



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

MÉTODO DE qPCR MULTIPLEX PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LOS VIRUS DE ZIKA, DENGUE Y CHIKUNGUNYA

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

LUIS URIBE ESPEJO GALICIA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ ABAD ZAVALA

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. GABRIEL GUILLEN SOLÍS

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA 2017

DEDICATORIAS

A mis padres, **María Florencia Galicia Herrera y Uribe Espejo Ruíz** sabiendo que no hay forma de agradecer toda una vida llena de sacrificios y esfuerzos para brindarme la educación y vida que me han dado. Les dedico este trabajo por darme la oportunidad de superarme y que este objetivo logrado también es de ustedes, porque la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su esperanza y esfuerzo.

A mi hermano **José Roberto Espejo Galicia** por enseñarme que el éxito viene del trabajo duro.

A **Daniel Sánchez Félix y Estefanía Sánchez Félix** por ser como mis hermanos y apoyarme siempre.

A mi prometida **Ania Itzel López Cobos** por apoyarme a que siga adelante.

A toda **mi familia** por desmostarme que el éxito lo puede lograr las personas que se lo propongan.

A mis amigos **Erick de Jesús Manzano Reyes y Keyla Mauleon Tolentino**, por estar conmigo apoyándome y dándome ánimos para terminar la tesis.

A todos mis **amigos y compañeros** por formar parte de mi vida, que me apoyaron para que siguiera adelante.

A mis **profesores y asesores** por el apoyo y tiempo brindado para realizar mi tesis.

A mis amigos **Abrahán Ramírez González, José Francisco Pulido Barraja y Luis Alberto Ramírez Vargas** por brindarme su amistad y apoyarme con el diseño y redacción de la tesis. Gracias por ser los mejores compañeros-amigos y compartir momentos de alegría, estrés, pereza, ansiedad, enojos, desveladas, tristeza y logros.

A mis compañeros que formaron parte de la generación 2011-2016 de biotecnología, gracias por ser los mejores compañeros-amigos y compartir momentos de alegría, estrés, pereza, ansiedad, enojos, desveladas y logros.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis **Dr. José Abad Zavaleta**, por su disponibilidad de tiempo para aclarar mis dudas, por guiarme, apoyarme y por brindarme su amistad.

A mi co-asesor de tesis **Dr. Gabriel Guillen Solís** por su amistad, comprensión, apoyo, consejos y por darme asesorías sobre mi tema de tesis.

A mis profesores: la **Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa**, **Dr. Julián Mario Peña Castro** y la **Dra. Jacqueline Capataz Tafur** por el valioso tiempo que invirtieron para apoyarme y guiarme.

Al personal de enfermería del Hospital General de Tuxtepec Oaxaca por apoyarme con las muestras.

Al Químico Clínico **Ricardo Hernández Vásquez** por la obtención de la muestras utilizadas para el diagnóstico.

Al director del Hospital General de Tuxtepec Oaxaca por darme el permiso para obtener las muestra de sangre de su institución.

Al doctor **Celso Ramos García** de instituto Nacional de Salud Pública por su donación de una muestra de Dengue tipo II y muestras en señal de préstamos para confirma la especificidad.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 5 de Diciembre del 2016 a las 12:00 hr, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Método de qPCR multiplex para el diagnóstico molecular de los virus de Zika, Dengue y Chikungunya** presentado por el alumno **Luis Uribe Espejo Galicia**, con número de matrícula 10090008, aspirante al grado de Licenciatura..

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU APROBACIÓN PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.

Tuxtepec, Oax., a 6 de Diciembre de 2016

ATENTAMENTE

LA COMISIÓN REVISORA

Asesor de Tesis

Dr. José Abad Zavaleta
Profesor- Investigador

Co-Asesor de Tesis

Dr. Gabriel Guillen Solis
Profesor- Investigador

Presidente

Secretario

Vocal

Dra. Julián Mario Peña Castro
Profesor- Investigador

Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo
Profesor-Investigador

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor- Investigador

CONTENIDO

Índice de Tablas	8
Índice de Figura	10
Abreviaturas	12
1.Resumen.....	13
2. Introducción	14
3. Antecedentes	15
3.1 Dengue	17
3.2 Chikungunya	18
3.3 Zika	20
3.4 Cuadro clínico de las infecciones virales del dengue, Chikungunya y Zika	21
3.5 Distribución Geográfica de los vectores que transmiten los virus de dengue, Chikungunya y Zika	23
3.6 Ciclo de Transmisión.....	25
3.7 Ciclo de replicación de los virus	26
3.8 Mecanismo de Infección de los virus	28
3.8 Tratamiento y Prevención de enfermedades virales transmitidas por vectores.....	29
3.9 el Diagnóstico de las Enfermedades Virales	31
3.9.1 Diagnostico Indirecto de las enfermedades virales	34
3.9.2 Diagnóstico Directo.....	38
4. Justificación	45
5. Pregunta Científica	45
6. Hipótesis.....	45
7. Objetivo General	46

8. Objetivos Específicos	46
9. Estrategia Experimental	46
10. Materiales y Metodos	47
10.1 Análisis Financieros	47
10.2 Muestras biológicas.....	47
10.3 Análisis de bases de datos de genomas de virus en NCBI.....	49
10.4 Análisis de similitud de secuencias de nucleótidos entre los genomas de los virus.....	50
10.5 Diseño de Oligonucleótidos.....	50
10.6 Validación del procedimiento de purificación de ARN.....	51
10.7 Extracción de ARN.....	52
10.8 Cuantificación de RNA viral en muestras de pacientes dianosticados con Zika, dengue o Chincongunya	53
10.9 Determinación de los parámetros de Estandarización	55
11. Resultados.....	58
11.1 Análisis de los Costos de la prueba y del Tiempo de procesamiento de las muestras.....	58
11.2 Búsqueda de Muestras	59
11.3 Alineamientos	60
11.4 Selección de Muestras y Kit de Purificación	66
11.5 Estandarización	70
12. Discusión.....	81
13. Conclusiones.....	83
14. Perspectivas.....	84
15. Referencias.....	85
Anexos.....	96

Anexo 1 Estudio de enfermedades transmitidas por vectores	96
Anexo 2 Carta informativa	97
Anexo 3 Formato de etiquetas	98
Anexo 4 Formatos de ingreso de muestra	98
Anexo 5 Formato de solicitud de proyecto para el hospital general.....	99
Anexo 6 Preparación de reactivo.....	100
Anexo 7 Protocolos de extracción de ARN.....	100
Anexo 8 Protocolo de kit TaqMan® Universal PCR Master Mix	102
Anexo 9 Protocolo de la tecnica de diagnostico diseñada.....	102
Anexo 10 Imágenes de amplificadas de qrt-pcr	108
Anexo 11 Datos obtenidos de rt-pcr para la seleccion de kit de extraccion ...	110
Anexo 12 Secuencias de Chikungunya seleccionadas para realizar alineamientos.....	111
Anexo 13 Secuencias de Zika seleccionadas para realizar alineamientos....	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características del fenotipos y genotípicos de los virus de chikungunya, dengue y zika.....	16
Tabla 2 Sintomatología en los cuadros clínicos de las tres enfermedades virales transmitidas por el mosquito Aedes.	22
Tabla 3 Tiempo de incubación del virus en el cuerpo.....	26
Tabla 4 Sintomatologías utilizadas en el diagnóstico clínico.....	32
Tabla 5 Métodos de diagnósticos para confirma enfermedades por virus.....	33
Tabla 6 Técnicas establecidos para el diagnóstico de virus patógenos para el humano.....	44
Tabla 7 Protocolo de preparación de reacción de RT-PCR.....	52
Tabla 8. Mezcla de reacción de la qRT-PCR.....	53
Tabla 9 Protocolo para la amplificación de los marcadores moleculares de los tres virus.....	54
Tabla 10. Características de los equipos utilizados para la validación de la prueba diagnóstica de marcadores moleculares de los virus zika, chikungunya y dengue	54
Tabla 11 Protocolo de preparación de controles en qRT-PCR	55
Tabla 12 Análisis de costos y tiempo de la qRT-PCR de un solo paso.....	58

Tabla 13 Secuencias conservadas de los 4 serotipos de dengue utilizada por el inDRe y OMS para el diagnóstico molecular del virus.	60
Tabla 14 Regiones seleccionadas para diseñar los oligonucleótidos de cada virus	61
Tabla 15. Oligonucleótidos diseñados para la qRT-PCR	63
Tabla 16. Secuencias control diseñadas para la técnica de qRT-PCR.....	63
Tabla 17 Ecuaciones de las regresiones lineal de la RT-PCR	68
Tabla 18 Resultados obtenidos de las muestras procesadas.	70
Tabla 19 Ct obtenidos en los equipos IQ5 y PIKO24 por dos usuarios	74
Tabla 20 Distribución de datos que se metieron en el programa SPSS 24.....	75
Tabla 21 Análisis Anova con tres factores para comprobar la repetibilidad y reproductividad.....	75
Tabla 22 Datos de Melting curve obtenidos para evaluar la factibilidad.....	76
Tabla 23. Estadística descriptiva de los datos obtenidos para el análisis de factibilidad.....	77
Tabla 24 Análisis ANOVA de dos factores en el programa SPSS 24.....	78

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1 Distribución de los mosquitos del genero Aedes en el mundo	23
Figura 2 Distribución geográfica de los virus de chikungunya, dengue y zika	24
Figura 3 Ciclo de transmisión del mosquito Aedes spp	25
Figura 4 Mecanismo replicación viral.....	27
Figura 5 Mecanismo de infección del virus..	28
Figura 6 Cronología de los componentes en una infección por virus.....	33
Figura 7 Esquema de la prueba de neutralización de la reducción de placa	35
Figura 8 Técnica de la hemaglutinación.....	36
Figura 9 Representación gráfica de la reacción de ELISA.....	37
Figura 10 Diagrama de flujo del procedimiento propuesto para el diagnóstico de virus en zonas endémica que presente chikungunya, dengue y zika	39
Figura 11 Representación esquemática de la reacción de PCR	40
Figura 12 Eventos moleculares durante la amplificación del DNA en presencia de las sondas Taqman.	41
Figura 13 Mecanismo de acción del SYBR GREEN..	42
Figura 14 Alineamiento de los virus de dengue, zika y chikungunya	62
Figura 15 Dispersión de secuencias de los oligonucleótidos para chikungunya	64

Figura 16	Dispersión de secuencias de los oligonucleótidos para para dengue	65
Figura 17	Dispersión de secuencias de los oligonucleótidos para zika	66
Figura 18	Grafica de concentraciones de cada ciclo de la qRT-PCR.	67
Figura 19	Amplificados de los controles sintéticos de zika y chikungunya.....	69
Figura 20	Amplificados de las secuencias control de los tres virus	69
Figura 21	Melting Curve de las muestras usadas para determinar la sensibilidad.	71
Figura 22	reacción de qRT-PCR con los Controles negativos	72
Figura 23	Amplificaciones a diferentes concentraciones de muestras	73
Figura 24	medias marginales estimadas de Melting para cada virus	79
Figura 25	Medias marginales para cada virus	79
Figura 26	Media marginal estimada de los virus	79
Figura 27	Amplificados de las muestras en los dos equipos.....	80

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ASIAN: virus de chikungunya genotipo de Asia

°C: Grados Celsius

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CHIKV: Virus de chikungunya

DENV: Virus de Dengue

ECSA: virus de chikungunya genotipo de Asia y África

ETV: Enfermedades transmitidas por vectores

FDA: Food and Drug Administration

h: horas

InDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

HRM: High Resolution Melt

Kb: kilobases

NCBI: National Center for Biotechnology Information

m: metros

ng: Nanogramos

OIE: World Organisation for Animal Health

OMS: La Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Pmol: picomol

PRNT: Prueba de neutralización de la reducción de placa

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa en tiempo real

Spp: Todas las especies

Tm: temperatura de disociación

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

WA: virus de chikungunya genotipo de este de África

ZIKV: Virus de zika

µg: microgramo

1.RESUMEN

El clima húmedo tropical de algunas regiones de México permite el desarrollo de Enfermedades de Transmisión Vectoriales (ETV). Las ETV con mayor prevalencia en el país son las que se transmiten por el mosquito del género *Aedes*, este vector tiene la capacidad de transmitir tres *arbovirus*; chikungunya (CHIKV), dengue (DENV) y zika (ZIKV).

Cada virus causa un cuadro febril muy parecido, pero dependiendo del virus causante de la enfermedad es el nivel de prioridad para su seguimiento, porque solo el virus de dengue puede causar daño severo e irreversible como la muerte, mientras que los virus de zika y chikungunya raramente producen cuadros febriles tan severos como el dengue, por este motivo sólo los pacientes con dengue se quedan internados en los centros de salud para su recuperación y seguimiento. Por lo tanto, para poder diagnosticar específicamente el agente causal se requieren de técnicas moleculares que permitan diferenciar el virus causante de la enfermedad.

Las técnicas de diagnóstico para su identificación se clasifican en dos tipos: el diagnóstico clínico que se basa en la determinación del virus causante de la enfermedad con el cuadro clínico que presenta el paciente, y las pruebas de laboratorio que se realizan mediante el análisis de la muestra para determinar si está o estuvo presente el virus durante la enfermedad.

Actualmente, los diagnósticos para estos virus se realizan de manera rutinaria debido al impacto social y económico que causa en los países del continente americano. Sin embargo, existen muy pocas técnicas de diagnóstico que permitan determinar los tres virus al mismo tiempo. Las que actualmente se utilizan en el mercado se basan en el uso de sondas Taqman, las cuales tienen un alto costo y un diseño complicado para su elaboración. Por tal motivo se hace necesario el diseño de una técnica de diagnóstico más económica y reproducible.

Por tal motivo, en este trabajo se diseñó una prueba de diagnóstico alternativa que permita disminuir los costos en la detección molecular simultánea de estos tres virus utilizando la técnica qRT-PCR múltiple.

Se realizó la qRT-PCR de un sólo paso usando el fluoróforo SYBR Green. Las muestras que se procesaron fueron de sangre humana recolectadas durante la fase

aguda (1-5 días del inicio del cuadro clínico) y posteriormente, se realizó el análisis de las curvas de disociación para obtener el diagnóstico.

Para poder confirmar que la técnica pueda ser usada como una técnica de diagnóstico molecular confiable, se evaluaron los parámetros de Especificidad, Reproducibilidad, Repetibilidad, Factibilidad y Sensibilidad para verificar que la técnica cumpla con los requisitos mínimos propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para poder ser utilizados como un diagnóstico y se determinó que la técnica cumple con los requisitos para ser utilizados como un kit de diagnóstico molecular para detectar los virus de chikungunya, dengue y zika de manera simultánea.

2. INTRODUCCIÓN

México es un país tropical donde hay insectos que son vectores de agentes infecciosos de humanos a las que se les denomina Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETV; Secretaria de Salud, 2012). Se estima que cerca del 60 % del territorio nacional presenta condiciones climatológicas que favorecen la transmisión de estos agentes infecciosos, dejando expuestos a más de 50 millones de habitantes (Ejupilco *et al.*, 2012). Dentro de las ETV las más relevantes en México por su prevalencia son las producidas por los virus chikungunya, dengue y zika los cuales, son transmitidos por los mosquitos del género *Aedes*. Es importante mencionar que estos virus son difíciles de diagnosticar si nos basamos en el cuadro clínico ya que son muy similares. Por esta razón, la OMS propone que se requiere una prueba de laboratorio confirmatoria cuando se sospeche de un cuadro clínico de una ETV (OPS, 2014b).

Las técnicas que se recomiendan actualmente para el diagnóstico de estos tres virus son el cultivo viral y La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (qRT-PCR), en especial durante la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, estas metodologías que propone la OMS son poco útiles para el diagnóstico en zonas que prevalecen los tres virus ya que se tienen que realizar tres pruebas consecutivas para determinar de manera precisa el agente causal de la enfermedad, y esto hace que aumente el tiempo para dar el diagnóstico y el costo (OPS, 2014b). Existe una variante de la qRT-PCR denominada qRT-PCR múltiple, que permite detectar simultáneamente más de un marcador molecular en un tubo de reacción de

qRT-PCR. Esto permite el diseño de metodologías que permitan buscar varios patógenos a la vez en una muestra biológica, por lo que permite diferenciar al agente causante de la enfermedad en una sola mezcla de reacción. Se realizó una búsqueda en la literatura y se encontró que en el continente americano la detección de estos tres virus se realiza a través de seis diferentes técnicas de PCR (BIONEER, 2016; CDS, 2016), pero todas utilizan las sondas Taqman que tienen un costo elevado, por lo que en este trabajo de investigación se propone desarrollar una prueba de detección molecular que permita la identificación de regiones específicas de chikungunya, dengue y zika en muestras biológica en un tubo de reacción. El diseño de la prueba está basado en la determinación de la “Tm” del producto de PCR a través de una curva disociación (“melting Curve”). La implementación de esta prueba permitirá ofrecer una prueba específica y de bajo costo para el control de estas enfermedades en México.

3. ANTECEDENTES

Las enfermedades virales transmitidas por el mosquito *Aedes spp* son un problema de salud pública a la que se enfrenta la humanidad. El género *Aedes* tiene la capacidad de transmitir más de 30 virus al hombre, con un foco máximo de infección durante los meses de julio a septiembre, debido a que durante este periodo lluvioso, el mosquito se reproduce (Icaza, 2010).

Actualmente, las ETV con mayor relevancia en México son las causadas por los virus de chikungunya, dengue y zika debidos ya que se han reportado un gran número de casos en los últimos años. Estos virus son originarios de Asia y África (Secretaría de Salud, 2012), y originalmente afectaban solo a los monos y chimpancés en zonas selváticas (Evia-Barba, 2014), pero debido a la introducción del hombre en zonas endémicas y el flujo de personas que viaja entre la selva y la ciudad se ha convertido en una enfermedad zoonótica (Zamudio *et al.*, 2008). Los primeros casos de las enfermedades por estos tres virus fuera de su zona endémica eran casos aislados, pero en el último siglo se han distribuido por todo el mundo, abarcando más de 90 países en 4 continentes, afectando principalmente a los países que se localizan en el cinturón tropical, como México, Colombia y Brasil (Palacios-Martínez *et al.*, 2015).

Desde la llegada de estos virus al continente se han diseminado rápidamente debido a: la migración de personas infectadas, aumento de la temperatura (Rivera-Ávila, 2014), la susceptibilidad que presenta la población de occidente para contraer el virus y la deficiencia de las campañas de prevención en los países latinos (Porta, 2012).

Los tres virus están estrechamente relacionados, pertenecen a un grupo de virus denominados *Arbovirus*, que comparten muchas características como el vector, mecanismo de infección, tipo de replicación y sus hospederos, son virus de ARN de cadena positivas (Tabla 1). Esta última característica es muy importante porque nos permite diseñar una técnica de diagnóstico molecular que los pueda detectar de manera simultánea .

Tabla 1 Características del fenotipos y genotípicos de los virus de chikungunya, dengue y zika.

	<i>Chikungunya</i>	<i>Dengue</i>	<i>Zika</i>
<i>Genero^{ak}</i>	Flavivirus	Alfavirus	Flavivirus
<i>Familia^{bg}</i>	Flaviviridae	Togaviridae	Flaviviridae
<i>Genoma^{fk}</i>	11 Kb	11.8 Kb	11 Kb
<i>Serotipo/genotipos^{dh}</i>	4 serotipos (DVEN1-4)	3 genotipos (WA, ASIAN, ECSA)	1 genotipo
<i>Tamaño^{ch}</i>	50 nm	65-70 nm	50-70 nm
<i>Tipo de virus^k</i>	ARN de cadena positiva	ARN de cadena positiva	ARN de cadena positiva
<i>Vector^{jl}</i>	<i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>Reservorio final^{ek}</i>	Primates	Primates y marsupiales	Primates

a: Conrad *et al.*, 2015; b: Ayers *et al.*, 2006; c: Evia-Barba, 2014; d: Ocazonez, Gómez, y Cortés, 2007; e: Zamudio *et al.*, 2008; f: Palacios-Martínez *et al.*, 2015; g: Powers y Logue, 2007; h: Caglioti *et al.*, 2013; i: Manore *et al.*, 2014; j: Abdelnabi *et al.*, 2015; k: Petersen *et al.*, 2016; l: Faye *et al.*, 2013.

Los tres virus producen una enfermedad denominada cuadro o síndrome febril, dependiendo del virus que lo produce es su cuadro clínico y el nombre que recibe, por ejemplo, si el causante de la enfermedad es el virus de dengue, se le denomina fiebre de dengue. Actualmente, se encuentran en el país los tres tipos de virus, y aunque llegaron en diferentes tiempos, ocupan las mismas zonas endémicas, lo que permite tener en una región las tres enfermedades simultáneamente, ocasionando un fuerte problema de salud pública.

3.1 DENGUE

El virus del dengue es un *Arbovirus* (Conrad *et al.*, 2015) que pertenece a la familia de *Flaviviridae* (Ayers *et al.*, 2006) y tiene la capacidad de producir una enfermedad denominada fiebre del Dengue. Este virus se transmite por la picadura de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* y como todos los virus de ARN positivo, tiene una nucleocápside que protege al material genético del ambiente (Evia-Barba, 2014). El virus del dengue presenta cuatro serotipos denominados DENV y se numeran del 1 al 4 (Evia-Barba, 2014). Esta clasificación se basa en las características antigénicas que produce cada serotipo (Rodríguez-Cruz, 2002), y es una variación de su estructura proteica en la cápside la que produce los diferentes anticuerpos (Ocazonez, Gómez, y Cortés, 2007).

La OMS estima que hay 100 millones de casos anuales de dengue a nivel mundial ocasionando cerca de 25,000 defunciones. De estos casos, en América se presentan más de 35 millones que provocan alrededor de 20,000 defunciones (Usme-Ciro *et al.*, 2012).

El DENV es un virus que cuenta con 4 serotipos, cada serotipo puede causar el cuadro clínico (Galvis *et al.*, 2014), el cuadro clínico que produce cada serotipo es muy variables, un solo serotipo puede causar desde un cuadro febril leve hasta un cuadro hemorrágico mejor conocido como dengue hemorrágico (Falcón-Lezama *et al.*, 2009) y la gravedad de la enfermedad esta relacionados con la respuesta inmune, la edad del paciente y características genéticas del individuo (Galvis *et al.*, 2014). El virus del Dengue está presente en cualquier época del año, pero los meses con mayor incidencia son los meses de julio a septiembre, que corresponde con la época de lluvia

que se presentan en el país, las cuales son las condiciones ideales para la reproducción del vector (Icaza, 2010).

El Dengue se volvió una enfermedad zoonótica (Zamudio *et al.*, 2008), cuando los humanos invadieron la selva y se pusieron en contacto con el vector (Pizarro, 2009), estas personas introdujeron los primeros brotes en zonas rurales, y posteriormente la enfermedad se diseminó por todo el mundo (Evia-Barba, 2014). Los primeros casos descritos del cuadro clínico que produce el DENV datan de china entre los siglos III y V, desde ese momento hasta casi 1000 años su presencia era exclusiva del viejo mundo, la llegada del virus al continente americano fue en año 1788 por las islas del Caribe (Instituto Internacional de Vacunas de México, 2009), la enfermedad estuvo aislada en esta zonas hasta que en 1941 se presentaron los primeros brotes en Puerto Rico, Bermuda, Cuba, Panamá, Venezuela, y Texas (Badii, *et al.*, 2007; Narro y Gómez, 1995; Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2011). Los primeros casos de Dengue en México fueron reportados en el mismo año (Ibañez-Bernal y Gómez-Dantés, 1995), desde entonces han pasado más de 70 años y sigue siendo uno de los problemas de salud pública a nivel nacional (Torres-Galicia *et al.*, 2014). En la actualidad los cuatro estados con mayor número de pacientes por fiebre de dengue son; Veracruz, Oaxaca, Guerrero y Chiapas (Centro de Información Estadística y Documental del estado de Oaxaca, 2012).

En México están presentes los cuatro serotipos del virus del Dengue (Icaza, 2003), la intensidad de cuadro clínico depende de varios factores como el serotipos, el sistema inmune del paciente, su edad, estado emocional y su genética (Galvis *et al.*, 2014).

3.2 CHIKUNGUNYA

El CHIK es un virus que pertenece al género *Alfavirus* (Powers y Logue, 2007), produce una enfermedad, denominada fiebre de chikungunya, su nombre proviene del Makonde que significa “el hombre que camina encorvado” (Casal *et al.*, 2015), por el aspecto que presentan los pacientes como consecuencia de su artritis que se presenta durante el cuadro clínico de la enfermedad (Porta, 2012). El virus tiene la capacidad de usar como huésped al hombre y algunos primates (Abdelnabi *et al.*, 2015) mediante la picadura del mosquito del género *Aedes* (Manore *et al.*, 2014). Los primeros casos

de la enfermedad fueron descritos por Robinson en la excolonia británica de Tanganika (actual Tanzania), en el año 1953 (Montero, 2015), desde su descubrimiento se han diseminado rápidamente por todo el mundo (OPS, 2014a), durante los años 1955-2003 mantuvo bajo perfil y solo se presentaban caso aislados en países africanos, hasta que en el 2004 se presentó el primer brote de CHIKV en Kenia, infectando a más de 40,000 personas (Josseran *et al.*, 2006), a partir de este brote el virus se esparció por el mundo, llegó a los continentes de Europa y Oceanía para el año 2005 (Matheus *et al.*, 2015), su llegada al continente americano fue en el 2013 por las islas del Caribe, y en menos de un año el virus se había propagado a Barbuda, Haití, República Dominicana y Saint Kitts (Rivera-Ávila, 2014), estos países permitieron su diseminación debido a que son países de un gran flujo de personas (Montero, 2015), gracias a estos para enero del 2014, el virus se había diseminado hacia el norte, llegando a los países de Centroamérica como el salvador y Guatemala (Rezza, 2014), posteriormente llegó a Norteamérica en el año siguiente (Casal *et al.*, 2015), el primer caso reportado de CHIKV en México fue en el mes de mayo del 2015 (Rivera-Ávila, 2015), y en menos de 10 meses el virus en México ya se habían confirmado un total de 11,394 casos, de los cuales el estado de Oaxaca tiene 1,190 casos confirmados (13 %), siendo el 4 estado del país con más casos (Secretaría de Salud, 2016).

El CHIKV no presenta serotipos como el dengue, debido a que es un virus relativamente nuevo en humanos, se estima mediante un análisis filogenético que el virus del chikungunya tiene 500 años desde que apareció (Rougeron *et al.*, 2015), pero se ha determinado que este virus presenta 3 genotipos denominados (Restrepo-Jaramillo, 2014); ECSA (Este, Central y Sur África) (Salud Pública, 2015), WA (África occidental) y ASIAN (Asiático). Los genotipos de este virus no tiene una distribución homogénea, el genotipo de ASIAN hasta el momento se encuentra solamente presente en el continente Asiático, mientras que el genotipo WA se encuentra tanto en Asia como África, por último el genotipo ECSA es el más distribuido en el mundo (Sam *et al.*, 2012), se encuentra presente en los continentes de África, Asia, Europa y América, se sospecha que la distribución que presenta este genotipo es debido a una mutación en el gen E1 (E1-Alanina226Valina) (Restrepo-Jaramillo, 2014), esta mutación le permitió usar no solo el mosquito *Aedes aegypti* como vector sino que permitió utilizar al *Aedes*

albopictus como su vector secundario (Tsetsarkin *et al.*, 2011), lo que posiblemente le permitió su rápida distribución por el planeta en comparación a sus otros dos genotipos.

3.3 ZIKA

El virus del zika pertenece a la familia *Flaviviridae*, del género *flavivirus*, es el agente causal de una enfermedad denominada fiebre de zika (Petersen *et al.*, 2016), y tiene el mismo vector que el dengue y chikungunya el mosquito *Aedes aegypti* (Faye *et al.*, 2013). El primer caso documentado del virus fue en 1947 cuando fue aislada de un mono *Rhesus* (Schuffenecker *et al.*, 2006) en el bosque zika, Uganda (Dick y Kitchen, 1973), durante un monitoreo de Fiebre Amarilla en la población de monos. Hasta ese momento se pensaba que era una enfermedad exclusiva de primates pequeños como los monos pero en 1968 se confirmó que el virus causaba un cuadro febril en humano cuando fue aislado el virus en un paciente que había sido diagnóstico con dengue durante un brote de dengue en África (Secretaría de Salud, 2015). A la fiebre que provoca el virus se le denomina fiebre de zika. Desde el momento que fue aislado en humano hasta el año 2006 se presentaron cuadros febriles producidos por el ZIKV de manera controlada en países del continente Africano (Martínez Sánchez *et al.*, 2015), pero en el 2007 se presentaron las primeras infecciones por el virus fuera de África, en las isla de Yap y posteriormente en el país de Micronesia en el año 2013 (Zanluca *et al.*, 2015). En el 2014, se registraron los primeros casos en Nueva Caledonia y en Islas Cook, que permitieron la entrada del virus al continente de Oceanía (Lancet, 2016). El primer caso de zika en el continente Americano no se sabe con exactitud debido a que el cuadro clínico de dengue, chikungunya y zika es parecido (Rodríguez-Morales, 2015) y no se contaba con una técnica que permitiera dar un diagnóstico preciso, pero el primer caso confirmado fue el 15 de mayo de 2015 en Chile. Se sospecha que llegó por la isla del Caribe durante la infección de chikungunya (Enfissi *et al.*, 2015), actualmente está presente en 26 países de América, como Colombia, Argentina, Brasil, Chile y México (Rodríguez-Morales y Willamil-Gómez, 2016; Martínez Sánchez *et al.*, 2015; Petersen *et al.*, 2016; Nishiura *et al.*, 2016). El universal

en su publicación del 9 de marzo del 2016 confirmo 143 casos de zika en México, de los cuales el 40 % de los casos son en el Estado de Oaxaca.

3.4 CUADRO CLÍNICO DE LAS INFECCIONES VIRALES DEL DENGUE, CHIKUNGUNYA Y ZIKA

El cuadro clínico aparece entre 3-12 días después de la picadura del mosquito, dependiendo del tipo de virus que fue infectado se producirá el cuadro clínico característico (OPS, 2011). Los cuadros clínicos que producen estos virus se llaman síndromes febriles o cuadros febriles. No todas las personas que son infectadas por los mosquitos presentan el cuadro clínico, se estima que en el caso de virus de dengue solo un 80 % de los infectados presenta el cuadro clínico (OPS, 2014), un 60 % en el caso de chikungunya (Secretaría de Salud, 2015) y un 30 % para zika (Willamil-Gómez, 2016).

En la Tabla 2 se puede observar las sintomatología que se puede presentar cuando una persona es infectada por cualquiera de estos virus. Los tres virus producen un aumento de la temperatura corporal, que puede llegar hasta los 40 °C (Powers y Logue, 2007), y ésta se acompaña de escalofríos y malestar general como cefalea y mialgias. Algunas particularidades como conjuntivitis, rubor fácil y fotofobia permiten saber el virus causante de la enfermedad, sin embargo, algunas de estas características están ligadas al sexo como el sangrado vaginal, mientras que otras están relacionadas a las condiciones fisiológicas del paciente, mientras que otras están relacionadas a las condiciones del estado fisiológico del paciente, otro factor importante es la condición del hígado ya que si no es el adecuado aumenta la posibilidad de hemorragias internas y petequias aumentando las variables para realizar un diagnóstico preciso, por este motivo se han desarrollado diversas técnicas de diagnóstico que permite detectar el causante de la enfermedad sin importa las condiciones o característica que presente el paciente (OPS, 2011; Powers y Logue, 2007; OPS, 2014b; OPS, 2014a; Rodríguez-Morales y Willamil-Gómez, 2016).

Tabla 2 Sintomatología en los cuadros clínicos de las tres enfermedades virales transmitidas por el mosquito Aedes.

	Chikungunya	Dengue	Zika
<i>Inicio del cuadro clínico^{ahm}</i>	3-7 días	5-8 días	3-12 días
<i>Fiebre^{ain}</i>	Alta (40°C)	Alta (40°C)	Mediana (38-39°C)
<i>Pacientes sintomáticos^{bg}</i>	70%	70%	20%
<i>Dolor de cabeza^a</i>	Moderado	Intenso	Moderado
<i>Cefalea^{ci}</i>	Moderado	Moderado	Moderado
<i>Hemorragias internas^e</i>	No	Solo Dengue hemorrágico	No
<i>Nausea^a</i>	Baja	Alta	Alta
<i>Eritemas^{ac}</i>	Pocas petequias	Petequias	Erupciones en la piel
<i>Microcefalia en neonatos^ñ</i>	No	No	Si
<i>Pérdida de apetito^a</i>	No	Si	Si
<i>Mialgias^{ci}</i>	Si	Si	Si
<i>Artralgias^{cn}</i>	Si	Si	Si
<i>Artritis^{an}</i>	Si	Si	Si
<i>Sangrado vaginal^d</i>	No	Si	No
<i>Choques anafilácticos^f</i>	No	Si	No
<i>Cansancio^a</i>	Si	Si	No
<i>Diarrea^a</i>	No	No	Si
<i>Conjuntivitisⁱⁿ</i>	Si	No	Si
<i>Rubor facial^c</i>	No	Si	No
<i>Fotofobiaⁱ</i>	Si	No	No
<i>Mielorradiculopatía^{kl}</i>	Si	No	No
<i>Duración de los síntomas^a</i>	4-7 días	2-7 días	4-7 días

a: <https://prevencionhn.wordpress.com> revisado el 27/03/2016; b Ministerio de Salud de Cuba, 2013; c: Rigau-Perez *et al.*, 1998; d: Kalayanarooj *et al.*, 1997; e: Srikiatkachorn *et al.*, 2005; f: OMS, 2009; g: Queyriaux *et al.*, 2008; h: OPS, 2011; i: Powers y Logue, 2007; j: OPS, 2014b; k: Josseran *et al.*, 2006; l: OPS, 2014a; m:Comite Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2015; n:Secretaría de Salud, 2015; ñ: Rodríguez-Morales y Willamil-Gómez, 2016

3.5 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS VECTORES QUE TRANSMITEN LOS VIRUS DE DENGUE, CHIKUNGUNYA Y ZIKA

La distribución geográfica de los tres virus está condicionada a su vector, el género *Aedes* está presente por todo el mundo, se encuentra entre los 35° de latitud norte y 35° de latitud sur, pero puede extenderse hasta los 45° norte y hasta los 40° sur (Secretaría de Salud, 2013), en alturas menores de 2,000 msnm. El género *Aedes* está presente en más de 100 países, los dos mosquitos del género *Aedes* con mayor distribución (figura 1) y prevalencia son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Secretaría de Salud, 2013), los dos géneros más distribuidos de *Aedes* son los encargados de distribuir los virus de dengue, Fiebre amarilla, chikungunya, zika, mayora y Fiebre del río Nilo, lo que permite que estas enfermedades estén presentes en varias partes del mundo (OMS, 2016a).

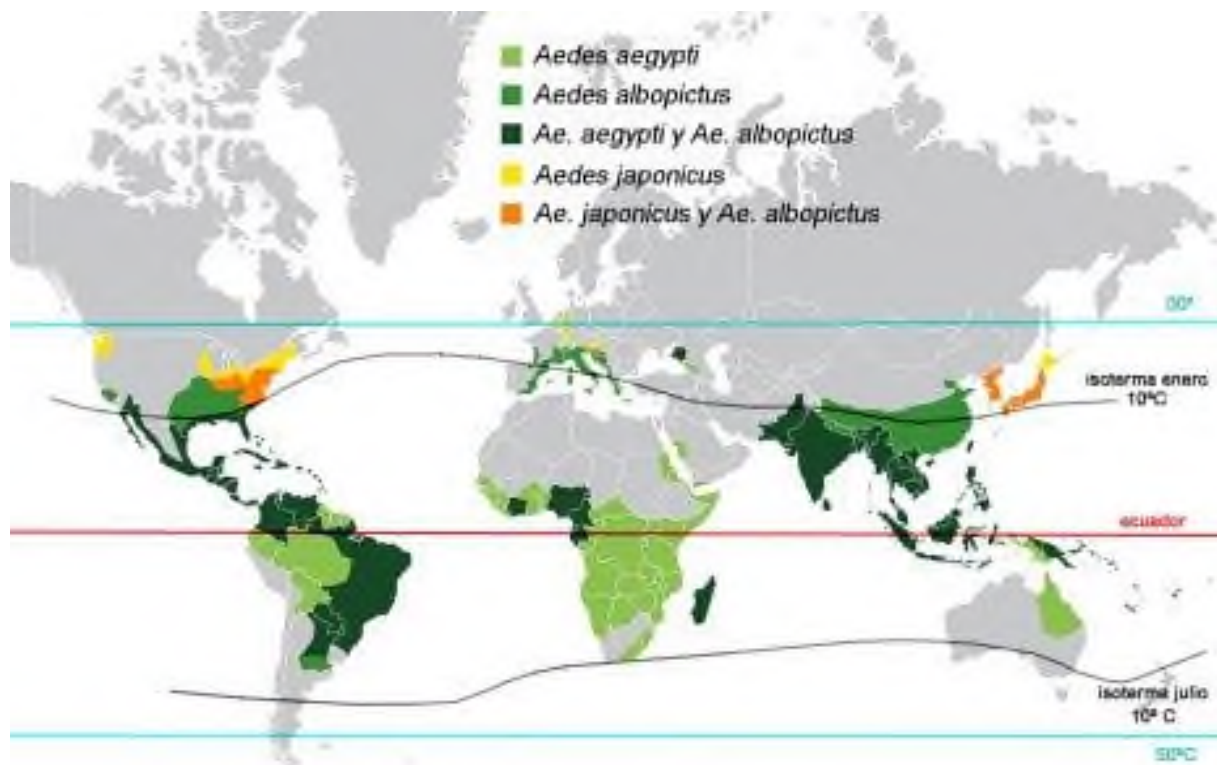


Figura 1 Distribución de los mosquitos del género *Aedes* en el mundo. fuente <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/es> (12/10/2016).

Debido a la distribución de los mosquitos, los virus se han esparcido por todo el mundo, afectando a más de 101 países (OMS, 2016b), aunque no todos los países presentan los tres virus en forma endémica. En la Figura 2 se puede observar la distribución de los virus en el mundo; solo se presentan los países con casos autónomos.

En el continente Americano existen más de 22 países que presentan los tres virus de manera autónoma (OMS, 2016a). El virus con mayor distribución a nivel mundial es el DENV, se encuentra en casi todos los lugares donde está presente su vector con excepción de Alaska y Estados Unidos (Espinoza Gómez *et al.*, 2001; OMS, 2016b), debido posiblemente a que el virus de dengue tiene más de 200 años que empezó su expansión por el mundo. Los virus CHIKV y ZIKV en su poco tiempo desde su brote del 2013-2014 se ha esparcido rápidamente; para el 2015 ya abarcaban más del 50 y 70 % de las zonas que están sus vectores respectivamente (OMS, 2016b).

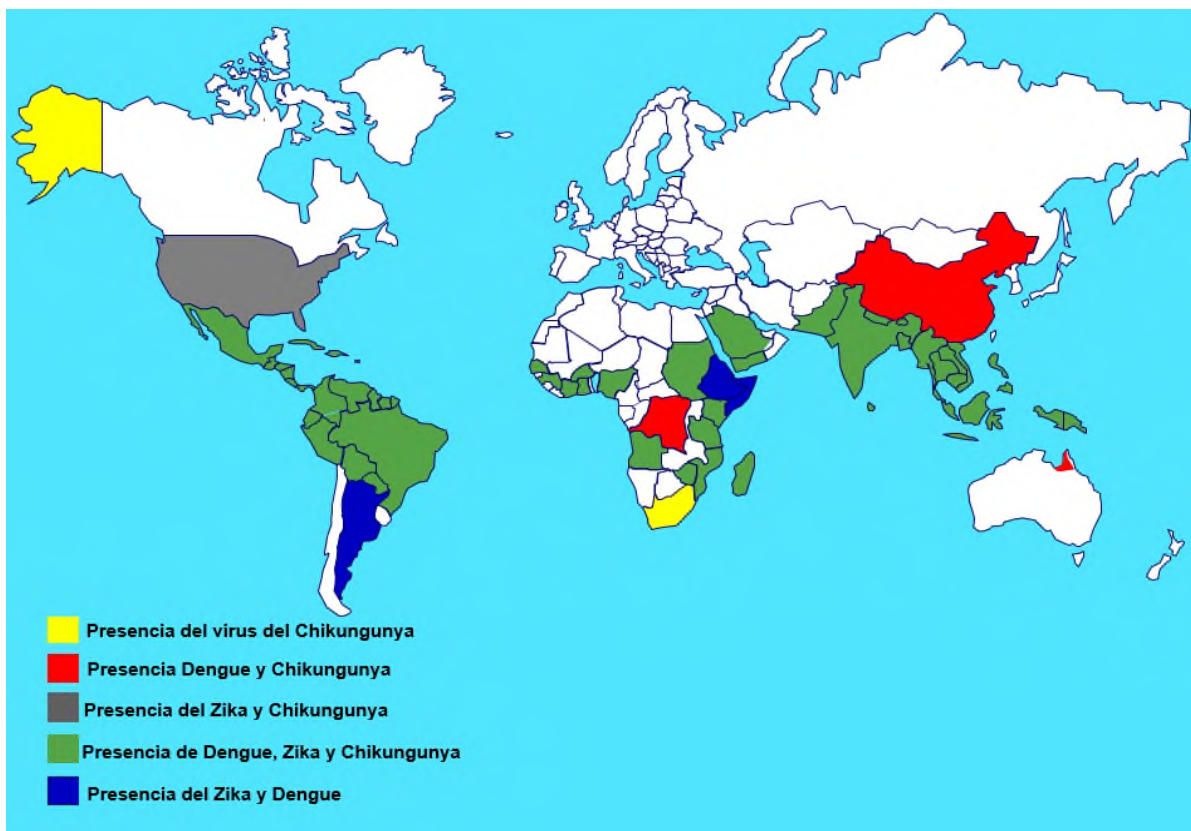


Figura 2 Distribución geográfica de los virus de chikungunya, dengue y zika. mapa realizado con los datos reportados por el centro de control y prevención de enfermedades (CDC; por sus siglas en ingles), obtenidos hasta el 26 de junio del 2016.

3.6 CICLO DE TRANSMISIÓN

Los responsables de la transmisión de los virus de chikungunya, dengue y zika son los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, que transmiten el virus mediante su picadura, y solo las hembras realizan esta actividad. Los insectos son activos durante las primeras horas del amanecer y del anochecer (Villegas-Trejo *et al.*, 2011).

El ciclo de transmisión es una característica que comparten, la única diferencia es el tiempo de incubación en el hospedero (Tabla 3). Durante este tiempo, el virus se multiplica exponencialmente dentro de las células dianas del huésped, hasta llegar a una concentración de un millar de copias genómicas del virus por microlitros de sangre (Montero, 2015). Cuando se alcanza esta concentración se presenta el cuadro clínico en los pacientes sintomáticos, a esto se le denomina fase aguda o virémica de la enfermedad, porque si el paciente es picado durante este estadio transmiten el virus al mosquito (Galvis *et al.*, 2014), permitiendo que la enfermedad se puede transmitir nuevamente (Figura 3). Existe otra forma de transmisión aparte de la picadura para el ZIKV y CHIKV (Galvis *et al.*, 2014). Se ha documentado transmisión mediante sangre por transfusiones o contacto directo. A parte de esta mecanismo de infección el ZIKV tiene otras dos formas de transmisión; mediante el coito (Foy *et al.*, 2011) e infección del feto por contacto placentario (Zammarchi *et al.*, 2015).

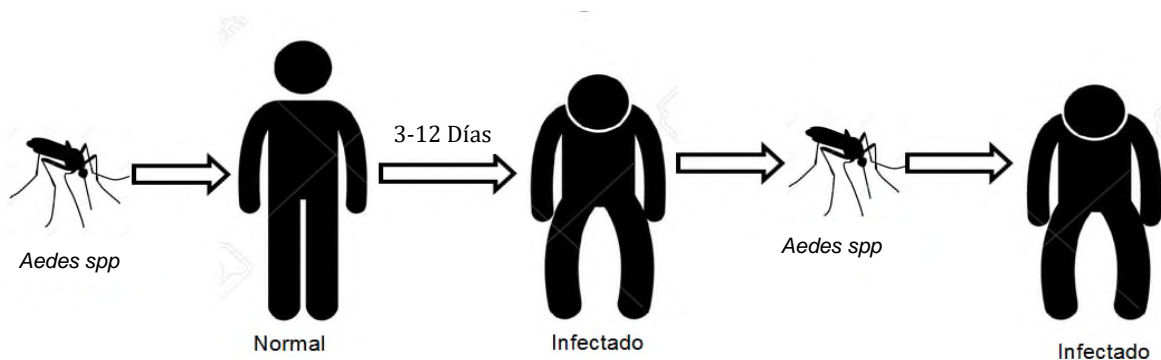


Figura 3 Ciclo de transmisión del mosquito *Aedes spp.* primero el mosquito infectado pica a una persona sana, introduce el virus en el huésped, después de un tiempo denominado incubación, el virus se multiplica dentro de las células hasta que la concentración es tan alta que cuando un mosquito libre del virus pique a este huésped se infecta y puede reiniciar este ciclo.

Tabla 3 Tiempo de incubación del virus en el cuerpo.

<i>Virus</i>	<i>Incubación (días)</i>
Dengue	5-9
Chikungunya	3-7
Zika	3-12

Fuente: Galvis *et al.*, 2014; Montero, 2015; Martínez Sánchez *et al.*, 2015

3.7 CICLO DE REPLICACIÓN DE LOS VIRUS

Los tres virus pertenecen al mismo filo y comparten los genes que están involucrados en su replicación. El mecanismo de replicación del chikungunya (Figura 4) ya que es el más estudiado, la única diferencia que se presenta entre los otros dos virus es el tiempo que requiere para realizar esta función, la replicación del CHIKV se estima que dura 8 horas, mientras para dengue requiere aproximadamente 7 horas y zika 10 horas (Lum y Ng, 2015). El virus entra al torrente sanguíneo con la picadura del mosquito, dentro del huésped, el virus entra a la célula diana (células endoteliales, epiteliales y fibroblásticas) gracias a la proteína E1, que presenta en su superficie. Esta proteína activa una señal que provoca que el virus sea encapsulado, y entra a la célula por endocitosis. Dentro de la célula se producen cambios conformacionales en la envoltura del virus, debido a la acidez que presenta el endosoma (pH 6), la acidez produce la fusión del endosoma y la superficie de la cápside del virus, causando la liberación de la nucleocápside en el citoplasma, donde se desmonta para liberar el material genético de ARN (denominados 49S). Esta secuencia entra en contacto con la maquinaria de traducción del huésped y genera la poliproteína que dará origen a las proteínas nsPs 1–4; las cuales forman un complejo de replicación, que sintetiza el ARN de cadena negativa. El ARN de cadena negativa se utiliza como plantilla o molde para sintetizar ARN genómico cadena positiva y el ARN subgenómico (denominado 26S). El 26S es un mRNA que sintetiza una poliproteína precursora de las proteínas C, pE2, 6K, E1 y E2, que son necesarias para formar la capsida del virus, estas poliproteínas entran en contacto con el complejo de replicación y forman la capsida. Cuando se forma esta estructura se separan las proteínas E1 Y qE2 de la poliproteína y se dirige al retículo endoplásmico y, posteriormente, en el aparato de Golgi recibirán modificaciones post-

tradicionales. Estas modificaciones le permitirán formar el dímero, después serán transportados a la membrana plasmática y se incorpora a la superficie del virus. Una vez que la cápside está formada se introduce el material genético del virus (49S) y se dirige a la membrana plasmática para su último paso, donde se unirá con un dímero para poder salir de la célula y continuar su ciclo de replicación, hasta llegar a una concentración necesaria para poder salir de la célula e infectar más células (Lum y Ng, 2015).

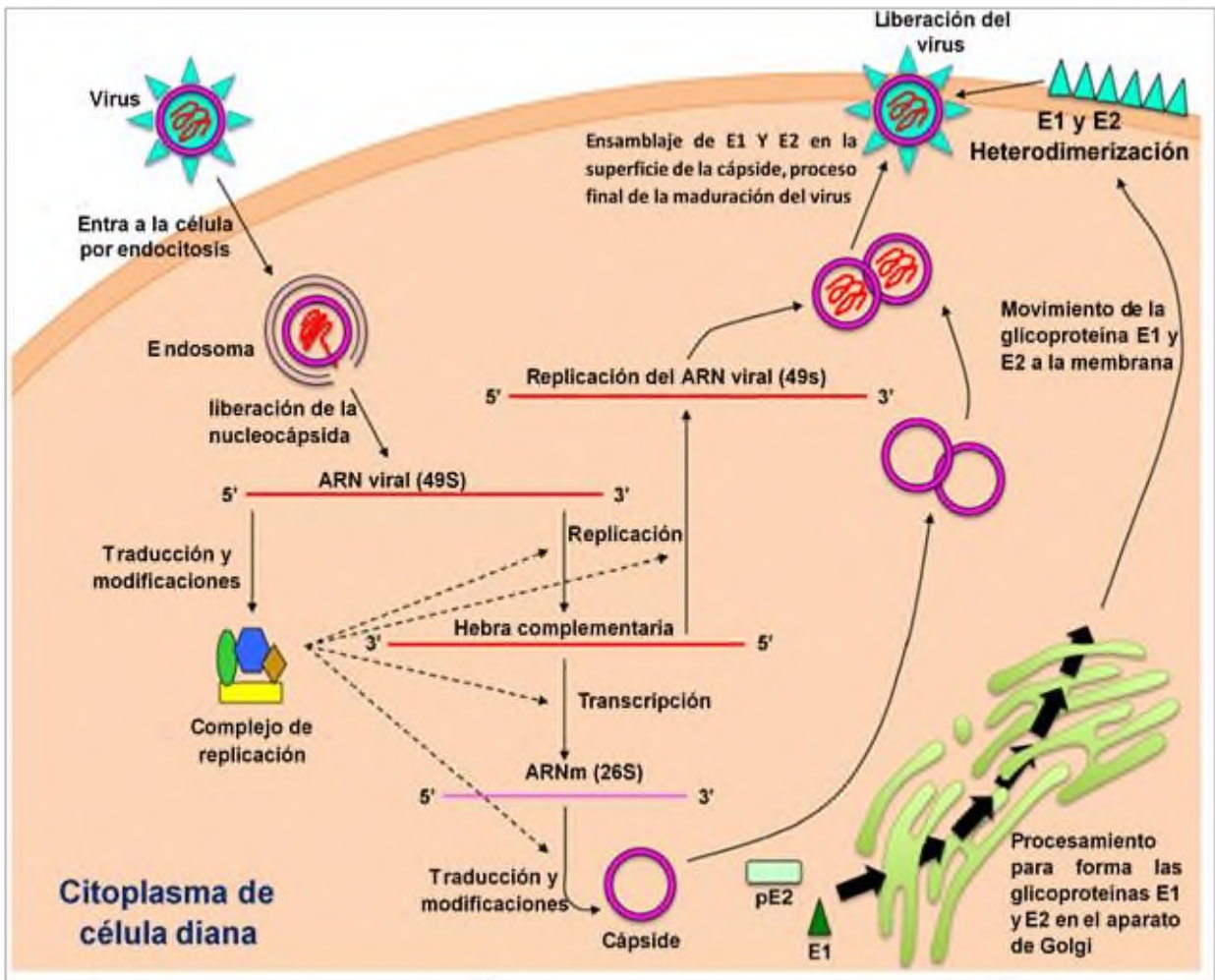


Figura 4. Mecanismo replicación viral. El virus entra a la célula por el endosoma, dentro de la célula libera su material genético, utilizando la maquinaria de la célula sintetiza su complejo de replicación, con este complejo se replica y produce su cápside, durante la síntesis de la cápside libera dos proteínas denominada E1 y pE2, éstas llegan al aparato de Golgi y se convierte en glicoproteínas, dirigiéndose a la membrana. La cápside encapsula el ARN viral y se desplaza a la membrana, en la membrana la cápside se une con las glicoproteínas E1 y E2, adquiriendo la capacidad de poder salir de la célula. modificado de Lum y Ng, 2015.

3.8 MECANISMO DE INFECCIÓN DE LOS VIRUS

Cuando el virus entra a las células después de la picadura se replica (figura 4) y posteriormente se dirige a nuevas células para empezar nuevamente su ciclo de replicación. El mecanismo completo de infección se muestra en la Figura 5. Inicialmente el mosquito introduce el virus e infecta a células residentes de la piel como los fibroblastos y macrófagos, esto dará lugar a la primera ronda de replicación del virus y posteriormente el virus sale de la célula y se difunde a otras células dianas (Figura 4), Las primeras células en ser infectadas son de ganglio linfático y posteriormente llegarán a órganos periféricos, tales como el bazo, hígado, cerebro y músculos. Cuando el virus llega a la sangre se le denomina fase de infección o aguda, y en este punto el paciente tiene la capacidad de transmitir el virus al mosquito (Lum y Ng, 2015).

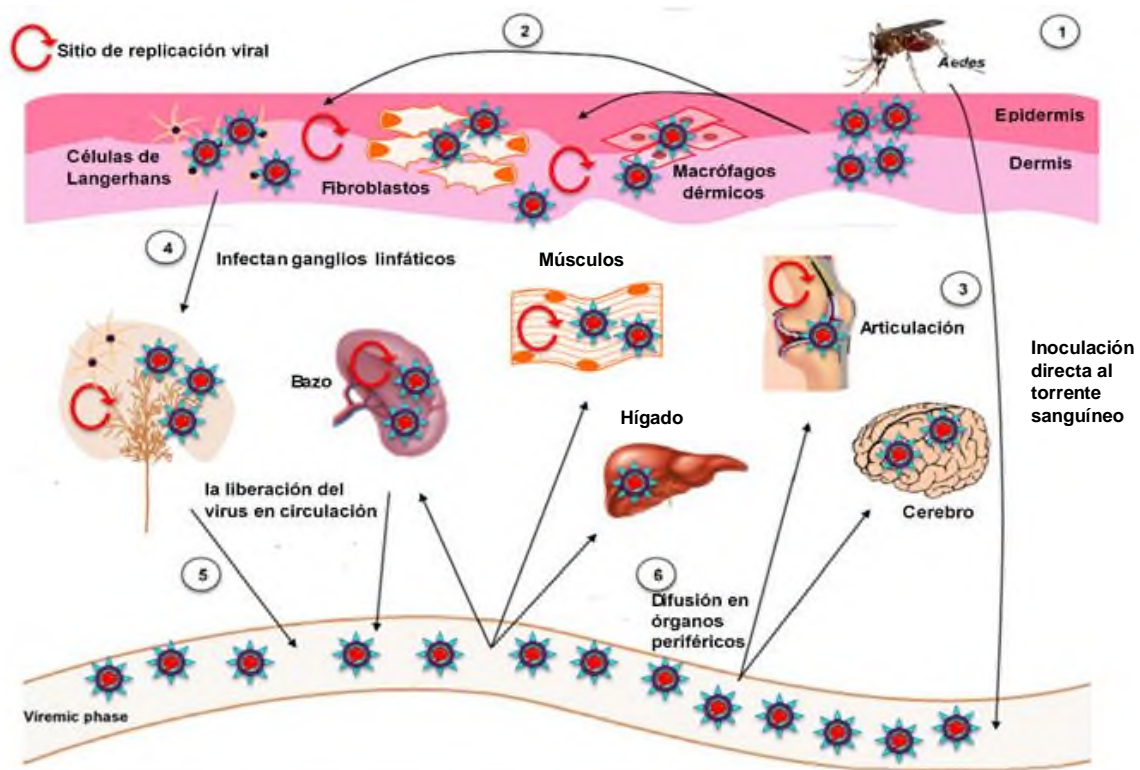


Figura 5 Mecanismo de infección del virus. El virus entra a epidermis por el piquete del mosquito (1), se disemina e infecta a las demás células que conforman la epidermis y dermis (2), al mismo tiempo el virus se introduce al torrente sanguíneo (3) y posteriormente infectar órganos periféricos como el hígado (6), cuando infecta a las células de Langerhans en la dermis, el virus se replica en los ganglios linfáticos (4), liberando al virus a la circulación sanguínea (5). Modificado de Lum y Ng, 2015.

3.8 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES VIRALES TRANSMITIDAS POR VECTORES

Tratamientos con medicamentos para enfermedades producidas por virus son escasos debidos que los virus se alojan dentro de las células de su huésped lo que imposibilita que el medicamento tenga efecto sobre ellos (LUM Y NG, 2015). Para las enfermedades de dengue, chikungunya y zika no existe ningún medicamento aprobado por la FDA o agencia equivalente. Para el tratamiento del paciente, únicamente se recomienda reposo e hidratación (OPS, 2015a), dependiendo del grado y de tipo de virus causante de la enfermedad se le adiciona condiciones extras para su recuperación como el uso de paracetamol y medicamentos para disminuir el dolor.

La fiebre del dengue se clasifican en dos grupos dependiendo del grado de los síntomas que se presenten en el paciente. Se le denomina dengue no grave cuando sólo se presentan malestares como fiebre, dolor de huesos, dolor de cabeza y molestia en el cuerpo, y dengue grave o hemorrágicos cuando el cuadro clínico presenta además de los síntomas anteriores niveles bajos de plaquetas y hemorragias. Para cada uno de ellos existen recomendaciones especiales, para el Dengue no grave, por lo general solo requiere hidratación y si presenta dolor intenso usar paracetamol. Los pacientes con Dengue grave o hemorrágicos se les debe de suministrar soluciones isotónicas y medicamentos para la fiebre y tenerlos en observación continua para evitar perdida de líquidos por hemorragias internas (Votano *et al.*, 2010).

Los malestares de la enfermedad que produce el virus de chikungunya no requiere tener al paciente bajo observación como en el caso de Dengue grave o hemorrágico, sino que las recomendaciones consisten en el reposo e hidratación y en los casos que se presentan temperaturas altas se recomienda usar acetaminofén o paracetamol, la dosis depende de la evaluación médica. El cuadro febril producido por el virus chikungunya en algunos casos es acompañado de dolor excesivo, por lo que se recomienda el uso de antiinflamatorios como ibuprofeno, naproxeno o algún otro agente antiinflamatorio no esteroideo. (Direcion de Vigilancia Epidemiologia, 2014).

Para el zika el tratamiento consiste en aliviar los síntomas que presenta el paciente, esta enfermedad es la más leve con respecto a su sintomatología, en caso que el paciente tenga temperatura mayor a 38°C, se recomienda tomar un compuesto

químico que permita bajar la temperatura, como cetaminofén (Ministerio de Salud Pública de la República Dominicana, 2014). Para tratar el dolor y la inflamación se utilizan un conjunto de compuestos químicos denominados AINES (antiinflamatorios no esteroideos), estos compuestos son del tipo diclofenaco, ibuprofeno o naproxeno, en caso de presentar dolor se permite usar paracetamol, y para los pacientes que presenten erupción y prurito se recomienda utilizar óxido de zinc o lociones refrescantes con aloe vera, mentol y alcanfor (Weaver y Forrester, 2015).

Bajo ninguna circunstancia se deben tomar o introducir componentes que tengan vasoconstrictores o vasodilatadores para bajar la temperatura, porque tienden a cambiar el ritmo cardiaco, causando complicaciones en el paciente (Consejo de Salubridad General, 2009).

El tratamiento más usado para la ETV que existe en la actualidad es la erradicación del patógeno y de su vector, para lo cual, existen muchas campañas que buscan eliminar el mosquito, pero hasta el momento ninguna ha tenido la efectividad esperada. Brasil debido que unos de los países con más pérdidas por la presencia de los 3 virus y por la aproximación que tenía los juegos olímpicos en su país y volverse un foco de propagación de la enfermedad para otros países, implemento el uso de mosquitos modificados genéticamente en los meses de mayo a junio del 2016 que son resistentes a las infecciones por virus del genero *alphavirus* y *flavivirus*, para remplazar a la población de mosquitos *Aedes* en su territorios y disminuir el índice de prevalencia de enfermedades transmitidos por mosquitos, se estima que se evitaron más de 50,000 casos nuevo de enfermedades febriles por mosquitos durante los juegos olímpicos (Chang et al, 2016).

La OMS permitió por la gran oleada de enfermedades transmitida por mosquitos implementar vacunas experimentales para la inmunización de Dengue, aplicables en personas de 9 a 45 años residentes en zonas endémicas, México es el primer país en aceptar la vacuna para evitar la aparición de nuevo brotes de dengue, la empresa responsable de desarrollar esta vacuna es Sanofi, la vacuna está diseñada para los cuatro tipos de serotipos de dengue, se estima que al inicio de año del 2017 ya estará disponible en 9 países para su aplicación (Chang et al, 2016).

3.9 EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES VIRALES

La importancia de realizar un diagnóstico radica en poder distinguir quien es el agente causal de la enfermedad para poder realizar el tratamiento preciso y eficaz para su recuperación. Las enfermedades producidas por *arbovirus* tienden a presentar un cuadro muy similar; sin embargo, el sistema de salud le asigna diferente prioridad a cada uno de ellos para la recuperación y la vigilancia debido a que algunos virus son más agresivos que otros, el virus del dengue y el virus del Nilo tiene la máxima prioridad debido a que estos virus atentan contra la vida del paciente, el segundo es el virus de chikungunya por el dolor que ocasiona aunque en raras ocasiones pone en riesgo la vida del paciente y por ultimo está el virus de zika su cuadro febril es menos agresivo comparado con el virus de chikungunya. Cuando se presenta varios pacientes en un hospital con enfermedades causados por un arbovirus es importante saber quién es el agente causal porque México no presenta con los suficiente recursos económicos y humanos para atender a cada paciente y se tiene que priorizar a cada uno de los pacientes para realizar un mejor seguimiento de la enfermedad.

Existen dos formas para realizar el diagnóstico de una enfermedad viral; diagnóstico clínico que determina la enfermedad a partir de la sintomatología que presenta durante la fase aguda de la enfermedad y el diagnóstico de laboratorio que utiliza técnicas para detectar la presencia del virus o un componente que se produce debido a la interacción con el virus. Las enfermedades por los virus dengue, chikungunya y zika muestran características similares en su cuadro clínico, pero cada virus presenta características específicas que permiten su identificación mediante el diagnóstico clínico, el único inconveniente es que no todos los pacientes presentan estas características (Tabla 4), por este motivo el diagnostico basado en su sintomatología es inespecífico cuando se intenta diferenciar a estos virus en zonas endémicas (Horcada y Díaz-calderón, 2015; CDC y OPS, 2011). El diagnóstico de laboratorio para detectar virus abarcan un amplio espectro de técnicas, se pueden clasificar en dos grupos, el método directo que consisten en detectar al virus o unos de sus componentes durante la fases agudas (Hernández *et al.*, 2003) mediante su aislamiento o detección de antígeno y ácidos nucleicos, el método indirecto permite ver si el paciente estuvo en contacto con el patógeno mediante la producción de anticuerpos (IGM y IGG), el único inconveniente

de este método requiere un mínimo de 7 días para ser reproducible (Sandin y Algorta, 2003), lo que impide realizar un diagnóstico durante el cuadro clínico de la enfermedad.

Tabla 4 Sintomatologías utilizadas en el diagnóstico clínico.

Síntomas	Chikungunya	Dengue	Zika
<i>Fiebre</i>	+++	++++	+++
<i>Mialgia</i>	+++	+++	++
<i>Edema</i>	0	0	++
<i>Conjuntivitis</i>	+	0	+++
<i>Hemorragias</i>	0	+	0

0 ningún paciente lo presenta, + lo presenta entre el 5-25 % de los Casos, ++ lo presenta entre el 26-45 %, +++ lo presenta entre el 46-60 %, ++++ lo presente entre el 61-100 %. Fuente: Rodríguez-Morales, 2016

La OMS y OPS establecen que, para la detección de una enfermedad viral existen cinco métodos de diagnóstico que tienen como resultados datos confiables (Tabla 5), cada uno de estos cinco métodos tiene su propio componente a detectar, pero no todos los componentes que se utilizan para detectar la enfermedad están presentes al mismo tiempo (Figura 6), por esta razón la técnica de detección depende del día en que se realice el análisis o prueba, si la muestra es tomada entre los primeros cinco días de que se presenta el cuadro clínico se pueden utilizar las técnicas de aislamiento viral, detección de antígeno y detección del ácidos nucleicos (RT-PCR) esta técnicas son técnicas de diagnóstico directo y solo se pueden realizar en esta primeras fechas debido a que se requiere una concentración mínima del virus en la muestras, si la muestra es obtenida después del 5 día del inicio del cuadro clínico no es confiable en su resultado porque puede ser un falso negativo debido a que la concentración ARN en la sangre es tan baja que la técnica no la puede detectar.

Para las técnicas de detección de anticuerpos, se utilizan dos tipos de anticuerpo para su detección, los anticuerpos IgG y IGM, ambos anticuerpos se producen después de que el cuadro clínico empieza a desaparecer y se puede encontrar hasta varios meses después de la infección (Weaver y Forrester, 2015), lo que le da cierta ventaja a estas técnicas sobre las de método directos, y es que puede ser detectada varios días después del cuadro clínico. La detección de anticuerpos presenta dos desventajas; que no tiende a diferenciar serotipos y la detección es después del cuadro clínico.

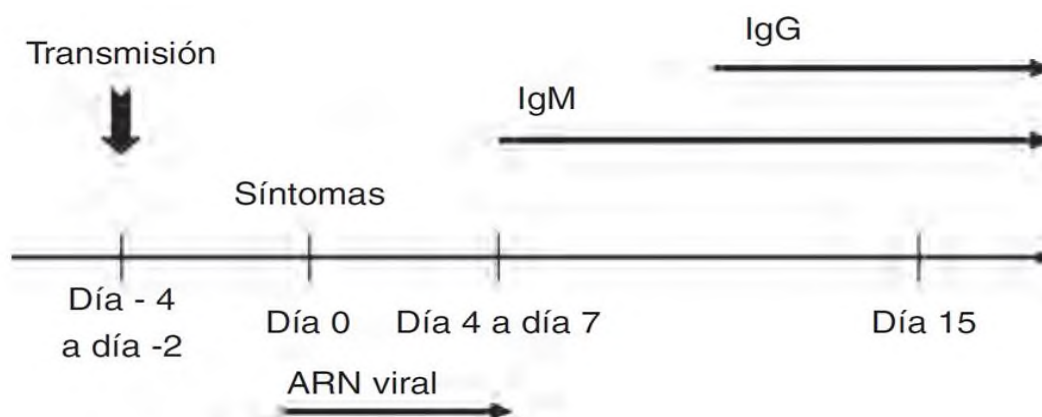


Figura 6 Cronología de los componentes en una infección por virus. Después de la picadura del mosquito se empieza a sintetizar el genoma viral, aproximadamente al 4 día la síntesis de anticuerpo toma lugar, bajando la concentración el genoma viral hasta no se detectable. Modificado de Weaver y Forrester, 2015.

Tabla 5 Métodos de diagnósticos para confirmar enfermedades por virus.

Métodos diagnóstico	Tiempo para resultados	Día de toma de muestras	Costo	Ventajas	Limitaciones
<i>Aislamiento viral</i>	1-2 semanas	1-5 días	muy elevado	Especificidad Identifica serotipo	Costo elevado Tiempo de resultados
<i>Detección de ácido nucleico</i>	1- 2 días	1-5 días	Elevado	Alta sensibilidad Identifica serotipo	Falsos positivos por contaminación Equipo especializado
<i>Detección de antígenos</i>	>1 día	3-5 días	Elevado	Fácil de realizar	No es muy sensible
<i>IgM EIA</i>	1-2 días	> 7 días	Bajo	Costo	falsos positivos
<i>IgG o test de neutralización</i>	≥ 7 días	≥ 15 días	Bajo	Fácil de realizar	falsos positivos

3.9.1 Diagnóstico Indirecto de las enfermedades virales

Estos diagnósticos son los más distribuidos en el mundo, por dos razones; fueron las primeras en ser utilizadas para el diagnóstico de virus y no requiere personal especializado para realizar la prueba, actualmente se utilizan para obtener datos epidemiológicos, reconfirmar la enfermedad y ver el comportamiento de propagación, debido a que éstas pruebas requieren que los anticuerpos estén presentes para confirmar la enfermedad, por lo tanto no permite tener un diagnóstico de la enfermedad durante el cuadro clínico, lo que impide realizar el tratamiento. Actualmente se usan tres técnicas para la detección de virus (Faingezicht y Avila, 1994); inhibición de hemaglutinación, prueba de neutralización de la reducción de placa (PRNT) y ELISA.

PRNT

La Prueba de neutralización de la reducción de placa se utiliza para cuantificar el título de neutralización del anticuerpo de un virus, su principal uso es cuando se requiere confirmar un diagnóstico del tipo serológico, este ensayo es la herramienta serológica más específica para la determinación virus del género *flavivirus* y *alfavirus* (Thomas *et al*, 2010). Su fundamento consiste en ver hasta que concentración de suero (anticuerpos) es requerida para que el virus no pueda entrar a las células cultivadas (CDC, 2016). Si bien la técnica de neutralización por reducción de placas (PRNT), ofrece una mayor especificidad para detección de anticuerpos, la reacción cruzada también ha sido documentada por este motivo no es muy confiable el diagnóstico y solo se usa para confirmar un resultado cuando no se tenga la certeza si el primer diagnóstico fue correcto (OPS, 2015b).



Figura 7 Esquema de la prueba de neutralización de la reducción de placa. Consiste en realizar suspensiones de células con el virus a diferentes concentraciones de suero (anticuerpos), esta suspensión es cultivada por intervalos de tiempo y se obtiene la concentración que con los anticuerpos neutralizan la concentración de virus evitando el contagio de las células, esta técnica se realiza con un control para comparar resultados. Se considera positivo cuando se obtiene una concentración 4 veces menos de la neutralización que su control.

Inhibición de Hemaglutinación

La prueba es fácil de realizar y requiere un mínimo de equipo, la importancia de esta y su utilidad ha disminuido rápidamente debido a que no distingue, a nivel especie, el agente causante de la enfermedad (Crespo, 2000), por este motivo esta técnica no se recomienda en zonas que presente enfermedad que tiene un origen evolutivo cercano (Vorndam V, 2000). La técnica está basada en la detección de la glicoproteína que está en la superficie del virus que tienen la propiedad de aglutinar glóbulos rojos de patos (Sandin y Algorta, 2003), permitiendo verificar la presencia de anticuerpo en el suero del paciente mediante la hemaglutinación. Se mezcla suero de paciente con sangre de pato y con el virus de interés, si en el suero existe presencia de anticuerpos reaccionarán con el virus y evitarán la hemaglutinación, confirmando el diagnóstico, pero si no existe presencia del anticuerpo, los virus reaccionarán con la sangre del pato y provocará la hemoaglutinación, dando un diagnóstico negativo para la presencia de anticuerpo en el suero del paciente (Figura 8).

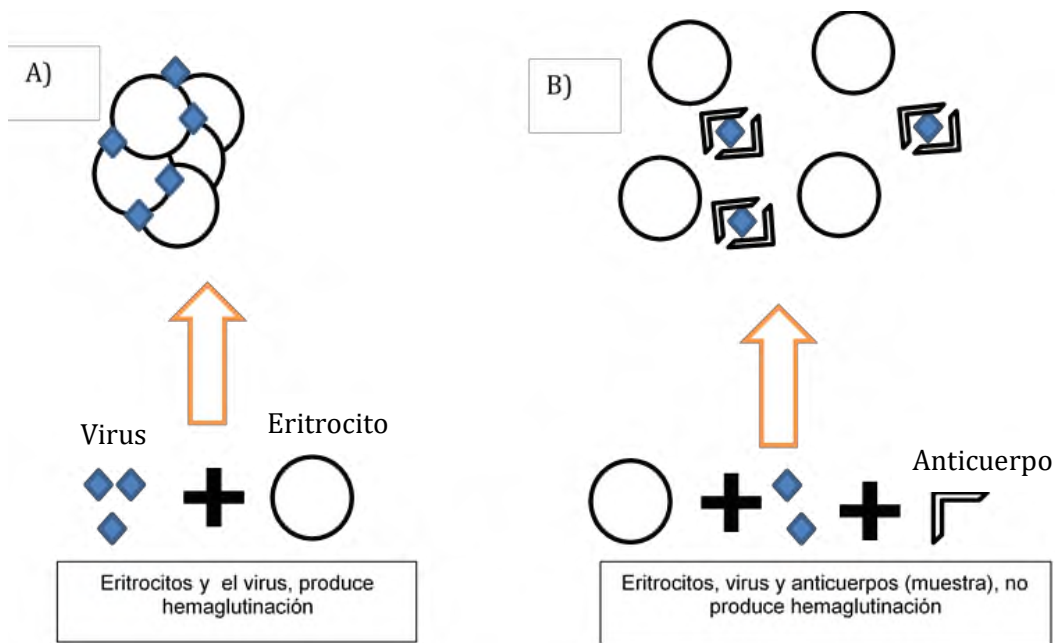


Figura 8 Técnica de la hemaglutinación. a) resultado negativo y b) resultado positivo.

Detección de los virus por la prueba de ELISA

Las personas infectadas por un agente patógeno en la sangre, desarrollan una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos (Alonso *et al*, 2005), estos anticuerpos tienen la función de eliminar el patógeno. La detección de anticuerpos en suero es la técnica más utilizadas para detección de patógenos en sangre, se utilizan anticuerpos monoclonales contra los anticuerpos producidos por el virus, sin embargo, se requiere que el título del anticuerpo sea elevado para poder detectarlo, en otras palabras, se requiere que el paciente este en un estadio avanzado de la enfermedad para poder ser diagnosticado, la técnica tiene alta sensibilidad pero baja especificidad (OMS, 2009), por lo que, en países que tienen casos endémicos de virus de la misma familia no se recomienda esta prueba (OMS, 2015) para el diagnóstico diferencial (Secretaría de Salud, 2010). Para realizar esta técnica se requiere de alrededor de una semana después de presentar el cuadro clínico (Muñoz-Valverde, 2002), es el tiempo mínimo requerido para que el cuerpo tenga una concentración de anticuerpos detectable para la prueba. La prueba consiste en determinar la presencia del anticuerpo producido por el virus mediante una reacción entre el antígeno y el anticuerpo (Figura 9), la

metodología se basa en la captura de anticuerpos (actuaría como el antígeno) producido por el virus en una placa, usando un anticuerpo anti-humano (anticuerpo primario) adherido a la pared de la placa, posteriormente se realiza un lavado y se le adiciona un segundo anticuerpo contra el anticuerpo anti-humano o anticuerpo de virus (depende del tipo de Elisa), denominado anticuerpo secundario, este anticuerpo está unido a una enzima que permite ver un cambio de color o fluorescencia cuando se le adiciona el sustrato específico (Delgado *et al* 2002).

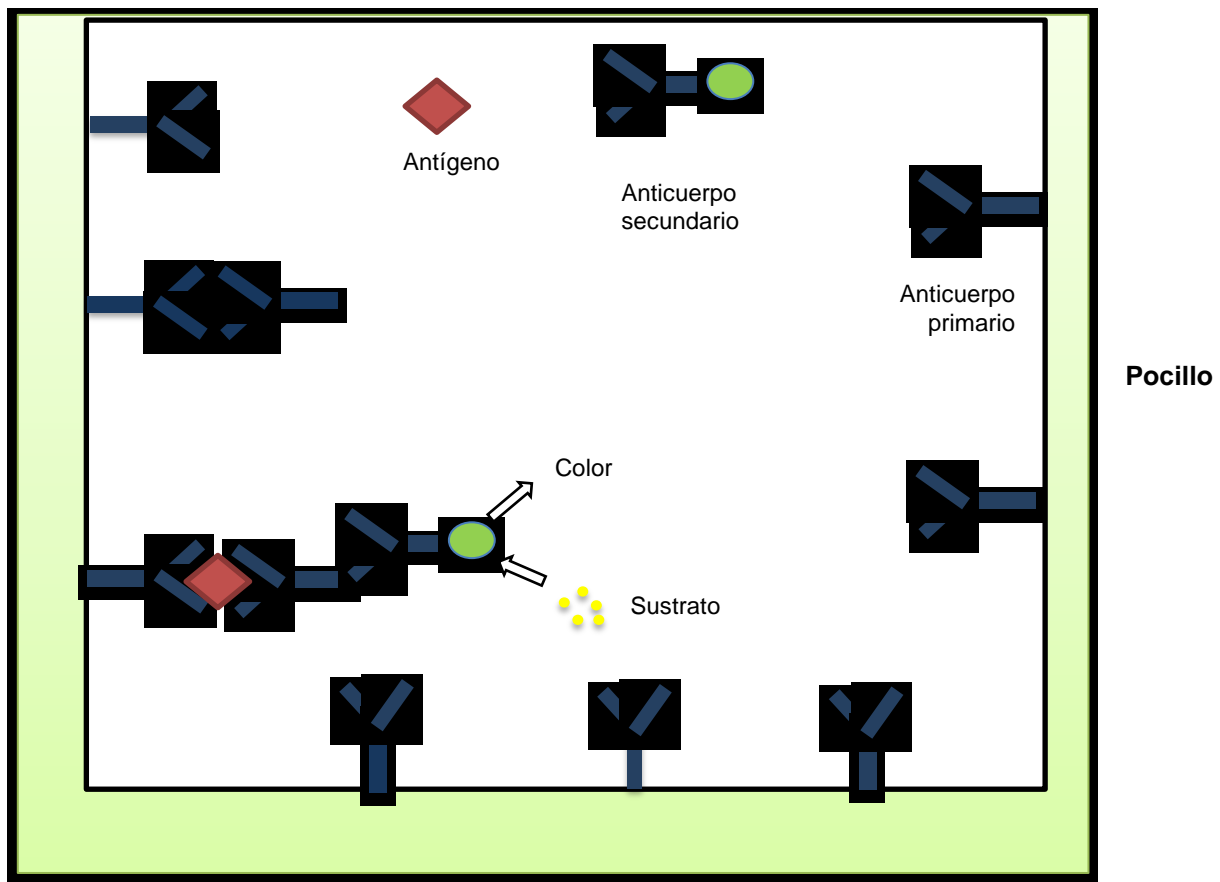


Figura 9 Representación gráfica de la reacción de ELISA. En el pozo de la placa se fija el anticuerpo primario (líneas negras) el cual reconoce el antígeno (diamante rojo) en la superficie del pozo. Después de varios lavados se introduce el anticuerpo secundario que tiene una enzima (círculo verde), este anticuerpo reconoce la región constante del anticuerpo primario. Antes de revelar la presencia del antígeno se hacen varios lavados y se adiciona el sustrato de la enzima que esta acoplado al anticuerpo secundario. El sustrato se rompe y el producto de la hidrólisis produce una sustancia de color.

3.9.2 Diagnóstico Directo

Las técnicas de diagnósticos directos son más costosas que los indirectos, pero su ventaja es que permite el diagnóstico durante la fase aguda de la enfermedad lo que permite ser utilizados para realizar el correcto seguimiento de la enfermedad. Las técnicas de diagnóstico para determinar la presencia del virus durante la fase aguda de la enfermedad que establece la OMS para la detección de un virus son; el aislamiento y qRT-PCR (Goh *et al.*, 2015), estas técnicas son aceptadas por la secretaria de salud para establecer un diagnóstico preciso.

El aislamiento viral permite confirmar la presencia de un virus durante los primeros días del cuadro clínico en la muestra, pero no permite diferenciar con exactitud que virus se aisló, para poder determinar el virus se recurre a la qRT-PCR (Christofferson, 2016), lo que vuelve la qRT-PCR, la técnica de confirmación de las enfermedades durante la fase aguda de la enfermedad.

Debido a que la qRT-PCR permite realizar un diagnóstico preciso, requiere menos tiempo y es menos costoso que el aislamiento viral, la OPS propuso un diagrama de diagnósticos diferencial utilizando la qRT-PCR (Figura 10) para la detección de la enfermedad durante la fase aguda de la enfermedad en las regiones endémica que presentan los tres virus (Campos *et al.*, 2016), estos diagnósticos se realizan para detectar la presencia de un virus a la vez (una reacción de la qRT-PCR por virus), el orden de prioridad para la detección del virus está determinado por el nivel de incidencia que presenta cada virus, primero se realiza la detección de Dengue, si sale negativo se realiza la detección de chikungunya, si el resultado es negativo se realiza el diagnóstico de zika. Esta metodología propuesta por la OPS tiene como finalidad determinar si existe la infección del virus, pero se tiene que realizar 3 diagnósticos para confirmar zika. Existe una variedad de la qRT-PCR denominada multiplex que permite detectar y diferenciar más de un virus en una sola prueba, bajando tiempo y costo para determinar el virus causante del cuadro clínico.

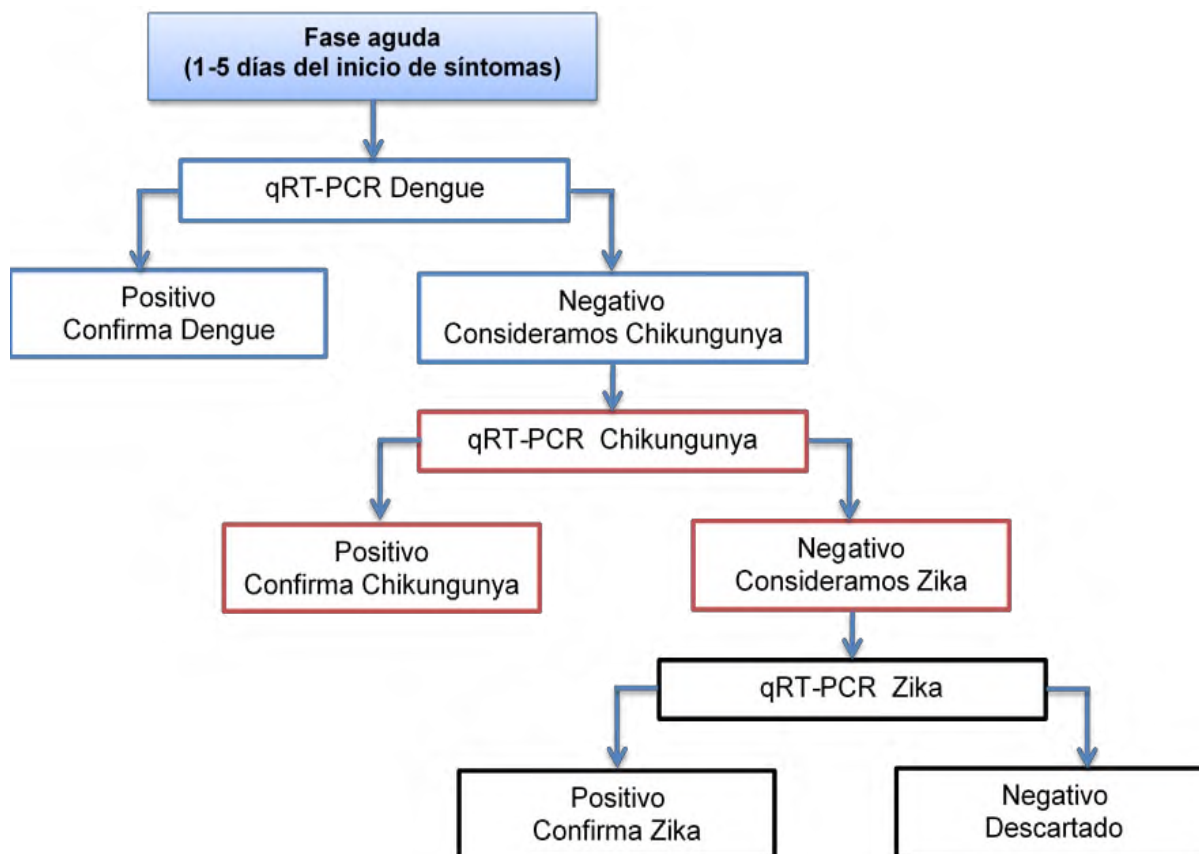


Figura 10 Diagrama de flujo del procedimiento propuesto para el diagnóstico de virus en zonas endémica que presente chikungunya, dengue y zika fuente: OMS.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se encuentran entre las técnicas más utilizadas en la investigación, desde su creación en 1983 por Kary B. Mullis (Pinilla *et al.*, 2008), su fundamento es la amplificación de fragmentos de ADN flanqueado por dos oligonucleótidos de la secuencia que se desea estudiar (Avila *et al.*, 1995), este procedimiento es realizado por un equipo denominado termociclador, dentro se lleva a cabo la amplificación del segmento en tres etapas (Figura 11).

La primera etapa es la desnaturalización, este paso consiste en romper los puentes de hidrogeno que existe entre las cadenas, para separar de las hebras, esto se logra cuando se llega a una temperatura entre 95-98 °C. La segunda etapa es el alineamiento de los oligonucleótidos mediante la hibridación con la secuencia de interés, esto requiere una temperatura entre 58-61°C, y por última la amplificación de

la secuencia denominada elongación, en este paso se requiere la intervención de la enzima Taq polimerasa, que realiza la síntesis de la nueva cadena de ADN, a una temperatura entre 70-72 °C, este proceso se puede repetir hasta 40 veces en la misma reacción (QIAGEN Technical Services, 2010).

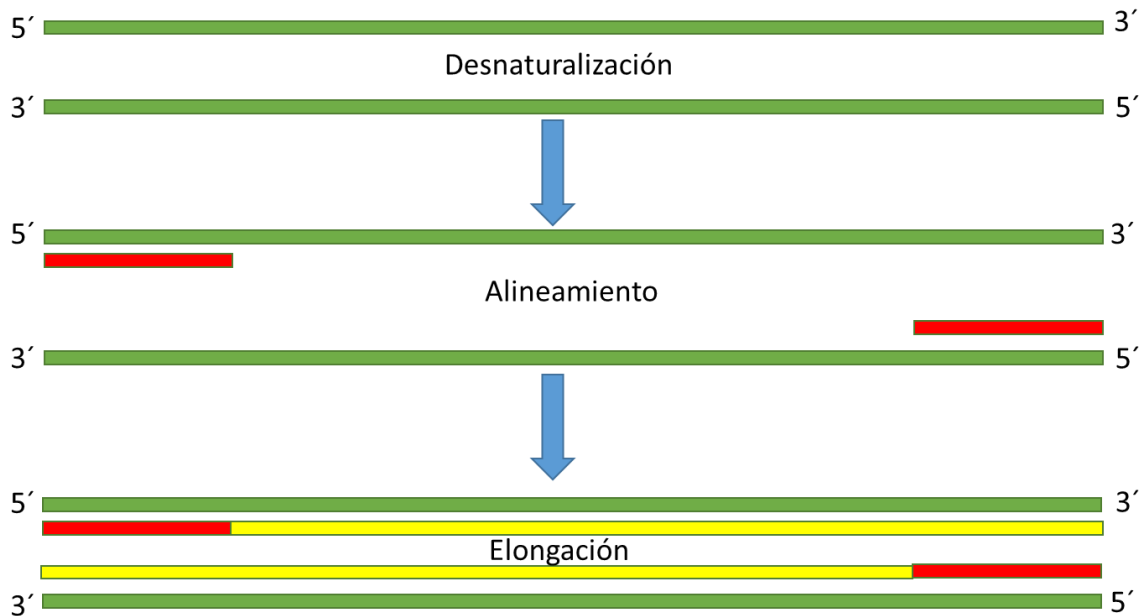


Figura 11 Representación esquemática de la reacción de PCR. Se representa los tres pasos de una PCR, primero la cadena de ADN se somete a temperaturas alta para desnaturalizarse, se baja la temperatura para que los oligonucleótidos y el ADN de una hembra se hibriden, por último, se sube la temperatura para que la enzima Taq polimerasa trabaje y realice la replicación (elongación).

PCR cuantitativo (qPCR)

La PCR en tiempo real (qPCR) es una variación de la PCR que permite detectar y cuantificar secuencias de ácidos nucleicos en la reacción (BIO-RAD, 2012). Su principio es que durante la amplificación un componente emitirá una señal que permite saber si la concentración de la muestra aumentó, confirmando que en la reacción existe algo que se está amplificando. Existe dos tipos de componentes que permite monitorear la amplificación; sondas y fluoróforos.

Las sondas son oligonucleótidos específicos que en su extremo 5' tiene un fluoróforo donador que emite fluorescencia a una longitud de onda determinada y un aceptor

(quencher) que absorbe energía a la longitud de onda que el emite el donador y se encuentra en su extremo 3', debido a que estos dos componentes están relativamente cerca la sonda no emite fluorescencia. Sin embargo, durante la amplificación, la sonda se hibrida con su cadena complementaria, y cuando el ADN polimerasa está replicando el ADN y se encuentra con la sonda, activa su función exonucleasa, lo que hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluoróforo (Wilheim *et al.*, 2003). Como el donador y aceptor no están juntos, la fluorescencia emitida por el donador es captado por el sistema de detección del termocilador (Higuchi *et al.*, 1993).

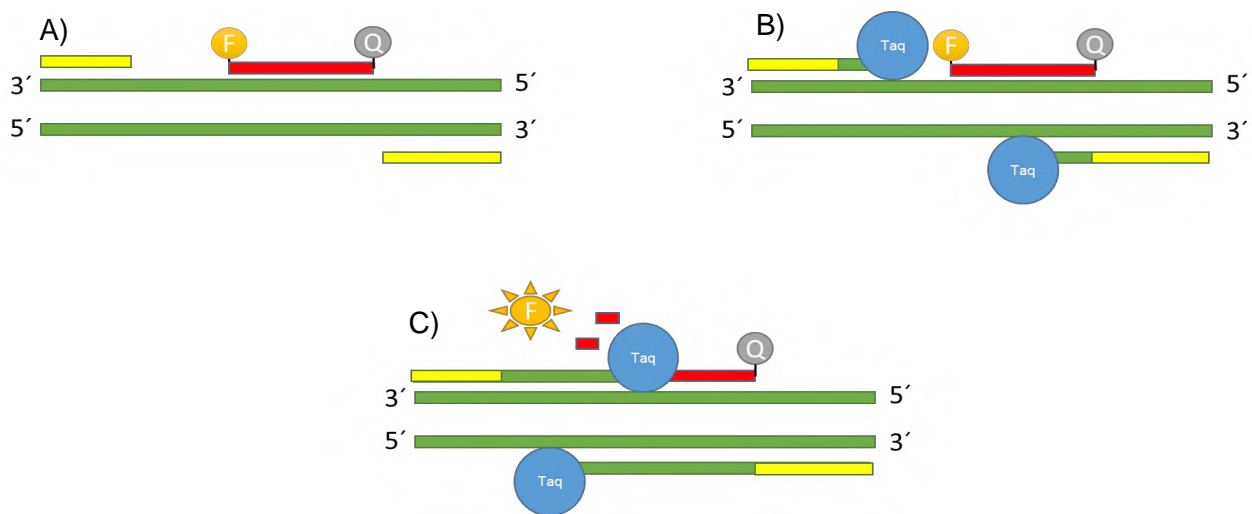


Figura 12 Eventos moleculares durante la amplificación del DNA en presencia de las sondas Taqman A) hibridación de la sonda, B) la taq polimerasa empieza la elongación de la cadena y se encuentra con la sonda, C) la actividad exonucleasa de la taq polimerasa activa hidroliza la sonda y libera el fluoróforo y la fluorescencia producidas será detectable en el equipo.

Para la PCR en presencia de un fluoróforo se utiliza un intercalante de ADN, que emita mayor fluorescencia cuando está presente con ADN de doble cadena, mientras más secuencias de ADN se tengan en la reacción mayor será la fluorescencia, permitiendo ver que existe un aumento de concentración durante cada ciclo de la PCR. El fluoróforo más utilizado es el SYBR Green (Rubio-García y Rodríguez-Prieto, 2014), el SYBR Green es una molécula intercalante que tiene afinidad por el ADN de doble cadena y cuando está dentro de la estructura del ADN emite fluorescencia (Figura 13), Tiene dos picos principales de excitación: a 280 nm en UV y 502 nm en región visible (color

verde de ahí su nombre), este fluoróforo es económicamente más competitivo, pero su único inconveniente es que es inespecífico cuando se intercala (Soediono, 1989).

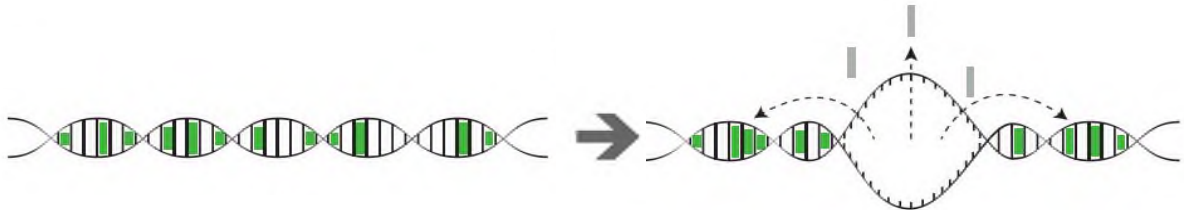


Figura 13 Mecanismo de acción del SYBR GREEN. Cuando está formado la estructura de doble cadena, el fluoróforo entra en la estructura y emite una señal de fluorescencia a una longitud de onda de 502 nm, cuando la cadena se rompe por un aumento de la temperatura el SYBR GREEN sale de la estructura disminuyendo la intensidad de fluorescencia.

La qPCR tiene varias ventajas sobre la PCR tradicional; el tiempo para obtener el resultados es menor (Vázquez-Pichardo *et al.*, 2011) y es más sensible esta técnica porque la cuantificación se hace directamente con el equipo y no depende de la observación del ojo humano. La fluorescencia que indica la presencia del producto amplificado se mide al momento, por lo tanto no es necesario el manejo posterior de los productos de la PCR y el tiempo de la reacción es menor si se compara con la detección tradicional en geles de agarosa o de poliacrilamida. Cabe mencionar que la qPCR es más sensible y específica en comparación a la PCR punto final (Bustin, 2000), otra ventaja es que la qPCR se puede automatizar, lo que la ha convertido en una metodología aceptada por la OMS y la OPS como una técnica para la identificación específica de los virus patógenos para el hombre (Vinueza, 2009).

La demanda para la detección y cuantificación de ARN, ha permitido crear una variante de la qPCR, la qRT-PCR, que incorporó la detección de ARN introduciendo un paso preliminar, la conversión inicial de RNA a ADN por una transcriptasa inversa, existe dos forma de realizarlo, la primera es la introducción transcriptasa inversa en el misma reacción de PCR (de un solo paso), esta forma se elimina la manipulación de ARN, bajando los índices de contaminación y degradaciones del ARN (QIAGEN Technical Services, 2010), el segundo método es realizar la reacción de reto-transcripción separados para tener ADNc, y posteriormente realizar la qPCR (de dos pasos) (Rasmussen, Morrison *et al.*, 1998).

Existe un formato de la qRT-PCR denominado multiplex, que permite detectar y diferenciar de forma simultánea varias secuencias de interés en una reacción (Romolo *et al.*, 2006), este se logra mediante un análisis Melting Curve. El análisis de la curva de disociación, permite observar la intensidad de la fluorescencia conforme se va aumentando gradualmente la temperatura (Rutledge y Cote, 2003), debido a que cada secuencia amplificada tiene su propio perfil cuando es sometido al gradiente de temperatura (Varga y James, 2005; S. A. Bustin y Mueller, 2005), es posible diferenciar una secuencia de otra, además usando secuencias conocidas como patrón podemos identificar y clasificar cada amplificado (Reed *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2008).

Se han diseñado varias técnicas para el diagnóstico diferencial de virus usando la qRT-PCR en formato Multiplex (Varga y James, 2005), principalmente para diferenciar virus patógenos para el humano (Yang *et al.*, 2010), también se utilizan para diferenciar serotipos del virus, como de dengue e Influenza (Pongsiri *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013). Para el diagnóstico diferencial de enfermedades producidas por virus se puede utilizar la RT-PCR y la qRT-PCR (Tabla 6), pero desde el último brote chikungunya en el 2014 la OMS han establecido que la única prueba que es aceptada con bases en la Biología Molecular para la detección de virus patógenos al ser humano durante la fase aguda de la enfermedad es mediante la qRT-PCR, utilizando sondas o fluoróforo, además estas técnicas deben cumplir 5 parámetros establecidos por la OMS y OPS para que la técnica sea considerada válida (OIE, 2008; Fondevila, Compaired, Maradei, y Duffy, 2014). La técnica tiene que ser factible y reproducible en cualquier equipo, debe de tener una especificidad y sensibilidad que permita detectar y diferenciar el virus durante la fase aguda de la enfermedad y tiene que ser repetible. Actualmente existen diagnósticos que permiten diferenciar a los tres virus usando sondas Taqman durante la fase aguda de la enfermedad (AccuPower, 2016; Genekam, 2016), pero no existe con SYBR GREEN, se ha reportado que el SYBR GREEN puede diferenciar hasta 6 virus (Zeng *et al.*, 2014), entre los virus que se pueden diferenciar se encuentra el dengue y el chikungunya, pero no se ha desarrollado para diferenciar el zika con SYBR GREEN. El uso de SYBR GREEN para diferenciar virus es más económico que el uso de sondas, lo que proponemos en el trabajo es realizar una técnica de diagnóstico

molecular usando la qRT-PCR multiplex con SYBR GREEN para la diferenciación de los virus de chikungunya, dengue y zika durante la fase aguda de la enfermedad.

Tabla 6 Técnicas establecidos para el diagnóstico de virus patógenos para el humano.

Técnica	Fluoróforo	Virus que se detecta con la técnica	Referencia
<i>qRT-PCR</i>	SYBR Green	Virus del herpes simple tipo 1 Virus herpes simple tipo 2 Virus de la varicela	(Schmutzhard, Riedel, Wirgart, & Grillner, 2004)
<i>qRT-PCR</i>	SYBR Green	Virus del síndrome porcino respiratorio y reproductivo (PRRS)	(Martinez <i>et al.</i> , 2008)
<i>qRT-PCR</i>	SYBR Green	Virus chikungunya Virus dengue Virus de Este del Nilo	(Naze <i>et al.</i> , 2009)
<i>qRT-PCR</i>	SYBR Green	Virus dengue Virus chikungunya Virus de la encefalitis japonesa Virus sindbis (SINV)	(Yang <i>et al.</i> , 2010)
<i>qRT-PCR</i>	Taqman	Virus dengue Virus chikungunya	(Pongsiri <i>et al.</i> , 2012)
<i>RT-PCR</i>	Bromuro de etidio	Virus de la influenza	(Wu <i>et al.</i> , 2013)
<i>qRT-PCR</i>	SYBR Green	Virus de la pseudorrabia (PRV), Virus del parvovirus porcina (PPV), Virus de la peste porcina clásica (CSFV) Virus del síndrome porcino respiratorio y reproductivo (PRRS) Virus de la encefalitis japonesa (JEV) y Virus porcino circovirus tipo 2 (PCV2)	(Zeng <i>et al.</i> , 2014)
<i>qRT-PCR</i>	EvaGreen	Virus circovirus porcino tipo 2 (PCV2) Parvovirus porcino (PPV) Virus de la peste porcina clásica (CSFV) Virus de la encefalitis japonesa (JEV)	(Rao <i>et al.</i> , 2014)
<i>qRT-PCR</i>	Taqman	Virus del dengue (serotipos)	(Kim <i>et al.</i> , 2015)
<i>qRT-PCR</i>	Taqman	Virus chikungunya Virus dengue Virus zika	(AccuPower, 2016)
<i>qRT-PCR</i>	Taqman	Virus chikungunya Virus dengue Virus zika	(Genekam, 2016)

4. JUSTIFICACIÓN

En la región del Papaloapan a partir del 2015 hasta la fecha, el 60 % de las camas de los hospitales son ocupadas por pacientes que tienen cuadros febriles que se sospecha que es dengue. Se estima que el 30 % de los pacientes internado por dengue en realidad tiene otra enfermedad que no requiere hospitalización (chikungunya y zika), el lugar ocupado por esta persona puede ser utilizado por un paciente que requiera atención médica y vigilancia constante. Por lo que se requiere una técnica de diagnóstico diferencial para los virus de chikungunya, dengue y zika y que sea rápida, precisa y rentable. Para establecer un diagnóstico diferencial aceptado por la secretaria de salud de México se deben de cumplir la norma NOM-017-SSA2-2012 y la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, estas contienen los requisitos mínimos para ser una técnica de diagnóstico aceptada por la OMS. En estas normas establece que la PCR es la única técnica aceptada para diagnosticar las enfermedades en zonas endémicas, debidos a que tiene una alta sensibilidad, baja contaminación y permite estandarizar y automatización el diagnóstico. Por este motivo se diseñó una técnica de diagnóstico molecular para los virus de dengue, chikungunya y zika.

5. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Regiones del genoma de chikungunya, dengue y zika pueden utilizarse como marcadores moleculares para detectar específicamente a cada virus en una curva de disociación de DNA en la técnica de PCR en tiempo real?

6. HIPÓTESIS

Existen diferencias en la secuencia de nucleótidos de los genomas de los virus chikungunya, dengue y zika que pueden ser utilizados como marcadores moleculares para diseñar una prueba de diagnóstico diferencial para las enfermedades virales.

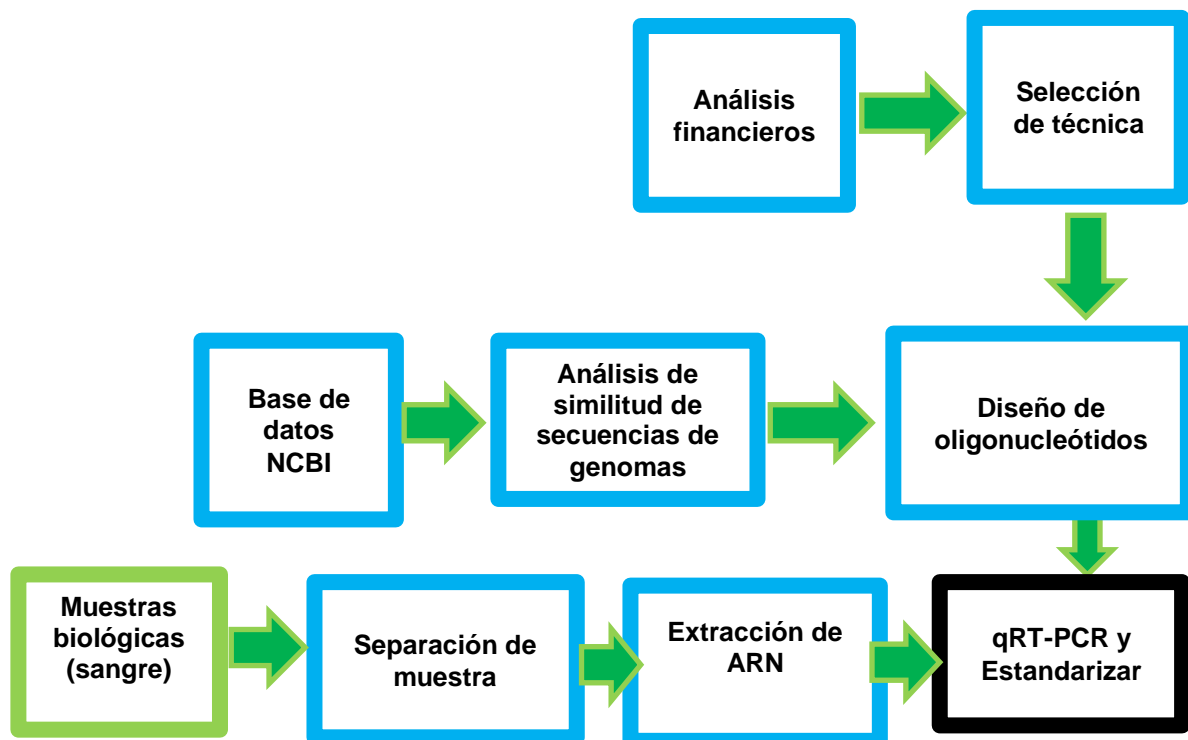
7. OBJETIVO GENERAL

Diseñar y validar un método de diagnóstico molecular de ácidos nucleicos de los virus de chikungunya, dengue y zika.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar las regiones específicas del genoma de los virus de chikungunya, dengue y zika.
2. Diseñar los oligonucleótidos que amplifiquen los marcadores moleculares de los virus chikungunya, dengue y zika
3. Validar los oligonucleótidos con controles positivos sintéticos en una reacción de qRT-PCR múltiple.
4. Determinar la Especificidad, Reproducibilidad, Repetibilidad, Concentración mínima, Factibilidad y Sensibilidad de la prueba en muestras biológicas.

9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Azul: Se realizó en el Laboratorio de biología Molecular de la UNPA

Verde: Se realizó en el Hospital

Negro: Se realizó en el Laboratorio de Grupo "QUAE"

10. MATERIALES Y METODOS

10.1 ANÁLISIS FINANCIEROS

Análisis de costos y de tiempo

Se realizó un análisis de costos teórico para las reacciones PCR para seleccionar cual es la técnica más rentable, se compararon 3 técnicas de diagnóstico para detección de material virales, las técnicas que se analizaron fueron RT-PCR, qRT-PCR y sondas Taqman toda de un solo paso. El análisis de costo se realizó con las cotizaciones obtenidas por las empresas Macrogen, Biosys y T4oligo obtenidas entre el 1 y 5 de mayo de 2016. Las cotizaciones fueron calculadas para realizar 500 reacciones, el análisis se realizó para seleccionar la técnica más rentable para poder desarrollar una metodología del diagnóstico usando la modalidad multiplex. Para calcular el tiempo que se requiere para el diagnóstico se realizaron 5 pruebas RT-PCR y 5 qRT-PCR para medir el tiempo mínimo requerido para el diagnóstico. Para calcular el tiempo que se requiere para usar sondas Taqman se tomó el tiempo del pipeteo de las reacciones de qRT-PCR y se le sumo el tiempo del protocolo de reacción de sondas Taqman del kit TaqMan® Universal PCR Master Mix (anexo 8).

Nota: Para obtener los gastos de las puntillas, placas o tubos y películas adhesivas se realizó un estimado que para 500 reacciones se utilizan un total de 1500 puntas para Taqman y qRT-PCR y para RT-PCR se calculó 2000 porque el protocolo indica la adición de Mg²⁺ de manera independiente del buffer de reacción, 500 pocillo de reacción y 250 películas adhesivas (Taqman y qRT-PCR).

10.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS

Selección de pacientes.

Las muestras de sangre que se utilizaron para este trabajo fueron del Hospital Regional de Tuxtepec Oaxaca. Los pacientes que se seleccionaron se identificaron mediante un estudio clínico diseñado para verificar si el paciente cumple con la definición operacional de una de las tres enfermedades virales para ser candidatos para la toma de muestra (anexo 1), el estudio fue realizado por el departamento de epidemiología del Hospital General de Tuxtepec, bajo el permiso del director general

del Hospital General de Tuxtepec, los pacientes que obtuvieron una definición operacional de una de las tres enfermedades se le presentó una carta informativa (anexo 2) para solicitarle su cooperación para obtener una muestra para realizar el diagnóstico y se le informó que todo dato obtenido para la tesis será confidencial, los pacientes que estuvieron de acuerdo con la petición se le dio las indicaciones para tomar la muestra de sangre.

Los pacientes candidatos se les informó que eran candidatos para una toma de muestra de sangre, y se les pidió que firmaran la carta informativa para poder realizar la toma de muestra con el personal del laboratorio del Hospital General de Tuxtepec Oaxaca.

Toma de muestra

Todas las muestras fueron tomadas por personal laboral del Hospital general de Tuxtepec Oaxaca, utilizando el protocolo establecido por el laboratorio clínico del Hospital General de Tuxtepec Oaxaca.

En total se tomaron 2 muestras diferentes por paciente, las muestras se tomaron por sistema de vacío por venopunción, una muestra fue con el tubo recolector con anticoagulante EDTA para obtener plasma y sangre completa, la segunda se usó un tubo recolector sin anticoagulante para la obtención de suero, las muestras fueron etiquetadas con un formato específico para la tesis (anexo 3). Las muestras se obtuvieron durante las fases agudas de la enfermedad (1-5 días después del cuadro clínico) y se almacenaron en refrigeración en el Hospital Regional hasta su traslado al laboratorio de biología molecular en la Universidad del Papaloapan, donde se almacenaron a una temperatura de -20 °C. Se tomaron 10 muestras de paciente que no presentaron enfermedad o presentaba otra enfermedad viral que fueron utilizados como controles para verificar la especificidad de la técnica; 2 personas que no presentan ningún cuadro clínico, 2 Proteus, 2 hepatitis C, 2 hepatitis A, 2 gripes virales y 2 VIH.

Nota: Las extracciones que no se obtuvieron el volumen necesarios para el análisis se rechazaron para realizar la extracción de ARN.

Obtención de suero.

Las muestras sanguíneas que se tomaron sin anticoagulante se dejaron reposar a temperatura ambiente de 30 a 60 minutos para coagular la muestra, posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 2000 g, se separó el suero a un tubo de recolección de muestra sanguíneas de tapón rojo limpio y nuevo para evitar contaminación, posteriormente se refrigeró el suero a una temperatura de 4°C hasta su traslado a la Universidad del Papaloapan. Las muestras se almacenaron a -70 °C, hasta que se realizó la extracción de ARN viral. Solo los sueros que no presentaba hemolisis o lipemia fueron utilizados para la extracción de ARN.

10.3 ANÁLISIS DE BASES DE DATOS DE GENOMAS DE VIRUS EN NCBI

Búsqueda de secuencia de virus

La búsqueda se realizó en la base de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para la selección de secuencias se tomaron 2 criterios, las secuencias debían de tener un máximo tres años desde su secuenciación y que fueran aisladas de países que no presentaban las enfermedades de manera endémica antes del 2013, se tomaron como prioridad las secuencias reportadas en México por el InDRe.

Para el virus chikungunya se seleccionaron un total de 20 secuencias; 8 aisladas en México, 2 en el Caribe, 3 de Estados Unidos, 2 de Brasil, 1 de Alemania, 1 de Filipinas, 1 de Venezuela y 1 de China. Las secuencias abarcan un total de 9 países entre los continentes de América, Europa y Asia (anexo 12), lo que permite obtener una secuencia conservada entre los virus de tres continentes.

Las secuencias para zika se seleccionaron un total de 18, de los siguientes orígenes; 2 de México, 7 de Brasil, 1 del Caribe 3 de Francia, 2 de Estados Unidos, 1 de Haití, 1 de Japón y 1 de Uganda, estas secuencias abarcan un total de 8 países entre los continentes de África, América, Europa y Asia (anexo 13).

Para el virus de dengue no se encontró secuencia con los parámetros establecidos y se utilizó la región D1 y D2 utilizados por el InDRe y OMS secuencias dengue conservado para los 4 serotipos.

10.4 ANÁLISIS DE SIMILITUD DE SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS ENTRE LOS GENOMAS DE LOS VIRUS

El alineamiento de las secuencias de los genomas virales se realizó con el programa MEGA V.7.0, con los parámetros predeterminados, debido a que este alineamiento es uno de los más precisos para localizar las regiones conservadas ya que puede hacerse sin “gaps”, permitiendo obtener regiones conservadas de tamaño relativamente largo. El alineamiento múltiple se analizó con el programa clustal omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para seleccionar regiones del genoma con una similitud menor al 50 % para diseñar los oligonucleótidos.

10.5 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron de las regiones conservadas de cada virus obtenido por el programa MEGA V7.0, los parámetros para el diseño de los oligonucleótidos fueron; la temperatura de alineamiento entre los 63-67 °C, un porcentaje de GC del 40-60% y que el producto de amplificación por PCR fuera de diferente tamaño a los otros dos virus de interés. Todos los parámetros fueron evaluados con un programa en línea llamado “oligo Calc” (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). La secuencia de los oligonucleótidos con las características adecuadas se enviaron, en la dirección 5´ a 3´, a la empresa MacroGen para que se realizará la síntesis química.

Diseño de Secuencia Control.

Los controles positivos sintéticos son secuencias de nucleótidos que contiene la región del genoma de cada virus que flanquean los dos oligonucleótidos.

Se diseñarán controles sintéticos para los virus de chikungunya y zika, fueron sintetizados por la empresa MacroGen. Para la secuencia control del Dengue se utilizó la extracción de ARN de sustrato de cerebro de ratón infectado con Dengue tipo 2 donado por el doctor **Celso Ramos García** del **Instinto de Salud Pública de Morelos**.

Especificidad de los Oligonucleótidos

Para verificar que los oligonucleótidos diseñados reconocen específicamente a cada genoma viral se realizó un análisis de similitud de secuencias en el programa "blast" para cada uno de los oligonucleótidos diseñados y se cambiaron los parámetros para que nos diera las primeras 20000 secuencias con mayor similitud a las secuencias del oligonucleótido, con los datos obtenidos cobertura y similitud se analizaron en una gráfica de dispersión de datos y el origen de las secuencias se diferenciaron por colores. Se usó como eje "x" la cobertura de la secuencia, y como eje "y" la identidad de la secuencia, los datos obtenidos se agruparon en 4 conjuntos distintos; CHIKV las secuencias que pertenecen a chikungunya, DENV las secuencias que pertenece a Dengue, ZIKV que proviene de ZIKA y OTROS cualquier secuencia de otra especie que no pertenezca a los grupos anteriores, no se tomó la secuencia predicción, el análisis se realizó con el programa SPSS Statistics Version 24.

10.6 VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN DE ARN.

Para poder realizar el diagnóstico debemos de tener un ARN íntegro, puro y concentrado. Para lograr una correcta extracción se debe de controlar principalmente dos variables, el tipo de muestras y el método de detección a usar. La obtención de ARN viral en sangre se puede obtener a partir de 3 tipos de muestra; suero, plasma y sangre completa. Para la obtención de ARN de alta calidad existen en el mercado varios protocolos de purificación; en este trabajo de investigación se compararon dos protocolos (QIAamp Viral RNA Mini y GeneJET Viral DNA/RNA Purification kit) que se han reportados para la extracción de ARN viral en muestras biológicas humanas como sangre completa, suero y plasma. La purificación de ARN se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y se procesaron las muestras de suero, plasma y sangre completa. Debido a que la eficiencia de purificación de estos dos protocolos de extracción de ARN viral es baja se obtuvieron concentraciones inferiores a la capacidad de detección del equipo nanodrop, la cuantificación se determinó con la técnica de RT-PCR semicuantitativa en donde se tomó una muestra cada 5 ciclos a partir del ciclo 20 para cuantificar el incremento de ADN de doble cadena con el peso molecular de cada producto de amplificación. Con estos datos se realizó una regresión

lineal y se determinó cual era el mejor procedimiento para la purificación del RNA de diferentes muestras para realizar el diagnóstico en formato multiplex.

Se realizaron un total de 60 RT-PCR de 50 μ L utilizando el kit Verso 1-Step RT-PCR ReddyMix con el protocolo (Tabla 7) con el equipo MaxyGene II Thermal (Axygen). Para la extracción de ARN de cada kit se usaron 5 pacientes que se le confirmó chikungunya por sus definiciones operacionales y por análisis realizados por el Indre, a estos pacientes se realizó dos extracciones para cada componente de su sangre (suero, plasma y sangre completa). Se tomó la concentración de ADN con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), Como blanco, se utilizó el master mix del kit de Verso 1-Step RT-PCR ReddyMix. Con los datos obtenidos con el nanodrop se realizó una regresión lineal y se seleccionó el kit con la muestra que tenga la pendiente más grande.

Tabla 7 Protocolo de preparación de reacción de RT-PCR.

	<i>Volumen (μL)</i>	<i>Final concentración</i>
<i>Verso Enzyme Mix</i>	1	
<i>2X 1-Step qPCR SYBR low ROX Min RT Enhancer</i>	25	1X
<i>Mix oligonucleótidos</i>	2.5	
<i>Templado</i>	6	1 pmol
<i>Agua libre de ARNasa</i>	5	1-100 ng
<i>Volumen Total</i>	9.5	
	50	

El Mix oligonucleótidos es una mezcla de oligonucleótidos es una solución, contiene los 3 pares de oligonucleótidos con una concentración final de 20 pmol/ μ L. Cada oligonucleótido se encuentra a una concentración de 3.33 pmol/ μ L.

La extracción y purificación de ARN.

El kit y el tipo de muestra que presentó la pendiente más grande se usó para obtener el ARN para determinar los parámetros de la técnica.

Las extracciones se realizaron bajo campana de flujo laminar y puntas libre de ARNasa para evitar la degradación de ARN como marca el lineamiento de diagnóstico de enfermedades virales del Indre.

10.8 CUANTIFICACIÓN DE RNA VIRAL EN MUESTRAS DE PACIENTES DIANOSTICADOS CON ZIKA, DENGUE O CHINCONGUNYA

La qRT-PCR que se realizó fue de un solo paso para evitar la degradación de ARN por pipeteo y/o manipulación humana, se usó el kit de Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR Low ROX, las reacciones se realizaron en dos equipos diferentes; en el IQ5 de Bio-Rad y Piko24 de Thermo Scientific.

Las reacciones fueron preparadas en un volumen final de 15 μL , en la Tabla 8 se indica el volumen usado y la concentración final de cada uno de los componentes de la PCR. La amplificación de los marcadores moleculares de los tres virus se realizó en el equipo de PCR en tiempo real "iQ5" (BioRad) en donde se programó el protocolo que se muestra en la Tabla 9. En cada corrida se procesaron nueve controles; dos de chikungunya, dos de Dengue, dos de Zika y tres controles sin muestra.

Se procesaron en total las 110 muestras en el equipo IQ5, de las muestras que salieron amplificadas se seleccionaron 80 muestras al azar para realizar la estandarización en ambos equipos para poder establecer un diagnóstico molecular (cinco de Dengue, 30 de chikungunya y 35 de Zika).

Cada equipo utilizado para la validación de la prueba de diagnóstico presentan ciertas particularidades que se muestran en la Tabla 10 donde se presenta las características de cada uno del equipo de qPCR.

Tabla 8 Mezcla de reacción de la qRT-PCR.

	<i>Volumen (μL)</i>	<i>Final concentración</i>
<i>Verso Enzyme Mix</i>	0.20	
<i>2X 1-Step qPCR SYBR low ROX Min RT Enhancer</i>	7.5	1X
<i>Mix oligonucleótidos*</i>	0.75	
<i>Templado</i>	1.55	300 Nm
<i>Volumen Total</i>	5	1-100 ng
	15	

El Mix oligonucleótidos es una Mezcla de oligonucleótidos en solución, contiene los 3 pares de oligonucleótidos con una concentración final de 20 pmol/ μL . Cada oligonucleótido se encuentra a una concentración de 3.3333333 pmol/ μL .

Tabla 9 Protocolo para la amplificación de los marcadores moleculares de los tres virus.

	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclo
cDNA Synthesis*	50°C	15 min	1 ciclo
Thermo-Start activation	95°C	15 min	1 ciclo
Denaturation	95°C	15 s	
Annealing**	60°C	30 s	40 ciclos
Extension **	72°C	30 s	
Melting Curve	95-65°C	21 min (gradiente de 0.2°C)	1 ciclo

Tabla 10 Características de los equipos utilizados para la validación de la prueba diagnóstica de marcadores moleculares de los virus zika, chikungunya y dengue.

	<i>IQ5</i>	<i>PIKO24</i>
<i>Volumen de la muestra (µL)</i>	15-50	10-50
<i>Numero de muestras</i>	96	24
<i>Rango de temperatura</i>	4-100°C	4-99.9 °C
<i>Exactitud</i>	±0.4°C	±0.2°C
<i>Sensibilidad</i>	No determinado	1 copia de ADN O ARN
<i>Intervalo de detección</i>	515-700 nm	520-740 nm
<i>Recomendando para multiplex</i>	No determinado	Si

La sensibilidad del Piko24 está determinado y en comparación de IQ5, presenta un mayor rango de detección, por lo que, se pueda utilizar con un gamma más grande de fluoróforos. Otro inconveniente del IQ5 es que utiliza como fuente de luz una lámpara de tungsteno, después de cierto tiempo la eficiencia de la emisión de luz baja, y disminuye la eficiencia de excitación del fluoróforo.

Caracterización de la amplificación de la secuencia control

En toda reacción de PCR se requiere incluir controles para poder corroborar la funcionalidad de los componentes y comparar el diagnostico obtenidos con los resultados de los controles. Por lo que, es necesario incluir un control positivo y un

control negativo para asegurar que los resultados sean válidos. El protocolo usado como controles es el mismo que se utiliza para las muestras.

Se realizó una serie de diluciones (1:10 ,1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000) por duplicado de cada una de las secuencias control para chikungunya, dengue y zika partiendo de una concentración de 10 μ M para determinar la concentración estándar a utilizar. El control de Dengue se usó una muestra de Dengue tipo 2 donado por el doctor **Celso Ramos García** de instituto Nacional de Salud Pública, se utilizaron los oligonucleótidos diseñados para este trabajo. Para los virus de chikungunya y zika se utilizó la secuencia sintética chikp y zikap con los oligonucleótidos chikf, chikr, zikaf y zikar.

Tabla 11 Protocolo de preparación de controles en qRT-PCR

	<i>Volumen (μL)</i>	<i>Final concentración</i>
<i>Verso Enzyme Mix</i>	0.20	
<i>2X 1-Step qPCR SYBR low ROX Min RT Enhancer</i>	7.5	1X
<i>Mix oligonucleótidos</i>	0.75	
<i>Controles</i>	1.55	300 Nm
<i>Agua con DEPC</i>	2	1 ng
<i>Volumen Total</i>	Hasta llegar a 15	
	15	

10.9 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN

Es evidente que una buena prueba diagnóstica es la que ofrece resultados positivos en enfermos y negativos en sanos. Por lo tanto, las condiciones que deben ser exigidas a un técnica son: Factibilidad, Reproducibilidad, Repetitividad, Sensibilidad y Especificidad. Los cinco parámetros se determinaron en los dos equipos.

Todos los datos obtenidos para la estandarización se procesaron con el programa estadístico **IBM SPSS STATISTICS 24** con el motor Dunca con un alpha de 0.05.

La reproducibilidad y repetitividad: se determinó realizando cuatro ensayos en diferentes días, en cada ensayo se procesando 12 muestras seleccionadas de manera aleatoria con la condición que por lo menos este presente una secuencia de cada tipo

de virus, se realizaron dos ensayos en el Pikoreal 24 y dos en el IQ5, cada equipo fue utilizado por dos personas diferente. El primer ensayo fue realizado por Luis Uribe Espejo Galicia y el segundo fue realizado por Erick de Jesús Manzano Reyes.

Los resultados obtenidos de la Ct que se obtuvieron fueron analizados por el modelo de análisis de varianza anidado para comprobar que las variables humanas, muestra y tiempo no afecta en el diagnóstico mediante el programa SPSS.

Sensibilidad: es la posibilidad que tiene una técnica en dar un resultado positivo de manera correcta, para que una técnica sea aprobada para el uso de diagnóstico no debe de dar resultados positivos falsos, para el diseño de la técnica se debe de confirmar que los oligonucleótidos no reaccionen con otras secuencias que no sean los virus seleccionados, esto se determinó de dos maneras; la primera de manera teórica, cada oligonucleótido se sometió a un análisis bioinformático de multialineamiento (Clustal) para verificar que no tengan una similitud mayor del 60 % con cualquier otra secuencia que no sea la región conservada seleccionada para el diseño del oligonucleótido que se presenta en la parte de especificidad de oligonucleótidos y la segunda se obtuvo de manera experimental, se procesaron 10 muestras por triplicado, que pertenecía a personas que presentaban otra enfermedad o estaban relativamente sanas cuando se toma la muestra, las muestras procesadas fueron; 2 de Hepatitis A, 2 Hepatitis C, 2 VIH, 2 de gripe viral y 2 personas sanas.

La especificidad: Es la probabilidad de tener un resultado negativo verdadero, para calcular que la prueba no de falsos negativos se procesaron un total de 20 muestras positivas de suero que fueron proporcionados por el doctor Ramos (15 dengue, 4 chikungunya y 1 zika), debido a que eran muestras biológicas que no se obtuvieron por el hospital general o firmaron consentimiento informado, solo se proporcionó el número de muestras infectada por cada virus y no especificaron que era cada muestra.

La Factibilidad: es la capacidad que tiene la técnica de diferenciar los resultados obtenidos en las diferentes categorías nominales que fue diseñada la técnica, esta característica mide la capacidad de la técnica que tiene para detectar y diferenciar los 3 tipos de virus, y verificar que si los virus tiene el mismo comportamiento en más de

un equipo. Para obtener este dato se realizaron 15 reacciones de qRT-PCR con 5 muestras positivas para cada virus en cada equipo, estas reacciones se distribuyeron en tres corridas de manera aleatoria debido al número limitado de reacciones que se puede disponer en el equipo Piko24. Posteriormente se realizó un análisis de la curva de disociación “Melting Curve” y se obtuvo la “Tm” de cada uno de los ADN amplificados, con estos datos se realizó un análisis de varianza anova de dos factores; virus y equipo con una confiabilidad del 95 % para verificar que la técnica permite diferenciar un virus del otro.

Concentración mínima: De manera teórica es suficiente con una sola cadena de ARN intacta para poder realizar la qRT-PCR, pero esto no sucede en el laboratorio, se requiere una cantidad mínima ARN para ser detectable con la técnica de qRT-PCR, este límite de detección depende de dos factores principales, la capacidad que tiene el equipo para detectar el ADN y por el protocolo utilizado. Este parámetro es esencial para evitar falsos negativos en el diagnóstico debidos a la ausencia suficiente de muestra y obtener un resultado confiable. Este se determinó realizando 5 reacciones de qRT-PCR con 5 concentraciones diferentes de ARN (1.3, 2.6, 4, 5.3 y 7 ng/μL) en el equipo IQ5, los datos obtenidos por el equipo se exportaron al programa Origin pro versión 9 para poder agrupar los datos en las diferentes concentraciones. Las concentraciones de las muestras se tomaron con el equipo de Nanodrop 2000C que se encuentra en el instituto de biotecnología en Cuernavaca Morelos.

Nota: las muestras que se procesaron fueron muestras que dieron positivos para chikungunya, para la preparación de la reacción se usó el protocolo de la Tabla 8 y las condiciones de reacción fueron las de la casa comercial de la enzima (Tabla 9).

11. RESULTADOS

11.1 ANÁLISIS DE LOS COSTOS DE LA PRUEBA Y DEL TIEMPO DE PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las cotizaciones fueron solicitadas para procesar 500 muestras y se calculó el costo del procesamiento de cada muestra, se analizaron tres técnicas de diagnóstico en la modalidad de Multiplex de un solo paso; qRT-PCR, RT-PCR y Sondas Taqman.

Para la reacción de qRT-PCR, se cotizo el estuche comercial Verso 1-Step QRT-PCR SYBR Green Mix, para sondas Taqman solicito el costo del estuche TaqMan® Multiplex Master Mix y para la RT-PCR fue el kit Verso 1-Step RT-PCR, todos los estuches se cotizaron con la empresa Biosys.

Los oligonucleótidos específicos para cada marcador molecular de los tres virus se cotizaron en Macrogen y los precios de las sondas fueron obtenidos en la página de T4oligo (<http://t4oligo.com/oligos-y-sondas/oligonucleotidos/>), para las sondas Taqman se cotizaron tres fluoróforos diferentes, FAM para chikungunya, HEX para Dengue y TAMRA para zika.

Tabla 12 Análisis de costos y tiempo de la qRT-PCR de un solo paso.

Análisis de costo para 500 reacciones	RT-PCR	qRT-PCR	Taqman
<i>Puntas estériles</i>	\$3,850.50	\$1,900.00	\$1,900.00
<i>Kit de purificación y concentración de ARN</i>	43,778.40	43,778.40	43,778.40
<i>Oligonucleótidos para virus chikungunya</i>	428.70	428.70	2,504.45
<i>Oligonucleótidos para virus dengue</i>	511.80	511.80	2764.50
<i>Oligonucleótidos para virus zika</i>	466.50	466.50	2,631.50
<i>Kit para la PCR</i>	14,000.12	22,726.14	63,827.84
<i>Placas, tubos y Películas adhesivas</i>	3,265.00	1,255.00	1,255.00
<i>Costo de electroforesis</i>	950.50	\$0.00	\$0.00
<i>Total</i>	67,251.52	71,066.54	117,406.69
<i>Tiempo de reacción (horas)</i>	4:25	3:05	2:50
<i>Costo unitario por Reacción</i>	\$134.50	\$142.13	\$234.81

En la Tabla 12 se muestra los costos y tiempos de reacciones de las diferentes técnicas, como se puede observar la reacción más económica para realizar el diagnóstico en modalidad multiplex para la detección de enfermedades virales es la RT-PCR, esto es porque los reactivos del kit no contienen fluoróforo, volviéndola más rentable respecto a las otras dos técnicas, el único inconveniente es que la técnica demanda más tiempos para obtener un resultado debido a que se requieren realizar técnicas post-reacción que pueden tomar hasta una hora más para obtener el diagnóstico final.

La qRT-PCR tiene un precio mayor en comparación con la RT-PCR, pero esta diferencia no es tan significativa (7.63 pesos más por reacción), la ventaja de la qRT-PCR es que el tiempo que se requiere para obtener el diagnóstico es aproximadamente una hora menor en comparada con la RT-PCR. Así mismo las sondas Taqman es la reacción más cara en comparación con las otras dos técnicas (234.81 por reacción), pero es la técnica más rápida de las tres (15 minutos menos que la qRT-PCR). Con los datos obtenidos se decidió seleccionar la qRT-PCR como la mejor técnica para realizar el diagnóstico molecular de chikungunya, dengue y zika en la modalidad multiplex debido a que la diferencia en el costo con respecto a la técnica más económica (RT-PCR) no se diferencia mucho y el tiempo de diagnóstico en comparación con la técnica más rápida (sondas Taqman) no cambia significativamente permitiendo que la técnica qRT-PCR pueda ser usado como un diagnóstico rápido y económico.

11.2 BÚSQUEDA DE MUESTRAS

Búsqueda de paciente.

Se procesaron un total de 132 estudios para diagnosticar a los candidatos, se seleccionaron 127 pacientes candidatos para tomar muestras sanguíneas.

Toma de muestra

En total se tomaron muestras de 127 pacientes con cuadro febril característico de una de las 3 enfermedades, se rechazaron 17 muestras.

Obtención de suero.

De las 137 muestras obtenidas sin anticoagulante solo se procesaron para obtener sueros 110, las muestras que no se procesaron fue porque presentaba hemolisis (7) y/o lipemia (10).

Búsqueda de secuencias

Se seleccionaron en total 20 secuencias para chikungunya de diferentes orígenes; 14 genómicos y 6 de la región de síntesis de las poliproteínas (Anexo 12), para el virus de zika se obtuvo un total de 18 secuencias, 4 genómicas y 14 la de región de la poliproteína (Anexo 13).

Para el virus del Dengue no se encontraron secuencias de los 4 serotipos reportadas en los últimos tres años (ausencia del serotipo 2 y 4), posiblemente esto se debe a que las investigaciones se enfocan principalmente a los virus de chikungunya y zika debidos a los últimos brotes que se han presentado y la poca información que se tiene de ellos. Para el diseño de los oligonucleótidos para dengue se procedió a buscar regiones conservadas en todos los serotipos de Dengue, se buscó en los reportes de OMS y se encontró que existe una región conservada de los 4 serotipos de dengue denominadas D1 y D2 (Tabla 13).

Tabla 13 Secuencias conservadas de los 4 serotipos de dengue utilizada por el inDRé y OMS para el diagnóstico molecular del virus.

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Posición del genoma</i>
<i>D1</i>	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	134-161
<i>D2</i>	GAACCTGAAGACATTGACTGTTGGTGCAA	616-644

11.3 ALINEAMIENTOS

Alineamiento de las secuencias

Se obtuvieron que todos las secuencias de chikungunya presentaban 4 regiones altamente conservadas y en el caso del virus zika se encontraron un total de 6 regiones conservadas, se seleccionó la secuencia con mayor tamaño de los virus de zika y chikungunya para realizar un alineamiento con el virus de dengue, para el virus de

dengue se seleccionó la secuencia del NCBI AY858048.2 para obtener la secuencia donde se encuentra las dos regiones conservadas del virus (Tabla 14).

Tabla 14 Regiones seleccionadas para diseñar los oligonucleótidos de cada virus.

Zika	GCATTGGCCATAATCAAGTACACATACCAAATAAAGTGGTA AAGGTCCTTAGACCAGCTGAAAAAGGGAAAACAGTTATGGAA TTATTTTCGAGACAAGACCAAAGGGGGAGCGGACAAGTTGTC ACTTACGCTCTTAACACATTTACCAACCTAGTGGTGCAACTCA TTCGGAATATGGAGGCTGAGGAAGTTCTAGAGATGCAAGACT TGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTGGTTG CAGAGCAACGGATGGGATAGGCTCAAACGAATGGCAGTCAG TGGAGATGATTGCGTTGTGAAGCCAATTGATGATAGGTTTGC ACATGCCCTCAGGTTCTTGAATGATATGGGAAAAGTTAGGAA GGACACACAAGAGTG
Chikungunya	GTCTGACAAAATCTGCATGCGCGGCCTTCATCGGCGACGAC AACATAATACATGGTGTCTCGTCTCCGATGAATTGATGGCAGCC AGATGCGCTACTTGGATGAACATGGAAGTGAAGATCATAGAT GCAGTTGTATCCCAGAAAGCTCCCTACTTTTGTGGAGGGTTT ATACTGCATGATA
Dengue	TGAAACGCGTGAGAAACCGTGTGTCAACTGGATCACAGTTG GCGAAGAGATTCTCAAGAGGATTGCTGAATGGCCAAGGACC AATGAAATTGGTTATGGCGTTCATAGCTTTCCTCAGATTTCTA GCCATTCCACCGACAGCGGGAATCTTGGCTAGATGGGGAAC CTTCAAGAAGTCGGGGGCTATTAAGGTCCTGAGAGGCTTCAA GAAGGAGATCTCAAATATGCTGAGTATTATCAACAGACGGAA AAAGACATCGCTCTGTCTCATGATGATGTTACCAGCAACACT TGCTTTCCACTTGACTTCACGAGATGGAGAGCCGCGCATGAT TGTGGGGAAGAATGAGAGAGGAAAATCCCTACTTTTTAAGAC AGCCTCTGGAATCAACATGTGCACACTCATAGCCATGGATTT GGGAGAAATGTGTGATGACACGGTCACTTACAAATGCCCCCT CATTACTGAAGTGGAGCCTGAAGACATTGACTGCTGGTGCAA CCTCACATCGACGTGGGTGACCTACGGAACGTGCAACCAAG CTGGAGAGCATAGACGC

El alineamiento de las tres secuencias permite identificar secuencias específicas para poder realizar el diseño de oligonucleótidos en zonas muy diferenciadas entre los diferentes virus pero conservadas en el mismo virus, en la Figura 12 se presenta el alineamiento para el diseño de los oligonucleótidos, se encontraron regiones no conservadas para todos los virus, se selecciona la primera línea para el diseño de los oligonucleótidos de dengue por tener mucha diferencia con los otros dos virus, se

seleccionó la línea número 5 para el diseño de los oligonucleótidos de chikungunya y la línea número 9 para el diseño de los oligonucleótidos de zika.

```

CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

ZIKV 1 -----GCATTGGCCATAATCAA-----GTACACATACCAAATA
CHIK 1 -----GTCTGACAAAATCTGCATGC
DENV 1 TGA AACCGCGTGAGAAACCGTGTG TCAACTGGATCACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAGAG
          * * * * *

ZIKV 2 AAGTGGTAAAGGTCCTTAGACCAGCTGAAAAAGGGAAAACAGT-----TATGGAATTA
CHIK 2 GCGGCCTTCATCGGCGACGACAACATAATACATGGTGTCT-----
DENV 2 GATTGCTGAATGGCCAAGGAC-CAATGAAATTGGTTATGGCGTTCATAGCTTTCCTCAGA
          * * * * *

ZIKV 3 TTTCGAGACAAG-----ACCAAAGGGGGAGCGGACAAGTTGTC-
CHIK 3 -----CCGATGAATTGATGGCAGCC-----AGATGC-----
DENV 3 TTTCTAGCCATTCCACCGACAGCGGGAATCTTGGCTAGATGGGGAACCTTCAAGAAGTCG
          * * * * *

ZIKV 4 -----ACTTACGCTCTTAACACATTTACCAA-----
CHIK 4 -----GCTACTTGGATGAACATGGAAGTGAAGATCATAGATGC-----
DENV 4 GGGGCTATTAAGGTCCTGAGAGGCTTCAAGAAGGAGATCTCAAATATGCTGAGTATTATC
          * * * * *

ZIKV 5 -----CCTAGTGGTGCAACTATTCGGAATATGG-----AGGC
CHIK 5 -----AGTTGTA---
DENV 5 AACAGACGGAAAAAGACATCGCTCTGTCTCATGATGATGTTACCAGCAACACTTGCTTTC

ZIKV 6 TGAGGAAGTTCTAGAGATGCAA-----GACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAAGT
CHIK 6 -----TCCCAGAAAAGC
DENV 6 CACTTGACTTCACGAGATGGAGAGCCGCGCATGATTGTGGGGAAGAATGAGAGAGGAAAA
          * * *

ZIKV 7 GACCAACTGGTTGCAGAGCAACGGATGGGATA----GGCTCAAACGAATGGCAGTCA-GT
CHIK 7 TCCCTACTTTT--TGGAGGGTTTATACT-----
DENV 7 TCCCTACTTTT--AAGACAGCCTCTGGAATCAACATGTGCACACTCATAGCCATGGATT
          * * * * *

ZIKV 8 GGAGATGATTGCGTTGTGAAGCCAATTGATGATAGGTTTGCACATGCCCTCAGGTTCTTG
CHIK 8 -----
DENV 8 TGGGAGAAATGTGTGATGACAC-----GGTCACTTACAAATGCCCCCTCATTACTG

ZIKV 9 AA-----TGAT-----ATGGGAAAAGTTAG
CHIK 9 -----GCATGATA-----
DENV 9 AAGTGGAGCCTGAAGACATTGACTGCTGGTGCAACCTCACATCGACGTGGGTGACCTACG
          * * *

ZIKV 10 GAAGGACACACAAGAGTG-----
CHIK 10 -----
DENV 10 GAACGTGCAACCAAGCTGGAGAGCATAGACGC

```

Figura 14 Alineamiento de los virus de dengue, zika y chikungunya, cada línea esta numerada para facilitar la interceptación de los datos.

11.4 Diseño de Oligonucleótidos

Se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos para la amplificación de los virus. Por motivos que los oligonucleótidos fueron diseñados por la empresa Grupo QUAE S de RL retiene todo derecho de los oligonucleótidos, se prohíbe el uso de los oligonucleótidos presentes en la tesis con fines lucrativos. Los oligonucleótidos con la terminación F son los oligonucleótidos forward también denominado oligonucleótido 5' y los de terminación R son los Revers o también conocidos como oligonucleótido 3'.

Tabla 15 Oligonucleótidos diseñados para la qRT-PCR.

<i>Virus</i>	<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>	<i>% CG</i>	<i>T_m</i>	<i>Pb</i>
<i>ZIKV</i>	ZIKAF	CGTTGTGAAGCCAATTGATGATAGG	44	64.1	25
	ZIKAR	TTCAAGAACCTGAGGGCATGTGC	52	64.6	23
<i>DENV</i>	DENVF	AATATGCTGAAACGCGCGAGAAACC	48	65.8	25
	DENVR	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGG	46	66.2	26
<i>CHIKV</i>	CHIKF	AGATGCGCTACTTGGATGAACATGG	48	65.8	25
	CHIKR	CTCCACAAAAGTAGGGAGCTTTCTGG	48	65.8	25

Diseño de Secuencias Control

Se diseñaron 2 secuencias control de nucleótidos, para el virus de Zika el control tiene un tamaño de 51 bases, mientras para el virus de Chikungunya es de 79 bases (Tabla 16), se confirmó que los controles sintéticos no formen estructura secundaria porque este puede afectar la eficiencia de la amplificación y se puede afectar de manera significativa a la Melting Curve permitiendo que se presenta una mayor variación entre Melting de mismo virus. La Secuencia control de dengue fue una muestra positiva de Dengue tipo 2 que fue donada por el instituto de salud pública, el tamaño del amplificados de los oligonucleótidos de dengue es de 502 bases.

Tabla 16 Secuencias control diseñadas para la técnica de qRT-PCR.

VIRUS	NOMBRE	SECUENCIAS	PB
ZIKA	ZIKAP	CGTTGTGAAGCCAATTGATGATAGGTTTG CACATGCCCTCAGGTTCTTGAA	51
CHIKUNGUNYA	CHIKP	AGATGCGCTACTTGGATGAACATGGAAGT GAAGATCATAGATGCAGTTGTATCCCAGA AAGCTCCCTACTTTTGTGGAG	79

Especificidad de los Oligonucleótidos

Las gráficas se dividen en dos partes, la parte de la izquierda pertenece al oligonucleótido 3' y el de la derecha pertenece al oligonucleótido 5', en la Figura 15, se muestra el análisis de las secuencia de Chikungunya, se obtuvo un total de 18231 secuencias mediante el blast de NCBI, el resultado obtenidos de este análisis fue que los oligonucleótidos son específicos para el virus de Chikungunya. Presenta cierta homología con otras secuencias reportadas en la base de datos pero no tiene más del 80 % de coberturas y la mayoría de estas secuencias no presenta una identidad mayor del 85 %. El oligonucleótido 5' presenta cierta homología con las secuencias reportadas de Dengue, presentan una identidad de 46 % y tiene una coberturas del 100 %, en el caso que el oligonucleótido 5' se alineara con secuencia de Dengue y se realice el amplificado, no sería un amplificado exponencial debidos a que la secuencia de Dengue no se encuentra presenta en el oligonucleótido 3'.

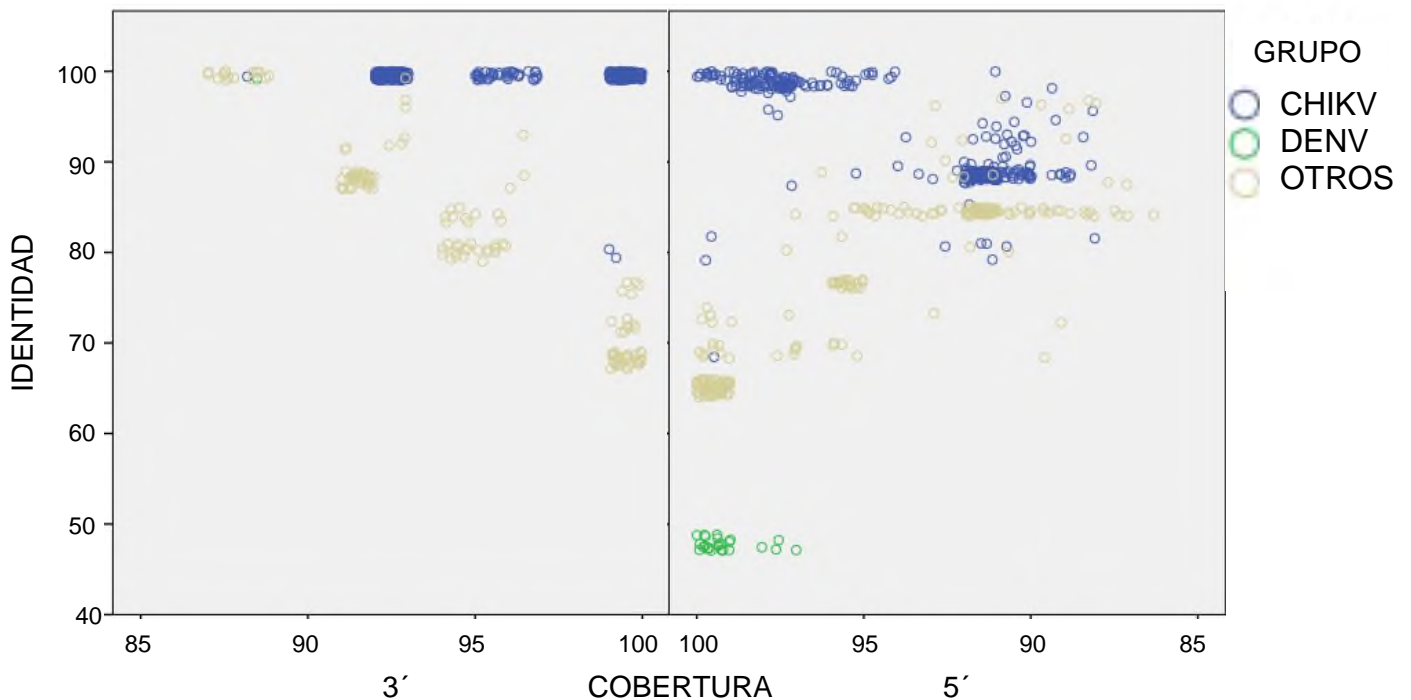


Figura 15 Dispersión de secuencias de los oligonucleótidos para Chikungunya.

La Figura 16 se muestra el análisis de los oligonucleótidos de Dengue, se obtuvo una gran diversidad de secuencia de dengue reportadas por su gran número de secuencias reportadas (40000 secuencias), la mayoría presenta un 100 % de identidad con respecto a los oligonucleótidos diseñados, pero también se pueden alinear con otras secuencias que no pertenecen a los virus que se están estudiando porque presenta una alta identidad, pero solo se encuentra en el oligonucleótido 5', si estas secuencias amplificas no tendría un oligonucleótido en la cadena complementaria lo que impide que se vuelva una amplificación exponencial. también presenta una identidad del 46 % con 100 % de cobertura con las secuencias de Chikungunya, de misma manera que sucede con las otras secuencias, puede existir amplificación de otras secuencias que no son de dengue pero solo se presenta en el oligonucleótido 3', lo que impide que tenga un amplificado de manera exponencial.

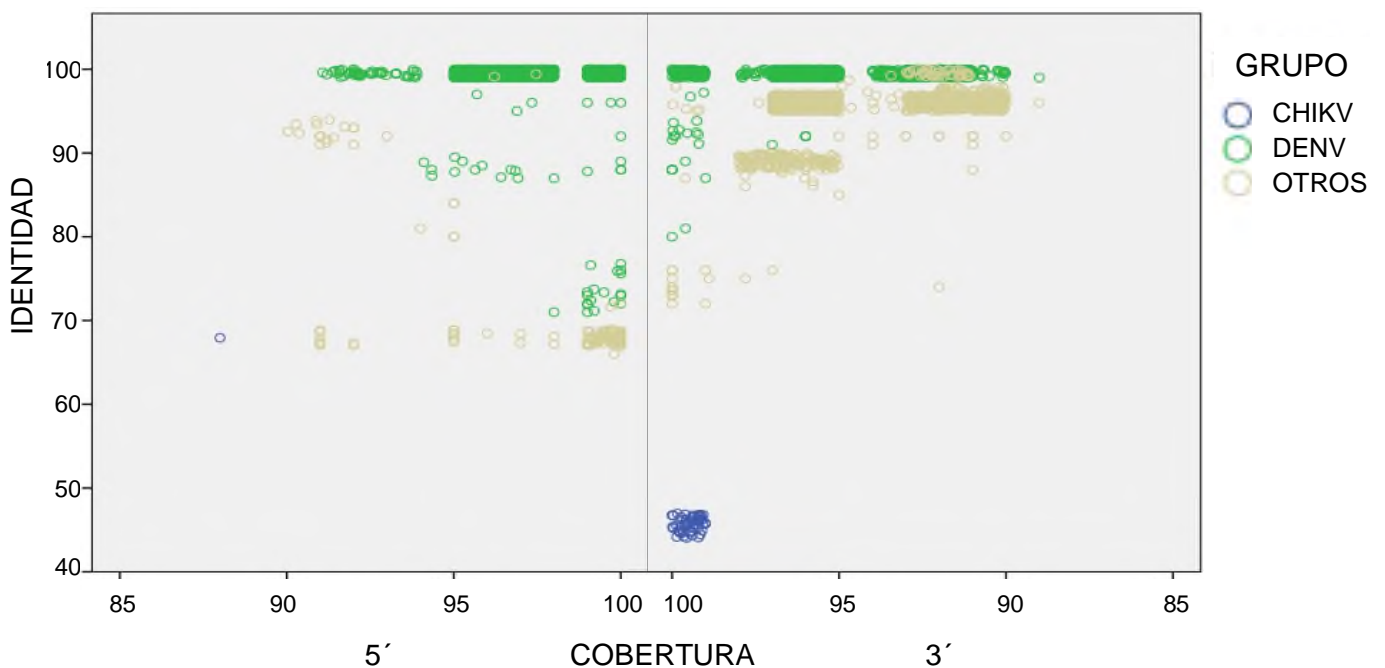


Figura 16 Dispersión de secuencias de los oligonucleótidos para para dengue.

El análisis de los oligonucleótidos de zika fue el que menos secuencia se obtuvieron del blast, se obtuvieron solo 5400 secuencias homologas entre los dos oligonucleótidos de las 40000 que se solicitaron en total (Figura 15), posiblemente debido a que actualmente se tienen pocas secuencias reportadas de zika en las bases

de datos gratuitas. En la Figura 17 se puede observar el análisis de las secuencias de zika, se obtuvo que todas las secuencias de zika presenta una identidad mayor del 95 %. En el oligonucleótido 3´ presento una identidad del 100 % con el virus de zika y no presenta un alineamiento significativo con otras secuencias, el oligonucleótido 5´ presenta homología alta con secuencias de dengue, pero como no está presente en el oligonucleótido 3´ no existe un amplificado exponencial.

El diseño de los oligonucleótidos de manera teórica es específico, no amplifica cualquier otra secuencia de manera exponencial que no sea la del virus específico. Lo que permite ser usados para el diseño de una técnica de diagnóstico diferencial.

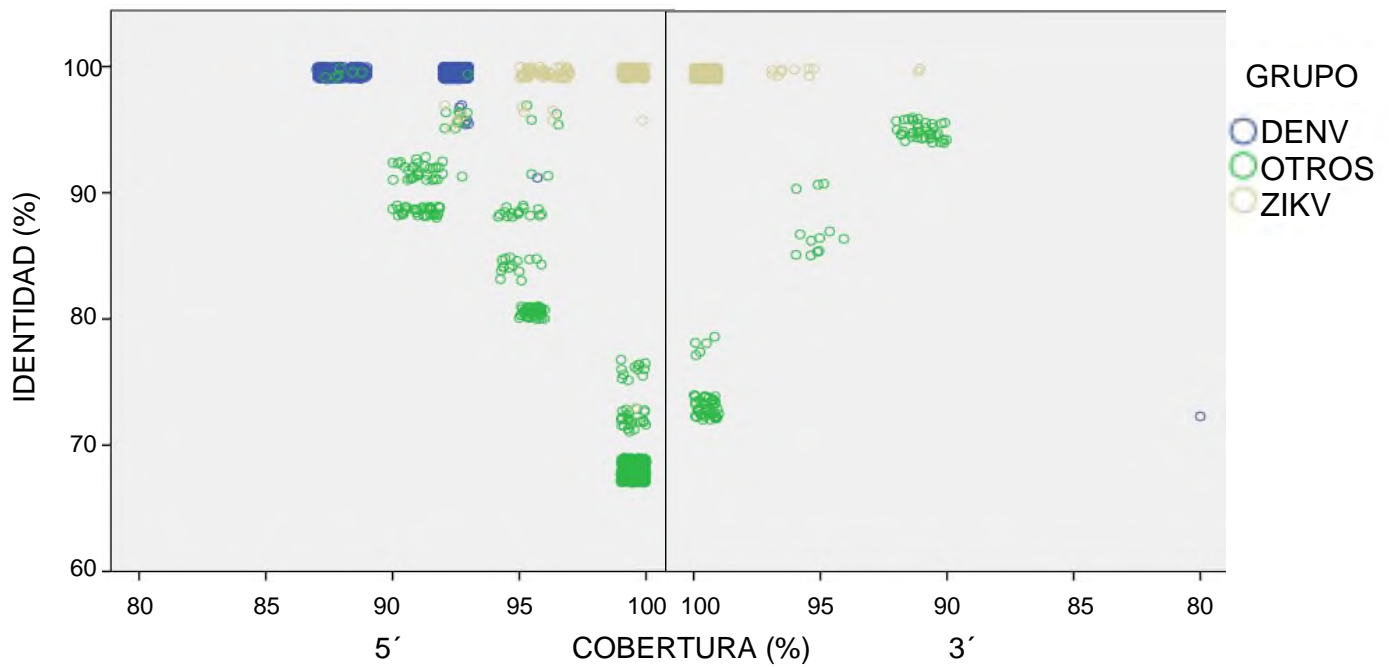


Figura 17 Dispersión de secuencias de los oligonucleótidos para zika.

11.4 SELECCIÓN DE MUESTRAS Y KIT DE PURIFICACIÓN

Por la limitación de reactivos se procedió a realizar una selección del mejor kit de purificación y muestras para poder realizar todas las pruebas de diagnóstico y poder establecer una técnica con un solo tipo de muestra y kit de extracción de ARN. Con el equipo presente en la universidad y la eficiencia de los kit de extracción de ARN no se pudo cuantificar de manera directa la concentración de ARN con el nanodrop 2000

porque era muy bajo. Por eso se procedió a realizar las mediciones en ciclos de amplificados de PCR para obtener una regresión lineal para determinar el mejor kit con la muestra.

Con los datos obtenidos del nanodrop (Anexo 11) se obtuvo que el mejor kit para extraer ARN es de la empresa Qiagen (Figura 18), sin importar que componente se use como muestra, este kit en comparación con la empresa Thermo Fisher tiene un mejor rendimiento en la amplificación de RT-PCR. Los tres componentes analizados, se obtuvo un mejor rendimiento con el kit de Qiagen cuando se usaba suero, en el kit de la empresa Thermo se obtuvo un mejor rendimiento con plasma, pero no fue muy diferente en sueros, en general en ambos kits se obtuvo el menor rendimiento con sangre completa, posiblemente esto se deba a dos cosas; que en la sangre completa exista presencia de sales, electrolitos y plaquetas que cambian la concentración de Mg^{2+} , en la reacción de PCR si el magnesio está limitado baja el rendimiento de la enzima y disminuye la concentración de ADN, la segunda es que la integridad del ARN en sangre es baja (Guillen-Solis, 2016). Para estandarizar la técnica se seleccionó el kit de Qiagen con suero, por presentar una pendiente más grande (Tabla 18), debidos a que la pendiente nos permite saber cual tiene mayor concentración de ARN viral.

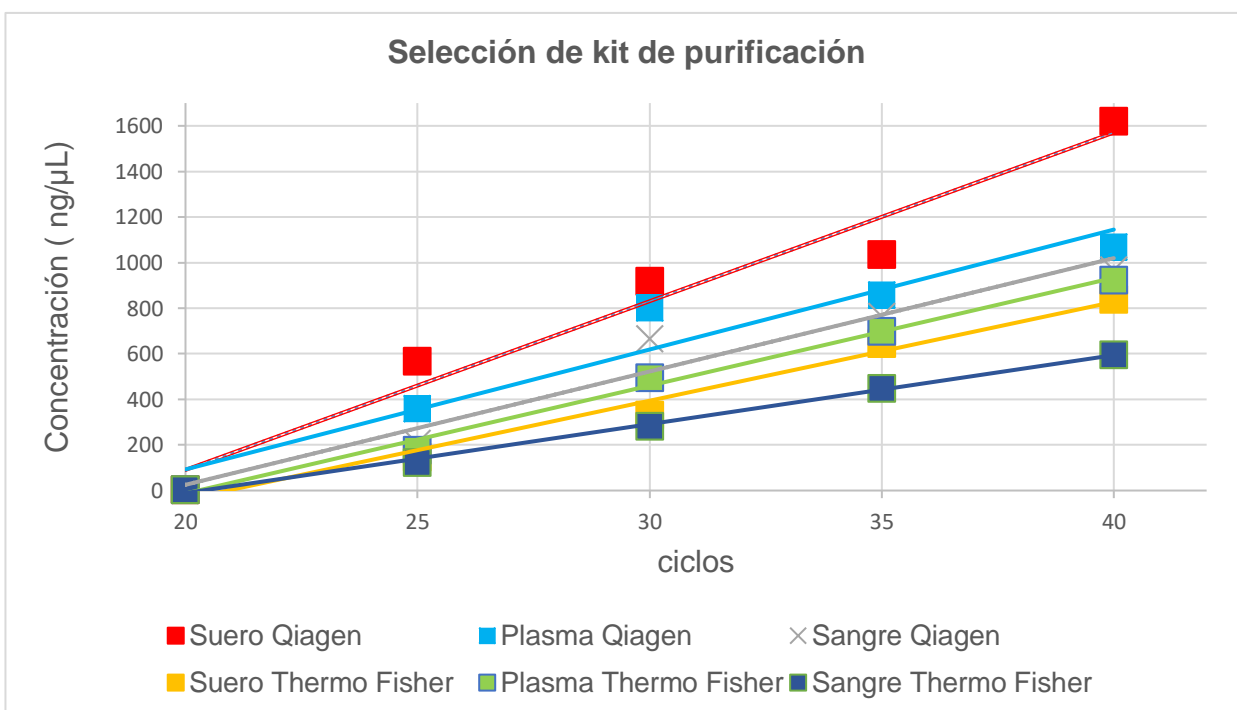


Figura 18 Grafica de concentraciones de cada ciclo de la qRT-PCR. Se utilizó el kit verso 1-step RT-PCR reddymix, utilizando el protocolo de la Tabla 7, la concentración se midió en cada 5 ciclos de la PCR a partir del ciclo 20 con el equipo Nanodroip 2000.

Con los datos obtenidos se calculó la ecuación de la regresión lineal de cada equipo y con su respectiva muestra. Todas las ecuaciones obtenidas presentaron una r^2 mayor a 0.9 (Tabla 17), lo que indicó una buena predicción del comportamiento de la reacción de PCR, lo que permite confirmar que la mejor combinación para la extracción y amplificación de ARN viral es el kit de purificación de Qiagen con suero.

Tabla 17 Ecuaciones de las regresiones lineales de la RT-PCR.

<i>KIT de Muestra purificación</i>	<i>Ecuación</i>	R^2
<i>Qiagen Suero</i>	$y=74X-389.4$	0.9606
<i>Qiagen Plasma</i>	$y=52.609X-959.53$	0.9348
<i>Qiagen Sangre</i>	$y=49.724X-969.4$	0.956
<i>Thermo Suero</i>	$y=47.311X-959.09$	0.9933
<i>Fisher Plasma</i>	$y=43.352X-906.5$	0.9832
<i>Thermo Sangre</i>	$y=30.247X-615.95$	0.9973
<i>Fisher</i>		

EXTRACCIÓN DE ARN

Extracción y purificación de ARN.

Para la extracción y purificación de ARN viral para el diagnóstico se usó el kit QIAamp® Viral RNA Mini cat. 52906 (QIAGEN), en total se realizaron 137 extracciones.

qRT-PCR

Amplificación de las Secuencias Control

Las 5 concentraciones diferentes amplificaron a diferentes ciclos, las reacciones que presentaban las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 de la solución de 10 picomol amplificaron entre los ciclos 9 y 10 (Figura 19), las diluciones 1:10000 y 1:100000 amplificaron entre los ciclos 18-20. Se seleccionó los controles de la dilución 1:10000 como controles para zika y Chikungunya por que la detección de amplificados se

encuentra entre los ciclos 15-25. Con las diluciones seleccionadas de los controles y con 5 μL de la muestra de dengue que se utilizaron como control positivo se realizaron dos qRT-PCR para cada control y para ver si se pueden diferenciar con Melting Curve cada uno de los virus.

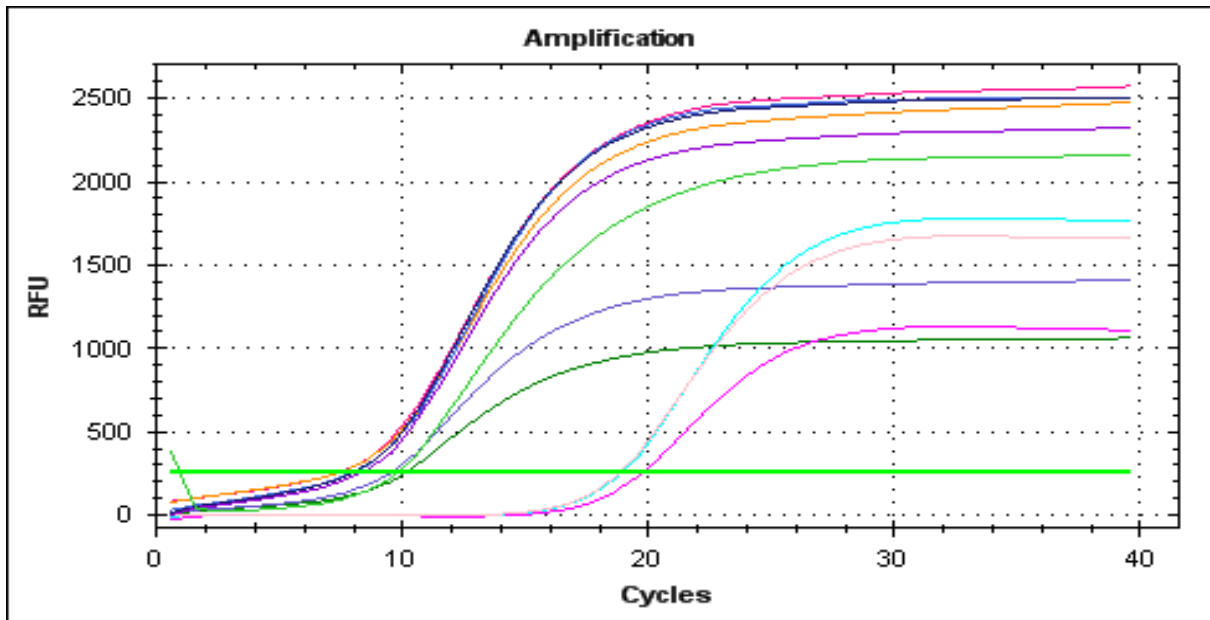


Figura 19 Amplificados de los controles sintéticos de zika y chikungunya, los amplificados en los 10 primeros ciclos perteneces a las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, los amplificados que esta después del ciclo 18 son las diluciones 1:10000 y 1:100000.

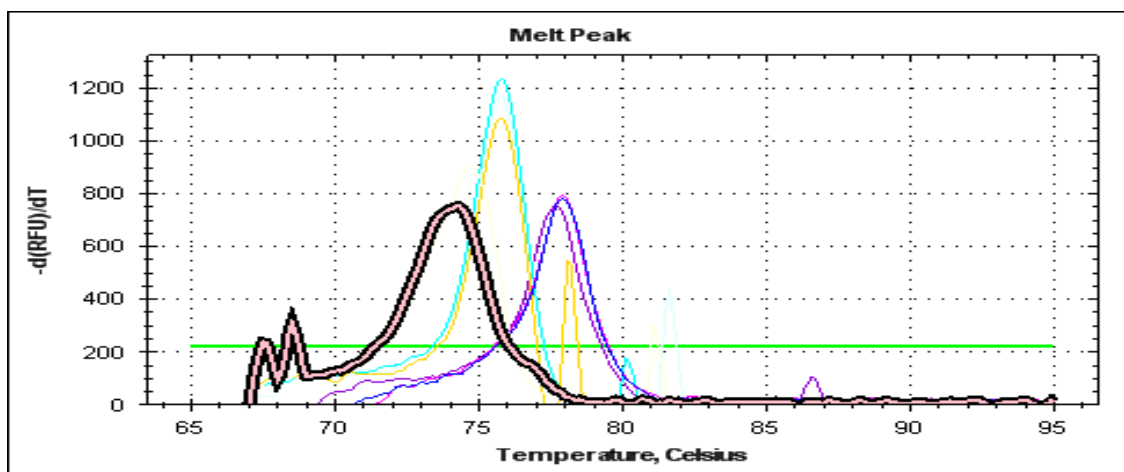


Figura 20 Amplificados de las secuencias control de los tres virus, el primer pico pertenece a las secuencias de zika, el segundo de chikungunya y el ultimo de dengue.

La Melting Curve obtenida de los controles se usaron para ser comparados con las muestras y poder agruparlo para realizar el diagnóstico diferencial. Cada vez que se corría una muestra siempre se usaron los tres controles por duplicados. De las 100 muestras que se procesaron por triplicado se obtuvo en total 93 muestras positivas y 7 negativas, distribuidas como se presenta en la Tabla 18, todas estas muestras se procesaron en el IQ5, de las muestras positivas se seleccionaron un total de 80 muestras positivas al azar para repetir la técnica en el PIKO24 y poder medir los parámetros de la estandarización. Los resultados negativos posiblemente se deben a tres factores; el paciente no presentó un cuadro febril estos virus, chikungunya y zika, la concentración que se tenía del ARN viral es muy baja y no permitió su detección o presenta una enfermedad que es producida por otro virus.

Tabla 18 Resultados obtenidos de las muestras procesadas.

<i>Virus</i>	<i>Muestras</i>
<i>Zika</i>	51
<i>Dengue</i>	5
<i>Chikungunya</i>	37
<i>No amplificaron</i>	7
<i>Total</i>	100

11.5 ESTANDARIZACIÓN

La especificidad:

Parámetro muy importante para el diseño de una técnica, porque nos permite saber si la técnica tiene falsos negativos, la importancia radica que si un paciente se le diagnostica de manera errónea puede causar gran problema de salud, por ejemplo, se le diagnostica a una persona como negativo para dengue se le manda a su casa y en la noche presenta un cuadro hemorrágico, se pone en riesgo la vida del paciente por el tiempo que requiere volver a su centro de salud, de ahí la importancia de la especificidad de la técnica. Para determinar la ETV se usaron un total de 20 muestras que fueron proporcionados por el doctor Ramos que presentaban un total de 15 muestras de dengue, 4 de chikungunya y 1 de zika, debido a que eran muestras biológicas que no se obtuvieron por el hospital general o firmaron consentimiento

informados no se nos proporcionaron que muestras eran positiva para cada virus, las muestras fueron procesada por el inDre.

Todas las muestras dieron positivos, la figura 21 muestra la Melting Curve de las 20 secuencias amplificadas, se obtuvieron 14 amplificados entre 77-78 que pertenece al virus de dengue, 5 amplificados entre 74-76 es la región que amplifica el virus de chikungunya y solo un amplificado de zika, estos datos indicaron que la técnica tiene una especificidad igual que la técnica que usa el inDre para su detección de enfermedades virales. Una vez obtenidos estos datos se calculó la especificidad de la técnica con la ecuación para la especificidad presente en la Figura 22, la especificidad de la técnica tuvo un 100 % en comparación con las técnicas usadas en México debido a que no presentó ninguna muestra como negativa.

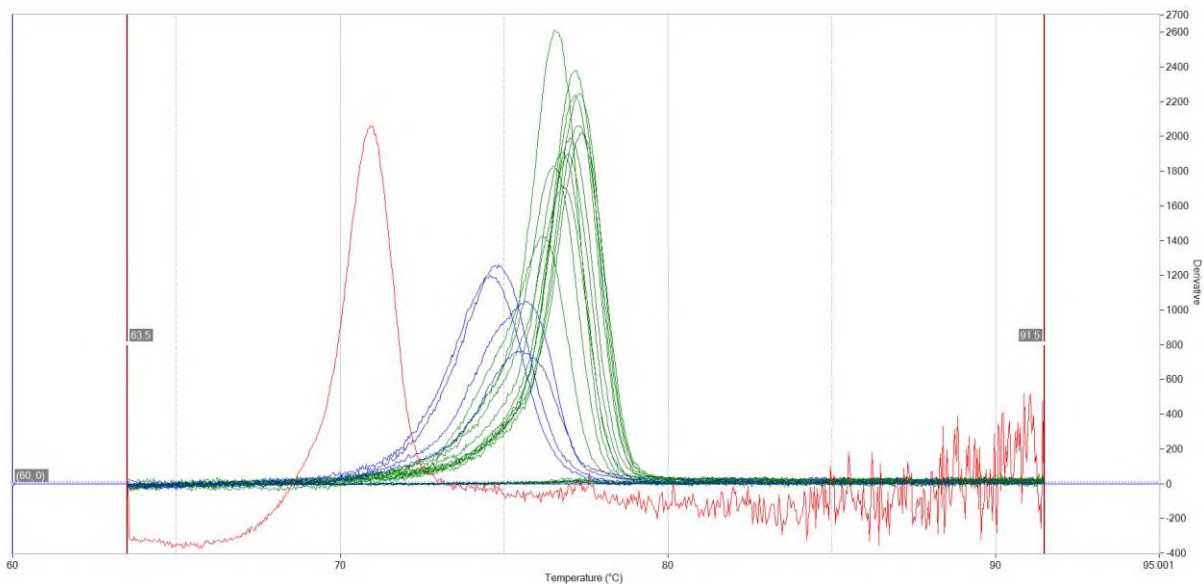


Figura 21 Melting Curve de las muestras usadas para determinar la sensibilidad. En base a la diferencia de temperatura que se presentó en las muestras se dividieron en tres grupos, grupo rojo amplifica por 72°C, grupo azul entre 74-76 y grupo verde entre 77-78.

Sensibilidad:

La sensibilidad es la posibilidad de dar un diagnostico falso positivo, para poder confirmar que la técnica es sensible se tiene que evaluar con muestras que estén

infectadas con otros tipos de virus o sin la presencia de virus, en este estudio a estas muestras se le denominó controles negativos, se procesaron en total 10 controles negativos (2 de Hepatitis A, 2 Hepatitis C, 2 VIH, 2 de gripe viral y 2 personas sanas). Esta prueba se realizó en dos equipos de PCR; piko24 e IQ5 (Figura 22). Ninguna de las muestras presentó una amplificación en ningún termociclador, permitiendo llegar a 3 conclusiones, el diseño de oligonucleótidos es específico y no reacciona con otros virus que puede causar enfermedades en humanos, no amplifica con secuencias de ARN presente en personas no enfermas y que los oligonucleótidos no forman dímeros o reaccionan entre ellos porque se presentaría un amplificado en ausencia de su templado. Lo que disminuye el riesgo de tener un resultado falso positivo, con los datos obtenidos tenemos una sensibilidad del 100 % de la técnica.

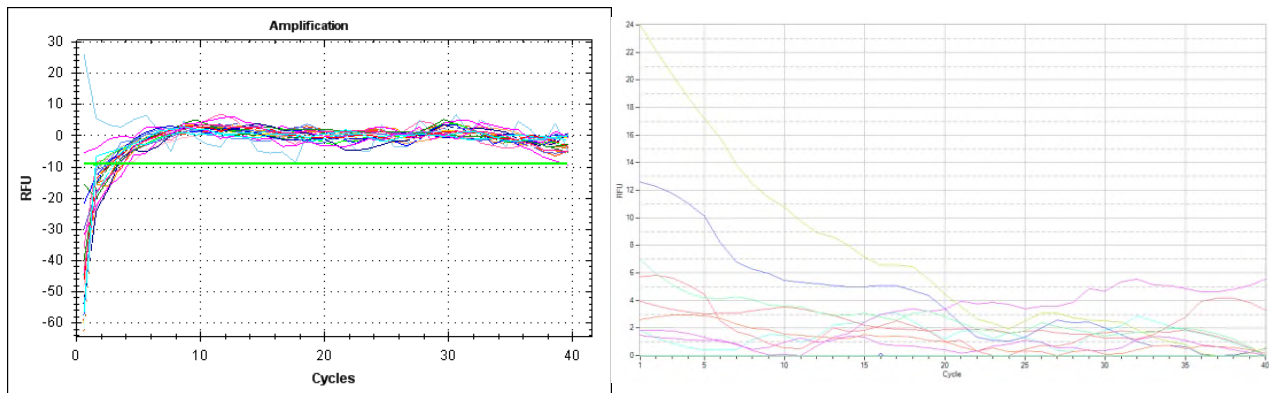


Figura 22 Reacción de qRT-PCR con los controles negativos (2 de Hepatitis A, 2 Hepatitis C, 2 VIH, 2 de gripe viral y 2 personas sanas). en la figura de la izquierda se presenta los controles en el equipo IQ5 y la gráfica de la derecha los mismos controles, pero en el equipo PIKO24.

Concentración mínima:

Los falsos negativos también puede producirse por una baja concentración de muestras, por dicho motivo se requiere conocer la concentración mínima requerida para tener siempre un resultados positivo. La concentración 7 ng/μL amplificó en todas las reacciones de la qRT-PCR (Figura 23), las muestras que presentaron una concentración de 5.3 pg/μL solo amplificaron 4, igualmente las muestras que presentaba una concentración de 3 pg/μL solo amplificaron 4, para las muestras que tenía concentraciones menores de 2.3 solo una amplificó, lo que permite determinar

que la concentración mínima para tener la certeza que no se obtuvo un falso negativo es tener una concentración final de reacción de 7 pg/ μ L, esta concentración se puede obtener cuando se usa 5 μ L de la extracción de ARN.

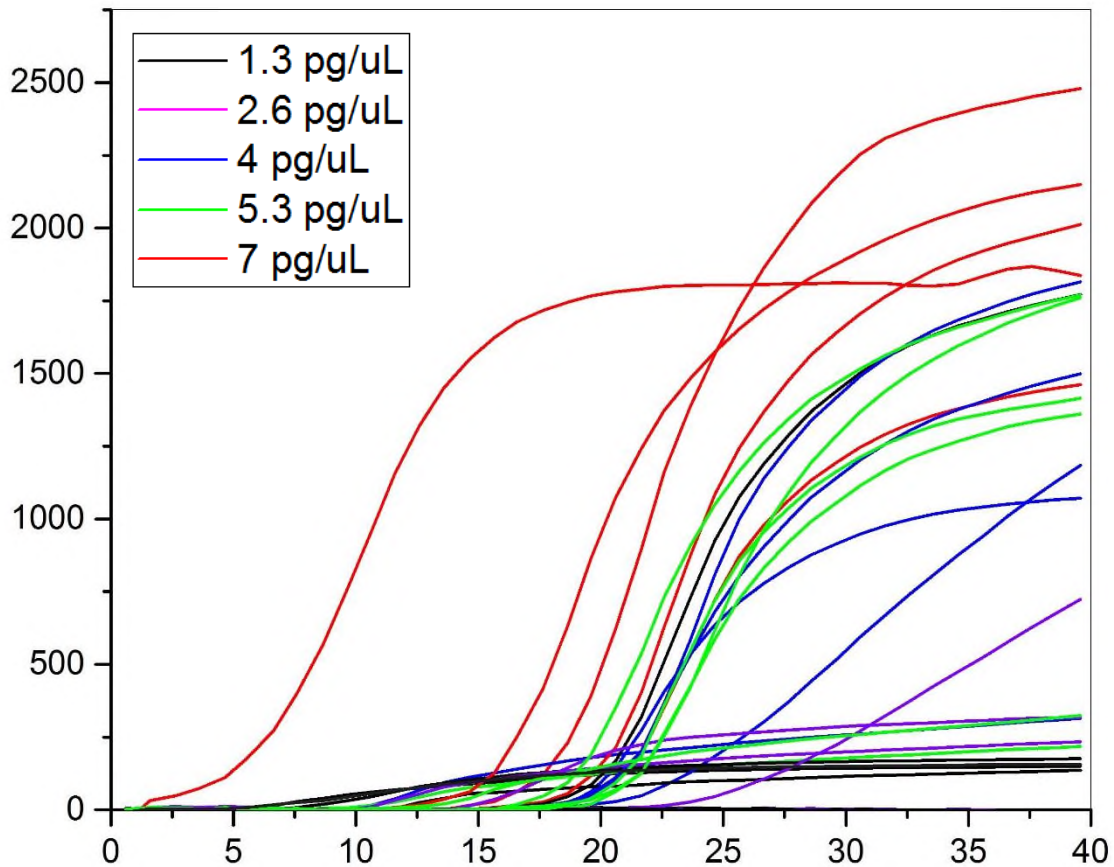


Figura 23 Amplificaciones a diferentes concentraciones de muestras.

La reproducibilidad y repetitividad:

En la Tabla 19 se representan los datos de Ct obtenidos del ensayo de reproducibilidad y repetitividad. Se procesaron en total 12 reacciones por día, cada 24 de estas reacciones fueron realizadas por una persona diferente y cada uno realizó 12 reacciones en cada equipo como se muestra en la Tabla 20, en el anexo 10 se muestran todas las amplificaciones obtenidas para la tesis. Con los datos obtenidos se realizó una prueba de hipótesis para verificar que las variables técnico, tiempo y equipo no tiene un efecto significativo en el diagnóstico, permitiendo ser realizados por cualquier persona sin importar que día se realice y con cuál de los dos equipos se use.

Tabla 19 Ct obtenidos en los equipos IQ5 y PIKO24 por dos usuarios.

<i>IQ5</i>			<i>PIKO24</i>		
<i>DÍA</i>	PERSONA	Ct	<i>DÍA</i>	PERSONA	Ct
<i>DÍA 1</i>	Erick de Jesús	2.46	<i>DÍA 3</i>	Luis Uribe	2.4
	Erick de Jesús	2.33		Luis Uribe	2.7
	Erick de Jesús	2.69		Luis Uribe	6.8
	Erick de Jesús	6.76		Luis Uribe	4.2
	Erick de Jesús	4.14		Luis Uribe	6.5
	Erick de Jesús	4.35		Luis Uribe	10.7
	Erick de Jesús	11.5		Luis Uribe	7.1
	Erick de Jesús	8.07		Luis Uribe	9.01
	Erick de Jesús	8.45		Luis Uribe	11.3
	Erick de Jesús	10.6		Luis Uribe	11.24
	Erick de Jesús	11		Luis Uribe	2.55
<i>DÍA 2</i>	Erick de Jesús	8.51	Luis Uribe	2.43	
	Luis Uribe	2.9	<i>DÍA 4</i>	Erick de Jesús	2.47
	Luis Uribe	1.9		Erick de Jesús	2.1
	Luis Uribe	3.1		Erick de Jesús	2.7
	Luis Uribe	7.3		Erick de Jesús	7.7
	Luis Uribe	4.1		Erick de Jesús	5.13
	Luis Uribe	4.4		Erick de Jesús	4.23
	Luis Uribe	12.1		Erick de Jesús	11.22
	Luis Uribe	8.9		Erick de Jesús	7.98
	Luis Uribe	8.4		Erick de Jesús	8.42
	Luis Uribe	11.2		Erick de Jesús	10.9
	Luis Uribe	12		Erick de Jesús	11.2
	Luis Uribe	2.5		Erick de Jesús	8.3

Los datos se llevaron al programa SPSS STATISTICS 24 para hacer una prueba de hipótesis con una confiabilidad del 95 % con análisis ANOVA de tres factores; equipo, persona y día de la prueba, se realizó el análisis estadístico para confirmar la hipótesis nula, se partió con la hipótesis nula que no existe diferencia en la amplificación de la reacción sin importar la personas, el día que se realizó la técnica y el equipo utilizado, para poder determinar si el diagnostico no está ligado a un equipo y que se pueda reproducir y realizar en cualquier termociclador para qPCR.

Tabla 20 Distribución de datos que se metieron en el programa SPSS 24.

Factores inter-sujetos			
		Etiqueta de valor	N
Día	1	Día 1	12
	2	Día 2	12
	3	Día 3	12
	4	Día 4	12
Persona	1	Erick de Jesús	24
	2	Luis Uribe	24
Equipo	1	IQ5	24
	2	PIKO24	24

Se realizó un análisis ANOVA de tres factores, usando como factor dependiente Ct y como factores independiente los días, personas y equipos, el resultado del análisis se presenta en la Tabla 21.

Tabla 21 Análisis Anova con tres factores para comprobar la repetibilidad y reproductividad.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Ct

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad
Modelo corregido	1.404 ^a	3	0.468	0.037	0.991	0.002	0.110
Intersección	2119.223	1	2119.223	165.339	0.000	0.790	165.339
Error	563.968	44	12.817				
Total	2684.595	48					

a. R al cuadrado = .002 (R al cuadrado ajustada = -.066)

Como se obtuvo una significancia de 0.991 y es mayor que alpha de 0.05 se acepta hipótesis nula, sin importar que equipo, persona o día se realice la técnica siempre será amplificada la secuencia. Como conclusión, la técnica es reproducible sin importar

que persona la realice y que los valores obtenidos son repetibles sin importar el día que se realice la técnica y en cualquier de los dos equipos evaluados.

La Factibilidad:

Se obtuvieron en total 30 datos de Melting, la Tm más baja que se obtuvo fue de 71.2 y la más alta 79.5, se obtuvo un rango de 9 grados de diferencia entre el valor más alto y el más bajo. Los datos que se presenta en la Tabla 22 se sometieron a un análisis de estadística descriptivas y análisis anova con rango múltiple de Duncan con una confiabilidad del 95 %.

Tabla 22 Datos de Melting curve obtenidos para evaluar la factibilidad.

IQ5		PIKO24	
VIRUS	MELTING	VIRUS	MELTING
ZIKA	74.7	ZIKA	71.9
ZIKA	75.1	ZIKA	71
ZIKA	75.3	ZIKA	71.2
ZIKA	75.8	ZIKA	7.3
ZIKA	76	ZIKA	71.4
CHIKUNGUNYA	76.5	CHIKUNGUNYA	74.79
CHIKUNGUNYA	76.6	CHIKUNGUNYA	75.32
CHIKUNGUNYA	76.7	CHIKUNGUNYA	75.32
CHIKUNGUNYA	76.9	CHIKUNGUNYA	75.47
CHIKUNGUNYA	77.1	CHIKUNGUNYA	75
DENGUE	79	DENGUE	76
DENGUE	79.3	DENGUE	76.2
DENGUE	79.3	DENGUE	76.4
DENGUE	79.4	DENGUE	76.3
DENGUE	79.5	DENGUE	76.5

Para cada equipo se obtuvo un promedio diferente para cada virus, el promedio más bajo se obtuvo para la secuencia de zika sin importar el equipo y la más alta siempre es el amplificados de dengue, entre los datos obtenidos la desviación estándar entre cada virus no supera una unidad.

Tabla 23 Estadística descriptiva de los datos obtenidos para el análisis de factibilidad por con el programa SPSS24.

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: MELTING

VIRUS	EQUIPO	Media	Desviación estándar	N
ZIKA	IQ5	75.3800	.52631	5
	PIKO24	71.1600	.20736	5
	Total	73.2700	2.25588	10
CHIKUNGUNYA	IQ5	76.7600	.24083	5
	PIKO24	75.1800	.27740	5
	Total	75.9700	.86800	10
DENGUE	IQ5	79.3000	.18708	5
	PIKO24	76.2800	.19235	5
	Total	77.7900	1.60170	10
Total	IQ5	77.1467	1.71167	15
	PIKO24	74.2067	2.28769	15
	Total	75.6767	2.48522	30

Con los datos obtenidos en la Tabla 23 se evaluaron 3 hipótesis nulas que se muestran en la Tabla 24, la primera hipótesis nula que se evaluó con estos datos fue que la Melting Curve obtenidas por los tres tipos de virus y por los dos equipos es la misma, en esta hipótesis se obtuvo una significancia de 0.000, por lo cual se rechaza hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que la Melting Curve obtenidas por cada uno de los virus es diferente en cada equipo.

La segunda hipótesis nula que se evaluó fue que Melting Curve de cada tipo de virus es la misma sin importar el equipo, se obtuvo una significancia de 0.000, se rechaza hipótesis nula y se aceptar hipótesis alternativa, cada virus tiene su propia Melting Curve y no depende del equipo. La tercera hipótesis es que la Melting obtenida en cada equipo es la mismas, el resultado igual que la hipótesis anterior es una significancia de 0.000 por lo que se rechaza hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa donde el resultado de Melting Curve depende del equipo usado.

Tabla 24 Análisis ANOVA de dos factores en el programa SPSS 24.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: MELTING

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	177.006 ^a	5	35.401	403.087	.000
Intersección	171808.736	1	171808.736	1956262.298	.000
VIRUS	103.443	2	51.721	588.914	.000
EQUIPO	64.827	1	64.827	738.138	.000
Error	2.108	24	.088		
Total	171987.850	30			
Total corregido	179.113	29			

a. R al cuadrado = .988 (R al cuadrado ajustada = .986)

Con las tres hipótesis aceptadas en este punto se llegó a la conclusión que se puede diferenciar el tipo de virus en cada equipo, que la Melting-Curve depende del equipo usado debido a que siempre se debe de tener los tres controles positivos de los virus en cada equipo para obtener un resultado confiable.

Con los datos obtenidos de análisis de ANOVA se realizaron tres gráficas de media marginales estimadas de MELTING para observar la diferencia que existe entre cada equipo y virus (Figura 24,25 y 26), la Figura 24 se observa que entre cada equipo se puede diferenciar una temperatura diferente para cada virus y la diferencia mínima entre ellas es de 0.7 °C, lo que permite ser utilizados para un diagnóstico diferencial para cada equipo. En la Figura 25 la media marginal que se obtiene es cada virus, los tres virus tienen el mismo comportamiento que en el equipo PIKO24 su Tm es más alta que el de equipo IQ5, pero los dos equipos se pueden utilizar para realizar el diagnóstico. La Figura 26 se agruparon los virus sin importar el equipo para poder ver la diferencia promedio que presenta cada virus, lo que permite visualizar que es posible realizar un diagnóstico con el protocolo establecido en esta tesis.

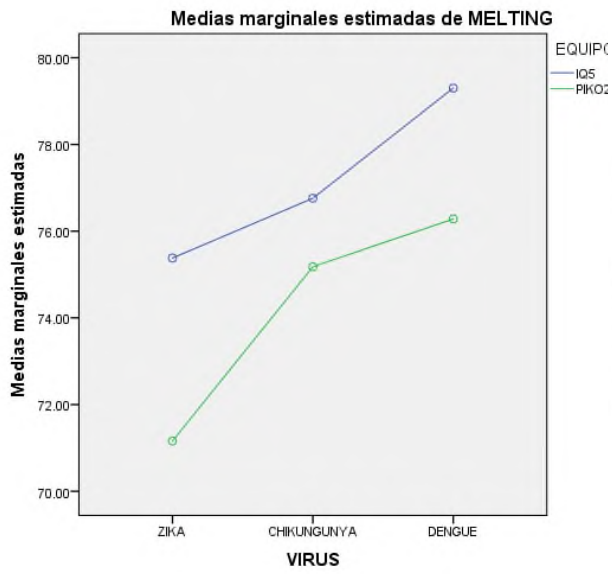


Figura 24 medias marginales estimadas de Melting para cada virus.

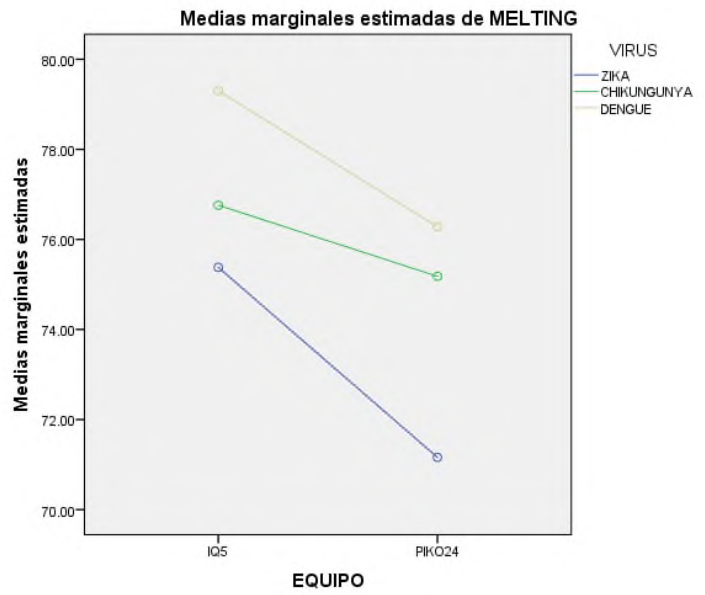


Figura 25 Medias marginales para cada virus.

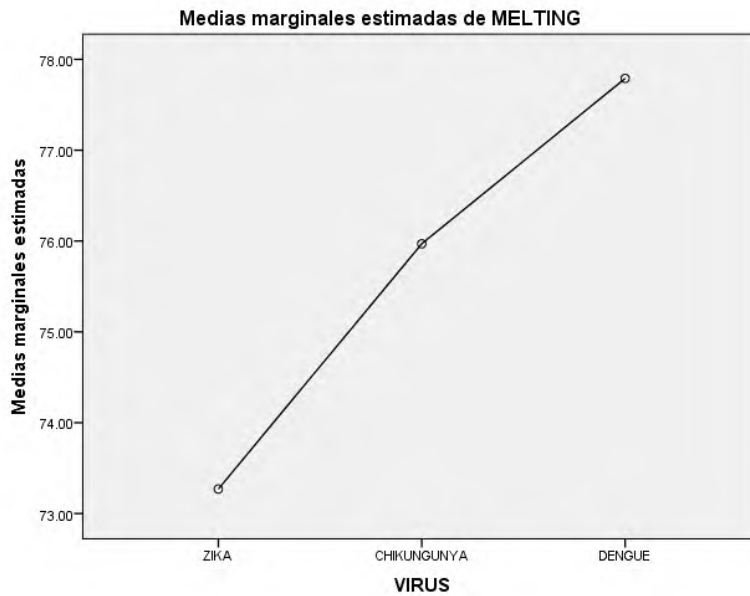


Figura 26 Media marginal estimada de los virus.

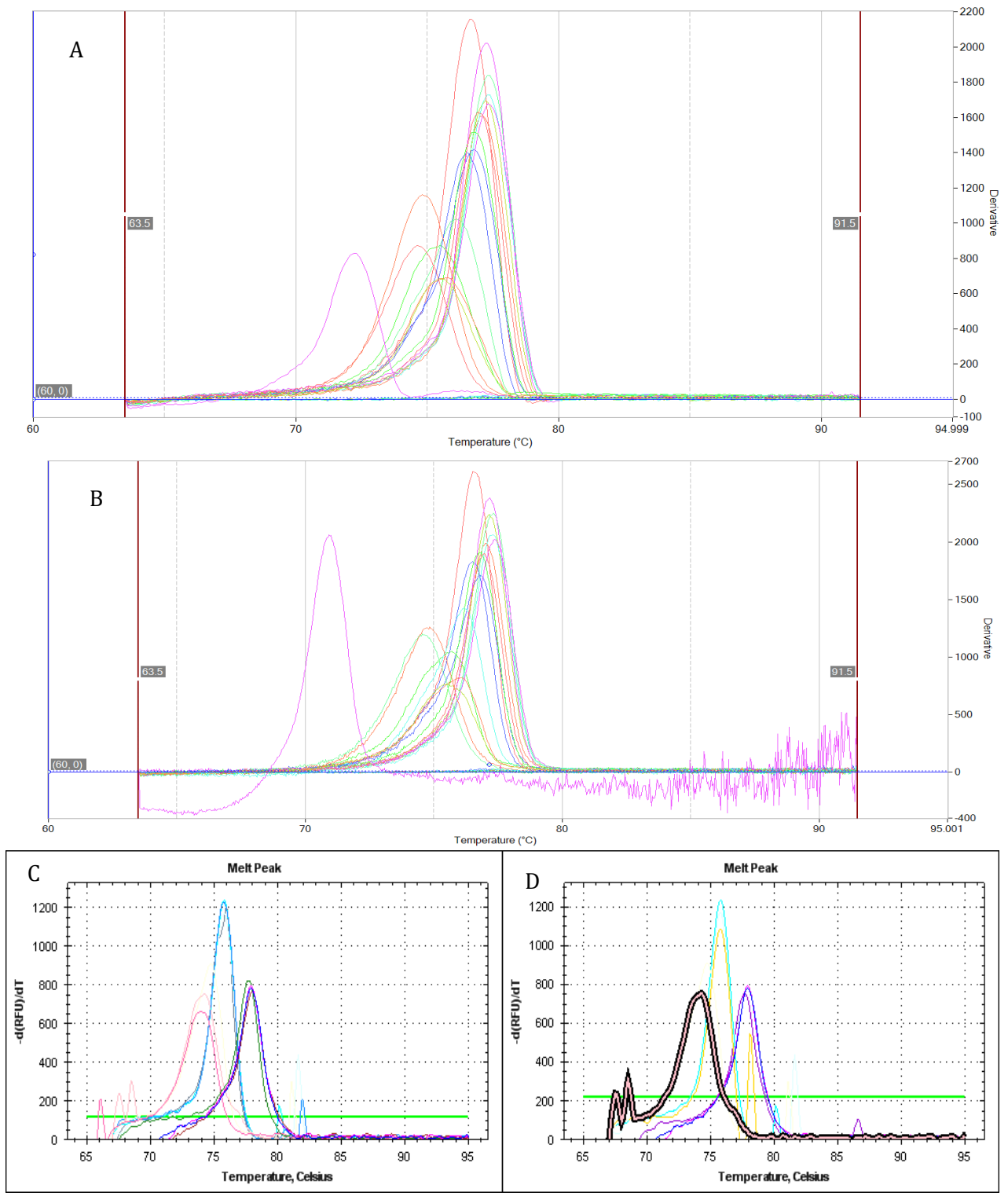


Figura 27 Amplificados de las muestras en los dos equipos. La figura a y b son por el equipo PIKO24, la Melting que se encuentra entre la temperatura 70-72 son del virus de Zika, los amplificados que se encuentra entre las temperaturas 73-76 son amplificaciones del virus de Chikungunya y las Melting entre 77-79 son del virus de Chikungunya. las figuras c y d son obtenidos por el equipo IQ5, las Melting curve que se presenta entre las temperaturas 73-75 son para el virus de Zika, temperatura entre 75-76 son del virus de Chikungunya y las temperaturas entre 77-78 son amplificaciones del virus de Dengue.

12. DISCUSIÓN

La variedad de diagnósticos para virus que se usan hoy en día, tienen diversos principios en su determinación, todos los diagnósticos son aceptados pero cada uno se fundamenta de diferente manera de acuerdo a su utilización, los diagnósticos indirectos son principalmente para obtener datos de la historia natural de la enfermedad y datos epidemiológicos que implementan medidas para controlar y disminuir la incidencia de la enfermedad. Los diagnósticos directos tienen como principio diferenciar pacientes que requieren atención y seguimiento, con respecto a los que solo requieren reposo e hidratación.

Con los datos obtenidos en este trabajo, podemos utilizar la qRT-PCR, como una técnica que diferencia los tres virus, además, ninguno de los controles positivos utilizados, se solapa con alguno control de los otros virus, consiguiendo una diferencia de 1°C como mínimo entre cada uno.

La T_m promedio obtenida para las secuencias de dengue, es la misma que reportan Naze, Yang y Kim en el 2009, 2010 y 2015 respectivamente con el equipo PIKO24, en sus técnicas para diferenciar virus, debido a que las secuencias utilizadas en ambos estudios es D1 y D2, las mismas zonas utilizadas para el diseño de oligonucleótidos, la única diferencia fue que durante su diseño se obtuvo un amplificado de 502 bases contra las 510 bases que implica los oligonucleótidos utilizados para la detección de Dengue (Naze *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2015).

Posiblemente, la diferencia de T_m presentado entre los dos equipos utilizados, depende de la sensibilidad de cada equipo, el IQ5 es un equipo que tiene más de 15 años en el mercado, y aún sigue funcional en los centros de diagnóstico e investigación por su duración y bajo costo, debido a que utiliza una lámpara de deuterio como fuente de luz, mientras que los equipos más recientes como el PIKO24, son más costosos porque cuenta con un sistema de detección más sensible y estos equipos cada pocillo de reacción cuenta con su propia fuente de luz mediante un foco de LED, lo que permite medir diferentes tipos de fluoróforos por pocillo (BIO-RAD, 2012; THERMO, 2012).

Los datos obtenidos de la C_t en el apartado reproducibilidad y repetitividad, fue muy alta, se encontraba entre 2.4-2.7, esto indica que la concentración de las muestras de

ARN de los virus fue alta, este dato se puede deber a tres razones, la primera es que la concentración de ARN en una muestra depende de la resistencia del paciente al virus, el día cuando se recolecto la muestra influye mucho en la concentración de ARN viral, mientras más tiempo pase desde que se inició el cuadro clínico la cantidad de material viral es inversamente proporcional, se tienen reportados que puede llegar en su pico máximo a un millar de copias en el primer día que se presenta el cuadro febril (Montero, 2015) y la última razón posible para que la Ct fuera menor a 3 en algunos casos es que durante la extracción de ARN con el kit se obtuvo una mejor eficiencia posiblemente porque se cargó más muestras o reactivo lo que cambio la concentración final de ARN. Pero el objetivo del trabajo es diseñar una técnica diferenciar rápida, precisa y rigurosa, que solo requiera una concentración mínima para obtener un resultado positivo, por dicho motivo no importa si se tiene una Ct alta sino que pueda diferenciar la técnica.

Con la técnica no se evaluó si se puede detectar coinfección, sin embargo, durante los años del 2014 al 2016, con los registros de todos los casos presentados en 54 países, solo se registraron 13 coinfección (Furuya-Kanamori *et al.*, 2016). Realizando un análisis de probabilidad, la posibilidad de tener una coinfección es menor de 0.01 %.

En este estudio se diseñó una técnica para la identificación de los virus de Chikungunya, Dengue y Zika mediante el análisis Melting-Curve usando como agente intercalante SYBR Green, siendo este un método que no ha sido utilizado para identificación y diferenciación de estos tres virus, utilizando muestras positivas y controles sintéticos de cada virus para una correcta identificación, en el continente existe 6 técnicas que permiten su detección mediante qRT-PCR (BIONEER, 2016; CDS, 2016), pero usan sondas lo que aumenta el costo, se estima que para esta técnica se tiene un costo de 250 pesos mexicanos, mientras que con el uso de las SYBR Green, el costo se reduce un poco más del 40 %, volviendo más rentable la técnica usando este fluoróforo que sondas taqman.

13. CONCLUSIONES

Se logró detectar e identificar los virus de chikungunya, dengue y zika en muestras de suero de paciente que presentaban la enfermedad en la etapa aguda utilizando la técnica qRT-PCR multiplex y posteriormente realizando el análisis Melting Curve con fluoróforo SYBR Green, demostrando ser eficiente para la correcta identificación de las secuencias de estos tres virus, se determinó que la técnica diseñada puede ser utilizada como mínimo en dos equipos de termociclador (IQ5 y PIKO24), se realizó la estandarización de la técnica y se demostró que cumple con parámetros necesarios para ser utilizados como un kit comercial para el diagnóstico molecular de enfermedades virales.

La técnica puede ser reproducible como mínimo en dos equipos de qPCR con una confiabilidad del 95 %.

Se determinó que la técnica no da falsos positivos con muestras de paciente con VIH, Hepatitis A y C, Gripe viral y personas que no presentan ningún cuadro clínico de manera aparentemente.

También se demostró que se puede obtener ARN viral de sangre con anticoagulante, suero y plasma dentro de los primeros 5 días del inicio de fase aguda de la enfermedad usando dos kits comerciales.

Se requiere una concentración mínima de 7 ng/ μ L para poder realizar la reacción de la técnica, si se usa concentraciones menores obtenerse un falso negativo.

La sensibilidad y especificidad de la técnica permite ser usado como técnica de diagnóstico directo, precisa y eficiente.

Se midieron los parámetros establecidos por las normas mexicanas para una técnica alternativa de diagnóstico que son aprobadas para ser usados como una técnica de diagnóstico alternativo y con los resultados obtenidos se puede aceptar como una técnica para realizar el diagnóstico diferencial.

14. PERSPECTIVAS

Diseñar nuevos oligonucleótidos para poder detectar e identificar los serotipos de Dengue para tener una técnica más compleja, que no solo permita detectar los virus sino los serotipos.

También determinar si a la técnica se le puede adicionar el diagnóstico del virus Mayora, que a partir del 23 de septiembre de 2016 fue reportado en Hatí por la ONU, tiene técnicamente el mismo cuadro clínico que las tres enfermedades en cuestión, por dicho motivo si se desea continuar con el trabajo seria adicionar la detección del virus Marayo.

El diseño de los oligonucleótidos fue para diagnosticar los virus que se presenta en el continente americano, determinar si la técnica se puede utilizar para el diagnóstico de los virus fuera del continente.

Realizar el proceso de validación de la técnica antes las autoridades correspondientes para poder obtener el certificado como técnica de diagnóstico molecular y ser evaluados por el COFEPRIS para su distribución.

Para validar la técnica ante COFEPRIS se requiere cambiar el fluoróforo debido a que el Sybr Green es inespecífico y recomienda usar EVA Green para diseñar la técnica más precisa y que los resultados no tenga una variación significativa.

Verificar que si los controles y parámetros establecidos por la ONU cumplen con los parámetros de las normas Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012 Para la vigilancia epidemiológica y la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para la protección ambiental-salud ambiental-residuos-peligrosos biológicos-Infeciosos y especificaciones de manejo para poder ser utilizadas en México como técnica de diagnóstico.

El análisis por una qRT-PCR de un solo paso es más cara que la de dos pasos, seria en un futuro verificar si se puede usar una enzima de dos pasos para reducir el costo del análisis.

15. REFERENCIAS

- Abdelnabi, R., Neyts, J., y Delang, L. (2015). Towards antivirals against Chikungunya virus. *Antiviral Research*, 121(7), 59–68.
- Rubio García A., Rodriguez Prieto V., y Kukielka Zunzunegu D. (2014). Aplicación de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de PRRS. *RCCV*, 1(2), 646–653.
- Avila, J. T., De Vera, A. M., Hernandez, C. y Vasallo, P. M. (1995). Analisis Del Dna. Clonar, Secuenciar y PCR. *Nefrologia*, 15(2), 31–43.
- Ayers, M., Adachi, D., Johnson, G., Andonova, M., Drebot, M., y Tellier, R. (2006). A single tube RT-PCR assay for the detection of mosquito-borne flaviviruses. *J Virol Methods*, 135(2), 23
- AccuPower. (2016). AccuPower® ZIKV (DENV, CHIKV) Multiplex Real-Time RT-PCR, Kit para el diagnostico de ZIKV, DENV y CHIKV. Mayo, 20, 2016, de Bioneer Sitio web: <http://eng.bioneer.com/diagnostic/HumanMDxkits/Accupower-ZIKV-Multiplex-technical.aspx> 5–239.
- Badii, M. H., Abreu, J. L., y Landeros, E. C. (2007). Ecología e historia del dengue en las Américas. *International Journal*, 2(2), 248–333.
- BIO-RAD. (2012). *Real-Time PCR Applications Guide*. (1st ed.). *Multiplexing Consideration*, EEUU:Bio-Rad Laboratories.
- Bolivar, A. M., Rojas, A., y Garcia-lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Inmunología Clínica*, 3(1), 25–33.
- Bustin, Stephen, A., y Reinhold, M. (2000). Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169–193.
- Bustin, Stephen, A., y Reinhold, M (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109(4), 365–379.
- Caglioti, C., Lalle, E., Castilletti, C., Carletti, F., Capobianchi, M. R., y Bordi, L. (2013). Chikungunya virus infection: an overview. *The New Microbiologica*, 36(3), 211–27.
- Casal, P. E., Chouhy, D., Bolatti, E. M., Perez, G. R., Stella, E. J., y Giri, A. A. (2015). Evidence for homologous recombination in Chikungunya Virus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 85(February), 68–75.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2015). *Countries and territories where Chikungunya cases have been as of October 20 (1)*. 13/04/16, recuperado de http://www.cdc.gov/Chikungunya/pdfs/Chikungunyaworldmap_10-20-2015.pdf
- Centers for Disease Control and Prevention, y Organización Panamericana de la salud. (2011). *Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya*

en las Américas. Organización Panamericana de la Salud. 13/04/2016 recuperado de http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_Spanish.pdf.

Centro de Información Estadística y Documental del estado de Oaxaca. (2012). *Panorama de Dengue Información Básica. Secretaria de Salud Oaxaca* (1). 10/01/2016 recuperado de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/dengue>

Christofferson, R. C. (2016). Zika Virus Emergence and Expansion: Lessons Learned from Dengue and Chikungunya May Not Provide All the Answers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. prensa

Cho, S. Y., Jeong, R. D., Yoon, Y. N., Lee, S. H., Shin, D. B., Kang, H. W., y Lee, B. C. (2013). One-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for the simultaneous detection of three rice viruses. *Journal of Virological Methods*, 193(2), 674–678.

Comite Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2011). Alerta epidemiológica Dengue. *Salud Publica de Mexico* (1). 13/03/2016 recuperado de http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/alertas/2011/ALERTA_DENG_20_OC_TUBRE_2011.pdf

Comite Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2015). *Situación Epidemiologica de Infeccion Por Virus Zika En América* (1). 13/03/2016 recuperado de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/avisos/2015/zika/Aviso%20Epidemiol%C3%B3gico-ZIKA%20VIRUS221015.pdf>

Conrad, M. D., Leclair, N., Arinaitwe, E., Wanzira, H., Kakuru, A., Bigira, V., y Greenhouse, B. (2015). Transfusion-Transmission of Dengue Virus and Associated Clinical Symptomatology during the 2012 Epidemic in Brazil. *Infectious Diseases Advance*, 4(1), 1–28.

Consejo de Salubridad General. (2009). *Manejo del dengue no grave y el dengue grave*. (1st ed.) *Dengue, México*: Salud Publica de Mexico

Cristina, F. (2015). *Virus Zika*. *Revista Clínica Hospital San Juan de Dios* (5).

Campos, R., Cirne-Santos, C., Meira, G. L. S., Santos, L. L. R., de Meneses, M. D., Friedrich, J., y Ferreira, D. F. (2016). Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. *Journal of Clinical Virology*, 77(16), 69–70.

Díaz, A., Osa, D., Pantoja, M. Q., y Rodríguez, A. H. (2015). Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa para el diagnóstico molecular de potyvirus que afectan a *Capsicum annum* L. en Cuba. *CENIC Ciencias Biológicas*, 46(2), 144–155.

Dick, G. W., y Kitchen, S. F. (1973). Zika Virus. Isolations and Serological Specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(2), 174–183.

- Dirección de Vigilancia Epidemiológica. (2014). *Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico por Laboratorio de Fiebre Chikungunya* (1st ed.) Tratamiento, Mexico: Salud pública de México
- Ejupilco, T., Karina, A., Quiroz, N., Virginia, M., Juárez, S., Gómez, A., y Medina, I. (2012). Distribución espacial del vector *Aedes Aegypti* del dengue clásico y su relación con características físico-geográficas en la jurisdicción sanitaria Tejupilco, Estado de México, 2000-2005. *Revista Digital Del Grupo de Estudios Sobre Geografía Y Análisis Espacial Con Sistemas de Información Geográfica*, 4(4), 77–110.
- Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M., y Rousset, D. (2015). Zika virus genome from the Americas. *The Lancet*, 6736(16), 6736.
- Espinoza Gómez, F., Hernández Suárez, C. M., y Coll Cárdenas, R. (2001). Factores que modifican los índices larvarios de *Aedes aegypti* en Colima, Mexico. *Rev. Panamericana de Salud Pública*, 10(1), 6–12.
- Evia-Barba, R. J. (2014). Dengue. Problema que preocupa y ocupa a la salud pública. *Patología Clínica*, 61(2), 84–101.
- Faingezicht, I., y Avila, M. L. (1994). Diagnóstico clínico y de laboratorio del paciente con dengue. *Revista Médica Del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34(1), 33–41.
- Faye, O., Faye, O., Diallo, D., Diallo, M., Weidmann, M., y Sall, A. A. (2013). Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology Journal*, 10(1), 311.
- Fondevila, N., Compaired, D., Maradei, E., y Duffy, S. (2014). Validación de una técnica de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de fiebre aftosa y evaluación de su desempeño en la infección aguda Validation of a real time RT-PCR assay to detect foot-and-mouth disease virus and assessment of its performance. *Argent Microbiol*, 46(3), 188–195.
- Foy, B. D., Kobylinski, K. C., Foy, J. L. C., Blitvich, B. J., da Rosa, A. T., Haddock, A. D., ... Tesh, R. B. (2011). Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 880–887.
- Furuya-Kanamori, L., Liang, S., Milinovich, G., Soares Magalhaes, R. J., Clements, A. C. A., Hu, W., y Yakob, L. (2016). Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses. *BMC Infectious Diseases*, 16, 84. <http://doi.org/10.1186/s12879-016-1417-2>
- Guillen-Solis, Gabriel. (2016). *Estuche de detección molecular para Salmonella spp. y Listeria monocytogenes en diferentes matrices alimenticias*, 2016, 1-20.
- Galvis, F., Lozano, C., Quintero, F., y Peñaranda, S. (2014). *Estudio de Variabilidad Genética y Determinación del Virus Dengue en Aedes aegypti en el Área Metropolitana de San José de Cúcuta* (1st ed.). Colombia: biogen.

Genekam. (2016). Kit Zika Virus & Dengue Virus & Chikungunya Virus. Mayo, 20, 2016, de Genekam Sitio web: <http://genekam.de/realtime-pcr-kits/Zika-Virus-and-Dengue-Virus-and-Chikungunya-Virus>

Goh, L. Y. H., Kam, Y.-W., Metz, S. W., Hobson-Peters, J., Prow, N. A., McCarthy, S., Lisa, F.P., y Hall, R. A. (2015). A sensitive epitope-blocking ELISA for the detection of Chikungunya virus-specific antibodies in patients. *Journal of Virological Methods*, 222, 55–61.

Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Esteve, T., Prat, S., y Pla, M. (2003). Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry*, 323(2), 164–170.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 11(1), 1026-1030.

Horcada, M. L., y Díaz-calderón, C. (2015). Fiebre Chikungunya . Manifestaciones reumáticas de una infección emergente en Europa. *Reumatología Clínica*, 11(3), 161–164.

Huang, Y. W., Dryman, B. A., Harrall, K. K., Vaughn, E. M., Roof, M. B., & Meng, X. J. (2010). Development of SYBR green-based real-time PCR and duplex nested PCR assays for quantitation and differential detection of species- or type-specific porcine Torque teno viruses. *Journal of Virological Methods*, 170(1-2), 140–146.

Ibañez-Bernal, S., y Gómez-Dantés, H. (1995). Los Vectores del Dengue en México: una revisión crítica. *Salud Pública de México*, 37(1), 53–67.

Icaza, J. T. (2003). EL dengue en México. *Bayer Environmental Science*, 1(6), 151.

Icaza, J. T. (2010). *El mosquito Aedes aegypti y el dengue en México*. Bayer (1st ed., Vol. 1). Mexico: *Environmental Science*.

Instituto Internacional de Vacunas de Mexico. (2009). *Acelerando los Avances en el Control del Dengue: Vigilancia del Dengue en las Américas* (1st ed., Vol. 1) Tratamiento, EEUU: *Americas Dengue Prevention Board Acelerando*.

Josseran, L., Paquet, C., Zehgnoun, A., Caillere, N., Le Tertre, A., Solet, J.-L., y Ledrans, M. (2006). Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1994–1995.

Kalayanarooj, S., Vaughn, D. W., Nimmannitya, S., Green, S., Suntayakorn, S., Kunentrasai, N., ... Ennis, F. a. (1997). Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(2), 313–321.

Kao, C.-L., King, C.-C., Chao, D.-Y., Wu, H.-L., y Chang, G.-J. J. (2005). Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 38(1), 5–16.

- Kim, J. H., Chong, C. K., Sinniah, M., Sinnadurai, J., Song, H. O., & Park, H. (2015). Clinical diagnosis of early dengue infection by novel one-step multiplex real-time RT-PCR targeting NS1 gene. *Journal of Clinical Virology*, 65, 11–19.
- Lancet, T. (2016). Zika virus : a new global threat for 2016. *The Lancet*, 387(10014), 96.
- Lum, F.-M., y Ng, L. F. P. (2015). Cellular and molecular mechanisms of Chikungunya pathogenesis. *Antiviral Research*, 120(June), 165–74.
- Manore, C. A., Hickmann, K. S., Xu, S., Wearing, H. J., y Hyman, J. M. (2014). Comparing dengue and Chikungunya emergence and endemic transmission in *A. aegypti* and *A. albopictus*. *Journal of Theoretical Biology*, 356, 174–91.
- Martinez, E., Riera, P., Sitja, M., Fang, Y., Oliveira, S., y Maldonado, J. (2008). Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Research in Veterinary Science*, 85(1), 184–193.
- Martínez Sánchez, A., Martínez Ramos, E. B., y Chávez Angeles, M. G. (2015). Panorama situacional de México ante la pandemia del virus chikunguña. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 53(2), 200 – 205.
- Ministerio de Salud de Cuba. (2013). *Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización de los virus del dengue* (1st ed.), CUBA: IPK
- Ministerio de Salud Pública de la República Dominicana. (2014). *Guía de manejo clínico para la infección por el virus Chikungunya (CHIKV)* (1st ed.), República Dominicana: Ministerio de Salud Pública de la República Dominicana.
- Montero, A. (2015). Fiebre Chikungunya - Una nueva amenaza global. *Medicina Clínica*, 145(3), 118–123.
- Mullan, B., Sheehy, P., Shanahan, F., y Fanning, L. (2004). Do Tag-generated RT-PCR products from RNA viruses accurately reflect viral genetic heterogeneity? *Journal of Viral Hepatitis*, 11(2), 108–114.
- Narro, J., y Gómez, H. (1995). El dengue en México: un problema prioritario de salud pública. *Salud Pública de México*, 37(Su1), 12–20.
- Naze, F., Le Roux, K., Schuffenecker, I., Zeller, H., Staikowsky, F., Grivard, P., ... Laurent, P. (2009). Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, Dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and Dengue virus typing using High Resolution Melting. *Journal of Virological Methods*, 162(1-2), 1–7.
- Nishiura, H., Kinoshita, R., Mizumoto, K., Yasuda, Y., y Nah, K. (2016). EquationTitle: Transmission potential of Zika virus infection in the South Pacific. *International Journal of Infectious Diseases*. prensa

Ocazonez, R. E., Gómez, S. Y., y Cortés, F. M. (2007). Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana. *Revista de Salud Pública*, 9(2), 262–274.

OIE. (2008). Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. (4 st ed.) *Manual de la OIE sobre animales terrestres*, EEUU: OSM

Organización Mundial de la Salud. (2009). *Dengue Guías Para El Diagnostico, Tratamiento, Prevencion Y Control*. (6 st ed.), Bolivia: Programa Especial Para Investigacion y Capacitacion De Enfermedades Tropicales.

Organización Mundial de la Salud. (2015). *Síndrome neurológico, anomalías congénitas e infección por virus Zika. Implicaciones para la salud pública en las Américas* (1). 13/04/2016 recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32404&lang=es

Organización Mundial de la Salud. (2016a). *Países con casos confirmados de infección por virus de zika en america* (1). 13/04/2016 recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599:zika-epidemiological-alerts-and-updates&Itemid=41691&lang=es

Organización Mundial de la Salud. (2016b). *Países con transmisión autóctona de Chikungunya* (1). 13/04/2016 recuperado de http://www.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/IR/Viral_Diseases/Chikungunya/CHIKV-Datos-Caribe-2016-SE-14.jpg

Organización Panamericana de la Salud. (2011). *Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en las Américas*. Organización Panamericana de la Salud.

Organización Panamericana de la Salud. (2014a). Fiebre Chikungunya: información para proveedores de asistencia sanitaria, (2), 2–3. 13/04/2016 recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=23977

Organización Panamericana de la Salud. (2014b). *Fiebre por Chikungunya y dengue en las Américas*. 13/04/2016 recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=27048

Organización Panamericana de la Salud. (2015a). *Infección por virus Zika*. 13/04/2016 recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=999999&lang=es

Organización Panamericana de la Salud. (2015b). *Vigilancia de virus Zika (ZIKV) en las Américas : Recomendaciones provisionales para la detección y diagnóstico por*

laboratorio en junio del 2015. 13/04/2016 recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=ygid=30177&lang=es

Palacios-Martínez, D., Díaz-Alonso, R. A., Arce-Segura, L. J., y Díaz-Vera, E. (2015). Chikungunya, una enfermedad vírica emergente. Propuesta de un algoritmo de manejo clínico. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 41(4), 221–225.

Petersen, E., Wilson, M. E., Touch, S., McCloskey, B., Mwaba, P., Bates, M., ... Zumla, A. (2016). Unexpected and Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. *International Journal of Infectious Diseases*, 44(May 2015), 11–15.

Pinilla, B. G., Cubillos, K., y Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Nova*, 104(1), 65–75.

Pizarro, D. (2009). Dengue, Dengue hemorrágico. *Acta Pediátrica Costarricense*, 21(1), 8–17.

Pongsiri, P., Praianantathavorn, K., Theamboonlers, A., Payungporn, S., & Poovorawan, Y. (2012). Multiplex real-time RT-PCR for detecting Chikungunya virus and dengue virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(5), 342–346.

Porta, C. (M. L. (2012). Fiebre Chikungunya Amenaza para la Región de las Américas. *Salud Militar*, 3(M), 25–33.

Powers, A. M., y Logue, C. H. (2007). Changing patterns of Chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology*, 88(9), 2363–2377.

QIAGEN Technical Services. (2010). *QIAGEN® Multiplex PCR Handbook*. (1, ed.) EEUU: Qiagen.

Queyriaux, B., Simon, F., Grandadam, M., Michel, R., Tolou, H., y Boutin, J. P. (2008). Clinical burden of Chikungunya virus infection. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(1), 2–3.

Rasmussen, R., Morrison, T., Herrmann, M., y Wittwer, C. (1998). Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. *Biochemica*, 2(2), 8–11.

Rao, P., Wu, H., Jiang, Y., Opriessnig, T., Zheng, X., Mo, Y., & Yang, Z. (2014). Development of an EvaGreen-based multiplex real-time PCR assay with melting curve analysis for simultaneous detection and differentiation of six viral pathogens of porcine reproductive and respiratory disorder. *Journal of Virological Methods*, 208, 56–62.

Reed, G. H., Kent, J. O., y Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 597–608.

Restrepo-Jaramillo, B. N. (2014). Infección por el virus del Chikungunya. *CES Medicina*, 28(2), 313–324.

- Rezza, G. (2014). Chikungunya Fever. In E. Inc. (Ed.), *Emerging Infectious Diseases* (1st ed., pp. 163–172). Elsevier Inc.
- Rigau-Perez, J., Clark, G., Gubler, D., Reiter, P., Sanders, E., y Vancevorndam, A. (1998). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Seminar*, 352(9132), 971–977.
- Rivera García, O. (2014). Aedes aegypti, virus dengue, chinkugunia, zika y el cambio climático. Máxima alerta médica y oficial. *REDVET*, 57(57), 1–10.
- Rivera-Ávila, R. C. (2014). Fiebre Chikungunya en México : caso confirmado y apuntes para la respuesta epidemiológica. *Salud Pública de Mexico*, 56(4), 402–404.
- Rodríguez-Cruz, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del Aedes aegypti en las Américas. *Rev Cubana Medecina Tropical*, 54(3), 189–201.
- Rodríguez-Morales, A. J. (2015). No era suficiente con dengue y Chikungunya : llegó también Zika. *iMedPub Journals*, 11(1), 1–4.
- Rodríguez-Morales, A. J., y Willamil-Gómez, W. E. (2016). El reto de Zika en Colombia y América Latina: Una urgencia sanitaria internacional. *Infectio*, 20(2), 59–61.
- Rodríguez-Sánchez, I. P., y Barrera-Saldaña, H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3), 323–335.
- Romolo, L., Prowse, T. D., Blair, D., Bonsal, B. R., Marsh, P., y Martz, L. W. (2006). Validación Y Control De Calidad. (2 nd ed.), *Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos EEUU*: Organizacion Mundial de Sanidad Animal.
- Rougeron, V., Sam, I.-C., Caron, M., Nkoghe, D., Leroy, E., y Roques, P. (2015). Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 64, 144–52.
- Rutledge, R. G., y Cote, C. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, 31(16), 93e–93.
- Salud Pública de México. (1995). Panorama Epidemiológico del Dengue y Dengue hemorrágico en México. *Redalyc*, 37(1), 109–113.
- Salud Publica, (2015). Prevención, diagnostico y tratamiento de la infeccion por el virus Chikungunya. secretaria de salud (Vol. 1).
- Sam, I.-C., Loong, S.-K., Michael, J. C., Chua, C.-L., Wan SuLaiman, W. Y., Vythilingam, I., y Chan, Y.-F. (2012). Genotypic and phenotypic characterization of Chikungunya virus of different genotypes from Malaysia. *PloS One*, 7(11), 50476.
- Sandin, D., y Algorta, G. (2003). Métodos de estudio de bacterias y virus Métodos diagnósticos. (2nd ed) *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, España: ISBN.
- Schmutzhard, J., Riedel, H. M., Wirgart, B. Z., & Grillner, L. (2004). Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin

lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *Journal of Clinical Virology*, 29(2), 120–126.

Schuffenecker, I., Iteman, I., MichapLt, A., Murri, S., FrangeµL, L., Vaney, M. C., ... Brisse, S. (2006). Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Medicine*, 3(7), 1058–1070.

Secretaria de Salud. (2010). *Manual para la Vigilancia , Diagnóstico , Prevención y Control del Dengue* (1st ed.), Mexico: Salud Publica de México.

Secretaria De Salud. (2012). *PROGRAMA DE ACCIÓN ESPECÍFICO 2007-2012 Otras Enfermedades Transmitidas por Vector* (2nd ed.), Mexico:Salud Publica.

Secretaria de Salud. (2013). *Prevención y Control de Dengue 2013-2018*. (1st ed.), MEXICO: Secretaria De Salud México.

Secretaria de Salud. (2015). Cuadro actualizado “ Casos confirmados de Fiebre Chikungunya ” , semana epidemiológica 41 del 2015, 13/04/2016 recuperado de <http://www.udea.edu.co/wps/wcm/connect/udea/acbbe80f-ade4-4633-b760-22aeeb910484/BES-41.pdf?MOD=AJPERES>

Secretaria de Salud. (2012). *Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Infección por el Virus Chikungunya* (2 nd ed.), México: Secretaria de Salud.

Secretaría de Salud. (2015). *Dirección General de Epidemiología Lineamientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica y Diagnóstico por Laboratorio de Infección por Virus Zika* (1st ed.), MEXICO: Secretaria de Salud.

Soediono, B. (1989). Aplicación de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de prrs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(2), 160.

Srikiatkachorn, A., Krautrachue, Anchalee Ratanaprakarn, W., Wongtapradit, L., Nithipanya, N., Kalayanarooj, S., Nisalak, A., ... Green, S. (2005). Natural History of Plasma Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Urology*, 26(5), 183–290.

CDC. (2016). Laboratory Guidance and Diagnostic Testing. 13/04/2016 recuperado de <http://www.cdc.gov/dengue/clinicalLab/laboratory.html>

Thermo Scientific.(2012). Piko Thermal Cycle User Manual Rev 1.3.EEUU.

Torres-Galicia, I., Cortés-poza, D., y Becker, I. (2014). Dengue en México : análisis de dos décadas I ntroducción. *Gaceta Médica de México*, 150(7), 122–127.

Tsetsarkin, K. a, Chen, R., Leal, G., Forrester, N., Higgs, S., Huang, J., y Weaver, S. C. (2011). Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), 7872–7877.

Usme-Ciro, J. A., Gómez-Castañeda, A. M., y Gallego-Gómez, J. C. (2012). Detección molecular y tipificación del virus dengue por RT-PCR y PCR anidada usando oligonucleótidos mejorados. *Salud Uninorte*, 28(1), 1–15.

Varga, A., y James, D. (2005). Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: A rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods*, 123(2), 213–220.

Vázquez-Pichardo, M., Rosales-Jiménez, C., Núñez-León, A., Rivera-Osorio, P., De La Cruz-Hernández, S., Ruiz-López, A., ... Alpuche-Aranda, C. (2011). Serotipos de dengue en México durante 2009 y 2010. *Biología Médica Infantil de México*, 68(2), 103–110.

Velandia, M. L. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33–43.

Villegas-Trejo, A., Che-Mendoza, A., González-Fernández, M., Guillermo-May, G., González-Bejarano, H., Dzul-Manzanilla, F., ... Manrique-Saide, P. (2011). Control enfocado de *Aedes aegypti* en localidades de alto riesgo de transmisión de dengue en Morelos, México. *Salud Pública México*, 53(2), 141–151.

Vinueza, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Redvet*, 10(2), 1–13.

Weaver, S. C., y Forrester, N. L. (2015). Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Research*, 120(May), 32–39.

Wilhelm J and Pingoud A. (2003) Real-time polymerase chain reaction. *Chem. Bio. Chem*, 4(1120), 26-28.

Wu, L., Ding, L., Pei, Z., Huo, X., Wen, G., & Pan, Z. (2013). A multiplex reverse transcription-PCR assay for the detection of influenza A virus and differentiation of the H1, H3, H5 and H9 subtypes. *Journal of Virological Methods*, 188(1-2), 47–50.

Yang, C. F., Chen, C. F., Su, C. L., Teng, H. J., Lu, L. C., Lin, C., ... Wu, H. S. (2010). Screening of mosquitoes using SYBR Green I-based real-time RT-PCR with group-specific primers for detection of Flaviviruses and Alphaviruses in Taiwan. *Journal of Virological Methods*, 168(1-2), 147–151.

Zammarchi, L., Stella, G., Mantella, A., Bartolozzi, D., Tappe, D., Gunther, S., ... Schmidt-Chanasit, J. (2015). Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *Journal of Clinical Virology*, 63, 32–35.

Zamudio, M., Arias, I., y Luna, M. (2008). Enfermedades Zoonóticas.13/04/2016 recuperado de <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/boletin/pdf/bol44.pdf>

Zanluca, C., de Melo, V. C. A., Mosimann, A. L. P., dos Santos, G. I. V., dos Santos, C. N. D., y Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias de Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 110, pp. 569–572).

Zeng, Z., Liu, Z., Wang, W., Tang, D., Liang, H., & Liu, Z. (2014). Establishment and application of a multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of six viruses in swine. *Journal of Virological Methods*, 208, 102–106.

ANEXOS

ANEXO 1 ESTUDIO DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES

ESTUDIO DE ENFERMEDADES VÍRICAS TRANSMITIDAS POR VECTORES

DATOS DEL PACIENTE

Nombre: _____ Sexo: _____ Edad: _____ Folio: _____

Residencia actual
 Domicilio _____
Calle y Núm. Colonia Localidad Municipio Estado

Sitio donde pasa la mayor parte de su tiempo:
 Trabajo Escuela Casa Otros _____

Cuadro clínico

Fecha del inicio de cuadro clínico: _____

Sintomatologías

Fiebre <input type="checkbox"/> Migraja <input type="checkbox"/> artralgia <input type="checkbox"/> Cefaleas <input type="checkbox"/> Induración <input type="checkbox"/> Conjuntivitis <input type="checkbox"/> Otitis <input type="checkbox"/> Fotofobia <input type="checkbox"/> Escalofríos <input type="checkbox"/> Linfadenopatías <input type="checkbox"/> Hepatomegalia <input type="checkbox"/> Leucopenia <input type="checkbox"/> Hemorragias <input type="checkbox"/> trombocitopenia <input type="checkbox"/>	Temperatura: _____ °C Debilidad muscular <input type="checkbox"/> Alteraciones de gusto <input type="checkbox"/> Adenomegalia <input type="checkbox"/> Dolor de espalda <input type="checkbox"/> Dolor retroocular <input type="checkbox"/> Rash maculopapular <input type="checkbox"/> enrojecimiento de orofaringe <input type="checkbox"/> Rigidez del cuello <input type="checkbox"/> Congestión nasal <input type="checkbox"/> Alteraciones cardíacas <input type="checkbox"/> Desorientación <input type="checkbox"/> Edema de extremidades <input type="checkbox"/>	Parálisis <input type="checkbox"/> Poliartralgia <input type="checkbox"/> Artitis <input type="checkbox"/> Nódulos <input type="checkbox"/> Úlceras <input type="checkbox"/> fínitis <input type="checkbox"/> prurito <input type="checkbox"/> Estupor <input type="checkbox"/> Fatigabilidad <input type="checkbox"/> Temblor <input type="checkbox"/> Convulsiones <input type="checkbox"/> Exantema <input type="checkbox"/> Otros _____
---	--	---

Notas del cuadro clínico _____

En las últimas semanas ha visitado otros lugares: sí no Donde: _____

En el último mes ha visitado otros lugares: sí no Donde: _____

Definición operacional presente en el paciente: Dengue Chikungunya Zika

El hospital mandará una muestra de suero al INDRÉ para su diagnóstico sí no

Mediante que método: NS1 Elisa IgM Elisa IgG RT-PCR tiempo real

especificar: _____

Condiciones de la muestra Aceptado Rechazado

Rechazado por Hemolizada Insuficiente Lipémica Otros:

especificar: _____

Observaciones del paciente: _____

NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN LLENO EL FORMATO

NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN AUTORIZO

ANEXO 2 CARTA INFORMATIVA



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oax. a de 20...

Estimado Sr(a).....me dirijo a usted para comunicarle e infórmale que se llevara a cabo un proyecto de investigación con una muestra de su suero sanguíneo, la muestra obtenida será utilizada única y exclusivamente con fines de investigación para validar una técnica de diagnósticos diferencial para enfermedades virales Dengue, Chikungunya y Zika, transmitida por vectores.

Este proyecto se está realizara en convenio entre la universidad del Papaloapan y el Hospital General de Tuxtepec, Oaxaca.

Por parte de la universidad; se compromete a mandar los resultados de la muestra al Hospital General en cuanto se disponga de ellos y usted tiene el derecho de pasar por el resultado al hospital en el área de epidemiología, los datos proporcionados por usted para la validación de la técnica serán confidenciales y no se utilizar para fines lucrativos.

De tal forma que, se presenta esta carta para solicitar su autorización con el fin mencionado anteriormente.

Agradeciendo su atención, quedo de Ud.

Nombre y firma

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial,
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax. Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria,
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax. Tel. 01(281)8729230

ANEXO 3 FORMATO DE ETIQUETAS

Hospital General-UNPA

Muestra: _____

Diagnóstico: _____ Fecha de muestra: _____

Días del inicio febril: _____

Sexo: _____ Edad: _____

ANEXO 4 FORMATOS DE INGRESO DE MUESTRA



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC
 INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Los abajo firmantes estamos de acuerdo en que se utilice nuestra muestra de sangre para los fines de investigación mencionados en el Oficio Adjunto.

Folio	Nombre del paciente	Diagnostico clínico (Dg: Dengue; Ck: Chikungunya; Zk: Zika)	Días de cuadro clínico	Firma	Fecha de toma de muestra
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					

CAMPUS TUXTEPEC
 C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
 C.P. 38301, Tuxtepec, Oax. Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
 Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
 C.P. 68400, Loma Bonita, Oax. Tel. 01(281)8729230

ANEXO 5 FORMATO DE SOLICITUD DE PROYECTO PARA EL HOSPITAL GENERAL



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Tuxtpec, Oax. a 03 de diciembre del 2015

*Comité de ética del hospital general
Presente*

Por medio del convenio establecido entre la universidad del Papaloapan y el Hospital General de Tuxtpec, Oaxaca, me dirijo a ustedes para manifestarles el deseo de llevar a cabo un proyecto de investigación en las áreas de epidemiología, laboratorio clínico y enseñanza, sobre la detección de enfermedades víricas de Dengue, Chikungunya y Zika, mediante un diagnóstico diferencial de RT-qPCR, con la finalidad de conocer desde el inicio del cuadro clínico, cuál es la enfermedad en cuestión.

Para el presente estudio se necesita obtener de 2 a 3 ml de suero sanguíneo extraído por venopunción de cada paciente que presente la definición operacional de las enfermedades víricas antes mencionadas, dichas muestras serán obtenidas por el personal capacitado del laboratorio que está encargado para dicho fin. En toda muestra e información recolectada, la Universidad del Papaloapan se compromete a utilizarlas única y exclusivamente con fines de investigación.

Para el suero sanguíneo, se tomara una muestra de sangre completa por venopunción (Aprox. 5 ml) por paciente, para procesarla y obtener el suero sanguíneo (Aprox. 2-3 ml) que se identificara con el formato de etiquetado (anexo 3). Una vez obtenida las muestras sanguíneas, se dejaran en el tubo reposar a temperatura ambiente de 30 a 60 min, posteriormente se centrifuga por 10 minutos a 2000 RPM y se almacenara el suero en refrigeración (4-6 °C) hasta su traslado a la universidad del Papaloapan. El traslado del suero sanguíneo será llevada a cabo por Luis Uribe Espejo Galicia, estudiante del noveno semestre de la Ingeniería en Biotecnología, los días martes a las 07:00 a.m. durante el periodo que sea necesario hasta obtener el numero de muestras requeridas.

Agradeciendo su atención, quedo de Ud.

Atentamente

M. C. Héctor López Arjona
Vice-Rector de la UNPA

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtpec, Oax. Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax. Tel. 01(281)8729230

ANEXO 6 PREPARACIÓN DE REACTIVO

Carrier RNA para el kit QIAamp Viral RNA Mini

COMPONENTES	Volumen (10 ml)
Eluyente	300 μ L

Reconstituir el carrier RNA deshidratado Carrier adicionando el eluyente. Incubarse por 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugar brevemente el vial. Inmediatamente usar o guardar a -20° . No congelar y reconstituir el Carrier RNA más de 10 veces. Si solo pequeñas muestras serán procesadas en un tiempo, dividir el Carrier RNA solución en alícuotas de 50 μ L. Y guardarlas a -20 o -70° C.

ANEXO 7 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ARN

Protocolo para el kit QIAamp Viral RNA Mini

1. Pipetear 560 μ L de Buffer AVL dentro de un tubo de 1.5 ml.
2. Agregar 140 μ L de suero al tubo, y mezclar con vortex por 15 segundos.
3. Incubar la mezcla a temperatura ambiente por 10 minutos.
4. Centrifugar brevemente el tubo y remover la pastilla del sobrenadante (eliminar el líquido)
5. Adicionar 560 μ L de etanol puro (96-100%) a la muestra, mezclar con vortex por 15 segundos. Después de mezclar, centrifugar el tubo y remover el líquido de la pastilla.
6. Cuidadosamente aplicar 630 μ L de la solución del paso 5 a la columna QIAamp Mini (en un tubo colector de 2 ml) cerrar la tapa y centrifugar a 6000 g (8000 rpm) por un minuto. Colocar la columna en un tubo limpio de 2 ml, y descartar el tubo que contiene el filtrado.
7. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp Mini, y repetir el paso 6
8. Cuidadosamente abrir la columna QIAamp Mini y agregar 500 μ L del buffer AW1. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 g (8000 rpm) por 1 minuto. Cambiar la columna a otro tubo colector.

9. Con cuidado abrir la columna y adicionar 500 μL del buffer AW2. Cerrar la columna y centrifugar a máxima velocidad (20000 g o 14000 rpm) por 3 min. Continuar directamente con el paso 11, o para eliminar cualquier posible contenido de buffer AW2 pasar al paso 10 y después continuar con el paso 11.
10. Recomendado: cambiar la columna a un nuevo tubo colector de 2 ml (no provisto) y descartar el tubo con todo el filtrado, centrifugar a máxima velocidad por 1 min.
11. Cambiar la columna a un tubo de 0.5 ml limpio (no provisto). Cuidadosamente abrir la columna y agregar 60 μL del buffer AVE equilibrado a temperatura ambiente. Cerrar la tapa e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 6000 g o 8000 rpm por un min.

Protocolo para el kit de GeneJET Viral DNA and RNA Purification

1. Adicionar 50 μL a la columna de preparación de líquidos en el centro de la membrana en el centro de la columna, de modo que la membrana se humedezca completamente.
2. Cargar 200 μL de muestra en un tubo de lisis vacío de 1.5 ml. Adicionar 200 μL solución de lisis (complementada con el carrier RNA) y 50 μL de proteinasa, mezclar con vortex o pipeteo.
3. Adicionar 300 μL de etanol (96-100%) y mezclar por vortex o pipeteo. Incubar la muestra por 3 min a temperatura ambiente. Centrifugar por 3-5 s a máxima velocidad.
4. Transferir el lisado a una columna de preparación preensamblada con el tubo de lavado.
5. centrifugar la columna por 1 minuto a 6000 g. descartar el tubo de lavado con el contenido líquido. Pasar la columna de a un nuevo tubo de lavado de 200 ml.
6. Adicionar 700 μL de buffer de lavado 1 adicionado con etanol a la columna. Centrifugar la columna por 1 min a 600 g. descarta el tubo de lavado con el filtrado. Colocar la columna en un nuevo tubo de lavado.

7. Adicionar 500 µL de buffer de lavado 2 complementado con etanol a la columna. Centrifugar la columna 1 min a 6000 g. descartar el tubo de lavado con el filtrado. Pasar la columna a un nuevo tubo de lavado.
8. Adicionar 500 µL de buffer de lavado complementado con etanol a la columna. Centrifugar la columna 1 min a 6000 g. descartar el tubo de lavado con el centrifugado y pasar la columna a otro tubo de lavado.
9. Centrifugar la columna por 3 min a 16000 g. descartar el tubo con el remanente.
10. Pasar la columna a un nuevo tubo de elución. Adicionar 50 ml de eluyente precalentado a 56 °C en el centro de la membrana de la columna. Incubar por 2 min a temperatura ambiente. Centrifugar la columna por 1 min a 13 000 g. desechar la columna.
11. Guardar el tubo de elución conteniendo los ácidos nucleicos virales puro. Usar inmediatamente o guardar a -20 °C o -70 °C.

ANEXO 8 PROTOCOLO DE KIT TAQMAN® UNIVERSAL PCR MASTER MIX

Temperatura	Tiempo	Numero de ciclo
50°C	2 min	1 ciclo
95°C	10 min	1 ciclo
95°C	15 s	40 ciclos
60°C	1 min	

ANEXO 9 PROTOCOLO DE LA TECNICA DE DIAGNOSTICO DISEÑADA.

Se diseñó una técnica de diagnóstico molecular para la detección de los virus de dengue, chikungunya y zika usando el Piko24 con tubos especiales para el equipo de la empresa Thermo. Si se requiere utilizar la técnica en otros se debe de tomar en cuenta los resultados se obtenga de los controles positivos y no ver la Tabla de resultados estandarizados para el Piko24.

Material a utilizar

Termociclador para Tiempo real

Puntas libres de ARNasa 0.1-10 µL

Puntas libres de ARNasa 2-200 µL

Pipetas de 0.2-2 µL

Pipetas de 2-10 µL

Placas o tubos para el termociclador

Filminas para qpcr en caso de usar placas

Guantes de nitrilo

Reactivos

Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR Low ROX

Agua libre de ARNasa

Controles sintéticos de cada virus

Oligonucleótidos para el multiplex qRT-PCR

Muestra biológica a procesar

Controles positivos

Virus	Nombre
Zika	ZIKAP
Chikungunya	CHIKP
Dengue	DENVP

Oligonucleótidos

Virus	Nombre
Zika	ZIKAF
	ZIKAR
Dengue	DENVF
	DENVR
Chikungunya	CHIKF
	CHIKR

CONDICIONES DE REACCION

- La preparación de la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente.
- La reacción fue diseñada para 15 µl cada una. Si se desean probar diferentes volúmenes, es necesario conservar la proporcionalidad.
- La preparación de una mezcla maestra (Master Mix) que incluya todos los componentes a excepción de la muestra o templado ayuda a reducir los errores de pipeteo y la variabilidad entre muestras, de igual manera se puede realizar

por separados, pero aumenta la posibilidad de error y contaminación en la prueba.

- Se deben incluir los controles positivos de los tres virus y un control negativo por cada ensayo de detección realizado.
- Se recomienda utilizar el protocolo de reacción ya establecidos, modificaciones en la metodología no garantiza resultados confiables
- Se debe minimizar la exposición a la luz de los componentes de reacción para evitar la pérdida de la intensidad de la señal de la fluorescencia.
- Evitar el congelado y descongelado continuo de los componentes de la reacción.
- Utilizar puntas y tubos nuevos, estériles y libres de ARNasa.

PROTOCOLO

1. Tomar la muestra de sangre del paciente con el tubo recolector rojo, usando sistema de venopuncion por vacío, dejar reposar de 30-60 min a temperatura ambiente o 30 minutos a baño maría a 37°C.
2. Llevar la muestra a centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos.
3. Realizar la extracción de ARN, en este punto se puede realizar de varias maneras, en este protocolo se estableció que se puede obtener ARN de dos kits diferentes; QIAamp Viral RNA Mini y GeneJET Viral DNA/RNA Purification.
4. Preparar la reacción para el qRT-PCR añadiendo los siguientes componentes por cada reacción de 15 µl

	Volumen (µL)	Final concentración
Verso Enzyme Mix	0.20	
2X 1-Step qPCR SYBR low ROX Min	7.5	1X
RT Enhancer	0.75	
Mix oligonucleótidos	1.15	300 Nm
Templado	4-5	1-100 ng
Agua libre de ARNasa	Hasta llegar a 15	
Volumen Total	15	

El Mix oligonucleótidos es una Mezclar de oligonucleótidos es una solución, contiene los 3 pares de oligonucleótidos con una concentración final de 20 pmol/μL. Cada oligonucleótido se encuentra a una concentración de 3.333333 pmol/μL.

5. Termociclar cada una de las reacciones en las siguientes condiciones:

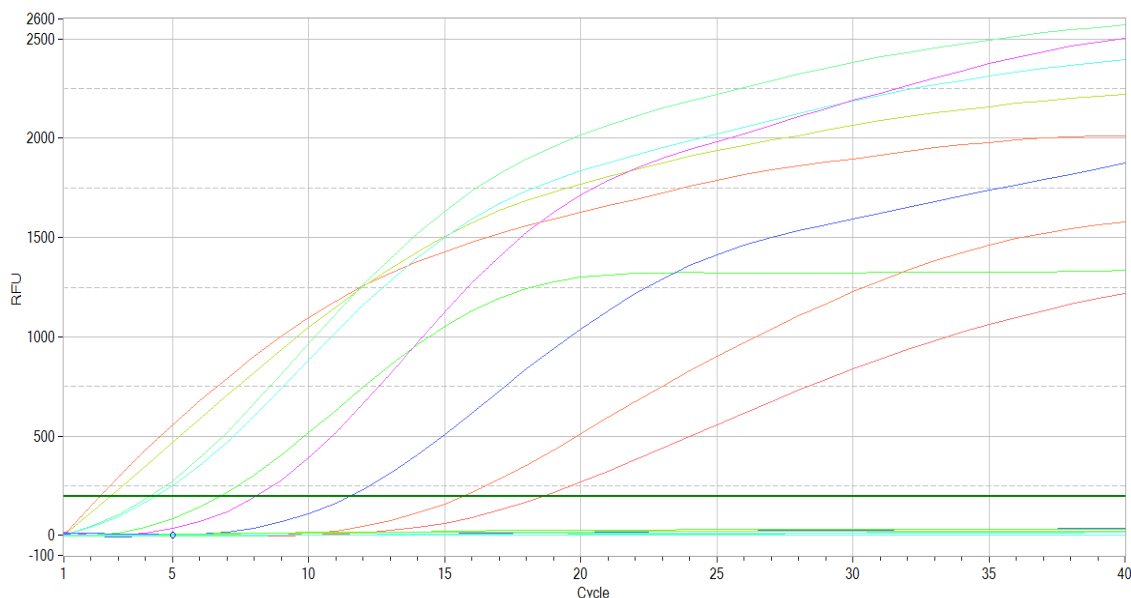
Condiciones de amplificación para la qRT-PCR (Tiempo Real)			
	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclo
cDNA Synthesis*	50°C	15 min	1 ciclo
Thermo-Start activation	95°C	15 min	1 ciclo
Denaturation	95°C	15 s	40 ciclos
Annealing**	60°C	30 s	
Extension **	72°C	30 s	
Melting Curve	95-65°C	21 min (gradiente de 0.2°C)	1 ciclo

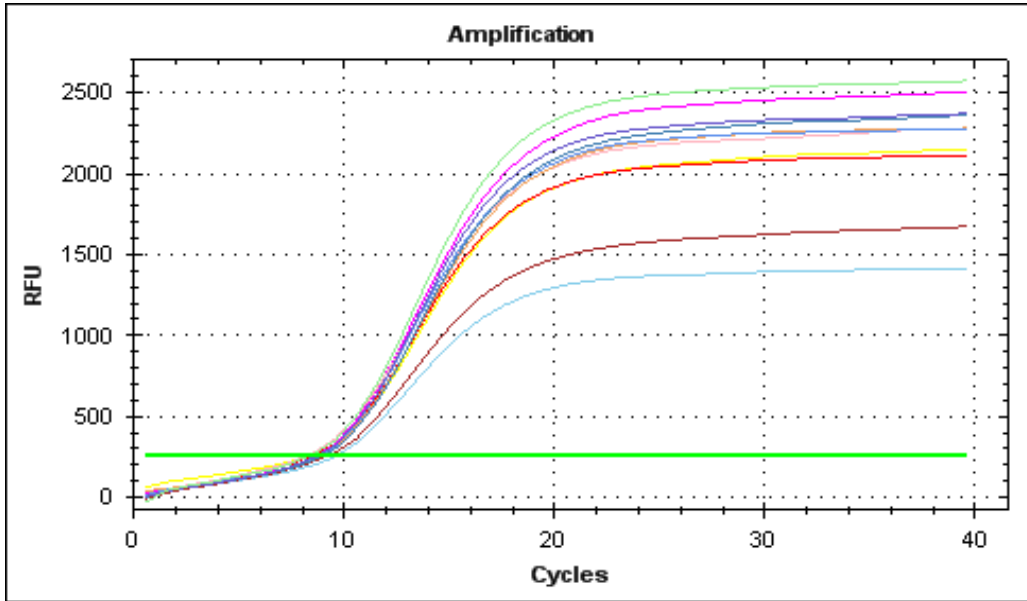
6. Analizar los resultados obtenidos y determinar la presencia o ausencia del virus de interés en la muestra

Nota: todas corridas de qRT-PCR se debe de poner como mínimo un control positivo de cada virus para tener un diagnostico confiable. El control se introduce como muestra y son requeridos 2 microlitros a una concentración entre 0.01-0.001 picogramos por mililitro.

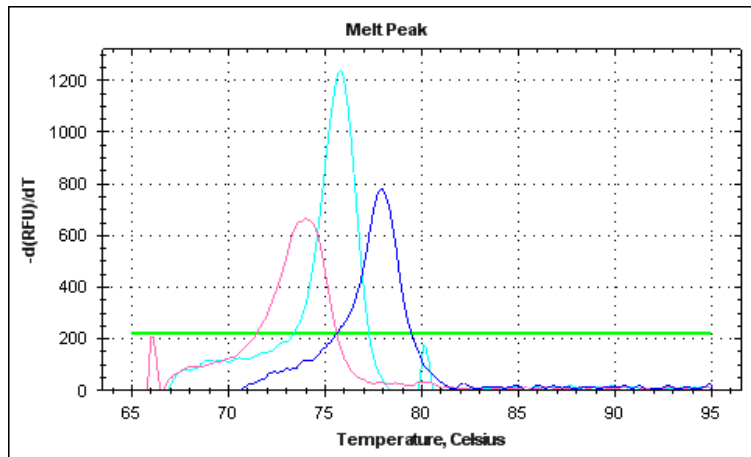
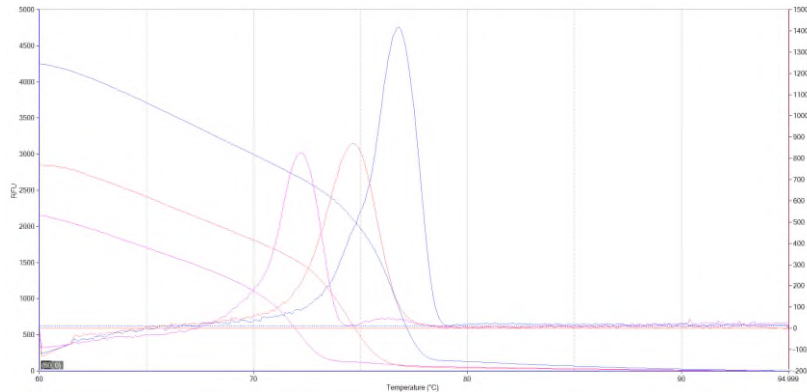
Resultados

Primero se tiene que verificar si existe algo que permite que el oligonucleótido amplifique en la muestra. De obtener amplificados se tienen





Si existe amplificados se procede a analizar el resultado obtenido de Melting Curve, siempre tenemos que comparar las secuencias controles contra las muestras, en la figura de abajo se presenta como se puede observar la Melting Curve en los equipos PIKO24 y IQ5 respectivamente.

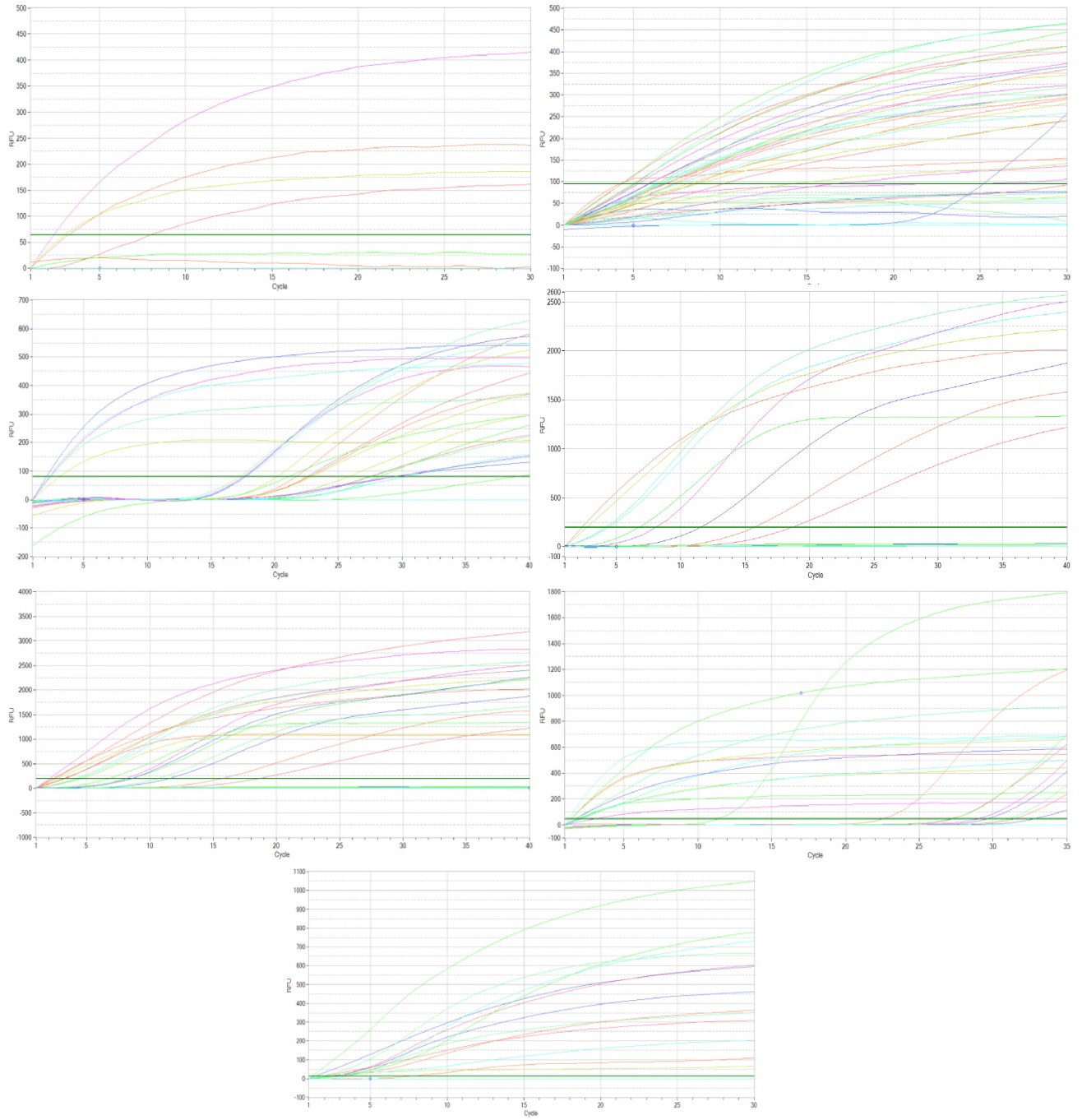


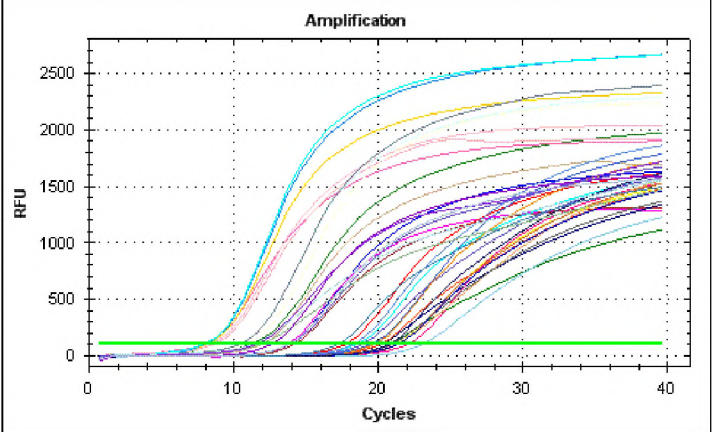
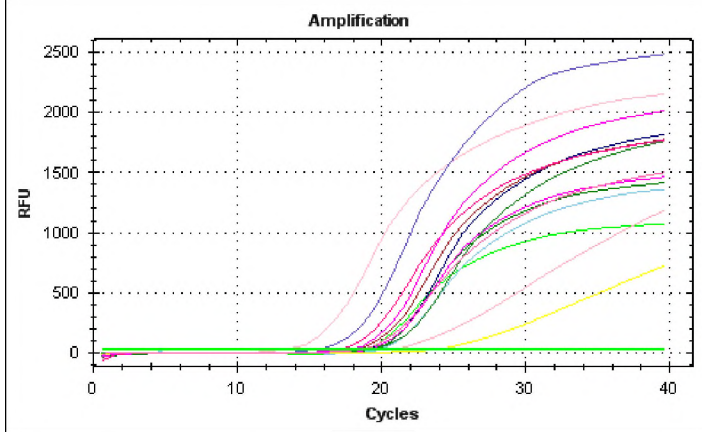
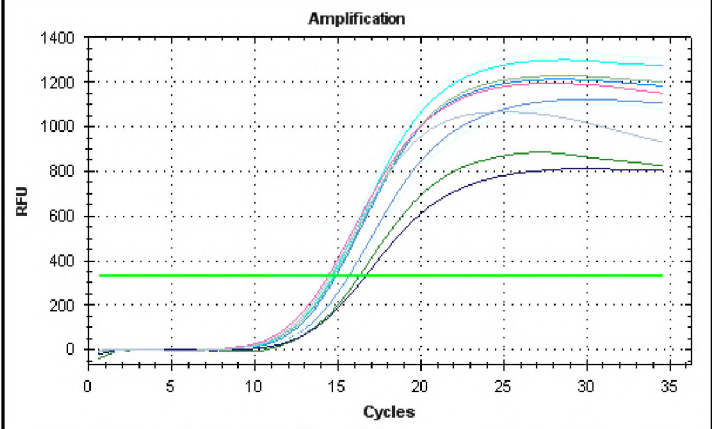
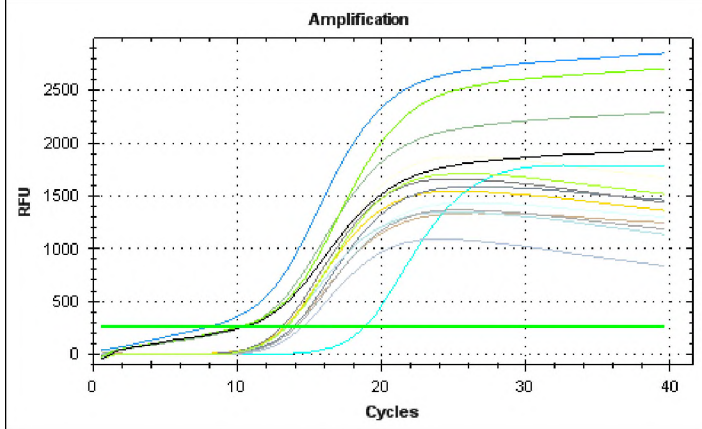
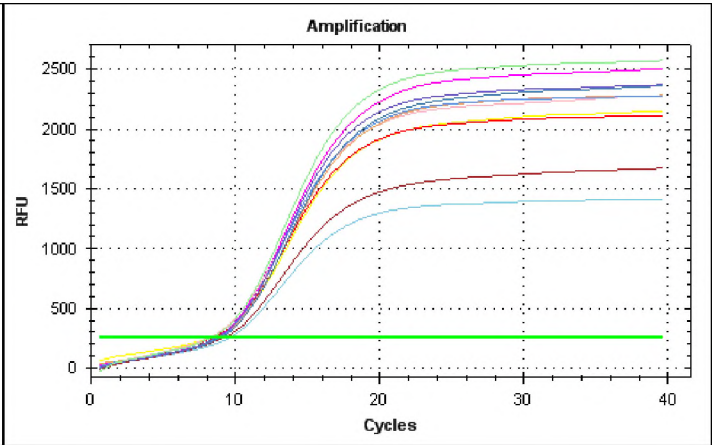
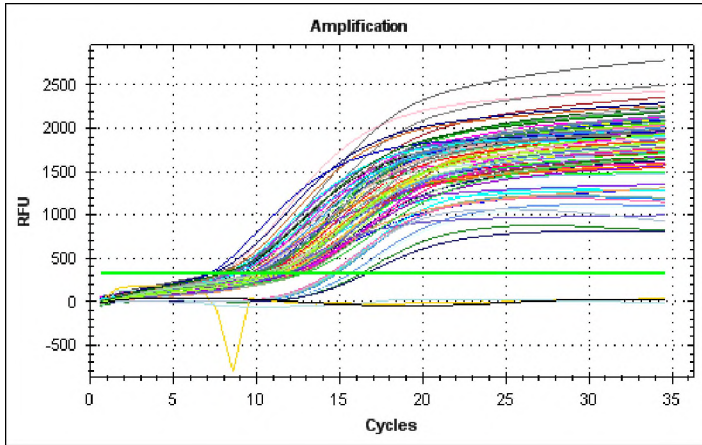
Para los controles de PIKO24 la primera Melting pertenece a virus de zika, el segundo pertenece al virus de Chikungunya y el tercero es el virus de Dengue. Para el IQ5 tiene el mismo patrón el primer pico zika, segundo chikungunya y tercero dengue. Para otros equipos se espera el mismo comportamiento, pero siempre se tiene que comparar las secuencia control con las muestras.

Posibles Problemas en la Reacción y Soluciones

Problema	Posible causa y solución
<p>NO HAY CURVA DE AMPLIFICACIÓN O LA INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA ES BAJA</p>	<p>Error de pipeteo o reactivo faltante Repetir la qRT-PCR y asegurarse de agregar todos los reactivos en las cantidades adecuadas</p> <p>Degradación de oligonucleótidos Checar la integridad de los oligonucleótidos en un gel de poliacrilamida o agarosa al 5 %. Repetir el ensayo con oligonucleótidos nuevos.</p> <p>Degradación del Buffer o fluoróforo Repetir el ensayo con un nuevo buffer</p> <p>Condiciones de ciclado incorrectas Revisar la programación de los termocicladores. Repetir el ensayo con las condiciones correctas.</p>
<p>NO HAY SEÑAL DE FLUORESCENCIA</p>	<p>Los ajustes del instrumento de qPCR son incorrectos Revisar los ajustes del instrumento sean correctos (selección de fluoróforo, selección de filtros)</p> <p>Detección de fluoróforo inactiva Corroborar que la programación del termociclador incluya la instrucción de detección en el paso correcto</p>
<p>LA INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA NO ES UNIFORME</p>	<p>Contaminación del instrumento de qPCR Realizar una limpieza y descontaminación de acuerdo a las instrucciones del fabricante</p> <p>Calibración subóptima del equipo de qPCR Realizar la calibración del equipo de acuerdo a las instrucciones del fabricante</p>

ANEXO 10 IMÁGENES DE AMPLIFICADOS DE QRT-PCR





ANEXO 11 DATOS OBTENIDOS DE RT-PCR PARA LA SELECCION DE KIT DE EXTRACCION

		QIAamp Viral RNA Mini														
		Suero					Plasma					Sangre Total				
Ciclo	M	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
20	M1	4.2	3.6	15.4	8.8	2.9	4	1.2	2.2	3.1	2.6	3.1	2.1	3	2.7	3.3
	M2	7	3	6.6	1	3.1	3.2	3.3	2.6	4.7	2.4	3	3.3	3.1	4	2.6
25	M1	726.8	774.3	747.2	365.9	190.4	328.5	474.3	346.6	233.4	404.3	211.9	147.2	191.9	111.9	168.5
	M2	704.1	794.5	742.7	455.3	192.8	310.2	503.3	399.5	192.8	407.9	224.6	145.8	475.3	275.3	132.6
30	M1	771	1007.2	916.4	936.6	871.4	902.7	706.7	766.5	801.4	750.6	674.9	763.1	528.5	428.5	448.1
	M2	763	1179.7	920.8	949.9	876.9	920.6	841.8	774.2	805.2	757	871.5	762.1	606.9	406.9	396.9
35	M1	876.3	1084.8	1139.7	985.9	943.9	941.8	905	833.4	881.7	787.6	873.9	883.3	723.8	623.8	523.8
	M2	892.5	1271.6	1130.7	1076.8	971.1	928	795.5	836.7	885.9	800.1	903.3	911.7	835.1	735.1	635.1
40	M1	1729.8	1720.7	1491.5	1500.8	1625.2	956	1131.7	1026.9	1056.2	1121.1	1188.9	894.6	962.5	808.7	775.7
	M2	1767.7	1728.6	1475.7	1543.1	1632.9	1046.7	1140.7	1022.4	1063.8	1118.5	1191.8	998.8	1068.4	936.6	853.3

		GeneJET Viral DNA/RNA Purification														
		Suero					Plasma					Sangre Total				
CICLO	M	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
20	M1	6.3	4.8	7.3	5.2	4	3.7	3.2	5.7	4	3.2	3.5	6.9	5.3	3.3	3.3
	M2	7.6	5.6	3.2	3.1	2.8	3.3	2.5	3.4	2.8	2.6	3.2	5.6	3.2	2.1	2.2
25	M1	127.1	147.2	201.2	187.5	98.4	211.9	168.5	191.9	261.8	168.5	211.9	68.5	191.9	261.8	168.5
	M2	104.1	145.8	243.3	78.6	76.5	224.6	132.6	175.3	114.1	122.6	5.1	7	175.3	34	109.6
30	M1	243	369.6	527.2	327.3	240.4	527.7	344.4	628.5	562.6	506.4	527.7	244.4	333.8	562.6	406.4
	M2	211.2	402.7	442.7	268.6	292.8	492.7	561.2	645	354.2	334.7	6.1	7.8	267.7	145.6	334.7
35	M1	505.9	762.1	667.7	385.9	671.4	674.9	500.4	743.8	700.3	744.9	674.9	400.4	449.8	700.3	714.9
	M2	451.9	883.3	850.8	504.5	776.9	781.5	634.4	955.1	561.4	702.6	7.6	6.5	666.1	406.6	466.2
40	M1	704.1	911.7	929.7	649.4	843.9	862.5	835.7	1062.7	1018.7	952.2	887.5	635.7	706.4	818.7	752.2
	M2	678.3	1008.2	1001.3	736.6	931.1	969.6	853	1026.4	831.8	835.7	7.7	5.9	871.7	649	635.7

ANEXO 12 SECUENCIAS DE CHIKUNGUNYA SELECCIONADAS PARA REALIZAR ALINEAMIENTOS.

NOMBRE	Código de acceso de NCBI	Secuencia	Lugar	Año
<i>Chikungunya cepa 1</i>	KP795109.1	Poliproteína no estructural	Chiapas, México	2015
<i>Chikungunya cepa 32</i>	KP795108.1	Poliproteína no estructural	Coahuila, México	2015
<i>Chikungunya cepa 4</i>	KP795107.1	Poliproteína no estructural	Jalisco, México	2015
<i>Chikungunya Islote 4</i>	KP851710.1	Genómico	México	2015
<i>Chikungunya Islote 51</i>	KP851709.1	Genómico	México	2015
<i>Chikungunya cepa Caribe islote G107</i>	LN898111.1	Genómico	Caribe	2016
<i>Chikungunya cepa Caribe islote M102</i>	LN898096.1	Genómico	Caribe	2016
<i>Chikungunya islote TA0006</i>	KT327167.2	Genómico	México	2014
<i>Chikungunya islote LI0031</i>	KT327166.2	Genómico	Chiapas, México	2015
<i>Chikungunya islote CH0072</i>	KT327165.2	Genómico	México	2015
<i>Chikungunya islote VE55_4</i>	KR046234.1	Genómico	Venezuela	2015
<i>Chikungunya cepa WHCHK29</i>	KR559498.1	Genómico	Estados Unidos	2015
<i>Chikungunya islote PR-S6</i>	KR264951.1	Genómico	Puerto Rico	2015
<i>Chikungunya islote TR206 -H804187</i>	KP164572.1	Genómico	Brasil	2015
<i>Chikungunya islote Yap 13-2148</i>	KJ689453.1	Genómico	Estados Unidos	2015
<i>Chikungunya islote CHIKV-13-112^a</i>	AB860301.3	Poliproteína no estructural	Quezon, Filipinas	2014
<i>Chikungunya islote 99659</i>	KJ451624.1	Genómico	Estados Unidos	2014
<i>Chikungunya islote chik-sy</i>	KF318729.1	Genómico	China	2013
<i>Chikungunya islote AMA2798/H804298</i>	KP164567.1	Genómico	Brasil	2015
<i>Chikungunya islote DH130003</i>	KM673291.1	Genómico	Alemania	2015

ANEXO 13 SECUENCIAS DE ZIKA SELECCIONADAS PARA REALIZAR ALINEAMIENTOS

NOMBRE	Código de acceso de NCBI	Secuencia	Lugar	Año
<i>Zika islote MEX</i>	KU686218.1	Poliproteína estructural	México	2015
<i>Zika islote MEX2</i>	KU556802.1	Poliproteína estructural	México	2015
<i>Zika cepa MRS OPY</i>	KU647676.1	Poliproteína estructural	París, Francia	2016
<i>Zika cepa Haiti/1225/2014</i>	KU509998.1	Genómico	Haití	2014
<i>Zika cepa ZikaSPH2015</i>	KU321639.1	Genómico	Brasil	2016
<i>Zika cepa CHI1410214</i>	KM078936.1	Poliproteína estructural	Caribe	2015
<i>Zika cepa H/PF/2013</i>	KJ776791.1	Poliproteína estructural	Francia	2013
<i>Zika cepa 103344</i>	KU501216.1	Poliproteína estructural	Estado Unidos	2016
<i>Zika cepa PRVABC59</i>	KU501215.1	Genómico	Estado Unidos	2016
<i>Zika cepa BeH815744</i>	KU365780.1	Poliproteína estructural	Brasil	2015
<i>Zika cepa BeH819015</i>	KU365778.1	Poliproteína estructural	Brasil	2016
<i>Zika cepa Z1106033</i>	KU312312.1	Poliproteína estructural	Francia	2016
<i>Zika cepa MR766</i>	LC002520.1	Genómico	Japón	2014
<i>Zika cepa ArD158095</i>	KF383121.1	Poliproteína estructural	Brasil	2014
<i>Zika cepa ArD158084</i>	KF383119.1	Poliproteína estructural	Brasil	2014
<i>Zika islote 30656</i>	HQ234500.1	Poliproteína estructural	Uganda	2013
<i>Zika cepa ArA27443</i>	KF383106.1	Poliproteína estructural	Brasil	2014
<i>Zika cepa ArD149810</i>	KF383093.1	Poliproteína estructural	Brasil	2014

