 3'

Como control positivo se utilizó:

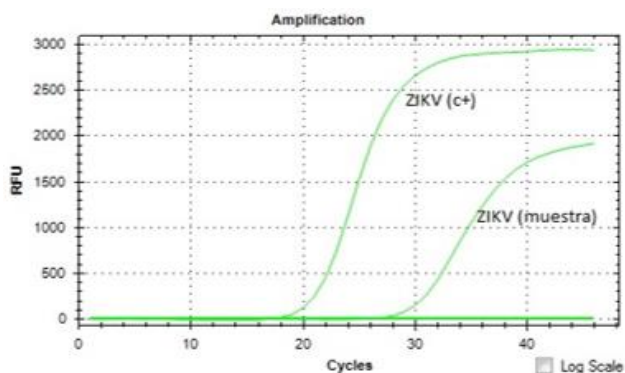
- Mayaro cepa donación Panamá cultivo

Como control de reactivo: se utilizó agua de grado molecular.

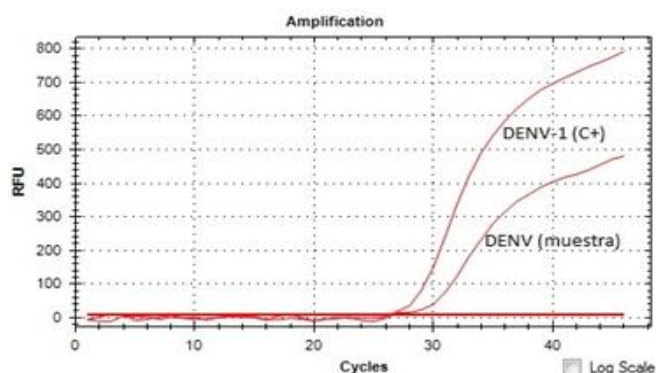
El programa del termociclador: fue de 10min a 50°C, 5min a 95°C, posteriormente 35 ciclos de 0:10min a 95°C, 0:30min a 55°C, 2hrs a 72°C; 1min a 95°C, 1min a 55°C, 0:5min a 95°C y 80 ciclos de 0:10min a 55°C.

6. Resultados

Para llevar a cabo el diagnóstico diferencial básico entre los virus de Dengue, Zika y Chikunguya se realizó una RT-qPCR triplex del CDC del cual se obtuvieron 3 muestras positivas a otros arbovirus a los cuales originalmente fueron dirigidos por la clínica que presentaron, 2 muestras con definición operacional de CHIKV, resultaron ser positivas: una a ZIKV con un Cq de 26.33 (ver gráfica 1) y la segunda a DENV con un valor de Cq de 26.73 (ver grafica 2) la cual fue tipificada por el protocolo fourplex degenerado, dando como resultado positivo a DENV-1.

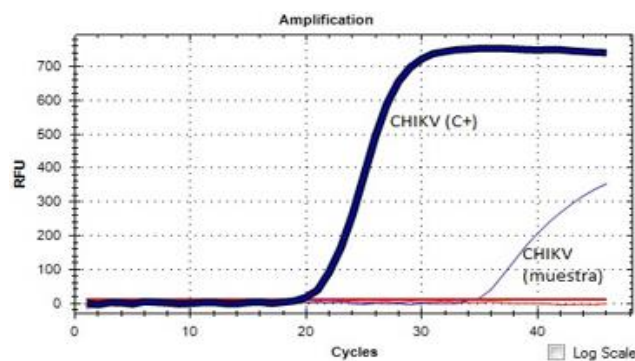


Gráfica 1. Muestra con diagnóstico clínico inicial a CHIKV. Resultados positivo a ZIKV (Cq 26.33) por RT-qPCR triplex (CDC).



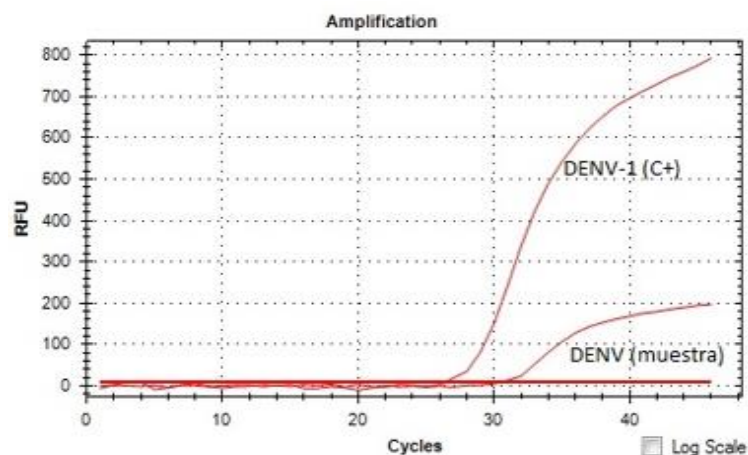
Gráfica 2. Muestra con diagnóstico clínico inicial a CHIKV. Resultados positivo a DENV (Cq 26.73) por RT-qPCR triplex (CDC).

La tercera muestra con sospecha clínica ZIKV, resultado ser positiva para Chikungunya con un Cq de 34.14 (ver grafica 2).



Gráfica 3. Muestra con diagnóstico clínico inicial a ZIKV. Resultados positivo a CHIKV (Cq 34.14) por RT-qPCR triplex CDC.

Las muestras que fueron dirigidas para el diagnóstico de dengue en el año 2016, resultaron ser negativas al antígeno NS1, sin embargo, por el método utilizado en el presente estudió una de ellas resultó ser positiva a Dengue con un valor de Cq de 30.61 (ver gráfica 4), de acuerdo a su tipificación la muestra resultó ser positiva a Dengue-1.



Gráfica 4 Muestra con diagnóstico clínico inicial a DENV. Resultados positivo a DENV (Cq 30.61) por RT-qPCR triplex (CDC).

Una vez obtenido el resultado de las 90 muestras por RT-qPCR triplex, se seleccionaron aquellas que tuvieran Cq de RNAsa P de 22 a 29, ya que todas las muestras clínicas deben exhibir curvas de reacción RP que crucen la línea umbral de los primeros 22 ciclos, indicando así la presencia de RNA suficiente de genes humanos RNase P, y por tanto indica que la muestra es aceptable³⁴.

Las muestras en las que se obtuvo un Cq de RNase P menor a 22 o mayor a 29, se debió a una cantidad baja de células en la muestra clínica original, debido a una mala recolección o la pérdida de la integridad de la muestra, puesto que el control de RP se encontraba dentro de lo establecido, ya que si el control no se hubiera encontrado en el rango, el error se podría haber atribuido a la inapropiada extracción de ácidos nucleicos totales por parte del analista, el mal funcionamiento del equipo o de los reactivos³⁵.

Se realizó la determinación de alfavirus empleando la técnica de PCR punto final, se utilizaron iniciadores reportados por Ortiz., A y colaboradores, para la detección de 13 especies de flavivirus. Las 90 muestras resultaron ser negativas a este género, algunas muestras se ejemplifican en los geles de agarosa de la imagen 1 (sueros) e imagen 2 (clarificados de moscos).

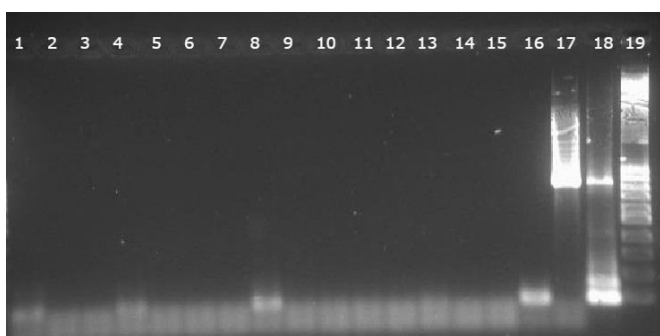


Imagen 1. Gel de agarosa al 1.5% de los productos de RT-qPCR genérico Flavivirus. Banda esperada de 850pb. Contenido de los carriles 1-15) muestras de sueros, 16) control negativo, 17) DENV (CDC) 18) YFV 19) Marcador de longitud molecular. (Ladder 100).

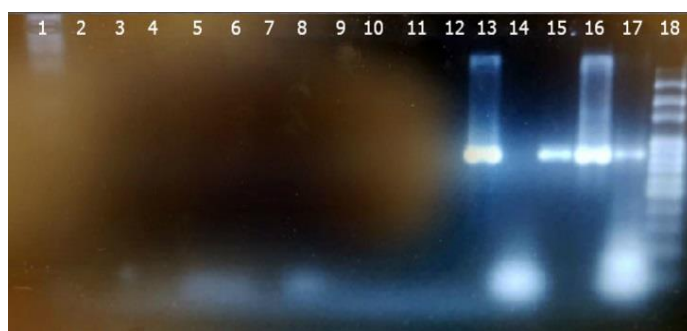


Imagen 2. Gel de agarosa al 1.5% de los productos de RT-qPCR genérico Flavivirus. Banda esperada de 850pb. Contenido de los carriles: 1-12) muestras de clarificados de moscos 13) DENV-1 14) Control negativo 15) DENV (CDC)⁻¹, 16) DENV (CDC), 17) YFV y 18) Marcador de longitud molecular. (Ladder 100).

Se realizó un ensayo de PCR anidada, utilizando iniciadores reportados por Sánchez., S y colaboradores. Estos iniciadores flanquean una región de aproximadamente de 200 pb, donde puede detectar 12 alfavirus aproximadamente.

Las muestras amplificadas por este método, resultaron ser negativas, para el género de alfavirus. Algunas muestras se ejemplifican en los geles de agarosa de la imagen 3 (sueros) y 4 (clarificados de moscos).

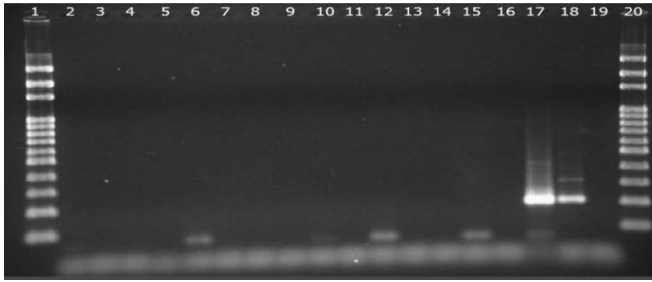


Imagen 3. Gel de agarosa al 1.5% de los productos de RT-qPCR genérico Alfvirus. Banda esperada de 200pb. Contenido de los carriles del electroferograma: 1-14) muestras de sueros, 15) Mayaro 16) OEEV 17) VEEV+ 18) EEEV+, 19) Control negativo y 20) Marcador molecular (Ladder 100).

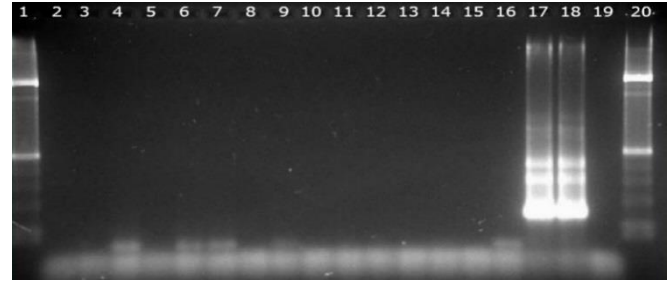


Imagen 4. Gel de agarosa al 1.5% de los productos de RT-qPCR genérico Alfvirus. Banda esperada de 200pb. Contenido de los carriles: 1) Marcador de longitud molecular, 2-16) muestras de sueros 17) CHIKV 18) CHIKV+ 19) Control negativo, 20) Marcador de longitud molecular. (Ladder 100).

Los protocolos utilizados para la detección de Alfvirus y Flavivirus, permiten detectar los siguientes arbovirus:

Alfvirus: Semilki Forest, O'nyong nyong, Middelburgh, Western Equine Encephalitis, Venezuelan Equine Encephalitis, Ross River, Eastern Equine Encephalitis, Barmah Forest, Aura, Ockelbo, Sindbis like, Sindbis³⁶.

Flavivirus: Ilheus, Bussuquara, Modoc, Aroa, Naranjal, Jutiap Dengue 1-4, Yellow Fever, Western Nile, St Louis Encephalitis³⁷.

Las condiciones en el ciclo del protocolo PCR anidado para Alfvirus, que se estaba utilizando en el laboratorio, se modificó utilizando las siguientes condiciones: 40 ciclos, desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 52°C por 1 min y la elongación a 72°C por 15 segundos y al final de la extensión a 72°C durante 5min; esta decisión se tomó ya que algunos geles que fueron revelados mostraban bandas inespecíficas que no correspondían a la banda esperada (200pb).

A demás que, la bandas que se observan de 100pb se debe al exceso de primers que se utilizaron, por lo que se recomienda ajustar la concentración de estos reactivos, para evitar la formación de dímeros, las concentraciones óptimas de los primers deben ser generalmente de 0.1µM a 0.5 µM. Altas concentraciones de primer pueden promover la acumulación de producto no específico y pueden incrementar la probabilidad de generar un templado independiente llamado dimero de primer^{38 & 39}.

Por último, las 25 que se seleccionaron para detectar otros arbovirus, por los métodos RT-qPCR detección de otros Alfvirus (VEEV, EEEV, OEEV); RT-qPCR con SYBER Green (MAYV) y RT-qPCR simplex o multiplex detección de otros flavivirus (WNV, YAV, EESLV), resultaron ser negativos a los siguientes virus:

- ✓ Mayaro.
- ✓ EEEV
- ✓ OEEV
- ✓ WNV
- ✓ YAV
- ✓ VEEV

No se puede confirmar si fueron negativos EESLV, puesto que en esos momentos el laboratorio no contaba con el control positivo.

7. Discusión

En el presente estudio fueron incluidas 36 muestras con sospecha clínica a Zika, 27 a Dengue y 27 a Chikungunya del año 2016, pero con resultado negativo por laboratorio. De las cuales dos muestras que iban dirigidos al diagnóstico de Chikungunya en el año 2016, resultaron ser positivas a otro arbovirus (ZIKV y DENV-1). De igual manera una muestra que iba dirigida al diagnóstico de Zika en el año 2016, resulto ser positiva para CHIKV.

Estos resultados evidencian el gran problema de salud que enfrenta la población ubicada en zonas endémicas para Dengue con la introducción de Chikungunya en el año 2014 y Zika en el año 2015⁴⁰, así como las dificultades del sistema de salud para dar un diagnóstico correcto y oportuno basado únicamente en la información clínica, repercutiendo en la elección del tratamiento. Si a esto sumamos condiciones de hiperendemicidad y la ocurrencia de casos en todos los grupos de edad con un comportamiento clínico potencialmente diferente, así como la aparición de formas atípicas o complicadas, el entorno se rarifica y dificulta el establecimiento de definiciones operacionales adecuadas, que apoyen la identificación y manejo de los enfermos de forma satisfactoria⁴¹.

Estos hechos son relevantes desde el punto de vista epidemiológico y repercuten directamente en el subregistro o sobrerregistro de casos. Por tal motivo, estamos obligados a considerar otras probables causas de los cuadros clínicos que se presentan y para los cuales aún no se tiene una causa específica definida.

La ventaja de la Rt-PCR triplex, afirmara a dar un diagnóstico oportuno, que ayudara a tratar de mejor manera al paciente. Y detectara las coinfecciones en lugares donde está circulando dengue, zika y chikungunya. De acuerdo con un estudio realizado por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Jalisco (LESP), logaron detectar por Rt-PCR triplex, 5 coinfecciones de Virus Dengue con Virus Zika, y 1 coinfección de virus chikungunya con virus zika de 1,083 muestras⁴².

Es de suma importancia, saber la técnica que se va utilizar en esos momentos, se debe de considerar ciertos factores como: periodo en el que inicia y termina la enfermedad, si en la zona

donde radica existe la circulación de dos o más virus pertenecientes a la misma familia, especificidad y sensibilidad de un método etc⁴³. Particularmente, las pruebas serológicas en poblaciones con alta exposición a DENV y la circulación de los 3 arbovirus, podrían ser extremadamente difíciles debido a problemas de reactividad cruzada. Por lo tanto, Rt-PCR tiene una ventaja sobre la serología debido a su especificidad.

Tal es el caso de una de las muestras que se incluyó en el presente estudio, la cual en el año 2016 se le realizó una prueba serológica dando negativa al antígeno NS1 y por Rt-PCR resultó positiva, también de acuerdo con la bibliografía los principales factores asociados con un resultado falso negativo de los tests inmunoenzimático, para DENV son una viremia relativamente baja y una infección secundaria (debido a la presencia de inmunocomplejos virus-IgG pre-existentes)⁵.

Las muestras analizadas (60 sueros y 30 clarificados) por protocolos por familia (Alfavirus y Flavivirus), no presentan carga viral detectable para ninguno de los virus antes mencionados. Sin embargo, es importante seguir con la investigación, ya que los descubrimientos pueden alertar el riesgo de diseminación de agentes infecciosos que comparten características de transmisión, que coinciden en el nicho ecológico en que se reproducen y que potencialmente pueden aparecer en una región y el daño que puede ocasionar a grandes grupos de poblaciones.

De acuerdo con investigaciones realizadas por diagnóstico diferencial, se ha detectado agentes etiológicos que presentan cuadros clínicos similares a los arbovirus, en especial a la familia de Flavivirus y Alfavirus.

En un centro de Brasil se realizó un estudio de seroepidemiológico, buscando la presencia de anticuerpos anti-MAYV / OROV en pacientes de Goiânia, en 647 muestras negativas a dengue, de ese total, seis muestras resultaron positivas para el virus Mayaro y otras seis dieron positivo para el Oropouche, los dos virus fueron detectados de manera simultánea en tres muestras⁴⁴

Por otro lado un estudio realizado en Panamá por Carrera P., Wiley R y colaboradores, fue detectado un virus llamado Punta Toro (PTV), el cual apareció por primera vez en un soldado estadounidense en Panamá en 1966, el virus reapareció en 2009 con un brote de dengue⁴⁵; Posteriormente siguiendo con la investigación encontraron 2 casos positivos en 2014 y 4 a finales de 2017 y principio de 2018 (diciembre-enero). Caracterizaron la enfermedad causada por este virus y demostraron que el diagnóstico no se puede lograr clínicamente, ya que los síntomas se confunden con el dengue.

En México en el año 2006, en un estudio realizado por el IMSS, detectaron la presencia del virus mayaro en 2 muestras tardías, en las cuales se utilizó la técnica por serología (IgM Elisa)⁴¹.

En otro estudio encontraron la presencia de *L. kmetzi* en pacientes de la región fronteriza de México, durante los años 2015-2016, La leptospirosis es una enfermedad zoonótica considerada una de las

más ampliamente diseminadas y prevalentes en la naturaleza, que puede transmitirse por contacto directo o indirecto con la orina de animales infectados. La mayoría de la carga de morbilidad se produce en las regiones tropicales donde pueden producirse grandes epidemias después de fuertes lluvias e inundaciones⁴⁶.

En el ensayo que realizaron por PCR en tiempo real, se logró detectar de los 253 sueros, la presencia de CHIKV, DENV y ZIKV en 71.5%, 0.39% y 2.37%, respectivamente. La ampliación de cobertura para la identificación de virus del género flavivirus y alfavirus por medio de PCR anidada, logro aumentar el poder de detección de CHIKV y ZIKV en un 76.24% y 15.01%, respectivamente. La búsqueda intencionada de otros patógenos causantes de síntomas a infección por enfermedad febril similares a arbovirosis, identificó 3.16% de casos positivos para L. Kmetzi por PCR tiempo real con Sybr-green para leptospirosis y rickettsiosis⁴⁶.

La destreza de utilizar dos métodos alternativos para la identificación de arbovirus demuestra el poder de detección (qPCR + PCR-anidada), para aumentar los casos positivos a algún tipo de virus⁴⁶. Es importante considerar que en este estudio se utilizaron iniciadores universales capaces de detectar 53 especies de Alfavirus y 32 especies de Alfavirus, aumenta la posibilidad de poder encontrar casos positivos a otro arbovirus, ya que los iniciadores utilizadas en esta investigación solo pueden detectar 13 alfavirus y 14 flavivirus. Por lo cual el uso de primers universales especialmente el género-específico permitirá la detección de varios virus que se encuentran dentro de un mismo grupo, posibilitando el diagnóstico de un número mayor de infecciones.⁵

Se debe de considerar en cada laboratorio la estandarización de técnicas moleculares con fines diagnósticos o de investigación, con la finalidad de determinar las condiciones adecuadas de reacción de todos los elementos que la componen. En el caso de la RT-PCR, es muy sensible y específica y es de suma importancia para su utilidad clínica, sin embargo suelen tener algunas limitantes, ya que estudios previos han demostrado que el procesamiento de muestras y el método de extracción de ARN contribuyen significativamente a los resultados en el número de positivos o negativos "falsos". De igual manera, algunos estudios demuestran que la variación de secuencia en los virus puede afectar la detección por RT-qPCR⁴⁶.

Es fundamental ejercer una vigilancia activa y permanente en todos los sitios de alto riesgo, así como la búsqueda y selección de pruebas diagnósticas más específicas para lograrlo. La implementación de los métodos para la detección de alfavirus y flavivirus, mejorará y agilizará la oportunidad de diagnóstico, ya que en una sola reacción se podrá identificar un gran número de virus y con ello se podrá obtener un resultado más oportuno. Además el diagnóstico diferencial virológico, debe ser fortalecido con el análisis diferencial bacteriano y parasitario

De igual manera se encomienda realizar la inoculación de las muestras en cultivos celulares tanto en células vero, como en células C6/36, disponibles en el departamento de virología, las cuales son líneas celulares que permiten el desarrollo de los arbovirus, la replicación viral se puede ver expuesta por el efecto citopático (ECP) presente en es las células y posteriormente se puede extraer el material genético del microorganismo que se encuentre , para así ser secuenciado y poder conocer el agente etiológico que está causando la infección.

En la actualidad no hay evidencia de que este circulando un diferente arbovirus de los que ya se han mencionado en el país. Sin embargo, la introducción puede llevarse a cabo, debido a la importación por viajes, la presencia de vectores competentes (los mismos vectores de Dengue, Zika, Chikungunya), y la susceptibilidad de la población. Dada la posibilidad de la introducción en el país, es esencial la preparación anticipada. La detección oportuna de casos y una respuesta apropiada y rápida, con la participación activa de todas las partes interesadas, serán necesarias para minimizar el riesgo.

8. Conclusiones

- No se encontró evidencia de la circulación de otros arbovirus en el país durante el período que abarco la investigación (año 2016).
- La implementación de la vigilancia molecular por metodologías multiplex, permite identificar simultáneamente arbovirus y hace de la vigilancia una herramienta más eficiente.
- La RT-PCR para alfavirus y flavivirus en conjunto con el implemento de la RT-qPCR triplex, fortalece el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de miembros de estos agentes virales.
- El mantener el diagnóstico diferencial virológico, debe ser fortalecido con el análisis diferencial bacteriano y parasitario, lo que favorecerá la detección oportuna de varios agentes etiológicos.
- Dada la posibilidad de la introducción de distintos arbovirus en el país, es esencial la preparación anticipada. La detección oportuna de casos y una respuesta apropiada y rápida, con la participación activa de todas las partes interesadas, serán necesarias para minimizar el riesgo.

9. Recomendaciones

Incrementar la capacidad de diagnóstico y la vigilancia clínica y epidemiológica, implementando de manera obligatoria “instrumentos para el diagnóstico y la atención a pacientes con sospecha de arbovirosis”³.

Mejorar la educación comunitaria en materia de salud, promover prácticas de higiene e incrementar la conciencia y capacidad de acción de la comunidad. Las campañas educativas son *esenciales* para reducir los sitios de reproducción e interrumpir la transmisión de enfermedades⁴⁷.

La comunicación efectiva con la comunidad y las distintas partes interesadas, es esencial para evitar la confusión y la desinformación y para comprometer a las personas en las actividades destinadas a reducir el riesgo de una enfermedad⁴⁸.

Una vez que se detecta un caso autóctono de algún arbovirus al país, se debe de llevar a cabo una investigación epidemiológica exhaustiva para²²:

- Rastrear la diseminación del virus
- Monitorear la posible introducción del virus en las áreas circundantes
- Describir las características epidemiológicas y clínicas clave.
- Evaluar la severidad clínica y el impacto sobre la sociedad (por ejemplo: días de ausencia en el trabajo, cierre de escuelas, etc.).
- Identificar los factores de riesgo de infección o enfermedad severa.

La única herramienta disponible para prevenir la infección por algún arbovirus, es la reducción del contacto humano-vector para ello se deben de seguir una serie de recomendaciones²²:

- Protección personal: Las personas pueden reducir el riesgo de infección mediante el uso de repelentes sobre la piel o ropa. Utilizar mosquiteros dentro y fuera del hogar. El uso de mosquiteros TI tiene la ventaja de matar a los mosquitos que entran en contacto con el mosquitero, lo que puede reducir el contacto vector-humano para otros habitantes en la vivienda.
- Prevención en la vivienda: El uso de mallas en las ventanas y puertas. Utilizar recipientes para almacenamiento de agua a prueba de mosquitos para reducir los sitios de ovoposición y de producción local. Evita que los mosquitos depositen sus huevecillos en el agua que almacenas. Una vez a la semana; vacía, lava, voltea y tapa.

Revisa dentro y fuera de tu casa que no haya recipientes y objetos propicios para servir como criaderos. Prevención en el barrio y la comunidad: La prevención en el barrio y en la comunidad debe basarse en programas para control de vectores, los cuales se encuentran disponibles al público.

Se recomienda hacer consulta de las guías que proporciona la OMS las cuales brindan información acerca de los principales métodos para el control de vectores. Se debe de contar con programas, los cuales deben de ser manejado por biólogos profesionales experimentados en el control de vectores, para garantizar que se utilicen las recomendaciones vigentes para el control, además que se pueda integrar nuevos métodos y se incluyan pruebas de resistencia²².

10. Bibliografía

¹ Organización Mundial de la Salud. (2017). Enfermedades transmitidas por vectores. Disponible en: [pps.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/index.html](https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/index.html).

² Organización Panamericana de la Salud. (2016). Instrumento para el diagnóstico y la atención a pacientes con sospecha de arbovirus. Washington, CDC Pp:1-2

³ Arredondo G. J., Méndez H. A., Medina C. H. (2016). Arbovirus en Latinoamérica. 37(2):111-131. Disponible en: www.actapediatrica.org.mx [01-abril-2019].

⁴ Cazares S. F., Medina P.P., Márquez M.M., Huerta H., Torres R.L., Fuentes C.C., Duran D., Vázquez M. (2017). Avances en la vigilancia Entomovirología. Secretaria de salud. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/avances-en-la-vigilancia-entomovirologica>. [3-02-2018].

⁵ Carpio L. (2017). Arbovirus Emergentes. Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. Veracruz. Pp: 1-4

⁶ Cardoza F.M., Rojas A.M., Franco L., Herebia L., Vallejos M., Páez G.M., Guillén Y., Mendoza L.M. (2017). Búsqueda de flavivirus en individuos con sospecha clínica de dengue y con resultado negativo para el antígeno NS1 en Paraguay. Mem. Ist. Investig. Cienc.Salud; 15(1):7-17.

⁷ Cardoza F.M., Rojas A.M., Franco L., Herebia L., Vallejos M., Páez G.M., Guillén Y., Mendoza L.M. (2017). Búsqueda de flavivirus en individuos con sospecha clínica de dengue y con resultado negativo para el antígeno NS1 en Paraguay. Mem. Ist. Investig. Cienc.Salud; 15(1):7-17

⁸ Vázquez G. A. (2010). Búsqueda de flavivirus en mosquitos de humedales españoles: Análisis moleculares del virus west nile, y otros flavivirus. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal. Madrid. Pp: 2-5

⁹ S/A. (2016) Virus Zika. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. Fichas de agentes biológicos. Disponible en: <https://www.insst.es/documents/94886/354390/Virus+Zika+2016.pdf/00a14c77-dd29-418a-8b59-e1974f2a9c24?version=1.0>

¹⁰ Ortega S.E., Arellano A. Z., Barrón L.B. (2016). Chikungunya y Zika en América y México. Laboratorio de Virología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Vol. 6, Núm. 2. Pp. 57-68. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2017/ir172c.pdf>

¹¹ Gómez A., Montoya G., Rivera H., Hernández J. (2017). Características de la estructura molecular de las proteínas E del virus del Zika y E1 del virus de la rubéola y posibles implicaciones en el neurotropismo y en las alteraciones del sistema nervioso. Biomédica. Supl.Pp.121-32. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v37s1/0120-4157-bio-37-s1-00121.pdf>

¹² Organización Mundial de la Salud. (2018). Enfermedad por el virus de Zika. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>

¹³ Velandia L. M., Jaime E. Castellanos. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia. Infect. vol.15 no.1. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922011000100006

¹⁴ Tiscareño L., Guo X. S., Bocanegra G. V. (2012). Virus del dengue. Estructura, serotipos y epidemiología molecular. Universidad Autónoma de Tamaulipas México. vol. 6, núm. 3 Pp. 27-33. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/4419/441942927002.pdf>

¹⁵ Montes M. T. (2001). Actualización en dengue. Parte 1. Cátedra de Microbiología, Escuela de Medicina "Luis Razetti", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsair/e/repindex/repi78/pagina/text/fulltext/vene.pdf>

- ¹⁶Centers for Disease Control and Prevention (2013). DENV-1-4 Real-Time RT-PCR Assay https://www.cdc.gov/dengue/resources/rt_pcr/CDCPackageInsert.pdf
- ¹⁷ Bernal V.M., Cardozo S.F., Mendoza T.L. (2017). Estandarización de una técnica de RT-PCR anidada para detección de alfavirus. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 36 15(2): 30-36
- ¹⁸ S/A. (2018). Genus: Alphavirus. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponible en: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/togaviridae/872/genus-alphavirus. [07-junio-2019].
- ¹⁹ Sánchez S.P., Navarro M. (2005). Infecciones por el virus de Toscana, el virus del Nilo occidental y otros arbovirus de interés en Europa. Elsevier. Vol. 23. Núm. 9. Pp.517-577. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-infecciones-por-el-virus-toscana-13080267>
- ²⁰ Cervantes A. G., Sanjuán V. H. (2016). Virus chikungunya: Características virales y evolución genética. *Salud Uninorte.* Barranquilla Vol. 32 No. 2 Pp. 292-301. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v32n2/v32n2a11.pdf>
- ²¹ Corrales A. E., Troyo A., Calderón A. O. (2015). Chikungunya: un virus que nos acecha. *Acta méd. costarric* vol.57 no.1. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022015000100002
- ²² Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez". (2017). Lineamientos para la vigilancia por laboratorio del dengue y otras arbovirus. México Pp:1-10
- ²³ Organización Panamericana de la Salud (2011). Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2010 (to week noted by each country). Disponible en: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2011/dengue_cases_2010_May_20.pdf
- ²⁴ Organización Mundial de la Salud. (2017). Dengue y dengue grave. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>

- ²⁵ Secretaria de Salud. (2014). Panorama Epidemiológico Dengue, 2014. Dirección General de Epidemiología. México. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/285237/Pano_dengue_sem_52_2017.pdf
- ²⁶ Secretaria de Salud. (2017). Panorama Epidemiológico Dengue, 2017. Dirección General de Epidemiología. México. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/285237/Pano_dengue_sem_52_2017.pdf
- ²⁷ Organización Panamericana de la Salud. (2017). Número de casos de fiebre Chikungunya en las Américas 2017. Pp:14
- ²⁸ Secretaria de Salud. (2016). Lineamientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico por Laboratorio de Infección por Virus Zika. Dirección General de Epidemiología. México. Pp: 5-7
- ²⁹ S/A. (2016). Epidemiological surveillance 19 - 25 of april. Federación Internacional de Sociedades de la Cruz Roja y de la Media Luna Roja. Disponible en: [http://zika.campuscruzroja.org/index.php/boletines/actualizaciones-epidemiologicas-ingles/5-update-zika-abril-ingles/file.\[4-feb-2018\]](http://zika.campuscruzroja.org/index.php/boletines/actualizaciones-epidemiologicas-ingles/5-update-zika-abril-ingles/file.[4-feb-2018]).
- ³⁰ Organización Mundial de la Salud. (2017). ZIKa-Actualización Epidemiológica Regional de la OPS (Américas) 25 de agosto de 2017. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599%3Aregional-zika-epidemiological-update-americas&catid=8424%3Acontents&Itemid=41691&lang=es.
- ³¹ Cazares S. F., Medina P.P., Márquez M.M., Huerta H., Torres R.L., Fuentes C.C., Duran D., Vázquez M. (2017). Avances en la vigilancia Entomovirología. Secretaria de salud. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/avances-en-la-vigilancia-entomovirologica>. [3-02-2018].
- ³² Cárdenas M., Pech N., Arias J. (2016). Fiebre Mayaro, Enfermedad emergente. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina. México; Vol 3, No 3. Pp: 32-40

- ³³ Organización Mundial de la Salud. (2016). Enfermedad por el virus de Oropouche. Perú. Disponible en: <http://www.who.int/csr/don/03-june-2016-oropouche-peru/es/>. [4-Feb-2018]
- ³⁴ Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2017). Prueba Trioplex RCP-TR en tiempo real. Disponible en: <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/spanish/trioplex-real-time-rt-pcr-assay-instructions-for-use-sp.pdf>
- ³⁵. Centers for Disease Control and Prevention (2013). DENV-1-4 Real-Time RT-PCR Assay https://www.cdc.gov/dengue/resources/rt_pcr/CDCPackageInsert.pdf
- ³⁶ Ortiz A., Capitan Z., Mendoza Y., Cisneros J., Moreno B., Zaldivar Y., Garcia M., Smith R., Motta R., Pascale M. (2012). Simple, specific molecular typing of dengue virus isolates using one-step RT-PCR and restriction fragment length polymorphism. Journal of Virological Methods. Elsevier. Pp.129-135
- ³⁷ Sánchez S., Rosario D., Guzmán G., Tenorio A. (2001). A generic nested RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. Journal of Virological Methods. Elsevier. Pp.153-161
- ³⁸ Tamay D. L., Ibarra C., Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Laboratorio de Biotecnología, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), México, D.F. Vol. 2, Núm. 2, Pp 70-78. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/rid>
- ³⁹ Cortazar M.A.,Silva R.E.(2004). Métodos Físicoquímicos en Biotecnología PCR. Instituto de Biotecnología .UNAM. Pp: 1-40. Disponible en: www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf
- ⁴⁰ Ortega S.E., Arellano A. Z., Barrón L.B. (2016). Chikungunya y Zika en América y México. Laboratorio de Virología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Vol. 6, Núm. 2. Pp. 57-68. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2017/ir172c.pdf>

- ⁴¹ Navarrete E.J., Gómez D.H. (2006). Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2006/im064i.pdf>
- ⁴² Ortiz E.A., Rodríguez S.M., López R.M., Quintero S.E. (2018). Identificación de Denv, Chikv y Zikv mediante el método TRIPLEX por rt-PCR en tiempo real en el LESP Jalisco, México. Estatal de Salud Pública. Revista Médico-Científica de la Secretaría de Salud Jalisco. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/saljalisco/sj-2018/sj18Eh.pdf>
- ⁴³ InDRE. (2019). Lineamientos de Vigilancia por Laboratorio Dengue y otras arbovirosis. Secretaría de Prevención y promoción de la Salud. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/506677/Lineamientos_Dengue_Arb_V2_2019.pdf
- ⁴⁴ Vivaldo G.C., Rezende F.C., Vogel S.M., Bosco L.G., Lázaro M.M.(2017). Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans in Central Brazil. Vol. 62. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.07.016>
- ⁴⁵ Palacios G., Wiley R. M., Travassos P. A., Guzmán H., Quiroz E., Savji N, Carrera P., Busseti V., Lander T. J., Lipkin W., Tesh R. (2015). Characterization of the Punta Toro species complex (genus Phlebovirus, family Bunyaviridae). Journal of General Virology; 96, 2079-2085.
- ⁴⁶ Lugo T.J. (2019). Diagnóstico molecular y caracterización genética de patógenos transmitidos por artrópodos vectores, en pacientes con síndrome febril en la región fronteriza del sur de México. Universidad autónoma de Nuevo León. Facultad de ciencias biológicas. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/18015/1/1080288638.pdf>
- ⁴⁷ Uribarren B. T. (2018). Dengue, y otras infecciones no hemorrágicas: fiebre Chikungunya, Zika, fiebre del Nilo Occidental y otros arbovirus. Departamento de microbiología y parasitología. UNAM. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/dengue.html>
- ⁴⁸ Organización Panamericana de la Salud. (2011). Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. Washington. Pp. 53-71, 112-117.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

PROYECTO: Diagnóstico diferencial de dengue, chikungunya y Zika mediante RT-PCR genéricos durante el año 2016 en México.

PROYECTO GENERICO Evaluación de productos relacionados con la salud

ALUMNO: Maetzin Villafranca Martínez

MATRÍCULA: 2123075296

DIRECCIÓN: Av San Pablo #396 B-3 403, Col. San Martín Xochinahuac, Azcapotzalco.

Teléfono: 55-78-07-84-88

Teléfono celular: 55-78-07-84-88

CORREO ELECTRÓNICO: maetzinvillafranca@outlook.com

Asesores

Dra. Ana Laura Esquivel Campos

M. en C. Mauricio Vázquez Pichardo

Fecha de inicio: 21 de febrero 2018

Fecha de terminación: 21 de agosto 2018

Fecha de entrega: 05 de marzo 2021

11. Resumen

Introducción

Países de toda América Latina continúan siendo focos de enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes afectando a millones de personas. Los brotes de tales enfermedades tienen un impacto significativo en la salud y el desarrollo económico en la población. La necesidad de prevenir, detectar y responder a cualquier enfermedad infecciosa que represente una amenaza para la seguridad sanitaria mundial sigue siendo una prioridad nacional, regional e internacional¹.

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETV) son padecimientos causados por agentes patógenos, representan más del 17% de las enfermedades infecciosas a nivel mundial, especialmente en regiones tropicales y subtropicales, donde son consideradas enfermedades endémicas². Se distinguen entre 300 a 400 especies de las cuales un tercio afecta al ser humano y 40% causan cuadros clínicos definidos³.

Las enfermedades producidas por arbovirus son un problema muy grave a nivel mundial, debido a que su vigilancia y prevención implica también la vigilancia de sus vectores, lo que hace difícil su control y casi imposible evitar su diseminación a cualquier país tropical o subtropical, e incluso algunas regiones templadas⁴. En México, las enfermedades por estos virus son reconocidas como prioritarias para la vigilancia epidemiológica y los programas de control de vectores. Se estima que cerca del 60% del territorio nacional presenta las condiciones que favorecen la transmisión de estas enfermedades⁵.

Los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) son un grupo taxonómicamente heterogéneo de más de 500 virus que tienen en común el mecanismo por el cual se transmiten. De éstos, se reconoce que aproximadamente 150 causan enfermedad en el hombre. Se divide en las siguientes familias: Togaviridae (arbovirus del grupo A), Flaviviridae (arbovirus del grupo B), Bunyaviridae, Reoviridae y Rhabdoviridae⁶; La enfermedad que causan puede ser subclínica y las manifestaciones, variadas. Los síndromes que habitualmente se asocian con estos virus suelen dividirse en cuatro grupos, según sus manifestaciones:

- Fiebre y mialgias (dengue, Oropuche, Punta Toro, otras).
- Artritis y exantema (Mayaro, Chikungunya, Río Ross, otras).
- Encefalitis (La Crosse, San Luis, del Nilo, otras).
- Fiebres hemorrágicas (dengue, fiebre amarilla, Valle del Rift, otras)⁶.

En México el Dengue, la fiebre Chikungunya y la enfermedad por virus Zika, son consideradas entre las más importantes arbovirosis. Ante la introducción de virus Chikungunya (2014) y virus Zika (2015), el diagnóstico clínico se complica⁷. La similitud clínica que se presentan por esto agentes etiológicos, hace del diagnóstico diferencial (ver gráfica 1) una herramienta de vigilancia por laboratorio sumamente importante para coadyuvar en el entendimiento del panorama epidemiológico Nacional y Regional.

Es importante determinar la técnica de detección a emplear basándose en la información clínica, tiempo de presentación de la sintomatología y sospecha de patógeno, ya que de esto depende el éxito de las pruebas.

El InDRE como Centro Colaborador de la OPS/OMS en arbovirus tiene el objetivo de dar respuesta a las necesidades que plantea el Panorama epidemiológico nacional e internacional; ya que cuenta con la infraestructura necesaria para realizar el diagnóstico diferencial. Por lo cual el presente trabajo tiene como propósito la búsqueda y detección de arbovirus que no han sido identificados por el SINAVE, lo cual permitirá a futuro desarrollar estructuras de planificación para el control de vectores y toma de decisiones en los centros de salud para responder a un probable brote por estos agentes etiológicos.

Objetivos

Objetivo general

Realizar la búsqueda intencionada de (14 Alfavirus y 21 Flavivirus) en México durante el año 2016, para coadyuvar en la oportuna aplicación de medidas de prevención y control de vectores.

Objetivos particulares

- Seleccionar las muestras negativas a DENV, CHIKV y ZIKV del año 2016.
- Obtener ácidos nucleicos totales, mediante el uso del robot MAGNA PURE LC 2.0.
- Realizar el diagnóstico de las muestras de sueros mediante RT-PCR trioplex.
- Amplificar material genético de otros arbovirus mediante RT-PCR punto final (Pan-Flavi y Pan-Alfa).
- Analizar amplicones obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa.

- Amplificar material genético de virus mayaro mediante PCR tiempo real en muestras positivas para Pan-Alfa.
- Analizar los resultados para contribuir al conocimiento de agentes patógenos que no han sido identificados.

Resultados

Se obtuvieron 3 muestras positivas a otros arbovirus a los cuales originalmente fueron dirigidos por la clínica que presentaron, 2 muestras con definición operacional de CHIKV, resultaron ser positivas una a ZIKV (Cq 26.33) y la segunda a DENV (Cq 26.73). La tercera muestra con sospecha clínica ZIKV, resulto ser positiva para Chikungunya (Cq 34.14).

Una cuarta muestra resultó ser positiva a DENV-1 con un Cq 30.61, inicialmente fue dirigida a DENV, sin embargo resultó negativa al antígeno NS1.

Como resultado en el diagnóstico diferencial ampliado no se evidenció la circulación de otros arbovirus en el país durante el período que abarco la investigación.

Sin embargo las condiciones en el ciclo del protocolo PCR anidado para Alfavirus⁸, que se estaba utilizando en el laboratorio, se modificó utilizando las siguientes condiciones: 40 ciclos, desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 52°C por 1 min y la elongación a 72°C por 15 segundos y al final de la extensión a 72°C durante 5min; esta decisión se tomó ya que algunos geles que fueron revelados mostraban bandas inespecíficas que no correspondían a la banda esperada (200pb).

Discusión

Con la circulación simultanea de DENV, ZIKV y CHIKV en el año 2016 en México y con la dificultad para dar un diagnóstico clínico correcto por la similitud de la sintomatología de estas 3 enfermedades, podemos observar que existen errores en el diagnóstico de la enfermedad y por ende el tratamiento que se le pudo haber proporcionado al paciente probablemente no fue el adecuado, poniendo en riesgo su salud. Por lo cual esta herramienta ayudara a dar un diagnóstico oportuno que ayudara a tratar de mejor manera al paciente.

Además que nos permitirá detectar coinfecciones en lugares donde circulan los 3 arbovirus. De acuerdo con un estudio realizado por el Instituto Mexicano del Seguro Social, logaron detectar por

Rt-PCR triplex, 5 coinfecciones de Virus Dengue con Virus Zika, y 1 coinfección de virus chikungunya con virus zika de 1,083 muestras incluidas en el estudio⁶.

Es de suma importancia, saber la técnica que se va utilizar en esos momentos, se debe de considerar ciertos factores como: periodo en el que inicia y termina enfermedad, si en la zona donde radica existe la circulación de dos o más virus pertenecientes a la misma familia, especificidad y sensibilidad de un método etc⁹.

Particularmente, las pruebas serológicas en poblaciones con alta exposición a DENV y la circulación de los 3 arbovirus podrían ser extremadamente difíciles debido a problemas de reactividad cruzada. Por lo tanto, Rt-PCR tiene una ventaja sobre la serología debido a su especificidad. Tal es el caso de la muestra que dio positivo a Dengue por el método Rt-PCR triplex y negativo a antígeno NS1, otros factores que pidieron influir de acuerdo a la literatura son una viremia relativamente baja y una infección secundaria (debido a la presencia de inmunocomplejos virus-IgG pre-existentes)¹⁰.

Las muestras analizadas (60 sueros y 30 clarificados) por protocolos por familia (Alfavirus y Flavivirus), no presentan carga viral detectable para ninguno de los virus que detecta estos protocolos, es importante seguir con la investigación, ya que los descubrimientos pueden alertar el riesgo de diseminación de agentes infecciosos que comparten características de transmisión, que coinciden en el nicho ecológico en que se reproducen y que potencialmente pueden aparecer en una región y el daño que pueden ocasionar a grandes grupos de población.

De acuerdo con investigaciones realizadas por diagnóstico diferencial, se ha detectado agentes etiológicos que presentan cuadros clínicos similares a los arbovirus, en especial a la familia de Flavivirus y Alfavirus.

Los investigadores del centro de Brasil, realizaron un estudio seroepidemiológico buscando la presencia de anticuerpos anti-MAYV / OROV en pacientes de Goiânia, en 647 muestras negativas a dengue, de ese total, seis muestras resultaron positivas para el virus Mayaro y otras seis dieron positivo para el Oropouche, los dos virus fueron detectados de manera simultánea en tres muestras¹¹. Por otro lado un estudio realizado en Panamá por Carrera P. y colaboradores, fue detectado un virus llamado Punta Toro (PTV), el cual apareció por primera vez en un soldado estadounidense en Panamá en 1966, el virus reapareció en 2009 con un brote de dengue⁴⁸; Posteriormente siguiendo con la investigación encontraron 2 casos positivos en 2014 y 4 a finales de 2017 y principio de 2018 (diciembre-enero). Caracterizaron la enfermedad causada por este virus y demostraron que el diagnóstico no se puede lograr clínicamente, ya que los síntomas se confunden con el dengue¹².

En otro estudio encontraron la presencia de *L. kmetyi* en pacientes de la región fronteriza de México, durante los años 2015-2016, detectado por PCR tiempo real con Sybr-green para leptospirosis y rickettsiosis¹³.

Es fundamental ejercer una vigilancia activa y permanente en todos los sitios de alto riesgo, así como la búsqueda y selección de pruebas diagnósticas más específicas para lograrlo. La implementación de los métodos para la detección de alfavirus y flavivirus, mejorará y agilizará la oportunidad de diagnóstico, ya que en una sola reacción se podrá identificar un gran número de virus y con ello se podrá obtener un resultado más oportuno. Además el diagnóstico diferencial virológico, debe ser fortalecido con el análisis diferencial bacteriano y de parasitario

De igual manera se encomienda realizar la inoculación de las 90 muestras en cultivos celulares tanto en células vero, como en células C6/36, disponibles en el departamento de virología, las cuales son líneas celulares que permiten el desarrollo de los arbovirus, la replicación viral se puede ver expuesta por el efecto citopático presente en las células y posteriormente se puede extraer su material genético, para ser secuenciado y poder conocer el agente etiológico que está causando la infección.

Conclusiones

- No se encontró evidencia de la circulación de otros arbovirus en el país durante el período que abarco la investigación (año 2016).
- La implementación de la vigilancia molecular por metodologías multiplex, permite identificar simultáneamente arbovirus y hace de la vigilancia una herramienta más eficiente.
- La RT-PCR para alfavirus y flavivirus en conjunto con el implemento de la RT-qPCR triplex, fortalece el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de miembros de estos agentes virales.
- El mantener el diagnóstico diferencial virológico, debe ser fortalecido con el análisis diferencial bacteriano y parasitario, lo que favorecerá la detección oportuna de varios agentes etiológicos.
- Dada la posibilidad de la introducción de distintos arbovirus en el país, es esencial la preparación anticipada. La detección oportuna de casos y una respuesta apropiada y rápida, con la participación activa de todas las partes interesadas, serán necesarias para minimizar el riesgo.

Bibliografía

1. Lugo T.J. (2019). Diagnóstico molecular y caracterización genética de patógenos transmitidos por artrópodos vectores, en pacientes con síndrome febril en la región fronteriza del sur de México. Universidad autónoma de Nuevo León. Facultad de ciencias biológicas. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/18015/1/1080288638.pdf>
2. Organización Mundial de la Salud. (2017). Enfermedades transmitidas por vectores. Disponible en: [pps.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/index.html](https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/index.html).
3. Organización Panamericana de la Salud. (2016). Instrumento para el diagnóstico y la atención a pacientes con sospecha de arbovirus. Washington, CDC Pp:1-2
4. Arredondo G. J., Méndez H. A., Medina C. H. (2016). Arbovirus en Latinoamérica. 37(2):111-131. Disponible en: www.actapediatrica.org.mx [01-abril-2019].
5. Cazares S. F., Medina P.P., Márquez M.M., Huerta H., Torres R.L., Fuentes C.C., Duran D., Vázquez M. (2017). Avances en la vigilancia Entomovirología. Secretaría de salud. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/avances-en-la-vigilancia-entomovirologica>. [3-02-2018].
6. Navarrete E.J., Gómez D.H. (2006). Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2006/im064i.pdf>
7. Ortega S.E., Arellano A. Z., Barrón L.B. (2016). Chikungunya y Zika en América y México. Laboratorio de Virología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Vol. 6, Núm. 2. Pp. 57-68. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2017/ir172c.pdf>
8. Sánchez S., Rosario D., Guzmán G., Tenorio A. (2001). A generic nested RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. Journal of Virological Methods. Elsevier. Pp.153-161
9. InDRE. (2019). Lineamientos de Vigilancia por Laboratorio Dengue y otras arbovirosis. Secretaría de Prevención y promoción de la Salud. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/506677/Lineamientos_Dengue_Arb_V2_2019.pdf
10. Cardoza F.M., Rojas A.M., Franco L., Herebia L., Vallejos M., Páez G.M., Guillén Y., Mendoza L.M. (2017). Búsqueda de flavivirus en individuos con sospecha clínica de

dengue y con resultado negativo para el antígeno NS1 en Paraguay. Mem. Ist. Investig. Cienc. Salud; 15(1):7-17.

11. Vivaldo G.C., Rezende F.C., Vogel S.M., Bosco L.G., Lázaro M.M.(2017). Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans in Central Brazil. Vol. 62. <https://doi.org/10.1016/j.jiid.2017.07.016>
12. Palacios G., Wiley R. M., Travassos P. A., Guzmán H., Quiroz E., Savji N, Carrera P., Busseti V., Lander T. J., Lipkin W., Tesh R. (2015). Characterization of the Punta Toro species complex (genus Phlebovirus, family Bunyaviridae). Journal of General Virology; 96, 2079-2085.
13. Lugo T.J. (2019). Diagnóstico molecular y caracterización genética de patógenos transmitidos por artrópodos vectores, en pacientes con síndrome febril en la región fronteriza del sur de México. Universidad autónoma de Nuevo León. Facultad de ciencias biológicas. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/18015/1/1080288638.pdf>