



T E S I S

Que para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A

Biol. Exp. Jeshermi Elisen De la Cruz Pérez

Comité Tutorial:

Dra. María Rosalía Lira Carmona

Dra. Roxana Uri Miranda Labra

M. en C. Ma. Angélica Maldonado Rodríguez

Febrero 2018

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: **592842**

Proyecto apoyado por el Fondo de Investigación en Salud, número de registro: **FIS-IMSS/PROT/G16/1574**

Programa para la formación de investigadores del Instituto Mexicano del Seguro Social, folio de becario: **2017-16**.

Red Mexicana de Virología-CONACyT: **269826**

Red INMUNOCANEI-CONACyT: **269316**

Miembros del jurado

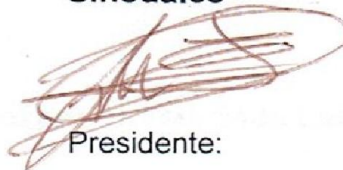
El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

Diagnóstico molecular diferencial del virus Dengue y Chikungunya, utilizando la técnica de amplificación isotérmica mediada por “asa” (RT-LAMP), que presentó

Jeshermi Elisen De la Cruz Pérez

El día 28 de Febrero del año 2018

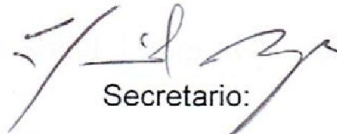
Sinodales



Presidente:

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, Laboratorio de Fisiología Celular



Secretario:

Dr. Edgar Enrique Sevilla Reyes

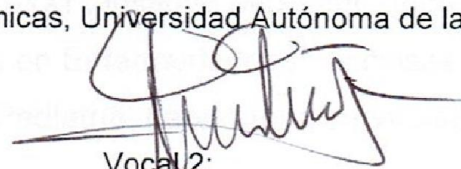
Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER)



Vocal 1:

Dra. Martha Eugenia Yocupicio Monroy

Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México



Vocal 2:

Dr. Jesús Miguel Torres Flores

Laboratorio de virología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO


No. 00189

Matricula: 2153803799

Diagnóstico molecular diferencial del virus Dengue y Chikungunya, utilizando la técnica de amplificación isotérmica mediada por "asa" (RT-LAMP)

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 28 del mes de febrero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ
- DRA. ROSA MARTHA EUGENIA YOCUPICIO MONROY
- DR. JESUS MIGUEL TORRES FLORES
- DR. EDGAR ENRIQUE SEVILLA REYES



JESHHERMI ELISEN DE LA CRUZ PEREZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

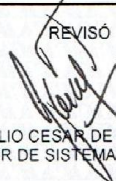
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JESHHERMI ELISEN DE LA CRUZ PEREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES


Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS




DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



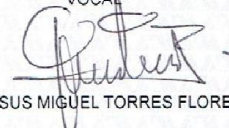
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL



DRA. ROSA MARTHA EUGENIA YOCUPICIO MONROY

VOCAL



DR. JESUS MIGUEL TORRES FLORES

SECRETARIO



DR. EDGAR ENRIQUE SEVILLA REYES

Miembros del comité tutorial

Dra. María Rosalía Lira Carmona

Co-directora externa

Centro Médico Nacional “Siglo XXI”, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, UMAE
Hospital de Pediatría, Laboratorio de virología

Dra. Roxana Uri Miranda Labra

Co-directora interna

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Departamento de Ciencias
Biológicas y de la Salud, Laboratorio de Fisiología Celular

M. en C. Ma. Angélica Maldonado Rodríguez

Asesora externa

Centro Médico Nacional “Siglo XXI”, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, UMAE
Hospital de Pediatría, Laboratorio de virología

RESUMEN

El incremento de arbovirosis en los últimos años por la co-circulación de los mosquitos *Aedes aegypti* y *A. albopictus* ha facilitado la diseminación de nuevos virus en zonas donde los recursos para el diagnóstico son limitados. En México, el Dengue es considerado endémico, el primer brote de Chikungunya fue en el 2015, seguido de un brote de Zika en el 2016, dificultando el diagnóstico por la similitud de los síntomas y la reactividad cruzada entre flavivirus.

Actualmente en México, la confirmación del diagnóstico se realiza en los laboratorios de referencia, mediante una RT-qPCR trioplex o una ELISA, por lo que es necesario implementar métodos de detección menos costosos, rápidos y accesibles como lo es la amplificación isotérmica mediada por “asa” (LAMP). LAMP amplifica a una temperatura constante a partir de DNA o RNA, ya que emplea una *Bst* DNA polimerasa que puede actuar como retrotranscriptasa y posee actividad de desplazamiento de cadena, la especificidad del ensayo es debido al diseño de cuatro primers que flanquean seis regiones diferentes del genoma.

El objetivo de este trabajo fue establecer dos sistemas de detección del genoma viral mediante RT-LAMP para Dengue y Chikungunya, la estandarización se llevó a cabo bajo condiciones controladas a 65°C, el tiempo de la reacción se estableció en 45 min para CHIKV y 1h para DENV, se incluyó al ZIKV como control de especificidad de primers para DENV, los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa.

Los ensayos de RT-LAMP fueron evaluados por duplicado en 95 muestras de plasma obtenidos de pacientes con sospecha de infección por DENV o CHIKV en Veracruz durante septiembre-octubre de 2015. Como estándar de oro se empleó un ensayo de RT-qPCR que incluía los 4 serotipos de DENV, ZIKV, CHIKV, Virus de la fiebre amarilla (YFV) y al Virus del Oeste del Nilo (WNV). También se empleó una RT-PCR de punto final y se realizó la serología para detección de IgM de DENV y CHIKV en las muestras.

El resultado por RT-LAMP y RT-qPCR para DENV fueron 2/95 muestras positivas, para CHIKV por RT-qPCR se obtuvieron 41/95 muestras positivas para CHIKV y por RT-LAMP fueron 45/95 muestras positivas, de las cuales 13/95 son falsos positivos y 9/95 son falsos negativos. La sensibilidad y especificidad del ensayo de RT-LAMP para DENV fue del 100%, no se detectó hibridación inespecífica entre DENV y ZIKV. El ensayo de RT-LAMP para CHIKV tuvo una sensibilidad del 78% y una especificidad del 75% comparado con el ensayo de RT-qPCR. La detección de IgM para DENV se encontró en 4/95 muestras y la IgM para CHIKV en 36/95 muestras. El resultado conjunto de las pruebas moleculares y serológicas demuestran que 66/95 pacientes tuvieron infección por CHIKV. No se detectó Zika en ninguna de las muestras.

El ensayo de RT-LAMP, demostró su utilidad para detectar el genoma de DENV y CHIKV en muestras de pacientes, permitiendo así implementar otra herramienta para el diagnóstico temprano en los sitios que se presentan los brotes epidémicos.

ABSTRACT

The increase of arboviruses in recent years due the co-circulation of *Aedes aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes has facilitated the spread of new viruses in areas where diagnostic resources are limited. For many years Dengue virus (DENV) has been endemic in Mexico, but first Chikungunya virus (CHIKV) outbreak occurred during 2015, followed by Zika outbreak in 2016, compromising the diagnosis by the similarity of symptoms and cross-reactivity between DENV and Zika virus (ZIKV).

In Mexico, the diagnosis is performed by reference laboratories, using RT-qPCR triplex or ELISA assay, so is necessary implement less expensive, rapid and specific detection methods as loop-mediated isothermal amplification (LAMP). LAMP amplifies at isothermal temperature using DNA or RNA as template, this method employs a *Bst* DNA polymerase with retrotranscriptase and strand displacement activity, and a set of four specially designed primers that recognize a total of six distinct sequences on the target DNA.

The aim of this work was to establish two detection systems of viral genome using RT-LAMP for DENV and CHIKV, standardization was carried out under controlled conditions at 65°C, the reaction time set was 45 min for CHIKV and 1h for DENV, ZIKV control was included for verify specificity of DENV primers, the amplified products were visualized in agarose gel.

The RT-LAMP assays were evaluated for duplicate in 95 acute plasma samples collected from patients with suspected DENV or CHIKV infection in Veracruz during September-October 2015. As gold standard, RT-qPCR assay was performed

included all serotypes of DENV, ZIKV, CHIKV, Yellow Fever Virus (YFV) and West Nile Virus (WNV). Conventional RT-PCR and detection of IgM of DENV and CHIKV also performed in all the samples.

The result by RT-LAMP and RT-qPCR assays for DENV were 2/95 positive samples, for CHIKV by RT-qPCR 41/95 positive samples were obtained for CHIKV and by RT-LAMP were 45/95 positive samples, of which 13 / 95 are false positives and 9/95 are false negatives. The sensitivity and specificity of RT-LAMP assay for DENV was 100%, nonspecific hybridization no detected between DENV and ZIKV. For CHIKV sensitivity was 78% and specificity was 75% compared to the RT-qPCR assay.

The IgM-DENV detection was found in 4/95 samples and IgM-CHIKV in 36/95 samples. Molecular and serological tests confirm CHIKV infection in 66/95 patients RT-LAMP assay demonstrated usefulness for detection DENV and CHIKV genome in patient samples, allowing the implementation of another tool for early diagnosis in low resource setting.

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| Número de registro de becario..... | i |
| Miembros del jurado..... | ii |
| Acta de examen de grado..... | iii |
| Miembros del comité de posgrado..... | iv |
| RESUMEN..... | v |
| ABSTRACT..... | vii |
| 1.-INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Arbovirosis..... | 1 |
| 1.2 Dengue..... | 2 |
| 1.2.1 Estructura y genoma..... | 3 |
| 1.2.2 Proteínas virales..... | 3 |
| 1.2.2.1 Proteínas Estructurales..... | 3 |
| 1.2.2.2 Proteínas No Estructurales..... | 4 |
| 1.2.3 Ciclo y replicación viral..... | 5 |
| 1.2.4 Evolución clínica de la enfermedad..... | 6 |
| 1.2.5 Epidemiología..... | 8 |
| 1.3 Chikungunya..... | 10 |
| 1.3.1 Estructura y genoma..... | 10 |
| 1.3.2 Proteínas virales..... | 11 |
| 1.3.2.1 Proteínas No Estructurales..... | 11 |
| 1.3.2.2 Proteínas Estructurales..... | 12 |

| | |
|---|----|
| 1.3.3 Ciclo y replicación viral..... | 13 |
| 1.3.4 Evolución clínica de la enfermedad..... | 15 |
| 1.3.5 Epidemiología..... | 15 |
| 1.4 Métodos de diagnóstico..... | 17 |
| 1.5 RT-LAMP..... | 21 |
| 1.5.1 Métodos de detección..... | 26 |
| 2.- ANTECEDENTES..... | 28 |
| 3.-JUSTIFICACIÓN..... | 29 |
| 4.- HIPÓTESIS..... | 30 |
| 5.-OBJETIVO GENERAL..... | 30 |
| 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES..... | 30 |
| 6.- MATERIAL Y MÉTODOS..... | 30 |
| 7.-RESULTADOS..... | 37 |
| 8.- DISCUSIÓN..... | 56 |
| 9.-CONCLUSIONES..... | 64 |
| 10.-PERSPECTIVAS..... | 65 |
| 11.- BIBLIOGRAFÍA..... | 66 |
| 12.-ANEXOS..... | 74 |

1.-INTRODUCCIÓN

1.1 Arbovirosis

Las enfermedades infecciosas emergentes son de reciente aparición en la población y se incrementan en un radio geográfico determinado. Para que exista una infección emergente, hay diversos factores involucrados, los cuales incluyen: un patógeno, un vector y un hospedero que facilite la diseminación en la población. La actividad humana, el cambio climático, la deforestación y la expansión de la población, ha facilitado que este tipo de fenómenos sean más frecuentes, generando lo que se conoce como una triada epidemiológica, la cual pretende representar los principales agentes causales que propaguen una enfermedad (Fig. 1) [1].

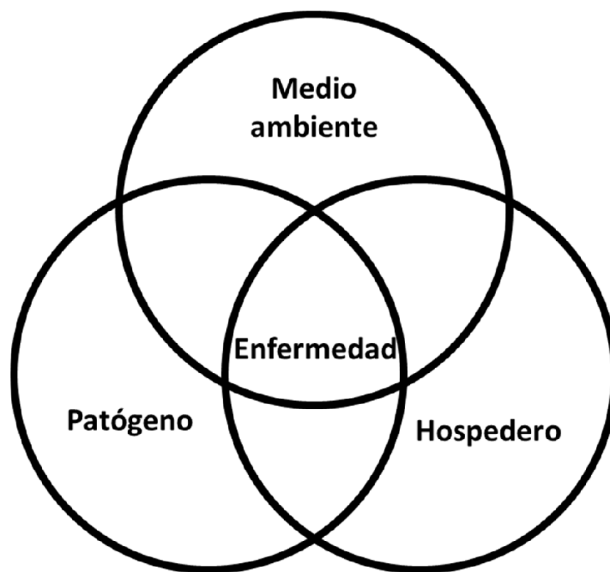


Figura 1.- Triada epidemiológica. La interacción entre el patógeno, el hospedero y el medio ambiente tienden a guardar un equilibrio que se manifiesta como la enfermedad.

Dentro de este tipo de enfermedades emergentes están las ocasionadas por los arbovirus, los cuales son virus transmitidos por artrópodos, donde los mosquitos actúan como su principal vector, y mantienen un ciclo de transmisión con hospederos vertebrados. La mayoría de los arbovirus son de RNA, de las familias *Flaviviridae*, *Togaviridae* y *Bunyaviridae* principalmente. Las infecciones por arbovirus pueden ser asintomáticas, sintomáticas y en pocos casos resulta ser fulminante, los síntomas clínicos generalmente se clasifican como enfermedades febriles sistémicas, fiebres hemorrágicas y enfermedades neurológicas invasivas [2].

1.2 Dengue

1.2.1 Estructura y genoma

El virus del Dengue (DENV) es un flavivirus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, del cual se conocen cuatro serotipos (DENV1-4) y es transmitido por la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes*, generalmente *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus* [3]. El DENV es un virus envuelto con cápside icosaédrica de aproximadamente 50 nm (Fig. 2), su genoma es de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva (ssRNA+) de 10.7 Kb que codifica para una poliproteína que será escindida en tres proteínas estructurales: cápside (C), Pre-Membrana (PrM) y Envoltura (E), y para siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. El genoma del DENV posee en el extremo 5' una estructura cap (m7GpppAmp) y en el extremo 3' carece de una cola poliadenilada, pero en ambos extremos está flanqueado por regiones no traducibles (UTR-5' y UTR-3') que participan durante la replicación y la traducción (Fig. 2) [4].

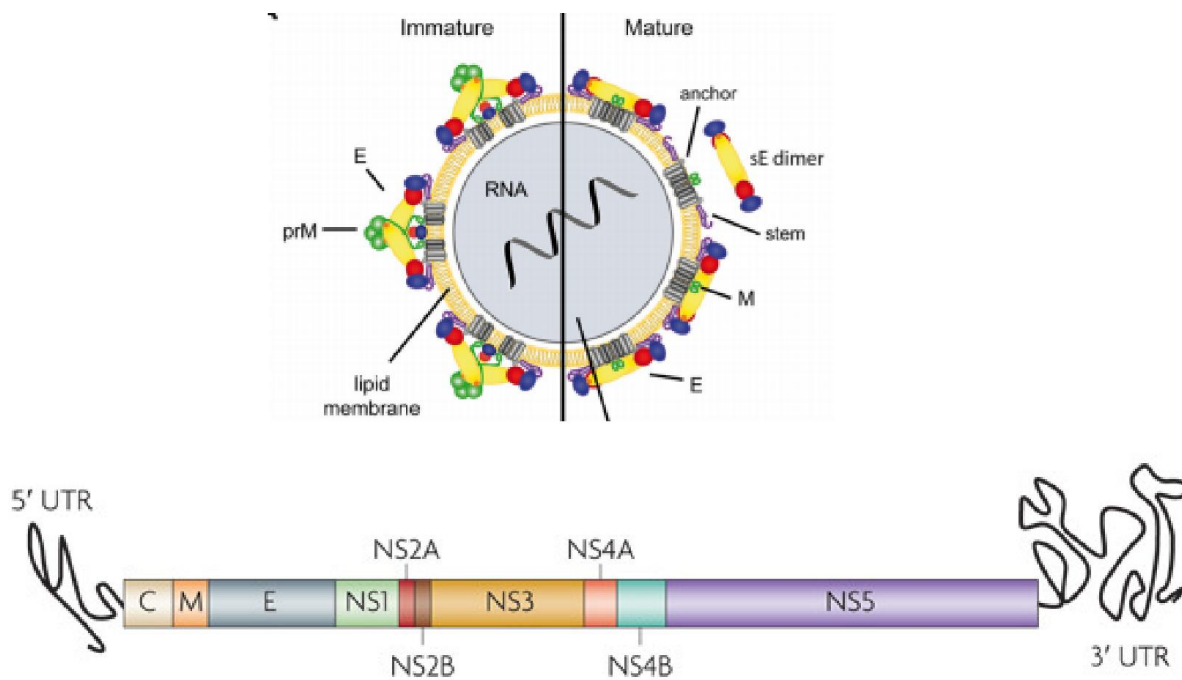


Figura 2.- Estructura y organización genómica del virus Dengue [5] [4] El DENV es icosaédrico de aproximadamente 50nm. El genoma es de ssRNA+ que codifica para una poliproteína que será escindida en 3 proteínas estructurales (C, M y E) y 7 no estructurales (NS1-NS5).

1.2.2 Proteínas virales

1.2.2.1 Proteínas estructurales

Proteína C.- La proteína de la cápside de aproximadamente 11 kDa, forma la estructura de la nucleocápside que empaqueta el genoma viral, consiste en un monómero constituido por cuatro alfa hélices y una región N-terminal que interactúa con las gotas lipídicas intracelulares del huésped para formar la partícula viral [6].

Proteína precursora de membrana (prM) y proteína de membrana (M). La proteína precursora de membrana (prM) tiene un peso molecular de 26 kDa y es procesada después de la traducción por una furina, la cual es una proteasa encargada de la fragmentación del prM para dar origen a la proteína M cuyo peso es de 8 kDa, la cual participa en el proceso de maduración de la partícula viral [7].

Proteína de envoltura (E). La proteína de envoltura tiene un peso molecular de 50 kDa y es la encargada de interactuar con el receptor celular para inducir la endocitosis y la fusión de membranas [8].

1.2.2.2 Proteínas no estructurales.

Proteína No Estructural 1 (NS1) de aproximadamente 46 kDa y forma dímeros o hexámeros asociados a balsas lipídicas de la membrana plasmática. También se puede encontrar libre en el citoplasma y en el espacio extracelular; por esta razón, NS1 puede estimular al sistema inmunitario.

Proteína No Estructural 2A (NS2A) es una proteína de 22 kDa que promueve el ensamblaje y la replicación viral, ya que coordina si el RNA genómico producido en cada ciclo de replicación es usado para generar nuevas formas replicativas o si se encapsida el RNA [9].

Proteína No Estructural 2B (NS2B) es una proteína de 14 kDa posee una región hidrofóbica que ancla a la membrana del retículo endoplásmico el complejo

NS2B/NS3 y luego, por un procesamiento proteolítico, un pequeño dominio hidrofílico de NS2B recién liberado interactúa con el dominio proteasa de la proteína NS3 para actuar como cofactor de ésta [9].

Proteína No Estructural 3 (NS3) es una proteína de 70 kDa que actúa como trifosfatasa de nucleótidos y como helicasa del RNA; ambas funciones son indispensables en la replicación viral [10].

Proteínas No Estructurales 4A y 4B (NS4A y NS4B) son proteínas que desempeñan múltiples funciones en la formación de complejos de replicación del virus. Un estudio sugiere que la proteína NS4A induce la autofagia para prevenir la muerte celular y facilitar la replicación viral [11], mientras que NS4B interactúa con el dominio helicasa de NS3 y lo disocia del RNA monocatenario [12].

Proteína No estructural 5 (NS5) tiene un peso de aproximadamente 103 kDa, posee un dominio N-terminal que actúa como metiltransferasa necesario para la síntesis del cap y un dominio C-terminal con actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA [13].

1.2.3 Ciclo y Replicación viral

La entrada del virus a la célula comienza con una interacción entre DENV y la superficie de la célula (Fig. 3), en donde la proteína E interactúa con los proteoglicanos como el heparán sulfato [14] y con el receptor para laminina LAMR1

[15], la proteína de adhesión celular ICAM-3 o DC-SIGN (Dendritic Cell Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin, CD209).

Después de la unión del virus al receptor, es endocitado en el endosoma tardío donde, se degrada la cápside y se libera el RNA viral en el citoplasma, que es traducido en una única poliproteína que será escindida por las proteasas celulares en diferentes proteínas [16].

El primer paso del proceso de replicación origina formas circulares del genoma viral por interacción de los extremos 5'-UTR y 3' UTR mediada por dos secuencias complementarias: Secuencia de ciclización (CS) en ambos extremos y una región corriente arriba del codón AUG 5' (UAR) así como Intermediarios Replicativos (RIs) y Formas Replicativas (Rfs). En el segundo paso se lineariza el RNA con ayuda de la proteína NS3, la cual va a formar un complejo con NS5 (NS3-NS5) para que se lleve a cabo la elongación de la hebra negativa, la cual servirá de molde para la síntesis de la hebra positiva [17]. Durante el ensamblaje del virión, el RNA viral recién sintetizado interactúa con la proteína C para formar la nucleocápside. El proceso de maduración tiene lugar en la red trans-Golgi donde prM es escindido por una furina del huésped, lo que genera un virión maduro de superficie lisa, que es liberado al medio extracelular [18].

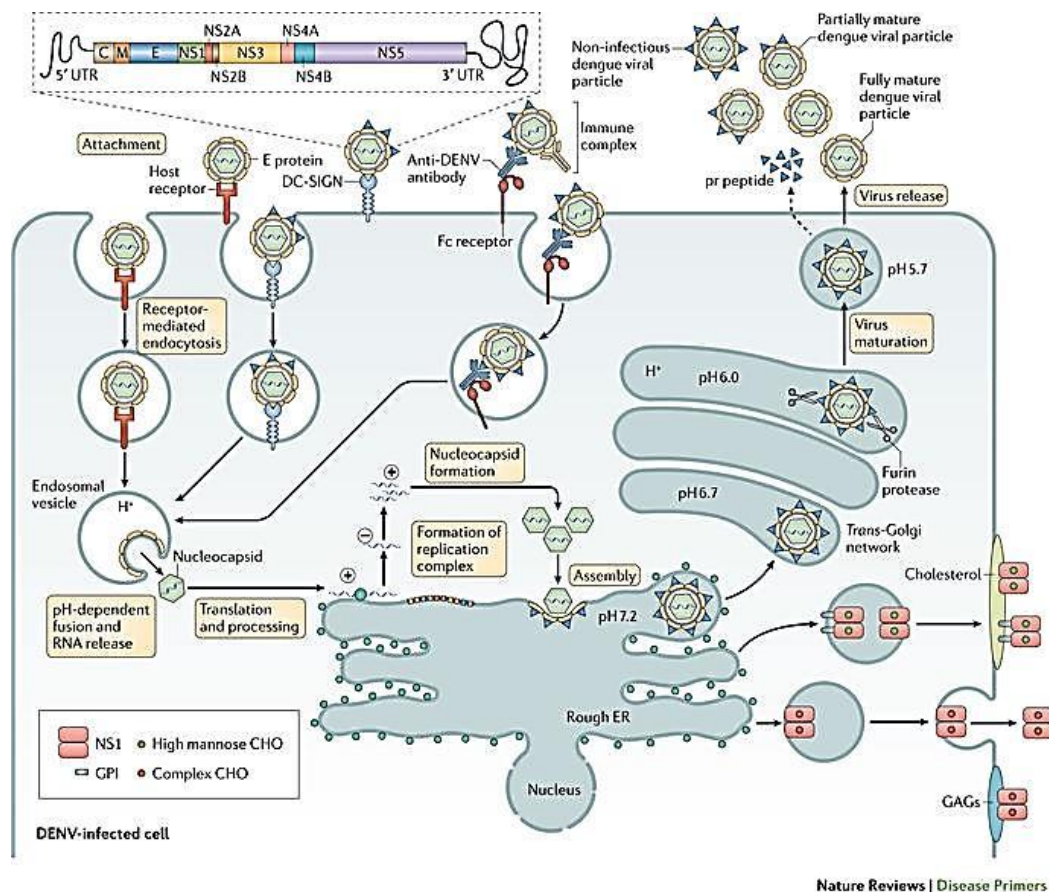


Figura 3.-Replicación viral del Dengue [19] El virus se une a la célula huésped mediante la interacción con el receptor seguido de la endocitosis, en el endosoma se lleva a cabo la fusión de membranas y liberación del RNA que es traducido en el citoplasma, la poliproteína es procesada por proteasas virales y celulares. El RNA es replicado y las cadenas de polaridad positiva son encapsidadas, se ensambla la membrana y se procesa la proteína viral PrM a M para ser liberado el virión por exocitosis.

1.2.4 Evolución clínica de la enfermedad

El dengue suele tener dos formas de clasificación: Dengue y Dengue grave el cual está relacionado con la fiebre hemorrágica del dengue (FHD). Los síntomas de la enfermedad por dengue son: fiebre elevada de hasta 40°C, dolor de cabeza intenso, dolor retro-ocular, muscular y/o articular, náuseas, vómitos, agrandamiento de ganglios linfáticos o salpullido. Los síntomas tienen una duración de 3 a 5 días

después de los cuales se adquiere inmunidad contra el serotipo en particular, sin embargo se ha descrito que las infecciones posteriores causadas por un serotipo diferente incrementan el riesgo de padecer el dengue grave [20]. No existe un tratamiento específico para la enfermedad, solo se ha indicado la administración de fármacos que disminuyan las molestias [21].

1.2.5 Epidemiología

En 2015, se reportaron en México 26,665 casos de DENV y en el estado de Veracruz se presentó la mayor incidencia. Durante el 2016, se confirmaron 17,795 casos y 130,069 sospechas. En el 2017 se confirmaron un total de 14,138 casos y 89,893 sospechas de infección por DENV. [22].

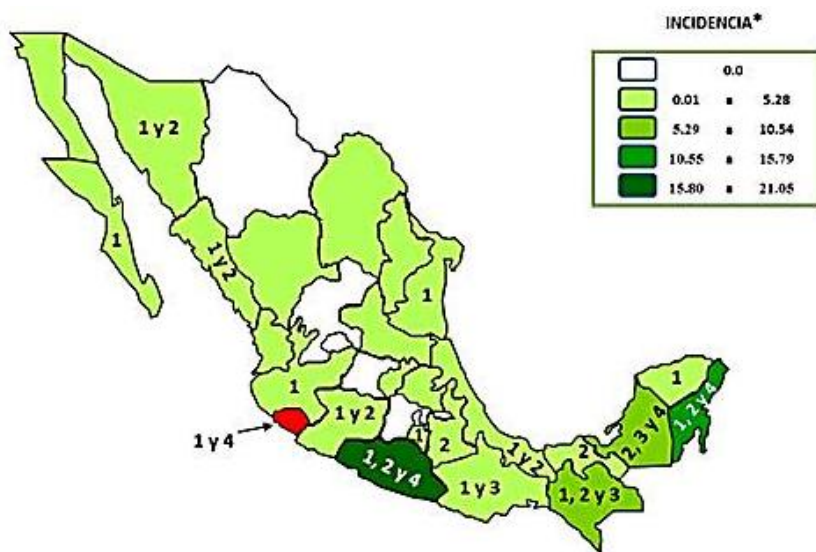


Figura 4.- Incidencia del dengue en México durante el 2015 [22]. Los estados de la republica con un número mayor de casos confirmados por DENV se encuentran en verde. En rojo se encuentra el estado con mayor incidencia (Colima).

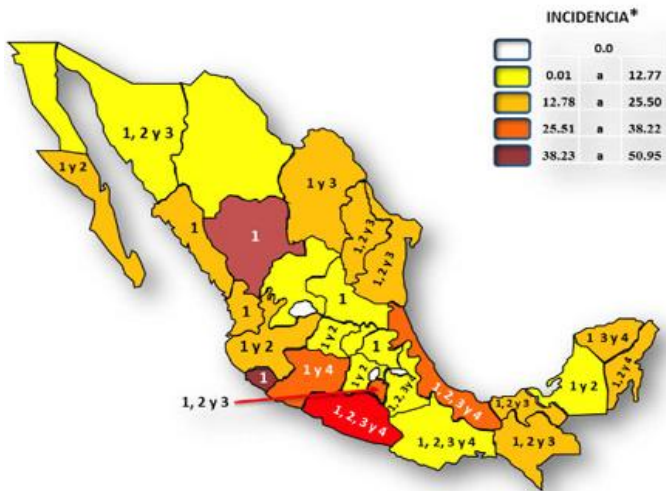


Figura 5.- Incidencia del dengue en México durante el 2016 [22]. Los estados de la republica con un número mayor de casos confirmados por DENV se encuentran en vino. En rojo se encentra el estado con mayor incidencia (Guerrero).

En México durante el 2016, el 63% de esos casos confirmados corresponden a Guanajuato, Chiapas, Nuevo León, Veracruz y Jalisco. En el 2017 Guanajuato es el estado que presenta mayor incidencia [22].

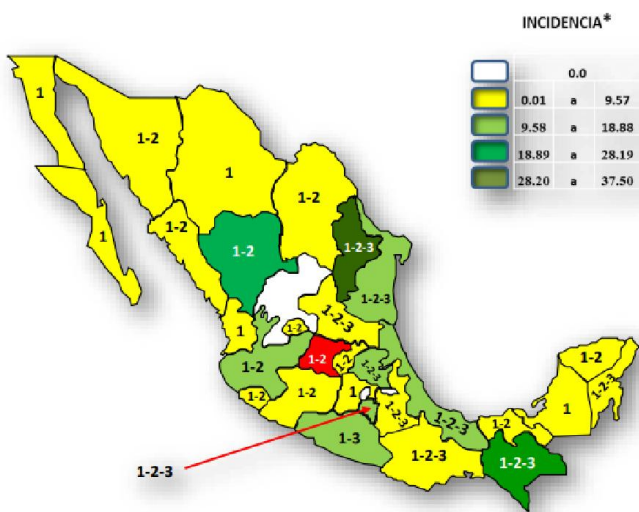


Figura 6.- Incidencia del dengue en México durante el 2017 [22]. Los estados de la republica con un número mayor de casos confirmados por DENV se encuentran en verde. En rojo se encentra el estado con mayor incidencia (Guanajuato).

1.3 Chikungunya

1.3.1 Estructura y genoma

El virus Chikungunya (CHIKV) es un alfavirus que pertenece a la familia *Togaviridae*, es un virus envuelto y posee una cápside icosaédrica, tiene un diámetro aproximado entre 65-70nm, su genoma (Fig. 7) es de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva de aproximadamente 11.8 Kb que tiene dos marcos abiertos de lectura (ORF) que codifica para una poliproteína que será escindida en cuatro proteínas no estructurales (nsP1-4), y las cinco proteínas estructurales (Cápside, E3, E2, 6K y E1), se traducen en una poliproteína a partir de un mRNA subgenómico (mRNA 26S) [23].

El genoma tiene dos regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5' y 3' que desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión génica del virus. El extremo 5' posee una cap 7-metilguanosa y en el 3' una cola de poli(A) [24].

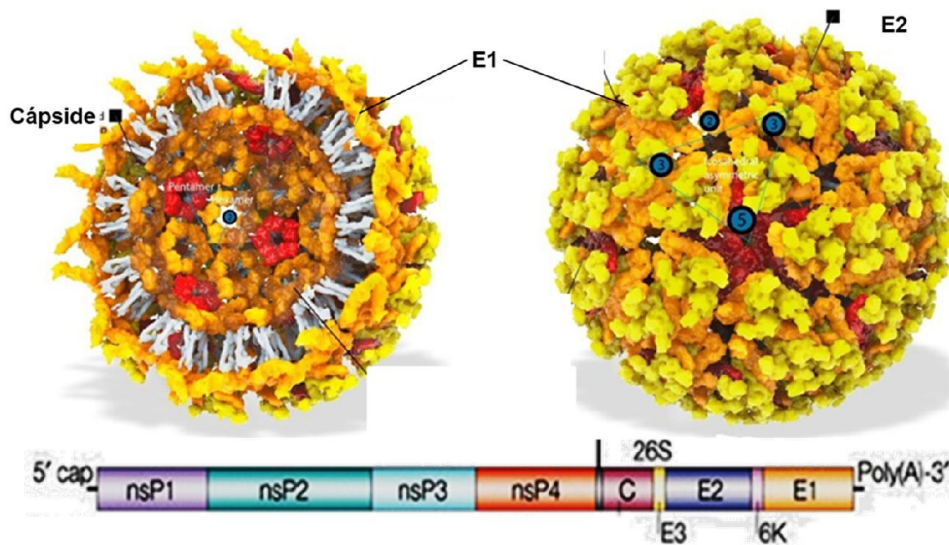


Figura 7.- Estructura de y organización genómica de Chikungunya [25] El CHIKV posee una cápside icosaédrica de aproximadamente 60nm. Su genoma es de ssRNA+ y codifica para 2 poliproteínas, que serán procesadas en 4 proteínas no estructurales y 5 no estructurales.

1.3.2. Proteínas virales

1.3.2.1 Proteínas no estructurales

La Proteína No Estructural 1 (nsP1) tiene un peso molecular aproximado de 60 kDa y tiene dos funciones principales durante la replicación, la primera es como N7-metiltransferasa para evitar la degradación del RNA y como estabilizador del complejo nsP1-3 para la replicación del genoma [26].

La Proteína No Estructural 2 (nsP2) tiene un peso de 90 kDa, es una enzima multifuncional que actúa como trifosfatasa en el extremo N y como proteasa en extremo C, cuando nsP2 se trasloca al núcleo antagoniza la respuesta antiviral al inhibir la respuesta a Interferón [27].

La Proteína No Estructural 3 (nsP3) tiene un peso de 60 kDa y es requerida para la correcta formación y localización de los complejos de replicación en el mRNA subgenómico y la síntesis de RNA de cadena negativa [28].

La Proteína No Estructural 4 (nsP4) con un peso de 70 kDa es una polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp) responsable de la replicación del genoma viral [29].

1.3.2.2 Proteínas Estructurales

Proteína de la Cápside (C) Tiene un peso de 30 kDa y se sintetiza a partir del RNA subgenómico, además de contener al RNA posee una actividad de serina proteasa [30].

Proteínas de envoltura

La Proteína E3 de 7.3 kDa juega un papel importante en la estabilización y la protección del trímero inmaduro, induciendo el plegamiento y activación de las proteínas durante la entrada del virus [31].

La Proteína E2 tiene un peso de aproximadamente 50 kDa y es la proteína que interactúa con el receptor del hospedero, E2 forma un heterodímero estable con E1 para dar una estructura de espiga indispensable para la producción de partículas infecciosas [32].

Proteína 6k: Es una proteína de 6 kDa codificada por un gen que se encuentra entre E1 y E2. Es una proteína hidrofóbica, rica en cisteínas, se considera que codifica para una viroporina que participa en el proceso de exocitosis del virión [33].

La Proteína E1 de 50 kDA, es la responsable de mediar la fusión viral entre la membrana del virus y la membrana de la célula huésped durante la infección [34].

1.3.3 Ciclo y Replicación viral

Como primer paso durante la infección, la proteína E2 del virus interactúa con algún receptor celular como: Prohibitina (PHB), fosfatidilserina (PtdSer), glicosaminoglicanos (GAGs) y la familia de las integrinas, estos receptores facilitan la entrada del virus, sin embargo no son un requisito para que ocurra la endocitosis [35]. Ya en el endosoma, E1 sufre un cambio conformacional que promueve la fusión de membranas permitiendo la liberación del material genético en el citoplasma. El RNA libre se traduce en una poliproteína que contiene a las proteínas no estructurales (P1234), que forman el complejo de replicación para la síntesis de la cadena negativa, la cual servirá de molde para la síntesis del RNA genómico 49S y el subgenómico 26S. El mRNA subgenómico 26S se traduce para dar la poliproteína que contendrá las proteínas estructurales C, E3, E2, 6k y E1 [36].

Posteriormente las proteínas se dirigen al RE para ser sometidas a modificaciones postraduccionales, E1 y E2 se heterodimerizan y se transportan a la membrana plasmática de la célula hospedera, donde se incorporan a la superficie del virión

como espigas triméricas. La proteína de la cápside se asocia en el citoplasma, formando la nucleocápside icosaédrica que contiene el RNA. Finalmente, los viriones maduros se ensamblan en la membrana plasmática y brotan de la célula huésped infectada [37].

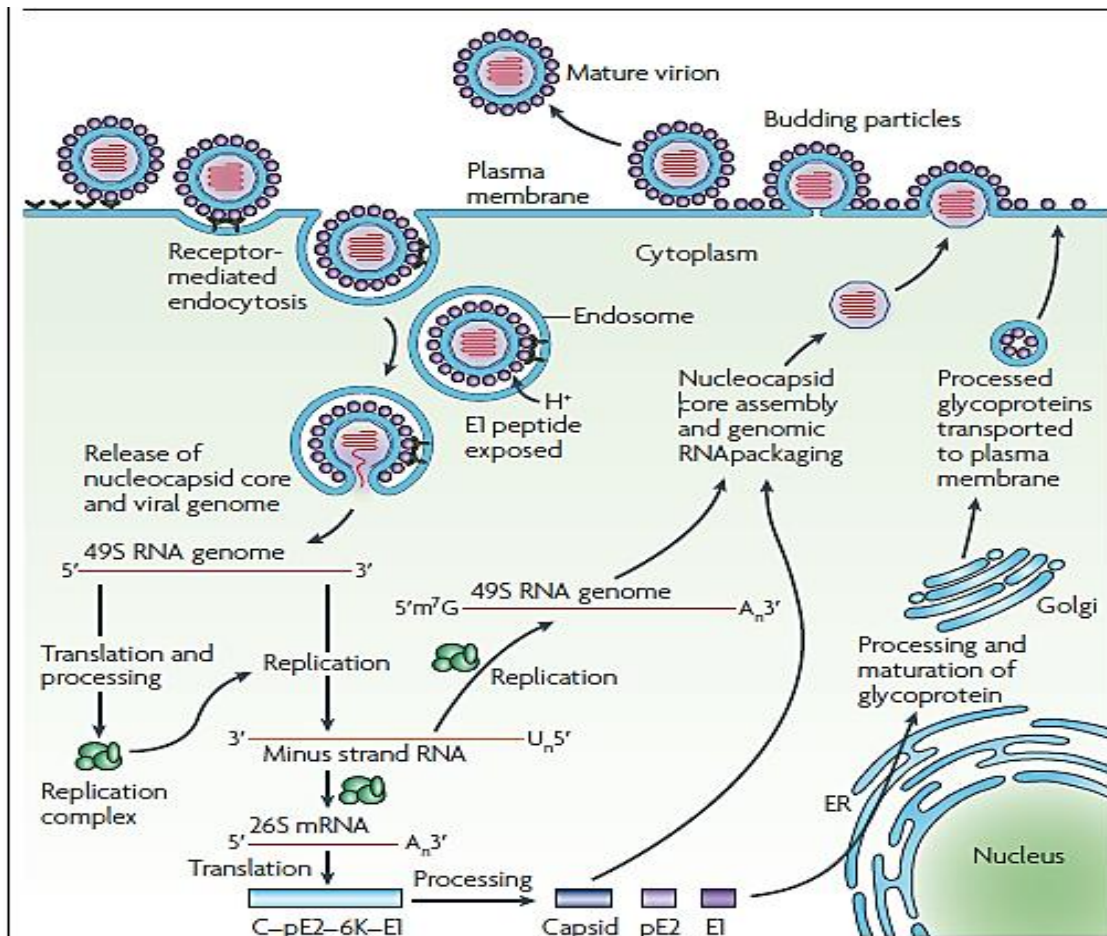


Figura 8.- Ciclo de replicación viral de CHIKV [38]. La unión del virus al receptor facilita la endocitosis, en el endosoma ocurre la fusión de membranas y posterior liberación del RNA en el citoplasma donde es traducido el primer ORF generando las proteínas no estructurales, la replicación se lleva a cabo y después se traduce el segundo ORF para generar las proteínas estructurales. El RNA (+) es empaquetado en la nucleocápside y finalmente el virión maduro es liberado por exocitosis.

1.3.4 Evolución clínica de la enfermedad

El periodo de incubación del CHIKV es corto, entre 2 y 4 días, se caracteriza por la aparición súbita de fiebre, generalmente acompañada de dolores articulares. Otros signos y síntomas frecuentes son: dolores musculares, dolores de cabeza, náuseas, cansancio y erupciones cutáneas. Los dolores articulares suelen ser incapacitantes y generalmente desaparecen en pocos días, sin embargo hay reportes de que el virus puede persistir causando una enfermedad crónica [39]. Se han descrito casos ocasionales con complicaciones oculares, neurológicas y cardíacas, y también con molestias gastrointestinales. Las complicaciones graves no son frecuentes, pero en personas mayores la enfermedad puede contribuir a la muerte. Frecuentemente entre el 72 y el 97% de los pacientes solo tienen síntomas leves y la infección puede pasar inadvertida o diagnosticarse erróneamente en zonas donde circulan otros arbovirus [40].

1.3.5 Epidemiología

Sólo existe un serotipo, y tres genotipos principales: Oeste de África (WAF), Este, Centro y Sur de África (ECSA), y Asiático. El CHIKV es transmitido por el mismo vector que el DENV o recurrente que dura meses o años [39]. El CHIKV fue reportado en México a finales de mayo de 2014, con un total de 155 casos, en 2015 se confirmaron 11, 577 (Fig. 9). Los estados con mayor incidencia fueron Veracruz, Yucatán, Guerrero y Oaxaca. Durante el 2016 se reportaron 757 casos y para el 2017 únicamente se tuvieron 57 casos confirmados (Fig. 10) [41].

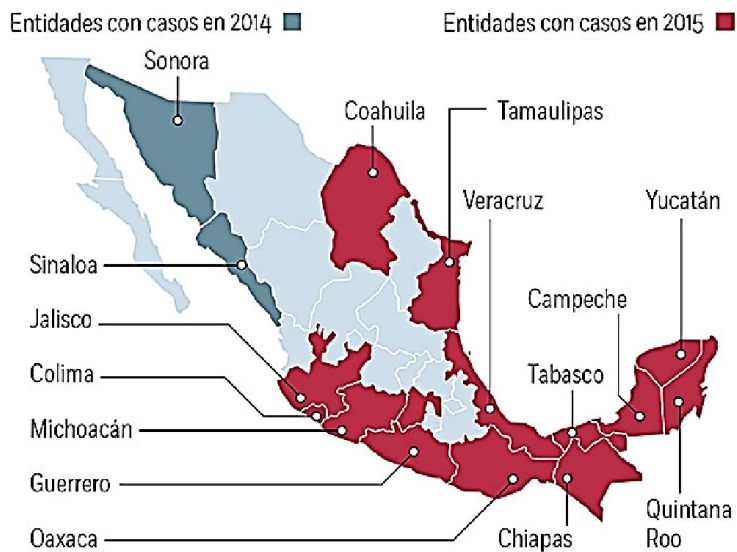


Figura 9.- Incidencia de Chikungunya en el 2015. Los estados representados en azul contienen los casos confirmados durante el 2014 y en rojo se observan los del 2015.

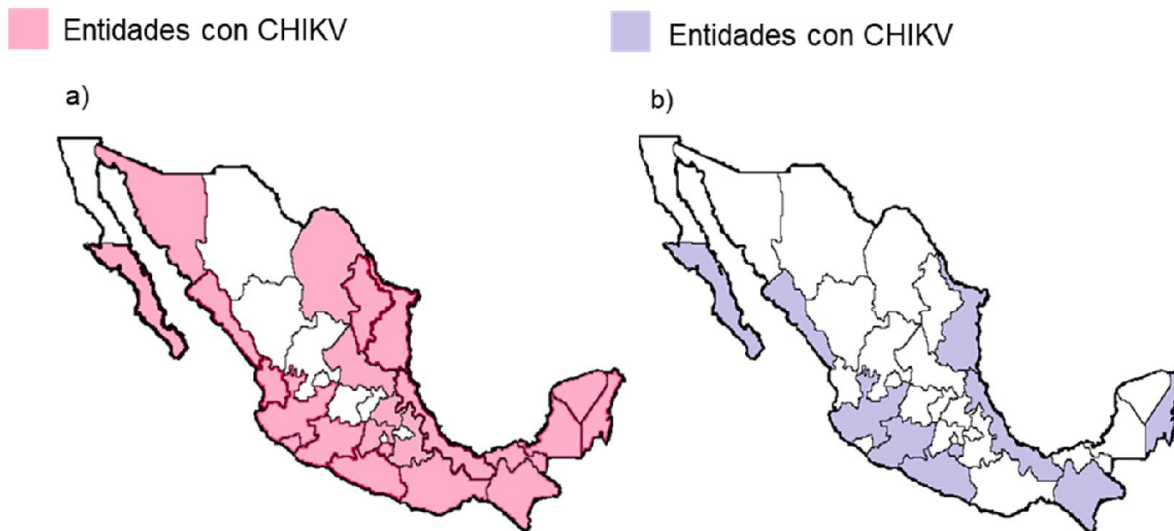


Figura 10.- Incidencia de Chikungunya en México: a) En rosa se representan los estados que presentaron casos confirmados durante el 2016. b) En morado se representan los estados que presentaron casos confirmados durante el 2017.

No existe un tratamiento específico para tratar las enfermedades, únicamente se prescriben fármacos para controlar los síntomas como el dolor en las articulaciones. Tampoco existe una vacuna disponible para prevenir la infección por este virus [42].

Debido a la circulación de los mosquitos *Aedes* en las zonas endémicas de DENV, es más probable que existan infecciones concurrentes en los próximos brotes.

En México, en Octubre de 2015 se dio el primer caso autóctono por ZIKV en Monterrey [43]. Entre el 2015 y 2017 se registraron 11,863 casos confirmados, de los cuales 6,951 corresponden a mujeres embarazadas [44].

1.4 Métodos de diagnóstico

El diagnóstico basado en la clínica es lo más frecuente, pero además existen métodos de laboratorio que incluyen: el aislamiento viral, los ensayos moleculares y serológicos. El aislamiento viral requiere de un laboratorio con infraestructura y nivel de bioseguridad 3, además de que es un procedimiento que requiere de varios días. La detección de anticuerpos (IgM) mediante serología, y la detección de ácidos nucleicos por RT-PCR. En México el diagnóstico de estos virus se realiza en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE), cuyo algoritmo está basado en lo propuesto por la CDC que incluye ensayos moleculares mediante una Triplex RT-qPCR si el paciente se encuentra en fase aguda, es decir, dentro de los primeros 5 días de inicio de los síntomas (Fig.11).

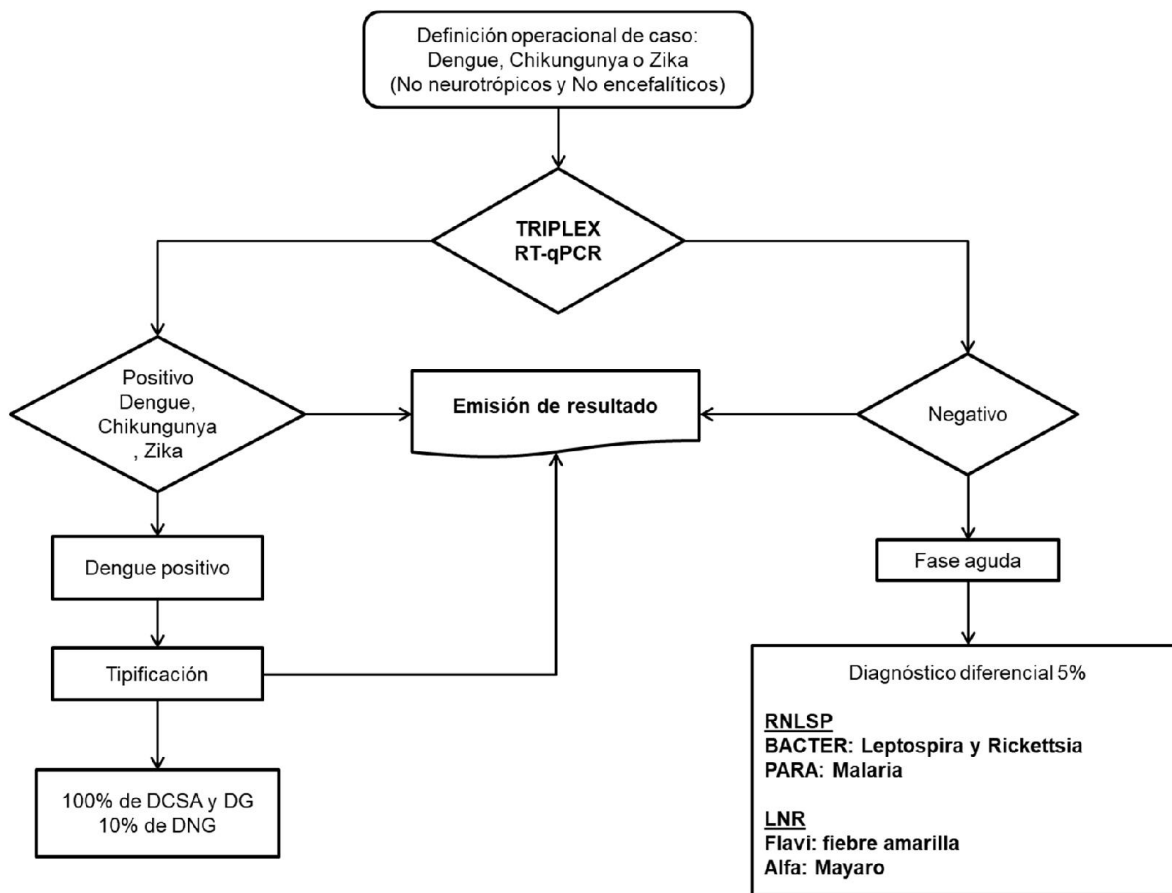


Figura 11.- Algoritmo de diagnóstico para fase aguda empleado por el InDRE [45] v2. Las muestras sospechosos para DENV, CHIKV y ZIKV tomadas en fase aguda son sometidas a una TRIPLEX RT-qPCR para confirmar o descartar el caso.

Cuando la muestra se toma entre los días 6-14 de inicio de síntomas, el algoritmo que se emplea incluye un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la determinación simultánea de anticuerpos IgM para ZIKV, DENV y CHIKV, y posterior confirmación por el panel de ELISA “SMART-ONLY-ARBO” (Fig. 12).

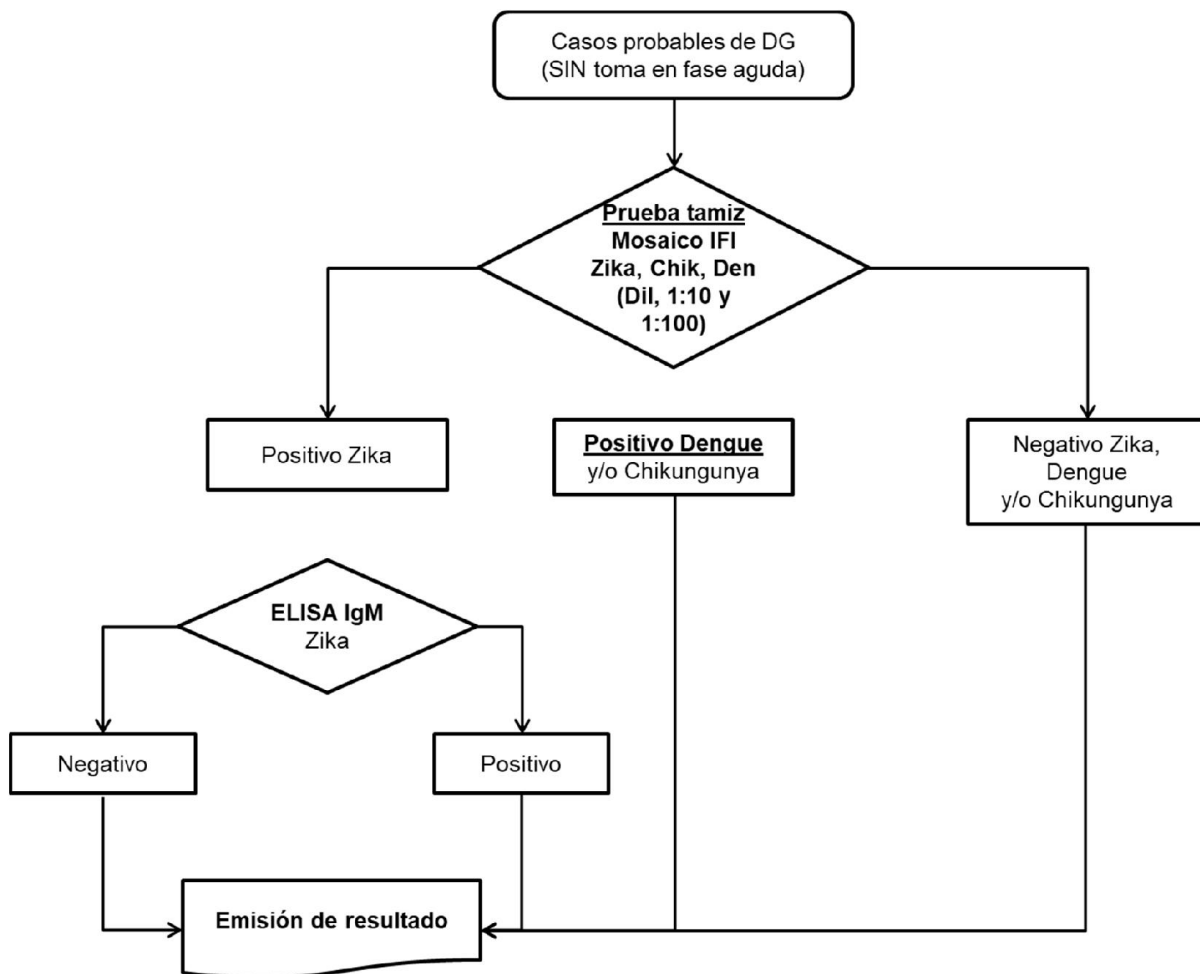


Figura 12.- Algoritmo de diagnóstico para fase convaleciente empleado por el InDRE [45] v2. Las muestras sospechosos para DENV, CHIKV y ZIKV tomadas en fase convaleciente son sometidas a un tamizaje por IFI. En el caso de Zika se realiza una Anti-IgM para confirmar o descartar el caso.

Sin embargo, el diagnóstico no se realiza a toda la población afectada, solamente a un 5 o 10% con sospecha de infección por alguno de estos virus [45].

Con la introducción de CHIKV en 2015 y Zika en 2016, el diagnóstico para DENV que era el único arbovirus circulante se afectó, dada la complejidad de poder diferenciar entre estos virus.

El algoritmo empleado por los CDC en pacientes cuya muestra sea tomada dentro de los primeros siete días (fase aguda) incluye una RT-qPCR para Zika, de ser positivo en el ensayo, el diagnóstico se confirma, de lo contrario, lo que se hace es una prueba serológica en busca de IgM, de ser positivo se realiza una Prueba de Neutralización por Reducción de Placas (PRNT) para confirmar o descartar la infección. Si la muestra es colectada pasados 14 días de iniciados los síntomas solo se incluye la prueba serológica. Los CDC indican que únicamente donde haya co-circulación de otros virus como Dengue o Chikungunya se deberá realizar el mismo procedimiento para la detección de los mismos (Fig. 13).

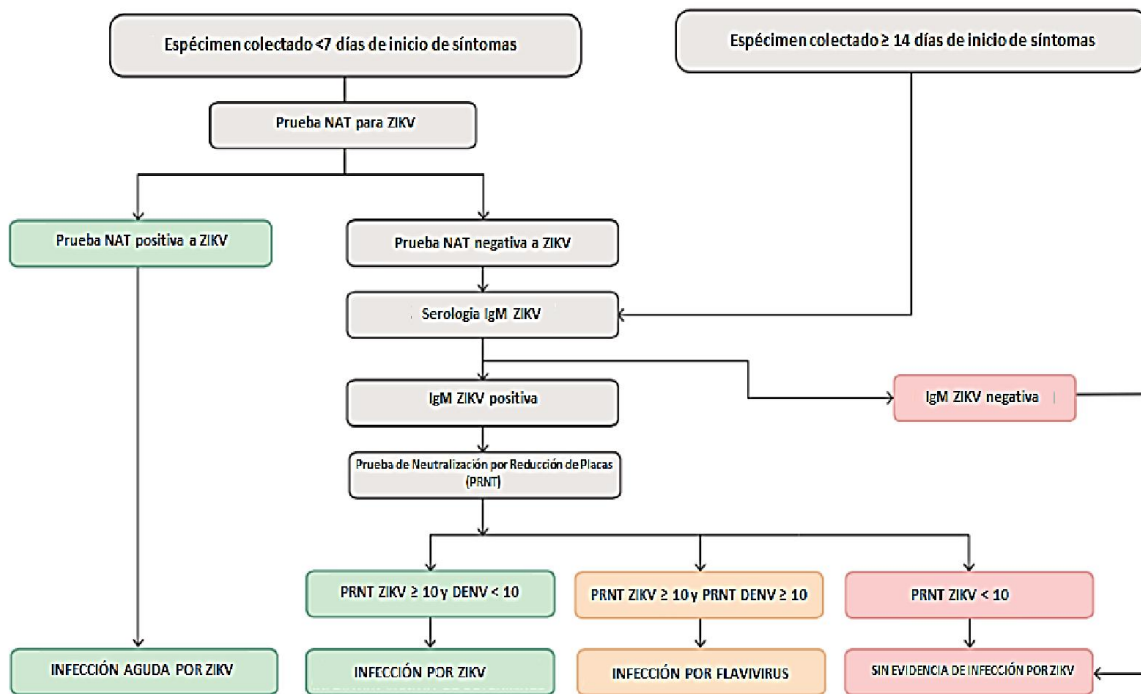


Figura 13.- Algoritmo de diagnóstico empleado por los CDC [46]. Las muestras tomadas en fase aguda serán sometidas a una prueba NAT para ZIKV, a las muestras en fase convaleciente se les hará la detección de Anti-IgM ZIKV.

1.5 Amplificación isotérmica mediada por “asa” (LAMP)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método más empleado para la amplificación del DNA. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías de detección de ácidos nucleicos, sencillas, rápidas, sensibles y específicas, ha permitido implementar nuevos sistemas de amplificación isotérmica [47].

Hay varios métodos de amplificación isotérmica para ácidos nucleicos como: amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación de círculo rodante (RCA) amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación isotérmica de desplazamiento múltiple (IMDA), amplificación mediada por señal de tecnología de RNA (SMART), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación dependiente de helicasa (HDA), amplificación isotérmica de cebador único (SPIA), amplificación circular dependiente de helicasa (cHDA) y la amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP) [48].

El método de LAMP fue descrito por primera vez en el 2000 por Notomi y cols [49] ante la necesidad de desarrollar un método alternativo a la PCR, específico y sensible que se utilizara como un sistema de detección rápida fuera de los laboratorios de diagnóstico, requiriendo una menor infraestructura.

El ensayo de LAMP ha sido empleado para la detección de diversos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* [50], virus de influenza [51], enterobacterias [52], biomarcadores de diagnóstico temprano en cáncer [53], entre muchas otras

aplicaciones. El ensayo de RT-LAMP emplea una retrotranscriptasa isotérmica que actúa simultáneamente con la polimerasa *Bst* para llevar a cabo la amplificación en un solo paso, por lo que es adecuada para la detección y el diagnóstico rápido de infecciones por virus de RNA [49].

El principio de LAMP se basa en la síntesis de múltiples productos de DNA por desplazamiento de cadena, el cual es llevado a cabo por una polimerasa isotérmica (*Bst*) proveniente de la bacteria *Bacillus stearothermophilus* la cual es termoestable hasta 70°C. La *Bst* DNA polimerasa posee actividad de exonucleasa 5'-3' y carecer de actividad de corrección exonucleasa 3'-5'. Esta enzima trabaja de manera óptima entre 60-65°C [54].

La DNA polimerasa *Bst* trabaja conjuntamente con los 4 primers, dos de ellos son denominados: F3, que es el primer externo en sentido, y B3, primer externo antisentido; los otros dos primers son: FIP, interno en sentido y BIP, externo en antisentido. Estos 4 primers reconocen 6 regiones distintas en un gen de interés (Fig. 1A). Los primers FIP y BIP contienen una región denominada F1c/B1c, respectivamente, seguido de un espaciador de timina (TTTT) y la región F2/B2 que es complementaria a la región F2c/B2c en la cadena complementaria y los primers externos F3 y B3 son complementarios a F3c y B3c en la secuencia blanco de amplificación (Fig. 14a) [49].

La inclusión de otro par de primers a la reacción denominados Loop primer F y Loop primer B, los cuales contienen secuencias complementarias entre las regiones F1 y

F2 / B1 y B2 donde se forma el asa, permite tener un número mayor de puntos de partida para la síntesis del DNA, lo que disminuye el tiempo de amplificación [55].

La amplificación por LAMP sigue dos etapas, en la primera, se emplean los 4 primers (F3, B3, FIP y BIP) para la síntesis de DNA y en la segunda etapa se emplean los primers internos (FIP y BIP). Como primer paso en la reacción de LAMP, sólo la región F2 del primer FIP alinea en la secuencia blanco, dejando a F1 sin alinear, mientras la polimerasa *Bst* sintetiza la cadena; en la misma secuencia blanco, el primer F3 alinea un momento después en el espacio que quedó entre la secuencia blanco y F1, como la polimerasa posee actividad de desplazamiento de cadena, va a sintetizar a partir de F3 y a liberar la primer cadena formada, la cual ya puede formar el primer bucle.

Después en el otro extremo la región B2 del primer BIP alinea en la primera cadena formada, se sintetiza la cadena y B3 alinea del mismo modo que F3, para sintetizar y liberar una segunda cadena, donde ya se puede formar una estructura que posee bucles en ambos extremos terminando así la primera etapa de síntesis de DNA (Fig. 14b). Durante la segunda etapa de elongación el primer FIP hibrida en el asa recién formada para iniciar la síntesis del DNA, generando un intermediario que forma un asa para que el primer BIP hibride en ese extremo y continúe con la síntesis del DNA (Fig. 14c).

Ambos productos sirven como plantilla para una reacción de síntesis y desplazamiento de la cadena en los ciclos subsiguientes, cada medio ciclo se

amplifica 3 veces la secuencia blanco, los productos finales son formados de manera azarosa durante la reacción, generando diferentes estructuras de tallo y asa, así como de coliflor (Fig. 14d) [49].

El diseño adecuado de los primers es lo que determina la especificidad de la reacción de LAMP, los cuales deben considerar las siguientes características: la distancia entre el extremo 5' de F2 y B2 se considera de 120-180 pb, entre F2 y F3, así como B2 y B3 es de 0-20 pb y la distancia para las regiones de formación de bucle es de 40-60 pb. La T_m se considera entre 60-65 °C en el caso de ser ricos en GC (50-60%), y entre 55-60 °C si son ricos en AT (40-50%). La secuencia del extremo 3' no debe ser rica en AT. Los extremos de los primers deben tener una dG calculada menor a -4 kcal/mol en los 6 pb finales en el extremo 5' de F1c / B1c y en el extremo 3' de F2 / B2 así como F3 / B3. Los primers deben diseñarse de manera que no formen fácilmente estructuras secundarias o complementarias a los otros primers. La eficiencia de LAMP depende también del tamaño del blanco a amplificar, generalmente se recomienda que sean menores de 300 pb para tener buenos resultados [56].

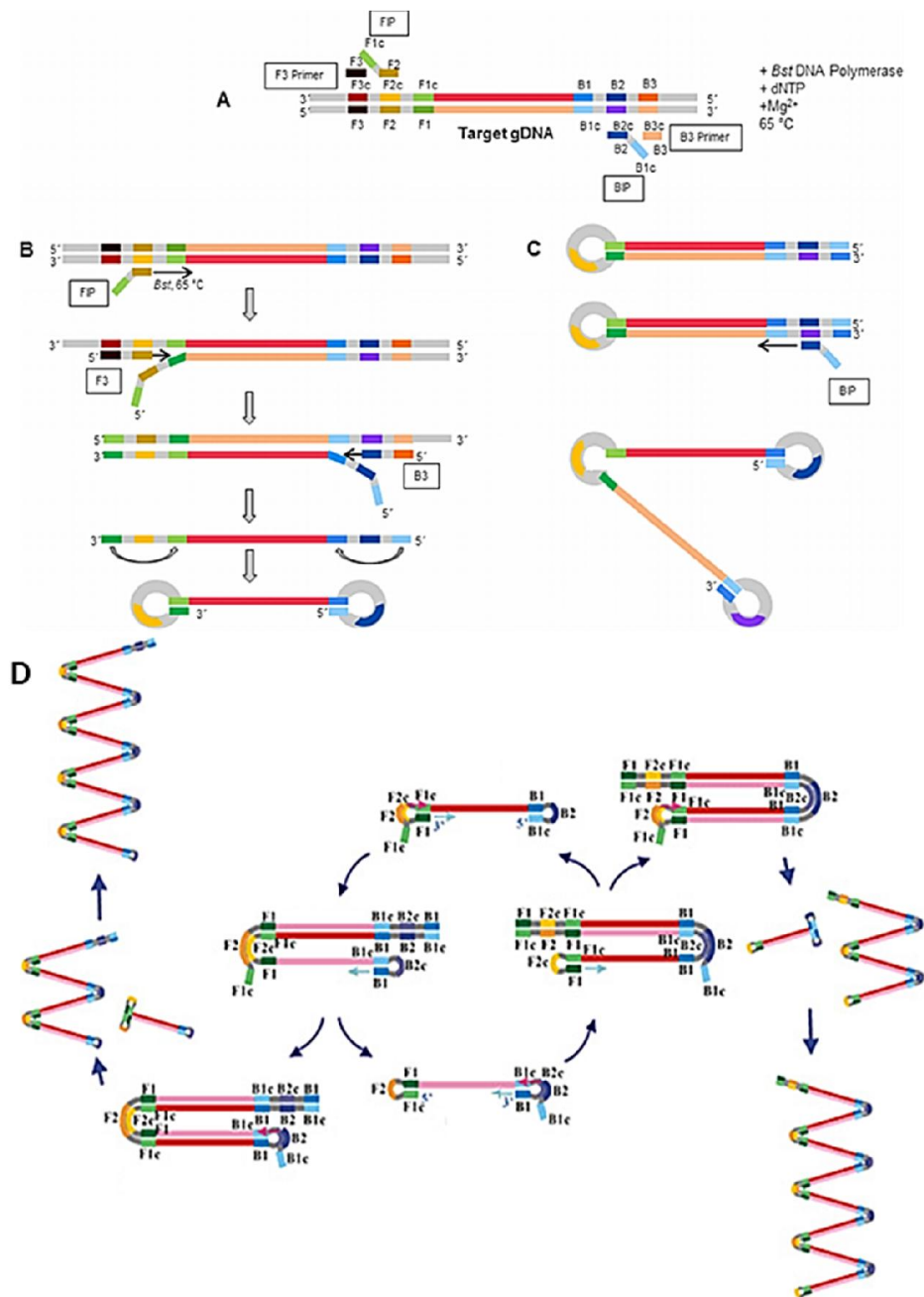


Figura 14.- Esquema representativo de la reacción de LAMP. Tomada de [57]. A) Diseño de primers sobre el DNA blanco, F3 (negro), FIP: F1c (verde claro)-F2 (dorado), B3 (naranja), BIP: B1c (Azul cielo), B2 (azul marino). B) Inicio de la reacción y formación de la estructura de doble asa. C) síntesis de DNA y desplazamiento de cadena a partir de las asas. D) Formación de estructuras a partir de los tallos-asas de diferentes tamaños.

1.5.1 Detección de productos de LAMP

Existen diferentes métodos para detectar los productos de LAMP, uno de ellos es a través de la detección indirecta de subproductos de reacción, basada en la formación de pirofosfato liberado por incorporación de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) en la cadena de DNA durante la polimerización. La cantidad de pirofosfato que se genera en la reacción de LAMP, suele ser alto y forma un complejo estable con iones metálicos como el magnesio, el calcio o el manganeso. El pirofosfato puede ser detectado cuando precipita con magnesio a concentraciones superiores a 0.5 mM y observarse a simple vista como un sedimento después de la centrifugación (Fig. 15a) [58].

Otro método emplea el Azul de hidroxinaftol (HNB) el cual es útil como indicador colorimétrico para la titulación de iones Ca^{2+} a pH 13.0 e iones Mg^{2+} a pH 10.0. El color del HNB cambia dependiendo del pH de la solución; pero en la reacción de LAMP, este cambio de color es inducido por la quelación de iones Mg^{2+} por dNTPs. El HNB cambia de color de violeta a azul cielo tras el agotamiento de iones de magnesio libres (Fig. 15b) [59].

Alternativamente, la calceína se puede usar en combinación con iones de manganeso libres por su efecto quelante. A medida que el manganeso se une fuertemente al pirofosfato recién formado, la calceína se libera y se une al magnesio libre, dando como resultado una fluorescencia verde brillante después de la excitación con luz visible o UV (Fig. 15b). La adición de intercalantes del DNA como

SYBR Green, Eva Green o berberina, puede hacerse durante o después de que terminó la reacción de LAMP y es fácil de visualizar bajo la luz UV. (Fig. 15c).

La visualización de productos en forma de barrido y patrones de escalera generados en la reacción de LAMP se puede observar mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Fig. 15d).

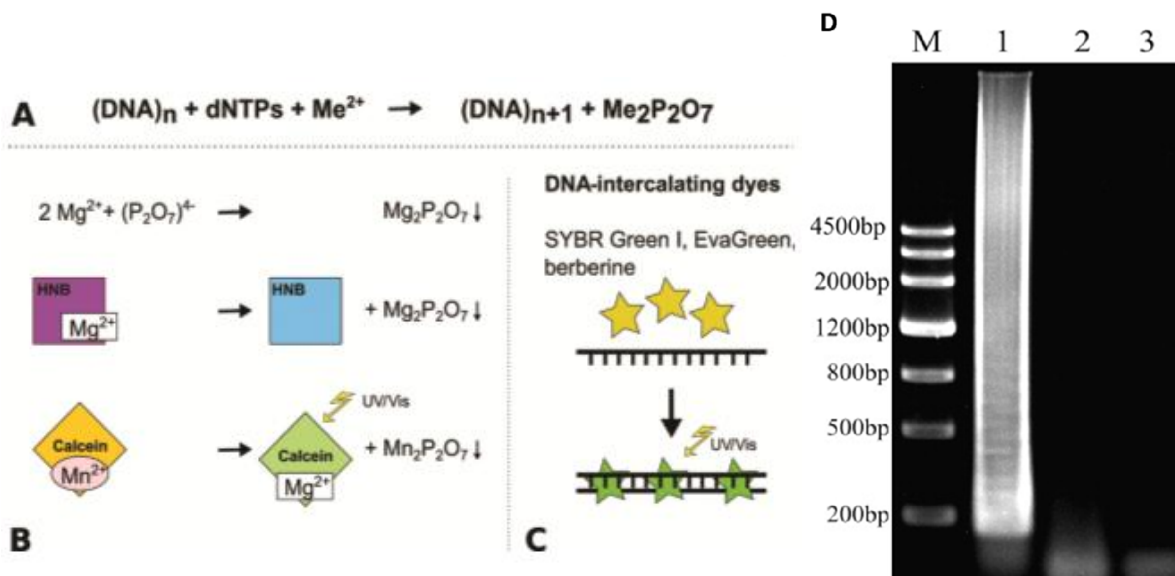


Figura 15.- Métodos de detección de productos de LAMP. Tomada de [60]. A) Ecuación simplificada de una reacción de ADN polimerasa. Me_2^+ + representa iones metálicos como Mg_2^+ + o Mn_2^+ + B) Detección por turbidez por la formación de pirofosfato, detección colorimétrica con HNB y con calceína. C) Detección con intercalantes del DNA como SYBR Green, EvaGreen, berberina. D) Visualización de productos amplificados en gel de agarosa.

2.- ANTECEDENTES

La infección por el virus del Dengue es una enfermedad con comportamiento epidemiológico estacional y constituye una de las principales arbovirosis a nivel mundial. En México es considerado como endémico ya que reside de forma permanente desde los años 70 [61].

El primer reporte de caso por infección del virus Chikungunya en el país fue en mayo del 2014, cuya confirmación fue hecha por el InDRE. El número de casos fue incrementándose durante el 2015 hasta alcanzar 11,577, mientras que para el 2016 disminuyó abruptamente a 757 casos, coincidiendo con la entrada de Zika [62].

Tanto el virus del dengue como Chikungunya son virus de RNA de cadena sencilla, por lo cual su genoma puede presentar mutaciones que faciliten la adaptación y su transmisibilidad [63]. Este tipo de adaptaciones favorecen la introducción de nuevos virus en donde otros ya son endémicos, dificultando la posibilidad de diferenciar entre ellos y obtener un diagnóstico certero en el momento, por lo que es indispensable implementar técnicas que permitan detectar el genoma viral de manera específica y rápida es indispensable.

El método RT-LAMP surgió en el 2000 como una herramienta de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de patógenos en zonas donde no es posible realizar una prueba diagnóstica, convirtiéndose en una técnica cada vez más aceptada debido a sus ventajas [49], por lo que se ha utilizado en la detección de

virus cuya similitud de síntomas, como ZIKV [64], DENV [65], o CHIKV [66] dificultan el diagnóstico clínico en los sitios donde co-circulan.

Estudios sobre la detección de CHIKV y DENV, demuestran que la técnica de RT-LAMP es altamente sensible y específica [67], comparable con otras técnicas moleculares de detección en fase aguda como los ensayos de RT-qPCR [68].

3.- JUSTIFICACIÓN

La comprensión de los mecanismos de virulencia y la dinámica de transmisión de los virus emergentes es necesaria para establecer las medidas que permitan diferenciar a los arbovirus que co-circulen en nuestro país. En el caso de DENV y CHIKV, los brotes recientes ya son un problema de salud pública, que genera confusión debido a la similitud de los síntomas en las personas infectadas, aunado a la falta de un diagnóstico certero y oportuno en los lugares requeridos.

Por lo que es necesario implementar sistemas de detección que puedan ser utilizados en los lugares donde surgen los brotes y donde no hay laboratorios de referencia equipados para realizar el diagnóstico de estos virus. Entre los sistemas que se han desarrollado para realizar el diagnóstico en los sitios de atención primaria de los pacientes, se encuentran las pruebas de amplificación isotérmica como LAMP cuya simplicidad permite proponerla como método alternativo para la detección de DENV y CHIKV, ya que se pueden amplificar de 10^9 - 10^{10} copias en aproximadamente 1 hora, brindando un resultado oportuno para un mejor manejo clínico de los pacientes.

4.- HIPÓTESIS

El sistema de RT-LAMP es tan sensible y específico como para detectar y amplificar los fragmentos de C en DENV y E1 en CHIKV comparable con una RT-qPCR.

5.-OBJETIVO GENERAL

Establecer dos sistemas de detección del genoma de Dengue y Chikungunya mediante la técnica de RT-LAMP, para la identificación diferencial de las infecciones que provocan estos virus.

.5.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer un ensayo de RT-LAMP para la detección del virus Dengue
- Establecer un ensayo de RT-LAMP para la detección del virus Chikungunya
- Evaluar el desempeño de los ensayos de RT-LAMP en muestras clínicas y compararlo con un ensayo de RT-qPCR

6.- MATERIAL Y MÉTODO

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

6.1.1 Controles de RNA-DENV y CHIKV

Para obtener los controles positivos del ensayo, se extrajo el RNA viral a partir de sobrenadantes de cultivos de células Vero infectadas con los 4 serotipos del DENV, después de 3 a 5 días post-infección. El RNA de CHIKV se obtuvo del plasma de un

paciente positivo a la infección. Como un control de especificidad, se obtuvo también el RNA del ZIKV a partir de un sobrenadante de cultivo en células Vero.

6.1.2 Muestras clínicas

Un total de 95 muestras de plasma y suero de pacientes con sospecha clínica de infección por DENV o CHIKV, sin diagnóstico previo fueron colectadas en la UMF N° 61, del IMSS ubicado en el puerto de Veracruz, durante el periodo de septiembre-octubre de 2015, la muestra se tomó durante la fase aguda, en promedio unos 4 días después del inicio de los síntomas que incluyen dos o más de los siguientes: fiebre, cefalea, mioartralgias, dolor retroocular, erupción cutánea, náuseas y vómito, Todos los pacientes firmaron una carta de consentimiento para participar en el estudio, (N° de protocolo: R-2011-785-051).

6.2.- MÉTODO

6.2.1 Extracción de RNA

Para llevar a cabo la extracción del RNA viral de los sobrenadantes de cultivo y del plasma de las 95 muestras de los pacientes se empleó el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). A 140 µL del sobrenadante/plasma se le adicionaron 560 µL de la mezcla AVL-RNA acarreador, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente (TA) y se añadieron 560 µL de etanol. La mezcla se transfirió a una columna de colección y se centrifugo 1 minuto a 10,035 g. Se hizo un lavado con 500 µL del buffer AW1, se centrifugó 1 minuto a 10,035 g después se realizó un segundo lavado con 500 µL del

buffer AW2 y se centrifugó 3 minutos a 30,733 g. La elución del RNA se hizo en un volumen de 60 μ L con el buffer AVE y se centrifugo 1 minuto a 10, 035 g.

El RNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm con el uso del NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.2.2 Establecimiento de controles positivos para los ensayos de RT-LAMP

Para el establecimiento de los controles positivos del ensayo de RT-LAMP se emplearon los primers externos del ensayo LAMP para el DENV (DEN-F3/DEN-B3) que corresponden a una región del gen de la Cápside y para el CHIKV (CHIK-F3/CHIK-B3) que corresponden a una región del gen de la Envoltura (Tabla 1). Se empleó una RT-PCR convencional empleando el kit SuperScript One-Step RT-PCR (Invitrogen™) modificando algunas instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción contenía: 6.25 μ L Buffer 2X (0.4 mM de cada dNTP y 2.4 mM de MgSO₄), 0.25 μ L de SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix, 1 μ L de agua y 1.25 μ L de cada primer DEN-F3/DEN-B3 o CHIK-F3/CHIK-B3, se empleó 1 μ L del RNA para un volumen final de reacción de 11 μ L. Las condiciones en el termociclador (Biometra) fueron las siguientes: un paso de retrotranscripción de 30 minutos a 50°C, un ciclo de pre-desnaturalización de 2 minutos a 94°C, 40 ciclos de (15 segundos a 94°C, 20 segundos a 60°C, 20 segundos a 72°C): con un paso de extensión final de 5 minutos a 72°C.

6.2.3 Purificación de productos de PCR por el método de precipitación por etanol

Para realizar la purificación de los productos se emplearon 10 μL del producto de PCR, se agregaron 28 μL de agua y 64 μL de etanol al 95 %, se incubó 15 minutos a TA, se centrifugó 20 minutos a 45,315 g. y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 250 μL de etanol al 70%, se centrifugó durante 10 minutos a 45,315 g. y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 10 μL de agua y se incubó 5 min a 65°C.

El producto purificado se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm con el uso del NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

6.2.4 Secuenciación de los productos purificados de PCR

La secuenciación de los productos purificados se realizó empleando el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) modificando las instrucciones del fabricante 1 μL de Buffer 5X, 1 μL de mezcla de reacción Big Dye, 1 μL de primers 10 μM , 4 μL de agua y 1 μL (5-10 ng) de templado de PCR purificado, teniendo un volumen final de 8 μL . Las siguientes condiciones fueron empleadas en el termociclador (Biometra): 25 ciclos con tres etapas de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60°C por 1 minuto. Después de la amplificación, cada reacción se purificó nuevamente con etanol y en oscuridad como se describió anteriormente en el punto 6.2.3.

La lectura de fluorescencia de los fragmentos purificados se hizo en un secuenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

6.2.5 Análisis de secuencias

Para obtener las secuencias consenso se empleó el programa CLC DNA Workbench 6.6.1 (CLC Bio, QIAGEN) y se realizó el alineamiento de las secuencias en sentido y en antisentido obtenidas en formato *.abi*. Las secuencias de referencia empleadas para ensamblar las secuencias consenso fueron; Cepa S27 CHIKV prototipo Africano (AF369024.2), DENV-2 QML16 (KX372564.1), DENV-3 H87 (KU050695.1), DENV-4 KBPV-VR-31 (KP406806.1).

6.2.6 Estandarización del ensayo de RT-LAMP

Se emplearon los RNAs extraídos a partir de cultivo celular para estandarizar los ensayos de RT-LAMP empleando los primers F3, B3, FIP y BIP tomados de [67] para DENV y CHIKV (Tabla 1) empleando las siguientes condiciones: 1.3 μL de Isothermal buffer 1X (NEB), 1.8 μL de dNTP's 1.4mM c/u (Roche), 0.7 μL MgSO_4 8mM (NEB), 0.5 μL de cada primer F3 y B3 (0.8 μM para DENV y 0.2 μM para CHIKV), FIP y BIP (1.6 μM), 1.6 U de *Bst* 3.0 (NEB), 5.5 μL de agua y se agregó 1 μL de RNA para un volumen final de 12.5 μL .

Tabla 1.- Primers diseñados para la región C de DENV y E1 CHIKV

| Primer | Secuencia (5'→3') | Posición en el genoma |
|-----------------------|---|--------------------------------|
| Cápside | | KX372564.1 |
| DEN-F3 | GAGAAACCGCGTGTCAAC | 153-170 |
| DEN-B3 | CCTTCCAATCTCTTTCCTGAA | 346-366 |
| DEN-FIP | AGGGCCATGAACAGTTTTAATGGTCAGCTGACAAAGA GATTCTCA | 178-195 218-238 |
| DEN-BIP | CCTAACAATCCCACCAACAGCACCTCTCAAAACATT GATAGC | 245-266 321-337 |
| Envoltura (E1) | | JF274082.1 |
| CHIK-F3 | CGCCCTCTTTAACGGACATG | 10,858-10,877 |
| CHIK-B3 | AATTCGGCGCTGGCTAAG | 11,057-11,074 |
| CHIK-FIP | TGCCTTTCTTGCTGGCTGCATATACCAGCCTGCACCC ATT | 10,888-10,905 10,938-10,959 |
| CHIK-BIP | AGTGTGCGGTGCATTTCGATGATGCAGCTGAGAATTCC CTTC | 10,960-10,977 11,019-11,038 |

Primers para la reacción de RT-LAMP de Dengue y Chikungunya. Primers externos: DEN-F3 y DEN-B3 / CHIK-F3 y CHIK-B3. Primers internos: DEN-FIP y DEN-BIP / CHIK-FIP y CHIK-BIP.

Las condiciones empleadas para la amplificación isotérmica del DENV fueron: 65°C durante 1 hora, mientras que para CHIKV fueron 65°C durante 45 minutos, seguido de un paso de inactivación de la enzima de 5 minutos a 80°C. Toda la incubación se realizó en el termociclador (Biometra).

Los ensayos de RT-LAMP para las 95 muestras se hicieron por duplicado y la detección de productos fue por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con HydraGreen™, durante 30 minutos a 100V (Miupid-exU).

6.2.7 Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para detectar las inmunoglobulinas de clase M de DENV y CHIKV en el suero de los pacientes se aplicó la técnica de ELISA, empleando el kit Anti-Dengue IgM Virus ELISA (EUROIMMUN) siguiendo las instrucciones el fabricante y la microplaca se leyó a 450 nm en el espectrofotómetro PowerWaveX (Biotek Instruments Ink).

6.2.8 Ensayo de RT-qPCR

Se empleó un ensayo de RT-qPCR como prueba de referencia para evaluar al ensayo de RT-LAMP. Se usó el RNA de las 95 muestras, el panel de detección por RT-qPCR incluyó la detección de DENV serotipos 1, 2, 3 y 4, Fiebre amarilla (YFV), West Nile Virus (WNV), ZIKV y CHIKV, los cuales se hicieron el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) en el equipo BioMark HD Fluidigm, el cual combina la tecnología de un circuito integrado de fluidos (IFC) compuesto por una red canales, válvulas y cámaras que se conectan entre sí, acoplado a un equipo de RT-qPCR que genera curvas de fusión de alta resolución permitiendo una detección altamente sofisticada ya que se obtiene el resultado de 2304 reacciones de PCR simultáneas.

6.3 Análisis estadístico

Se determinó la sensibilidad y la especificidad de los ensayos de RT-LAMP calculando la sensibilidad y especificidad, $p < 0.0001$, se determinó la correlación de Pearson y se realizó un análisis del área bajo la curva.

7.-RESULTADOS

7.1 Caracterización de controles positivos para DENV y CHIKV

Para la caracterización del control positivo de DENV se utilizó el RNA cada uno de los virus obtenidos de sobrenadantes de cultivo, y se amplificó una región por RT-PCR de punto final. Se amplificó una banda de aproximadamente 213 pb, para cada uno de los 4 serotipos de RNA-DENV (Fig. 16a).

En el caso de CHIKV, se utilizó el RNA-CHIKV y se amplificó una región de la envoltura (E1), como se observa en la Fig. 16b se obtuvo un fragmento con el tamaño esperado (216 pb) en linaje Africano y Asiático.

Para demostrar que los primers no hibridaban inespecíficamente con otros virus, se llevó a cabo una prueba de especificidad en la cual se utilizó DENV con los primers de CHIKV, y no se observó amplificación (Fig. 16b) lo que indica que los primers utilizados son específicos a CHIKV.

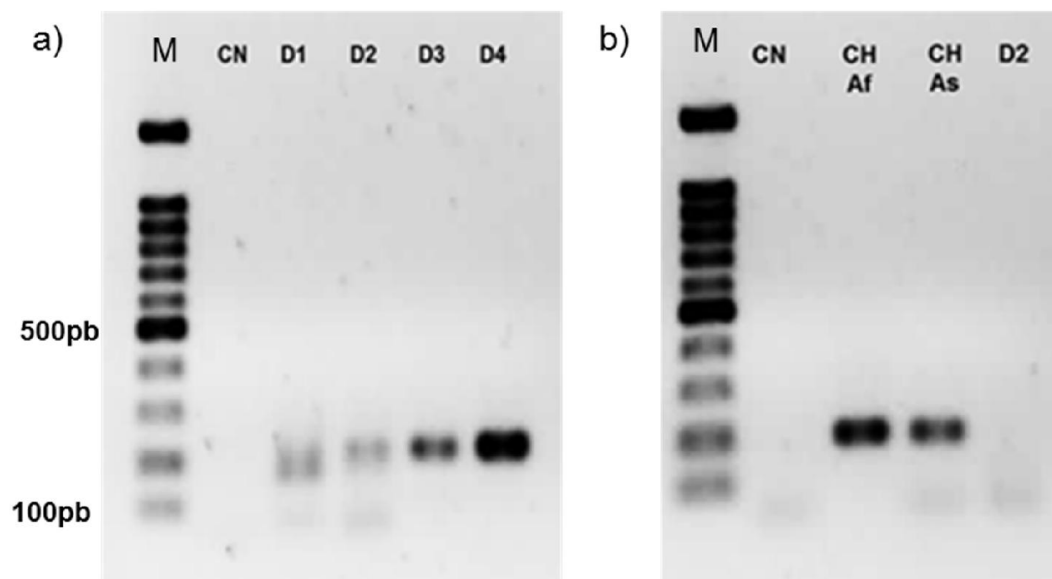


Figura 16.- Amplificación por RT-PCR de una región del gen C del DENV y E1 en CHIKV. a) Productos de RT-PCR empleando los primers externos de DENV (DEN-F3 y DEN-B3), pertenecientes a una región de la cápside, tamaño esperado del amplicón: 213 pb, b) Productos de RT-PCR empleando los primers externos pertenecientes a la envoltura (E1) de CHIKV (CHIK-F3 y CHIK-B3), tamaño esperado del amplicón: 216 pb M: marcador 100 pb, CN: Control negativo D1-D4. Dengue serotipos 1-4 CH Af: Chikungunya linaje Africano, CH As: Chikungunya linaje asiático.

Para confirmar la identidad de los fragmentos amplificados se secuenciaron los productos de PCR purificados de DENV y CHIKV mediante secuenciación tipo Sanger. Como se puede ver el fragmento obtenido para DENV-2 se alinea con la región de la cápside de la cepa QML16 del virus Dengue serotipo 2 (Fig. 17a), para DENV-3 alinea en la región de la cápside en la cepa H28 (Fig. 17b), para DENV-4 también alinea en una región de la cápside correspondiente a la cepa H241 (Fig. 17c) y para CHIKV la secuencia alinea en la región de la envoltura (E1) con la cepa S27 prototipo Africano (Fig. 17d).

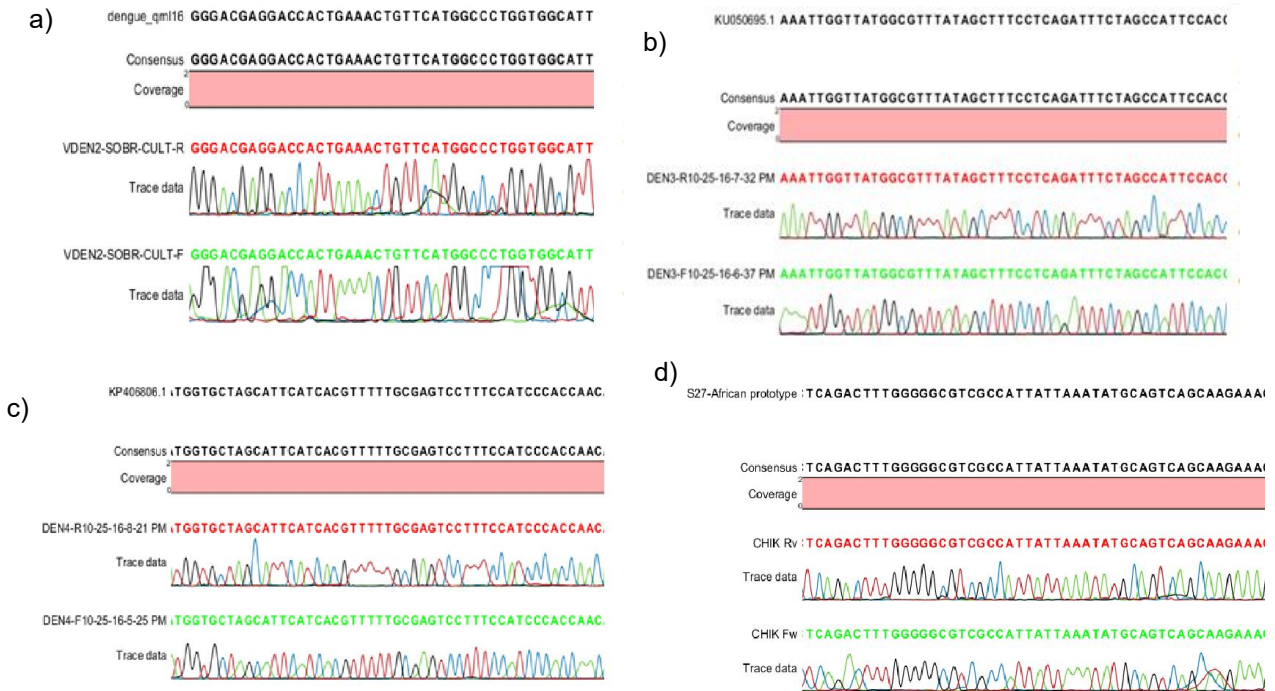


Figura. 17.-Alineamiento de la secuencia consenso con la cepa de referencia Las secuencias se analizaron con el programa CLC DNA Workbench, el ensamble de la secuencia consenso con la cepa de referencia se hizo mediante el alineamiento de las secuencias en sentido y antisentido de a) QML16 para DENV2 b) H28 para DENV3 y c) H241 para DENV4 corresponden a una región del gen de la cápside y para CHIKV se empleó la cepa d) S27-prototipo Africano perteneciente al gen E1 de CHIKV.

7.2 Estandarización del ensayo de RT-LAMP

7.2.1 Optimización del ensayo de RT-LAMP para DENV y CHIKV

La optimización de la reacción de RT-LAMP depende de varios factores como es la concentración de los primers y que la enzima trabaje adecuadamente, En este trabajo, una vez que los controles positivos fueron caracterizados para cada virus, se optimizo el ensayo de RT-LAMP mediante la modificación de las condiciones

estándar [49] en el que se incluyó un ensayo para ZIKV como control de especificidad por la posible hibridación inespecífica con DENV, por lo que se realizó un gradiente de concentraciones con los primers F3 /B3, se modificaron las unidades de enzima *Bst* empleadas y no se adicionó una retrotranscriptasa a la reacción.

Una vez hecho se esto, se seleccionaron las siguientes condiciones para llevar a cabo los ensayos de RT-LAMP. La concentración óptima de los primers F3 y B3 fue 0.8 μM para DENV y 0.2 μM para CHIKV, en ambos casos para FIP y BIP se empleó la concentración de 1.6 μM y 1.6 U de enzima *Bst*, en el caso de DENV el tiempo de amplificación fue de 1 h y para CHIKV fueron suficientes 45 min. En una reacción de RT-LAMP, la formación de diferentes productos amplificados está representado por un barrido que puede observarse en el gel de agarosa (Fig. 18a) indicando que la reacción para cada virus esta optimizada.

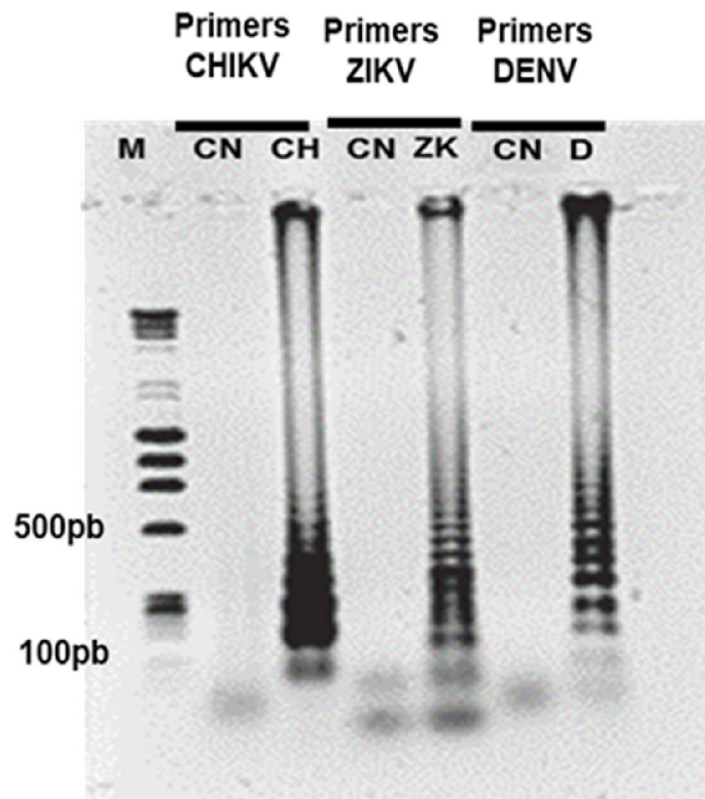


Figura 18- Detección del genoma viral mediante RT-LAMP. Visualización de los productos de la reacción de RT-LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% formando un patrón escalonado en la reacción positiva a los virus Dengue (D), Chikungunya (CH) y Zika (ZK). M: Marcador, CN: Control Negativo.

Dengue y Zika pertenecen a la familia *flaviviridae* por lo tanto, sus genomas tienen un 50-60% de identidad, por lo que para evitar que se presente una hibridación inespecífica se realizó un ensayo para verificar la especificidad de los primers y como se observa en la Fig. 19 no hay hibridación inespecífica entre ellos.

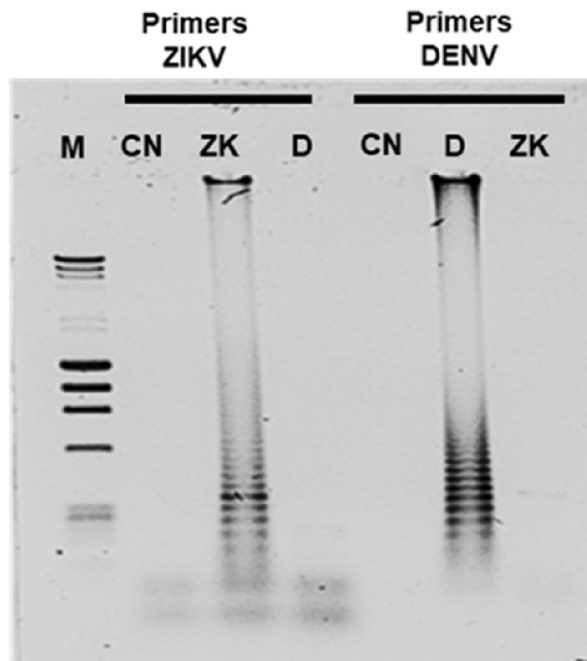


Figura 19-Especificidad del ensayo de RT-LAMP. En el ensayo de especificidad se empleó el RNA control de DENV2 con los primers (F3, B3, FIP y BIP) de Zika y RNA de Zika con los primers (F3, B3, FIP y BIP) de Dengue. Cada ensayo con su respectivo control positivo. M: Marcador, CN: Control Negativo.

7.2.2 Sensibilidad del ensayo de RT-LAMP

Para determinar la concentración mínima de RNA viral que pueda ser detectado por el sistema de RT-LAMP se tomó como modelo al DENV-2 y se hicieron diluciones partiendo de una concentración de 80.4 ng/μL, y se observó que el ensayo amplifica incluso 0.08 ng/μL de producto que corresponde a la última dilución realizada (Fig. 20).



Figura 20- Dilución del RNA de DENV2 y detección por RT-LAMP. Se utilizaron diferentes concentraciones del RNA de DENV-2 en la reacción de RT-LAMP, los productos detectados en la electroforesis en gel de agarosa se visualizan en el siguiente orden M: Marcador, 1: Control negativo, 2: RNA (80.4 ng/μL), 3.-RNA (40.2 ng/μL), 4: RNA (26.8 ng/μL), 5: RNA (16.8 ng/μL), 6: RNA (8.04 ng/μL), 7.-RNA (0.804 ng/μL), 8.- RNA (0.08 ng/μL).

7.3 Evaluación del ensayo de RT-LAMP en muestras clínicas.

Para evaluar el ensayo de RT-LAMP se utilizaron las muestras de pacientes con sospecha clínica de infección por Dengue o Chikungunya colectadas en la UMF N° 61 en el periodo de Septiembre-Octubre de 2015 en Veracruz debido a un fuerte brote de infecciones febriles. por lo que para este estudio los criterios de inclusión fueron fiebre, dolor muscular o articular, erupciones en la piel, malestares gastrointestinales. Los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión fueron 95, en una proporción de 45 hombres (47.36%) y 50 mujeres (52.63 %). La mediana de la edad es de 33 ± 13.32 , y el promedio de días de inicio de fiebre fue de 3 ± 1.3 días.

Tabla 2.- Demografía de los pacientes con sospecha de infección por CHIKV o DENV

| Datos generales de los pacientes | |
|---|------------|
| Pacientes | 95 |
| Genero (M:F) | 45:50 |
| Edad (mediana) | 33 ± 13.32 |
| Promedio de días de inicio de fiebre | 3 ± 1.3 |

Para evaluar el sistema de RT-LAMP, se emplearon los RNA extraídos del plasma de los pacientes. Todos los ensayos se hicieron por duplicado para DENV y CHIKV, ZIKV fue empleado como un control de especificidad y como se puede observar en la figura 21, en el gel se representan únicamente las muestras que fueron positivas para DENV 2 de 95 (2.1%) que corresponden a las muestras D70 y D71.

DENV

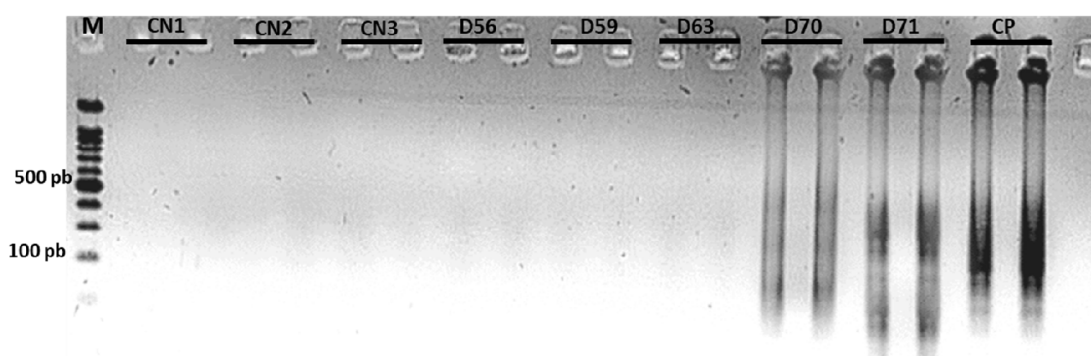


Figura 21.- Amplificación mediante RT-LAMP del genoma de DENV en muestras de pacientes. El ensayo se realizó por duplicado. Gel de agarosa al 2%. M: Marcador, CN1: Control negativo mix, CN2: Control negativo zona adición de muestras, CN3: Control negativo zona adición de control positivo, CP: control positivo, D: muestras con sospecha de infección por Dengue o Chikungunya.

En la figura 22 se muestra un gel representativo en el cual se observan 11 muestras positivas para CHIKV, el total de muestras positivas fue de 45 de 95 (47.36%). En la figura 23 se muestra un gel representativo de las pruebas para ZIKV, ninguna dio un resultado positivo.

CHIKV

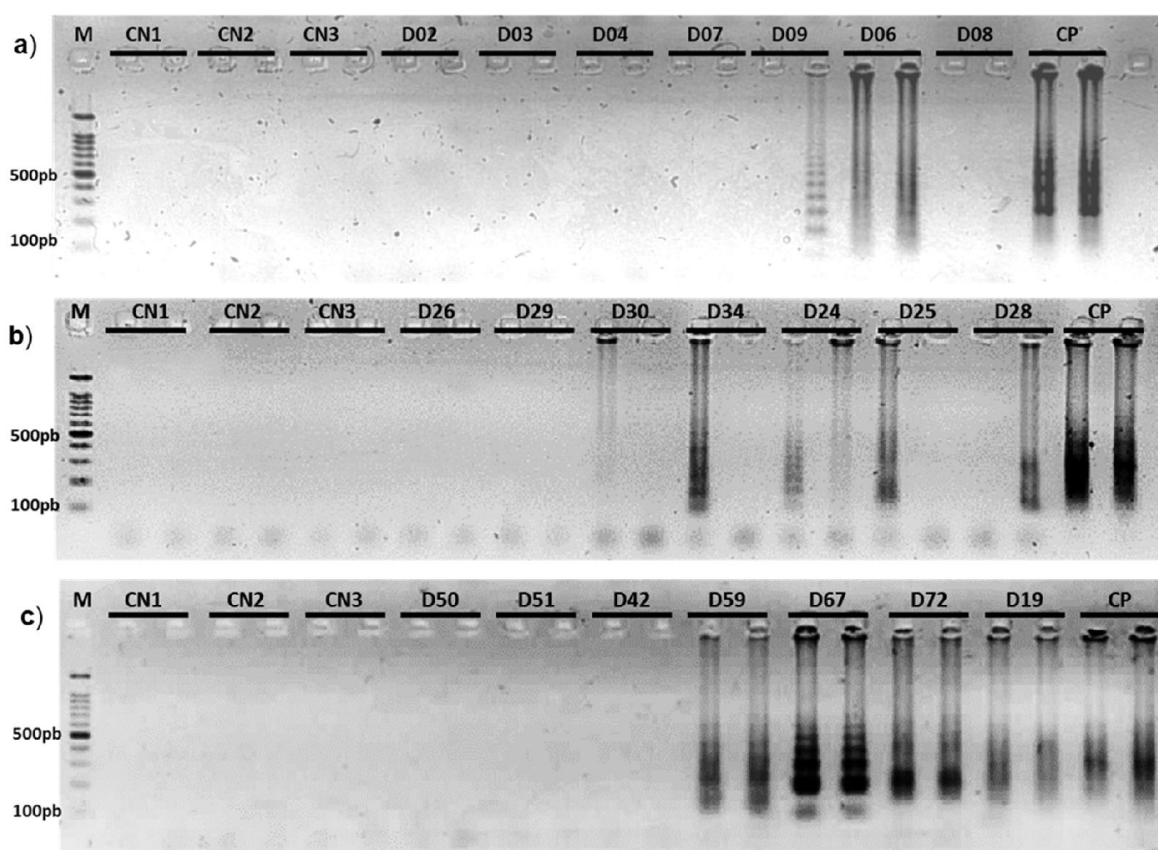


Figura 22.- Amplificación mediante RT-LAMP del genoma de CHIKV en muestras de pacientes. El ensayo se realizó por duplicado y la visualización fue por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las muestras positivas amplificaron formando diferentes patrones de bandeo a) 2 muestras positivas, b) 5 muestras positivas, c) 4 muestras positivas, D59 y D19 (diluidas 1:1000) M: Marcador, CN1: Control negativo mix, CN2: Control negativo zona adición de muestras, CN3: Control negativo zona adición de control positivo, CP: control positivo, D: muestras con sospecha de infección por Dengue o Chikungunya.

ZIKV

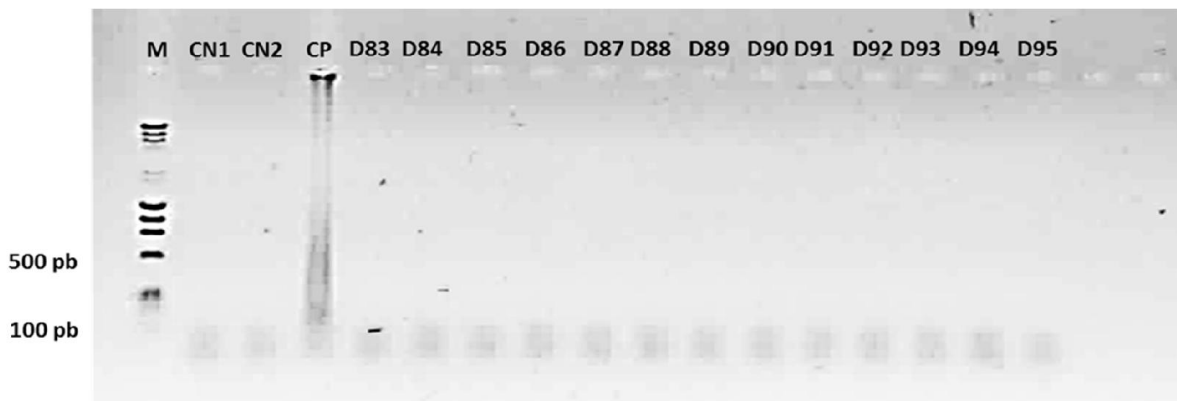


Figura 23.- Amplificación mediante RT-LAMP del genoma de ZIKV en muestras de pacientes. El ensayo se realizó por duplicado, la visualización fue por electroforesis en gel de agarosa al 2%. No se detectaron muestras positivas a Zika. M: Marcador, CN1: Control negativo mix, CN2: Control negativo zona adición de muestras, CP: control positivo, D: muestras con sospecha de infección por Dengue o Chikungunya.

El sistema empleado como referencia para comparar el resultado de los ensayos de RT-LAMP fue la RT-qPCR, realizado en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) para demostrar la consistencia entre el resultado de una prueba y otra, para esto se empleó un panel de detección de arbovirus validado que incluye DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, WNV, YFV, ZIKV y CHIKV cada ensayo se realizó por cuadruplicado. El resultado del ensayo por RT-qPCR fueron 41 de 95 muestras positivas para CHIKV (43.15%), 2 de 95 para DENV-2 (2.10%) y ninguna para ZIKV, YFV o WNV.

La tabla de contingencia indica qué tan específica y sensible es la prueba de RT-LAMP empleando como estándar de oro la RT-qPCR se obtuvieron para DENV 2 muestras positivas que coinciden con la RT-qPCR (Tabla 3).

Tabla 3.- Tabla de contingencia RT-LAMP y RT-qPCR de DENV

| PRUEBA | RT-qPCR (+) | RT-qPCR (-) | TOTAL |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| RT-LAMP (+) | 2 | 0 | 2 |
| RT-LAMP (-) | 0 | 93 | 93 |
| TOTAL | 2 | 93 | 95 |

En el caso de CHIKV, el resultado fue diferente, ya que al comparar con la RT-qPCR se obtuvieron 32 Verdaderos Positivos (VP), 41 Verdaderos Negativos (VN), 13 Falsos Positivos (FP) y 9 Falsos Negativos (FN) (Tabla 4).

Tabla 4.- Tabla de contingencia RT-LAMP y RT-qPCR de CHIKV

| PRUEBA | RT-qPCR (+) | RT-qPCR (-) | TOTAL |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| RT-LAMP (+) | 32 | 13 | 45 |
| RT-LAMP (-) | 9 | 41 | 50 |
| TOTAL | 41 | 54 | 95 |

7.5 Sensibilidad y especificidad del ensayo de RT-LAMP

Se determinó la especificidad y sensibilidad de los ensayos de RT-LAMP comparados con el ensayo de RT-qPCR, la sensibilidad está representada como la probabilidad de que un sujeto enfermo obtenga un resultado positivo en la prueba de RT-LAMP y la especificidad en este caso representa la probabilidad de que un sujeto sano tenga un resultado negativo en la prueba de RT-LAMP.

En el caso de DENV se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100%, mientras que para CHIKV, la sensibilidad de RT-LAMP fue del 78% y la especificidad del 75% (tabla 5).

Tabla 5.-Porcentaje de sensibilidad y especificidad del ensayo de RT-LAMP

| | | | |
|----------------------|-----------------|--------------|------------|
| sensibilidad | vp/vp+fn | 0.78 | 78% |
| especificidad | vn/vn+fp | 0.759 | 75% |

VP: verdaderos positivos, VN: verdaderos Negativos, FP: falsos positivos, FN: falsos negativos

Además del estadístico anterior, se representó gráficamente la sensibilidad frente a la especificidad mediante la curva ROC la cual representa la proporción entre verdaderos positivos y falsos positivos obtenidos en el ensayo de RT-LAMP comparado con la RT-qPCR. El valor del área bajo la curva obtenido fue de 0.775, empleando un intervalo de confianza del 95% (Fig. 24).

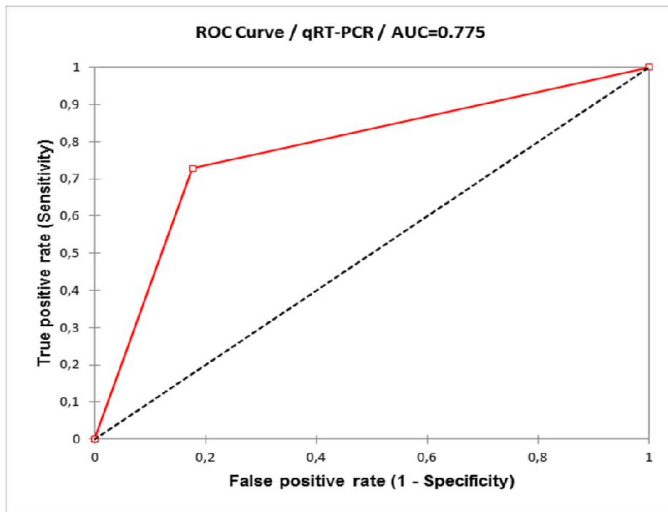


Figura 24.- Curva ROC de RT-LAMP. La grafica representa la relación entre sensibilidad y especificidad de la técnica de RT-LAMP

La prueba estadística de correlación de Pearson se realizó para determinar si existía una correlación entre el ensayo de RT-qPCR y RT-LAMP y se obtuvo el valor de $r=0.555$ y $R^2=0.30$ (Fig. 25), mostrando una baja correlación entre ambas pruebas.

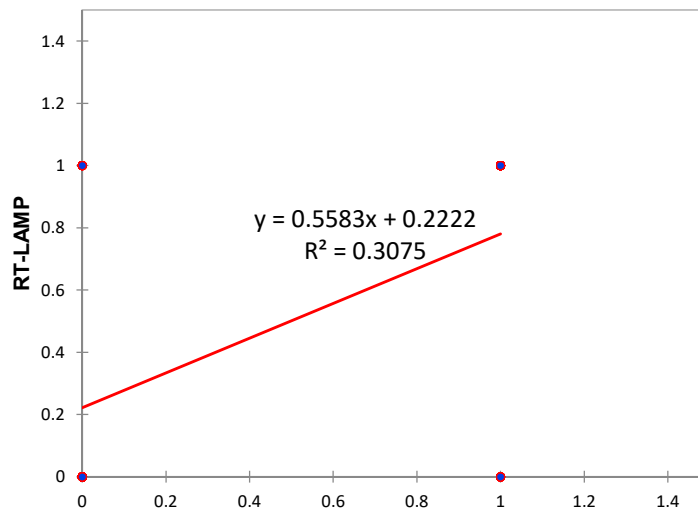


Figura 25.- Correlación lineal entre RT-qPCR y RT-LAMP. La prueba evaluada muestra una baja correlación en comparación con la RT-qPCR.

Empleando tres diferentes pruebas estadísticas, sólo la correlación de Pearson nos da un valor muy bajo, esto debido a las inconsistencias presentadas por los falsos positivos y falsos negativos, sin embargo, el AUC y las pruebas de sensibilidad y especificidad arrojan resultados similares, lo que nos indica que la correlación entre un método y otro es similar.

7.7 Ensayo de RT-PCR de punto final para CHIKV

El ensayo de RT-PCR se realizó como un complemento para dar una posible explicación a los resultados obtenidos en el ensayo de RT-LAMP- El resultado fue una menor sensibilidad para la detección de CHIKV que por RT-LAMP y RT-qPCR: se obtuvieron 28 de 95 muestras positivas y 67 de 95 muestras negativas. En la Fig. 26 se observa un gel representativo de los ensayos de RT-PCR.

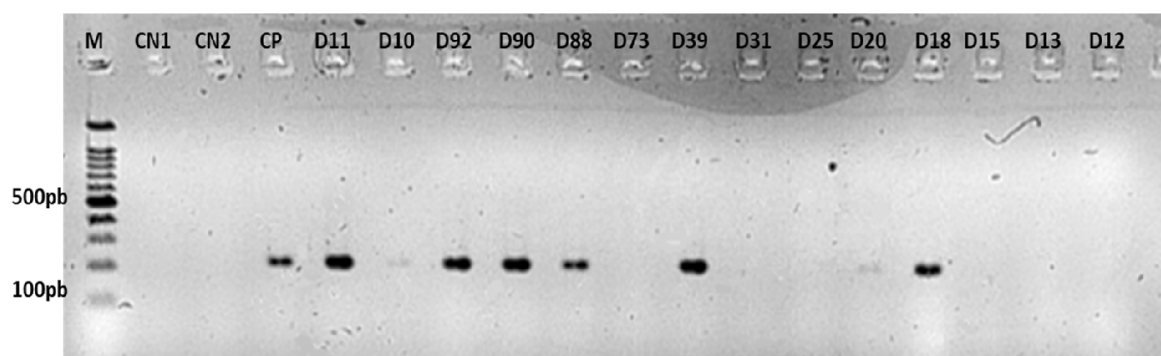


Figura 26.-Amplificación por RT-PCR punto final en muestras de pacientes. Los fragmentos detectados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% corresponden a una región del gen E3 de CHIKV. El tamaño de la banda esperada es de 211 pb. M: marcador, CN: Control negativo: 1 y 2, CP: Control Positivo, D: Muestras con sospecha de Dengue o Chikungunya.

7.6 Resultados de la detección de Inmunoglobulinas mediante ELISA Anti-IgM e IgG para DENV y CHIKV

Para determinar que las muestras negativas por ensayos moleculares son negativas a la infección por Chikungunya, se hizo una ELISA Anti-IgM de CHIKV, como se puede ver en la tabla 6, se obtuvieron 36 de 95 muestras positivas, confirmando la reciente infección. En el caso de DENV, la detección de anti IgM-DENV sólo se encontró en 4 de 95 muestras (4.2%), mientras que la Anti IgG-DENV se detectaron en 75 de 95 muestras (78.95%).

Tabla 6.- Número de muestras CHIKV positivas para cada ensayo

| | RT-qPCR | RT-PCR | ELISA | RT-LAMP |
|----------|---------|--------|-------|---------|
| Positivo | 41 | 28 | 37 | 45 |
| Negativo | 54 | 67 | 58 | 50 |
| Total | 95 | 95 | 95 | 95 |

En la tabla 7 se concentran algunos datos demográficos, el rango de edad va desde los 10 hasta los 71 años, el inicio de fiebre abarca de 1 a 5 días, el rango de los ciclos de cuantificación (Cq) va de 3.6 a 19.8. Se obtuvo un total de 41/95 (43.15%) muestras positivas por RT-qPCR, 45/95 (47.36%) por RT-LAMP y un 36/95 (33.89%) por ELISA Anti IgM-CHIKV.

En este trabajo se encontraron algunas coincidencias entre los ensayos moleculares y serológicos, las cuales están representadas en la tabla 7 donde se observa en color azul las muestras que dieron positivo para RT-LAMP y Anti-IgM CHIKV (13

muestras), en rosa las coincidencias entre RT-qPCR y Anti-IgM CHIKV (12 muestras), y en morado se encuentran las coincidencias en pruebas moleculares y serológicas (7 muestras).

Tabla 7.-Resultados de los ensayos de ELISA anti IgM CHIKV y DENV, RT-qPCR y RT-LAMP

| Muestra | Edad | Inicio Fiebre (d) | IgM DENV | IgM CHIKV | RATIO | RT-qPCR | Cq | RT-LAMP |
|---------|------|-------------------|----------|-----------|-------|---------|------|---------|
| D01 | 30 | s/d | N | P | 2.9 | N | | P |
| D02 | 24 | s/d | N | P | 2.9 | N | | N |
| D03 | 37 | s/d | N | N | 0.2 | N | | N |
| D04 | 23 | s/d | P | P | 6.3 | N | | N |
| D05 | 34 | s/d | N | N | 0.3 | N | | N |
| D06 | 62 | s/d | N | N | 0.3 | P | 9 | P |
| D07 | 15 | s/d | N | N | 0.3 | N | | N |
| D08 | 42 | s/d | N | P | 1.2 | P | 15.9 | N |
| D09 | 23 | 3 | P | P | 4.3 | N | | P |
| D10 | 39 | 4 | N | P | 2.0 | N | | N |
| D11 | 29 | 1 | N | N | 0.2 | P | 6.5 | P |
| D12 | 30 | 5 | N | P | 3.2 | N | | N |
| D13 | 23 | s/d | N | P | 2.2 | N | | P |
| *D14 | 24 | s/d | N | N | 0.3 | P | 4.1 | P* |
| D15 | 23 | 3 | N | N | 0.4 | P | 18.5 | P |
| D16 | 28 | s/d | N | N | 0.4 | N | | N |
| D17 | 30 | 2 | N | N | 0.3 | P | 15 | N |
| D18 | 23 | 2 | N | N | 0.2 | P | 11.8 | P |
| *D19 | 32 | s/d | N | N | 0.3 | P | 4.5 | P* |
| D20 | 23 | 3 | N | N | 0.2 | N | | P |
| D21 | 27 | 4 | N | N | 0.2 | N | | P |
| D22 | 26 | 5 | N | P | 3.4 | N | | N |
| D23 | 46 | 5 | N | N | 0.2 | N | | P |
| D24 | 19 | 2 | N | N | 0.3 | P | 9.2 | P |
| D25 | 25 | 3 | N | N | 0.4 | P | 15 | P |
| D26 | 24 | 2 | N | N | 0.8 | N | | N |
| D27 | 23 | 1 | N | N | 0.2 | N | | N |
| D28 | 43 | 4 | N | N | 0.3 | P | 13 | P |

| Muestra | Edad | Inicio Fiebre (d) | IgM DENV | IgM CHIKV | RATIO | RT-qPCR | Cq | RT-LAMP |
|---------|------|-------------------|----------|-----------|-------|---------|------|---------|
| D29 | 25 | 4 | N | P | 2.2 | N | | N |
| D30 | 49 | 3 | N | N | 0.3 | N | | P |
| D31 | 43 | 4 | N | P | 1.4 | N | | P |
| D32 | 42 | 4 | N | N | 0.3 | P | 8 | P |
| D33 | 15 | 1 | N | N | 0.4 | P | 13.6 | P |
| D34 | 54 | 4 | N | P | 4.1 | N | | P |
| D35 | 21 | s/d | N | N | 0.2 | N | | N |
| D36 | 32 | 5 | N | P | 3.7 | P | 12.6 | N |
| D37 | 20 | 1 | N | N | 0.2 | N | | N |
| D38 | 33 | 4 | N | P | 1.6 | P | 7.9 | P |
| D39 | 19 | 1 | N | N | 0.3 | N | | N |
| D40 | 21 | s/d | N | N | 0.2 | N | | N |
| *D41 | 43 | 3 | N | N | 0.2 | P | 4.5 | P* |
| D42 | 24 | 5 | N | P | 5.5 | N | | N |
| D43 | 59 | 2 | N | N | 2.9 | N | | N |
| D44 | 43 | 4 | N | N | 0.3 | N | | N |
| D45 | s/d | 3 | N | N | 0.3 | N | | N |
| D46 | 42 | s/d | N | N | 0.2 | P | 9.6 | P |
| D47 | 35 | 3 | N | P | 3.7 | P | 6.8 | P |
| D48 | 52 | 4 | N | P | 1.9 | P | 15.1 | N |
| D49 | 28 | 5 | N | N | 0.4 | N | | N |
| D50 | 52 | 3 | N | P | 2.5 | P | 19.8 | N |
| D51 | 42 | 1 | N | N | 0.3 | N | | N |
| D52 | 71 | 4 | N | N | 0.2 | N | | N |
| D53 | 38 | s/d | N | N | 0.3 | P | 7.7 | P |
| D54 | 60 | s/d | N | P | 1.7 | P | 16.8 | P |
| D55 | 51 | s/d | N | P | 3.7 | N | | P |
| D56 | 19 | s/d | N | P | 1.3 | N | | N |
| D57 | 40 | s/d | N | N | 0.7 | P | 12.2 | P |
| D58 | 33 | s/d | N | N | 0.4 | P | 17 | P |
| *D59 | 50 | s/d | N | N | 0.2 | P | 6.1 | P |
| D60 | 44 | s/d | N | N | 0.6 | P | 12.8 | P |
| D61 | 23 | s/d | N | N | 0.4 | N | | P |
| D62 | 60 | 3 | N | P | 2.4 | P | 16.4 | P |
| D63 | 31 | s/d | N | N | 0.3 | N | | P |
| D64 | 29 | s/d | N | P | 3.5 | N | | N |
| D65 | 29 | 2 | N | N | 0.5 | N | | N |
| D66 | 26 | 1 | N | N | 0.3 | N | | N |

| Muestra | Edad | Inicio Fiebre (d) | IgM DENV | IgM CHIKV | RATIO | RT-qPCR | Cq | RT-LAMP |
|---------|------|-------------------|----------|-----------|-------|---------|------|---------|
| D67 | 36 | 2 | N | P | 2.1 | P | 18.2 | P |
| *D68 | 29 | 1 | N | N | 0.3 | P | 3.6 | P* |
| D69 | 25 | 4 | N | P | 5.1 | N | | N |
| D70 | 33 | 1 | N | N | 0.2 | N** | 19.4 | N** |
| D71 | 10 | 1 | N | N | 0.3 | N** | 17.8 | N** |
| D72 | 54 | 3 | P | N | 0.2 | P | 13 | P |
| D73 | 37 | 3 | N | N | 0.7 | N | | N |
| D74 | 27 | 3 | N | N | 0.8 | P | 13 | P |
| D75 | 61 | 3 | N | P | 1.4 | P | 16.6 | P |
| D76 | 66 | 4 | N | P | 1.3 | P | 14.8 | N |
| D77 | 37 | s/d | N | P | 6.2 | P | 17.8 | P |
| D78 | | s/d | N | N | 0.3 | N | | P |
| D79 | 38 | 3 | N | N | 0.5 | N | | N |
| D80 | 49 | 2 | N | N | 0.6 | P | 10.8 | P |
| D81 | 44 | 1 | N | N | 0.3 | P | 6.4 | N |
| D82 | | s/d | N | P | 4.5 | N | | N |
| D83 | 40 | s/d | N | P | 6.2 | N | | N |
| D84 | 16 | s/d | N | P | 1.2 | N | | N |
| D85 | 51 | s/d | N | N | 1.0 | P | 18.7 | P |
| D86 | 12 | s/d | N | P | 7.3 | N | | N |
| D87 | 31 | 1 | N | N | 0.3 | P | 11.6 | P |
| D88 | 44 | s/d | N | N | 0.3 | P | 16 | N |
| D89 | 51 | s/d | N | N | 0.3 | N | | N |
| D90 | 51 | s/d | P | N | 0.5 | P | 8.6 | P |
| D91 | 45 | s/d | N | P | 3.3 | N | | N |
| D92 | 40 | s/d | N | N | 0.2 | P | 9.9 | N |
| D93 | 23 | s/d | N | P | 7.1 | N | | N |
| D94 | 50 | 2 | N | N | 0.3 | N | | N |
| D95 | 30 | s/d | N | P | 3.1 | N | | N |

N: negativo, P: Positivo, Cq: Ciclo de cuantificación. *Muestras con Cq alto (diluidas 1:1000), ** Muestras únicamente positivas a DENV. Azul: coincidencias entre RT-LAMP-IgM CHIKV, Rosa: coincidencias entre RT-qPCR-IgM CHIKV. Morado: coincidencia en los 3 ensayos.

Con los datos de la tabla 7, se determinó la correlación entre los días de inicio de síntomas, cuyo valor de R^2 fue de 0.26, indicando que no existe una correlación directa entre los días de evolución y la aparición de IgM (Fig. 27a), en cuanto al valor de Cq el valor de R^2 fue de 0.0085, lo que nos indica que no hubo correlación entre estas variables (Fig. 27b).

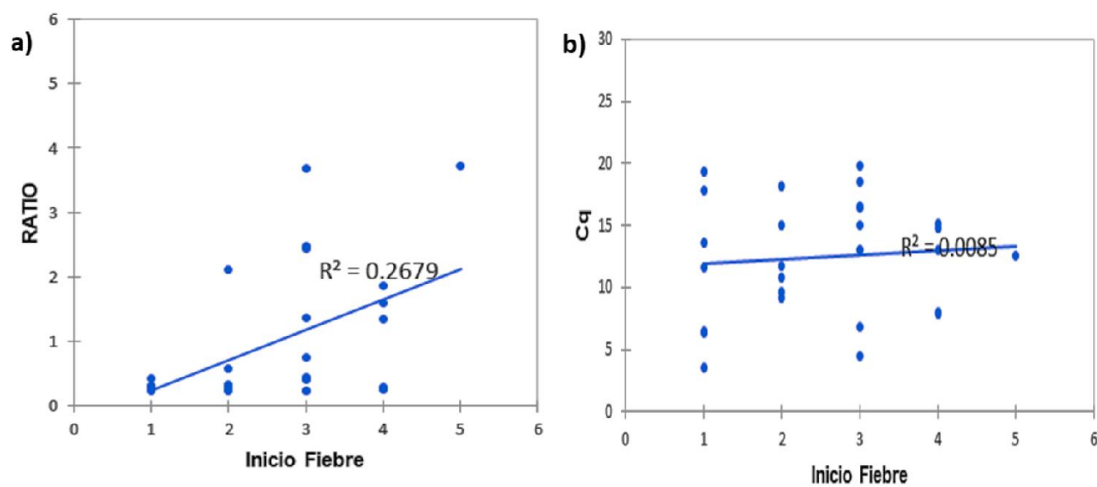


Figura 27.- Correlación entre el día los días de evolución y a) aparición de IgM-CHIKV, b) el Cq de la RT-qPCR para CHIKV. Las gráficas nos muestran que no existe una correlación directa entre las variables, el valor obtenido de R^2 es muy bajo.

8.- DISCUSIÓN

La aparición de nuevos arbovirus en lugares endémicos que producen cuadros clínicos similares es un reto para el diagnóstico en las personas infectadas por los virus Dengue o Chikungunya, por lo que la confirmación por laboratorio es necesaria para emitir un diagnóstico certero [69].

Las pruebas diagnósticas empleadas por los CDC para la detección de ZIKV, DENV o CHIKV emplean métodos moleculares y serológicos; un resultado positivo de una prueba de ácidos nucleicos (NAT) confirma la infección aguda por alguno de los virus, sin embargo, dado que la viremia es variable, un resultado NAT negativo no excluye que el paciente haya sufrido de una infección reciente [46].

El algoritmo de diagnóstico por arbovirus empleado en México [45] incluye la detección molecular si la toma de muestra es en los primeros 6 días (fase aguda), y el serológico si la toma de muestra es en los días 7-14 (fase convaleciente). Sin embargo, para realizar este tipo de pruebas de laboratorio, se requiere transporte en red fría de la muestra hacia los centros de referencia epidemiológica en donde es procesada. Este tipo de transporte tiene muchas complicaciones, ya que no es costoso en los centros de salud enviar todas las muestras y las que son enviadas muchas veces no llegan en las condiciones adecuadas para su procesamiento, por lo que son descartadas. Aproximadamente el 5% de los casos con sospecha de infección tienen la confirmación por los centros de referencia epidemiológica, por lo que implementar una técnica que permita realizar de manera específica y oportuna

un diagnóstico en lugares donde se estén presentando los brotes epidémicos facilitaría el manejo de los pacientes, especialmente en los que presenten complicaciones.

El desarrollo de nuevas herramientas de amplificación isotérmica diseñadas para el diagnóstico en campo facilita la detección de arbovirus en áreas endémicas donde los recursos son limitados por lo que en este trabajo propusimos desarrollar 2 ensayos de RT-LAMP para la detección genómica de DENV y CHIKV demostrando que estos ensayos son específicos para los virus que circulan actualmente en México y no hay hibridación inespecífica entre ellos.

El ensayo de RT-LAMP ha demostrado en otros trabajos realizados tener una sensibilidad superior a la RT-qPCR para detectar DENV y/o CHIKV, por lo que los resultados que obtuvimos nos demuestran que la especificidad de nuestro método es menor a lo ya reportado [66, 67, 70, 71], sin embargo la sensibilidad es buena para ser la primer prueba piloto. El ensayo de RT-LAMP estandarizado en este trabajo demostró que se pueden detectar incluso 0.084 ng/μL del RNA control de DENV (Fig. 19), comparable con el límite de detección reportado (<1 ng/μL) para otros patógenos [72], sugiriendo que el ensayo de RT-LAMP detecta cantidades pequeñas de RNA como se ha demostrado en otros estudios donde es 10 veces más sensible que una RT-PCR convencional [53, 66, 67, 73]. El ensayo de RT-LAMP tiene varias ventajas, por ejemplo la enzima *Bst* puede amplificar a partir de moldes de DNA o RNA por lo tanto no se requiere de adicionar una retrotranscriptasa [74].

Otro aspecto importante a considerar para nuestro estudio, fue la posible hibridación inespecífica entre los primers para DENV y ZIKV ya que, como se ha reportado existe una homología de aproximadamente el 55.6% en la identidad de secuencia de aminoácidos entre estos virus [75, 76] lo cual genera un problema en el diagnóstico entre flavivirus que circulan en la misma zona, por lo tanto el hecho de que nuestra reacción no presente hibridación inespecífica (Fig. 19) hace a al método de RT-LAMP una opción viable para diferenciar a estos virus, sin importar el serotipo de DENV que este circulando.

La RT-qPCR es la técnica de primera elección por los laboratorios para la detección de ácidos nucleicos virales, por lo que en este trabajo se utilizó como prueba de referencia para comparar los resultados obtenidos de los ensayos de RT-LAMP. La prueba de RT-qPCR, incluye la detección simultánea de: CHIKV, DENV 1-4, ZIKV, WNV y YFV. Usando las muestras obtenidas en el brote correspondiente a septiembre y octubre del 2015 de pacientes con sospecha de infección por estos arbovirus, se pudo determinar por RT-qPCR que de las 95 muestras, 2 son positivas al DENV, mismas que coinciden con el resultado obtenido en el ensayo optimizado para DENV de RT-LAMP, sin embargo este número de muestras es muy bajo, por lo que sería conveniente ver el desempeño del ensayo en un brote de DENV. En el ensayo optimizado para CHIKV por RT-qPCR se obtuvieron 41 muestras positivas mientras que por RT-LAMP fueron 45 muestras, y el análisis de la comparación de estos resultados, se determinó un total de 32 verdaderos positivos, 41 verdaderos negativos, 13 falsos positivos y 9 falsos negativos.

Como se observa en la tabla 7 las 4 muestras que presentan un Cq de 3 a 6 (marcadas con un asterisco), indican una carga viral muy alta, lo que nos sugiere que la cantidad de RNA viral podría inhibir la reacción de RT-LAMP, por lo que decidimos diluir el RNA de la muestra D41 (Cq 4.5) (Fig. S4), demostrando que el resultado de RT-LAMP solo fue positivo en la dilución del RNA de 1:1000. Otra característica encontrada durante los ensayos, es que algunas muestras requirieron una dilución 1:1000 (Fig. 21c) para ser detectadas por RT-LAMP, lo que nos sugiere que la enzima *Bst* no trabaja de manera óptima si la muestra tiene una alta concentración de RNA, generando una disminución o inhibición de la amplificación así como se ha observado en una PCR convencional [77].

Los resultados indican que en el caso de CHIKV cuya viremia es muy elevada en los primeros días, sería conveniente diluir las muestras para evitar falsos negativos por esa causa. Sin embargo, en esta población algunas muestras que tienen de 1 a 3 días de evolución presentan una carga viral muy baja o incluso son negativos en todas las pruebas realizadas, lo que nos lleva a pensar que la respuesta inmunológica en cada individuo actúa de manera diferente e impredecible.

El ensayo de RT-LAMP tuvo una sensibilidad del 78% y una especificidad del 75%, menor a lo que han reportado en otros estudios donde la especificidad y sensibilidad es mayor al 95% [67, 78]. Los resultados de la RT-PCR punto final demostraron una sensibilidad del 53%, menor a la RT-qPCR y a RT-LAMP como se esperaba, sin embargo, la especificidad fue del 89%. A pesar de que se emplearon los mismos primers en la realización de la RT-qPCR y la RT-PCR de punto final, se encontraron

discordancias en los resultados (Tabla S1), no habiendo problema con los falsos negativos, dos de los falsos positivos coincidieron con el ensayo de RT-LAMP, para comprobar que los falsos positivos realmente son verdaderos positivos se requiere hacer aislamiento viral o amplificación de otra región y posterior secuenciación.

Los resultados discordantes entre el ensayo de RT-qPCR y RT-LAMP pueden implicar varias cosas: los falsos positivos pueden significar contaminación de muestras o de la mezcla durante la realización de la reacción, ya que como se demostró en la estandarización, es una técnica muy sensible que puede ser susceptible a las amplificaciones inespecíficas. Otra posibilidad es que las muestras sean verdaderamente positivas y que sea muy baja la cantidad de virus que no sea detectado por la RT-qPCR, ya que como se ha demostrado en diversas publicaciones, RT-LAMP puede ser más sensible que cualquier RT-qPCR [79] y tan específica que puede distinguir entre linajes como se reportó para Zika [78].

De las 9 muestras positivas por RT-qPCR y negativas por LAMP para CHIKV consideradas como falsos negativos, el RNA podría no detectarse debido a que las regiones de los primers para ambos ensayos son diferentes, existen estudios donde emplean regiones mucho más conservadas para CHIKV como nsP4 [80]. De acuerdo a lo que se ha visto en otros trabajos, el rango estimado de evolución para el linaje Asiático es de 4.3×10^4 sustituciones/nucleótido/año, siendo E1 el que presenta más variantes relacionadas a la adaptación como las mutaciones E1 T98A, o E1 A226V que facilitan la adaptación del virus en nuevos vectores [81]. Por lo que emplear a E1 podría ser una variable que afecte la detección, explicando así algunas discordancias

en los resultados obtenidos, sugiriendo que para CHIKV debería emplearse una región más conservada, o un multi blanco para incrementar la especificidad como se ha reportado en otras aplicaciones [82].

El algoritmo de diagnóstico que se empleaba para DENV en las Américas se basaba en ensayos para detectar NS1-Ag, IgM e IgG-DENV. Con la entrada de CHIKV se empleó la RT-qPCR, y cuando llegó ZIKV el diagnóstico se complicó por la reactividad cruzada que presenta con DENV, requiriendo ensayos moleculares que permitieran diferenciar a estos virus de manera simultánea, dejando a la serología como un complemento para demostrar que hubo infección en una muestra cuyo resultado fue negativo a los ensayos moleculares.

El título de IgM aumenta conforme avanzan los días [83] (Fig. 27a), sin embargo en el caso de Chikungunya, no existe una estricta relación directa entre los días de evolución y la aparición de IgM, debido a que la respuesta a interferones es diferente para cada individuo, haciendo impredecible el comportamiento de una infección por Chikungunya.

En el caso de CHIKV se esperaría que exista una relación entre el día de inicio de síntomas y el valor de Cq, pero los datos obtenidos indican que no existe una correlación entre estas variables (Fig. 27b), sugiriendo una vez más que la carga viral en cada individuo no depende de que el paciente se encuentre en un día particular de evolución de la enfermedad.

Las muestras negativas a ensayos moleculares y positivas por IgM, sugieren que la respuesta humoral desarrollada es más rápida en algunos casos, por lo tanto

resuelvan la infección más rápido a pesar de que existan citosinas circulantes que ocasionen los síntomas, existe una gran diversidad en la respuesta inmune de la gente.

Otros estudios han reportado resultados de detección serológica y molecular que demuestran una buena sensibilidad (>90%) [83, 84], nosotros encontramos que de las 95 muestras analizadas 73 (76.84%) fueron positivas a CHIKV en al menos uno de los métodos empleados.

Considerando los falsos positivos en el ensayo de RT-LAMP, sólo en 66 muestras (69.47%) se confirma la infección por CHIKV mediante la combinación de RT-qPCR y la detección de anticuerpos IgM.

La detección de Anti-IgM DENV, dio un total de 4/95 muestras positivas, este resultado era de esperarse ya que, en Veracruz, el Dengue es endémico y la mayoría de la población ya ha estado expuesta a la infección por DENV; la detección de Anti-IgM CHIKV fueron 36/95 muestras positivas, de las cuales 13 muestras coincidieron con el ensayo de RT-LAMP, y 12 por RT-qPCR, únicamente 7 coincidieron en los 3 ensayos, en estas muestras la carga viral es más baja comparada con los que dieron un resultado positivo por pruebas moleculares

Las dos muestras que dieron positivo a IgM para CHIKV como para DENV indican una infección reciente para ambos virus, esto no implica necesariamente una infección simultánea, sin embargo no se descarta la posibilidad, ya que la replicación simultánea de DENV y CHIKV sólo se ha comprobado bajo condiciones experimentales en mosquitos [85, 86].

En total, empleando la RT-qPCR y la serología se lograron diagnosticar 66 pacientes que tuvieron infección por CHIKV (69.47%), demostrando que el emplear ambos métodos aumenta la cantidad de muestras detectadas con infección por CHIKV. Sin embargo, es importante la detección temprana en los sitios donde se presentan los brotes, por lo que implementar este tipo de técnicas en México, permitiría el acceso a un diagnóstico diferencial rápido y sencillo que no requiere una gran infraestructura y puede ser implementada en los hospitales que carezcan de grandes recursos, ya que como se observó en este estudio, casi el 70 % de la población tuvo infección por Chikungunya y solo un 4% tuvo dengue, dejando al resto de la población sin diagnóstico confirmatorio ya que todos presentaron los mismos síntomas, sin embargo hay muchas variables que no competen al ensayo, como la calidad que presenta la muestra, la viremia de cada individuo, los ciclos de congelación-descongelación, transporte de la muestra al laboratorio, un agente causal diferente o no identificado, ya que en Veracruz durante el 2015 se reportaron casos por Tifo murino, fiebre manchada, fiebre de malta y leptospirosis [87], los cuales pueden pasar desapercibidos cuando se dan los brotes causados por DENV y/o CHIKV.

Con esos datos, estadísticamente al obtener el área bajo la curva (AUC) el valor es de 0.775, esto significa que existe el 77.5% de correlación, indicado un valor alto para obtener un resultado verdadero, como primera prueba, la técnica de RT-LAMP estandarizada en este trabajo parece una prueba prometedora para la detección de CHIKV en los puntos de atención donde se requiera un diagnóstico.

En este estudio se demostró que en las muestras colectadas en 2015, en la UMF-61, no se detectó ninguna muestra positiva para ZIKV, lo que es interesante, porque corrobora los datos reportados por el SINAVE, donde la introducción del ZIKV fue hasta principios del 2016 en esta población.

La ventaja de RT-LAMP, es que se puede adaptar fácilmente en aquellos sitios donde co-circulen estos virus, ya que con poca infraestructura es posible tener un diagnóstico temprano con un alto porcentaje de certeza, el cual permitiría dar una mejor atención en situaciones de riesgo como: mujeres embarazadas o personas inmunosuprimidas, donde la detección rápida supera la necesidad del diagnóstico definitivo brindado en los centros de referencia.

9.-CONCLUSIONES

- ✓ En este estudio se estableció un sistema específico de RT-LAMP para detectar el DENV, que no presenta reactividad con el ZIKV y que demostró tener una sensibilidad y especificidad del 100% en las muestras colectadas durante el brote del 2015 en Veracruz.

- ✓ Se estableció un sistema de RT-LAMP que detecta el genoma de CHIKV y que demostró tener una sensibilidad del 78% y una especificidad del 75%, cuando fue probado en un grupo de muestras de pacientes con infección por CHIKV.

- ✓ El método de RT-LAMP, es una herramienta molecular útil para la detección de estos virus, que puede ser empleada como alternativa a la RT-qPCR para el diagnóstico diferencial de DENV y CHIKV, en sitios donde se presenten los brotes epidémicos futuros.

PERSPECTIVAS

- Optimizar la sensibilidad y especificidad del ensayo de RT-LAMP para CHIKV, así como evaluar el desempeño de RT-LAMP en los sitios de atención primaria durante los futuros brotes de estos virus en nuestro país.

10.- BIBLIOGRAFÍA

1. Mayer, S.V., R.B. Tesh, and N. Vasilakis, *The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers.* Acta Trop, 2017. **166**: p. 155-163.
2. Blitvich, B., *Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control.* Nikos Vasilakis and Duane J. Gubler. Am J Trop Med Hyg, 2016. **95**(2): p. 488-9.
3. Chen, L.H. and M.E. Wilson, *Update on non-vector transmission of dengue: relevant studies with Zika and other flaviviruses.* Trop Dis Travel Med Vaccines, 2016. **2**: p. 15.
4. Phillips, S.L., et al., *Identification of Proteins Bound to Dengue Viral RNA In Vivo.* 2016. **7**: p. 1-10.
5. Jarmer, J., et al., *Variation of the specificity of the human antibody responses after tick-borne encephalitis virus infection and vaccination.* J Virol, 2014. **88**(23): p. 13845-57.
6. Faustino, A.F., et al., *Understanding dengue virus capsid protein disordered N-Terminus and pep14-23-based inhibition.* ACS Chem Biol, 2015. **10**(2): p. 517-26.
7. Marzinek, J.K., et al., *Pushing the Envelope: Dengue Viral Membrane Coaxed into Shape by Molecular Simulations.* Structure, 2016. **24**(8): p. 1410-1420.
8. Huang, C.Y., et al., *The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion.* Virology, 2010. **396**(2): p. 305-15.
9. Arias, C.F., F. Preugschat, and J.H. Strauss, *Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain.* Virology, 1993. **193**: p. 888-899.
10. Perera, R. and R.J. Kuhn, *Structural proteomics of dengue virus,* in *Current Opinion in Microbiology.* 2008. p. 369-377.
11. Shiryayev, S.A., et al., *NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus.* 2009.

12. Umareddy, I., et al., *Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA*. 2006.
13. El Sahili, A. and J. Lescar, *Dengue Virus Non-Structural Protein 5*. *Viruses*, 2017. **9**(4).
14. Thakkar, N., et al., *Emerging Roles of Heparanase in Viral Pathogenesis*. *Pathogens*, 2017. **6**(3): p. 43.
15. Tio, P.H., W.W. Jong, and M.J. Cardoso, *Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMR1) interaction with dengue virus serotypes 1, 2 and 3*. *Virol J*, 2005. **2**: p. 25.
16. Martin, N.C., et al., *An immunocytometric assay based on dengue infection via DC-SIGN permits rapid measurement of anti-dengue neutralizing antibodies*. *J Virol Methods*, 2006. **134**(1-2): p. 74-85.
17. Yábar., C., *Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus dengue: propuesta de un modelo de replicación del ARN*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 2017. **20**(1): p. 51-57.
18. Yu, I.M., et al., *Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation*. *Science*, 2008. **319**(5871): p. 1834-7.
19. Guzman, M.G., et al., *Dengue infection*, in *Nat Rev Dis Primers*. 2016: England. p. 16055.
20. OMS, *Organización Mundial de la Salud*. 2015.
21. OPS, *OPS*. 2016.
22. PAHO. OPS OMS | *Dengue | Datos estadísticos y epidemiológicos*. 2017; Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=3274&Itemid=40734\(=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=3274&Itemid=40734(=es).
23. Strauss, J.H. and E.G. Strauss, *The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution*. *Microbiol Rev*, 1994. **58**(3): p. 491-562.
24. Solignat, M., et al., *Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus*. *Virology*, 2009. **393**(2): p. 183-97.

25. Sun, S., et al., *Structural analyses at pseudo atomic resolution of Chikungunya virus and antibodies show mechanisms of neutralization*. Elife, 2013. **2**: p. e00435.
26. Bullard-Feibelman, K.M., B.P. Fuller, and B.J. Geiss, *A Sensitive and Robust High-Throughput Screening Assay for Inhibitors of the Chikungunya Virus nsP1 Capping Enzyme*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0158923.
27. Fros, J.J., et al., *The C-terminal domain of chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replication, cytopathicity, and inhibition of interferon signaling*. J Virol, 2013. **87**(18): p. 10394-400.
28. Varjak, M., E. Zusinaite, and A. Merits, *Novel functions of the alphavirus nonstructural protein nsP3 C-terminal region*. J Virol, 2010. **84**(5): p. 2352-64.
29. Rubach, J.K., et al., *Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro*. Virology, 2009. **384**(1): p. 201-208.
30. Jose, J., J.E. Snyder, and R.J. Kuhn, *A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly*. Future microbiology, 2009. **4**: p. 837-56.
31. Parrott, M.M., et al., *Role of Conserved Cysteines in the Alphavirus E3 Protein* φ , in *J Virol*. 2009. p. 2584-91.
32. Dudha, N., et al., *Host-pathogen interactome analysis of Chikungunya virus envelope proteins E1 and E2*. Virus Genes, 2015: p. 200-209.
33. Jose, J., J.E. Snyder, and R.J. Kuhn, *A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly*. Future Microbiol, 2009. **4**(7): p. 837-56.
34. Omar, A. and H. Koblet, *Semliki Forest virus particles containing only the E1 envelope glycoprotein are infectious and can induce cell-cell fusion*. Virology, 1988. **166**(1): p. 17-23.
35. van Duijl-Richter, M.K.S., et al., *Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus CellBinding to Membrane Fusion*. Viruses, 2015. **7**: p. 3647-74.
36. Perera, R., et al., *Alphavirus nucleocapsid protein contains a putative coiled coil alpha-helix important for core assembly*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 1-10.

37. Jupille, H.J., et al., *Mutations in nsP1 and PE2 are critical determinants of Ross River virus-induced musculoskeletal inflammatory disease in a mouse model*. *Virology*, 2011. **410**(1): p. 216-27.
38. Solignat, M., et al., *Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus*. *Virology*, 2009. **393**: p. 183-197.
39. Couderc, T. and M. Lecuit, *Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench*. *Antiviral research*, 2015. **121**: p. 120-31.
40. OMS, *OMS | Chikungunya*. WHO, 2017.
41. OPS. *OPS OMS | Chikungunya | Datos estadísticos*. 2017; Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5932&Itemid=40931\(=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5932&Itemid=40931(=es).
42. SINAVE, *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*. 2016.
43. DGE. *Lineamientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica y diagnóstico por laboratorio de la enfermedad por el virus Zika*. 2016; Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/121722/lineamientos_ve_y_la_b_virus_zika.pdf.
44. DGE. *Casos Confirmados de Enfermedad por Virus del Zika*. 2018; Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/301815/Cuadro_Casos_ZIKA_y_Emb_SE06_2018.pdf.pdf.
45. InDRE. *Lineamientos para la vigilancia por laboratorio del dengue y otras arbovirosis*. 2017; Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/269560/Actualizados_Lineamientos_Dengue_y_otros_Arb_V2.pdf.
46. CDC, *Testing Guidance | Zika Virus | CDC*. 2017.
47. Zhao, Y., et al., *Isothermal Amplification of Nucleic Acids*. *Chem Rev*, 2015. **115**(22): p. 12491-545.
48. Gill, P. and A. Ghaemi, *Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008. **27**(3): p. 224-43.

49. Notomi, T., et al., *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. Nucleic acids research, 2000. **28**: p. E63.
50. Wu, D., et al., *Evaluation of the RT-LAMP and LAMP methods for detection of Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Lab Anal, 2017.
51. Kubo, T., et al., *Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(3): p. 728-35.
52. Zou, D., et al., *Sensitive and Rapid Detection of the Plasmid-Encoded Colistin-Resistance Gene mcr-1 in Enterobacteriaceae Isolates by Loop-Mediated Isothermal Amplification*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2356.
53. Cao, H., et al., *Ultrasensitive detection of mucin 1 biomarker by immuno-loop-mediated isothermal amplification*. Talanta, 2017. **164**: p. 588-592.
54. Aliotta, J.M., et al., *Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3'→5' proofreading exonuclease activity*. Genet Anal, 1996. **12**(5-6): p. 185-95.
55. Nagamine, K., T. Hase, and T. Notomi, *Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers*. Mol Cell Probes, 2002. **16**(3): p. 223-9.
56. Co., E.C. *LAMP design primers*. 2018; Available from: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/index.html>.
57. Niessen, L., *Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts*. Appl Microbiol Biotechnol, 2015. **99**(2): p. 553-74.
58. Mori, Y., et al., *Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(1): p. 150-4.
59. Goto, M., et al., *Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue*. Biotechniques, 2009. **46**(3): p. 167-72.

60. Fischbach, J., et al., *Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine*. Biotechniques, 2015. **58**(4): p. 189-94.
61. Torres Galicia, I., D. Cortés Poza, and I. Becker, *Dengue en México: análisis de dos décadas*. Gaceta médica de México, 2014(2): p. 122-127.
62. InDRE, *Arbovirus y virus hemorrágicos*. 2016.
63. Edwards, C.J., et al., *Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus*. J Clin Virol, 2007. **39**(4): p. 271-5.
64. Wang, X., et al., *Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*. Journal of virological methods, 2016. **238**: p. 86-93.
65. Parida, M., et al., *Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(6): p. 2895-903.
66. Parida, M.M., et al., *Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay*. Journal of Clinical Microbiology, 2007. **45**: p. 351-357.
67. Lu, X., et al., *Rapid Identification of Chikungunya and Dengue Virus by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Method*. 2012. **87**: p. 947-953.
68. Hu, S.-f., et al., *Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1 – 4*. BMC Microbiology, 2015: p. 1-15.
69. PAHO, OPS OMS | *Dengue*. 2017.
70. Sahni, A.K., et al., *Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for diagnosis of dengue*. Med J Armed Forces India, 2013. **69**(3): p. 246-53.
71. Lau, Y.L., et al., *Colorimetric detection of dengue by single tube reverse-transcription-loop-mediated isothermal amplification*. PLoS ONE, 2015. **10**: p. 1-9.

72. Adao, D.E. and W.L. Rivera, *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of the sexually-transmitted parasite, Trichomonas vaginalis*. *Ann Parasitol*, 2016. **62**(1): p. 25-31.
73. Kurosaki, Y., et al., *Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13503.
74. Shi, C., et al., *Innate Reverse Transcriptase Activity of DNA Polymerase for Isothermal RNA Direct Detection*. *J Am Chem Soc*, 2015. **137**(43): p. 13804-6.
75. Danecek, P., W. Lu, and C.H. Schein, *PCP consensus sequences of flaviviruses: correlating variance with vector competence and disease phenotype*. *J Mol Biol*, 2010. **396**(3): p. 550-63.
76. Chang, H.H., et al., *Systematic analysis of protein identity between Zika virus and other arthropod-borne viruses*. *Bull World Health Organ*, 2017. **95**(7): p. 517-525i.
77. Schrader, C., et al., *PCR inhibitors – occurrence, properties and removal*. *Journal of Applied Microbiology*, 2017. **113**(5): p. 1014-1026.
78. Chotiwan, N., et al., *Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses*. *Sci Transl Med*, 2017. **9**(388).
79. Teoh, B.-T., et al., *Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification*. *BMC infectious diseases*, 2013. **13**: p. 387.
80. Pabbaraju, K., et al., *Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay*. *J Clin Virol*, 2016. **83**: p. 66-71.
81. Stapleford, K.A., et al., *Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Outbreak Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements*, in *PLoS Negl Trop Dis*. 2016.
82. Sharma, M., et al., *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for speedy diagnosis of tubercular lymphadenitis: The multi-targeted 60-minute approach*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2016. **100**: p. 114-7.

83. Reddy, V., et al., *Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever*. *J Med Virol*, 2012. **84**(11): p. 1771-8.
84. Sengupta, M., et al., *Utility of Loop-mediated Isothermal Amplification Assay, Polymerase Chain Reaction, and ELISA for Diagnosis of Leptospirosis in South Indian Patients*, in *J Glob Infect Dis*. 2017. p. 3-7.
85. Le Coupanec, A., et al., *Co-Infection of Mosquitoes with Chikungunya and Dengue Viruses Reveals Modulation of the Replication of Both Viruses in Midguts and Salivary Glands of Aedes aegypti Mosquitoes*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(8).
86. Jain, J., et al., *Dengue Chikungunya co-infection: A live-in relationship??* *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **492**(4): p. 608-616.
87. DGE. *Boletín epidemiológico 2015*. 2015; Available from: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/50233/sem52.pdf>.

ANEXOS

Tabla S1.- Resultado de los ensayos moleculares

| ID | RT-qPCR | RT-PCR |
|-----|---------|--------|
| D01 | N | P |
| D02 | P | N |
| D03 | N | N |
| D04 | N | N |
| D05 | P | N |
| D06 | P | N |
| D07 | P | P |
| D08 | P | P |
| D09 | N | N |
| D10 | P | N |
| D11 | N | N |
| D12 | N | N |
| D13 | N | N |
| D14 | N | N |
| D15 | P | P |
| D16 | P | P |
| D17 | N | N |
| D18 | N | N |
| D19 | N | N |
| D20 | P | P |
| D21 | N | N |
| D22 | P | N |
| D23 | P | N |
| D24 | P | N |
| D25 | P | P |
| D26 | N | P |
| D27 | N | N |
| D28 | P | P |
| D29 | P | P |
| D30 | N | N |
| D31 | N | N |
| D32 | N | N |

| ID | RT-qPCR | RT-PCR |
|-----|---------|--------|
| D33 | P | N |
| D34 | N | N |
| D35 | P | P |
| D36 | P | P |
| D37 | N | N |
| D38 | P | P |
| D39 | N | N |
| D40 | P | P |
| D41 | N | N |
| D42 | N | N |
| D43 | N | N |
| D44 | N | N |
| D45 | N | N |
| D46 | N | N |
| D47 | N | N |
| D48 | N | N |
| D49 | P | P |
| D50 | N | N |
| D51 | P | N |
| D52 | N | N |
| D53 | N | P |
| D54 | P | P |
| D55 | N | N |
| D56 | N | N |
| D57 | P | N |
| D58 | P | N |
| D59 | N | N |
| D60 | P | N |
| D61 | P | P |
| D62 | P | P |
| D63 | N | P |
| D64 | N | N |
| D65 | N | N |
| D66 | N | N |
| D67 | P | P |

| ID | RT-qPCR | RT-PCR |
|-----|---------|--------|
| D68 | P | N |
| D69 | N | N |
| D70 | N | N |
| D71 | P | P |
| D72 | N | N |
| D73 | N | N |
| D74 | N | N |
| D75 | P | N |
| D76 | P | P |
| D77 | N | N |
| D78 | N | N |
| D79 | P | N |
| D80 | N | P |
| D81 | P | N |
| D82 | N | P |
| D83 | N | P |
| D84 | P | P |
| D85 | N | N |
| D86 | N | N |
| D87 | N | N |
| D88 | N | N |
| D89 | P | P |
| D90 | P | N |
| D91 | P | N |
| D92 | N | N |
| D93 | P | N |
| D94 | N | N |
| D95 | N | N |

P: Positivo, N: negativo, En azul: Coincidencias entre RT-qPCR y RT-PCR

GELES DEL ENSAYO DE RT-LAMP CHIKV

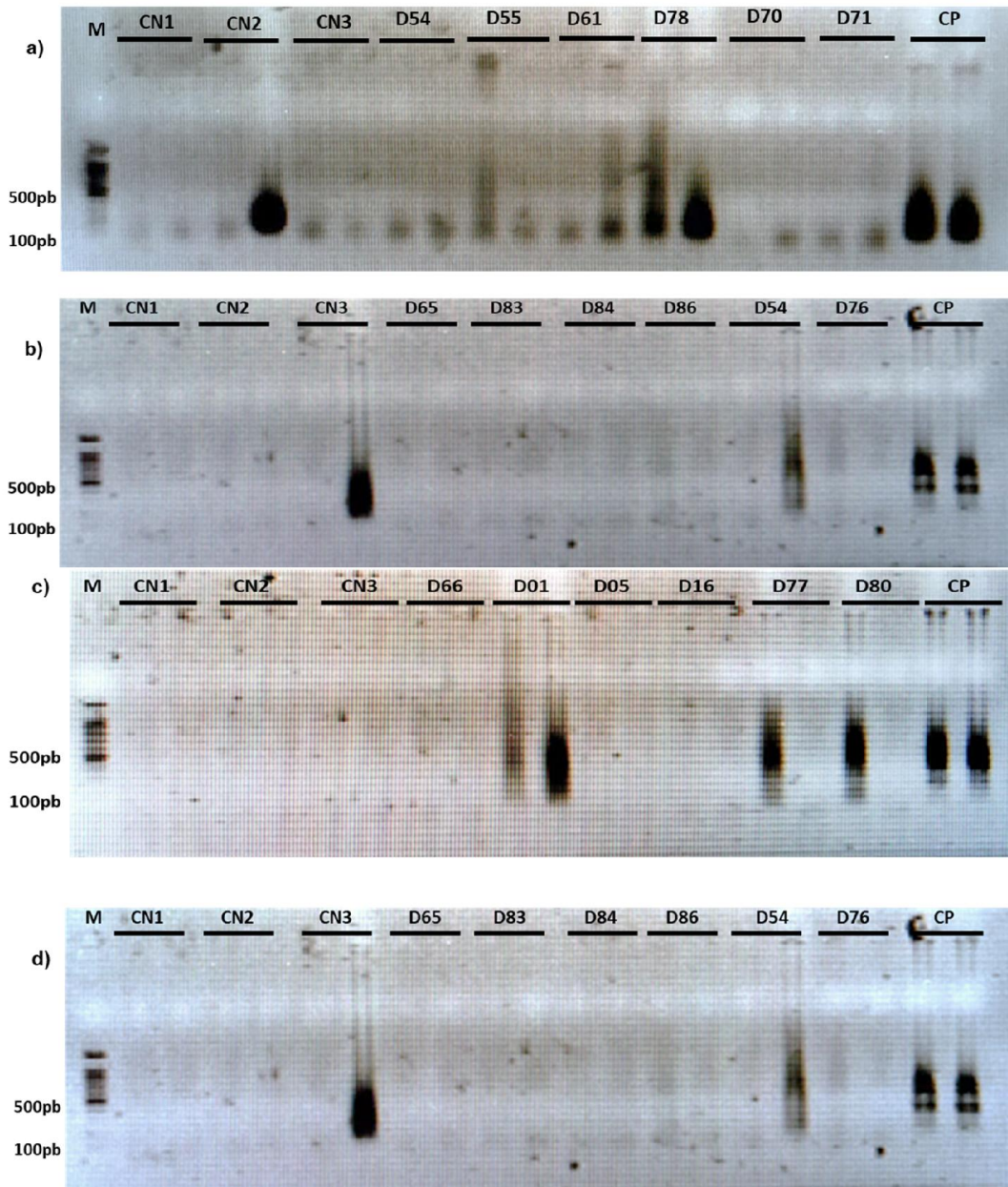


Figura S1.- Amplificación mediante RT-LAMP del genoma de CHIKV en muestras de pacientes. El ensayo se realizó por duplicado y la visualización fue por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las muestras positivas amplificaron formando diferentes patrones de bandeado M: Marcador, CN1: Control negativo mix, CN2: Control negativo zona adición de muestras, CN3: Control negativo zona adición de control positivo, CP: control positivo, D: muestras con sospecha de infección por dengue o chikungunya.

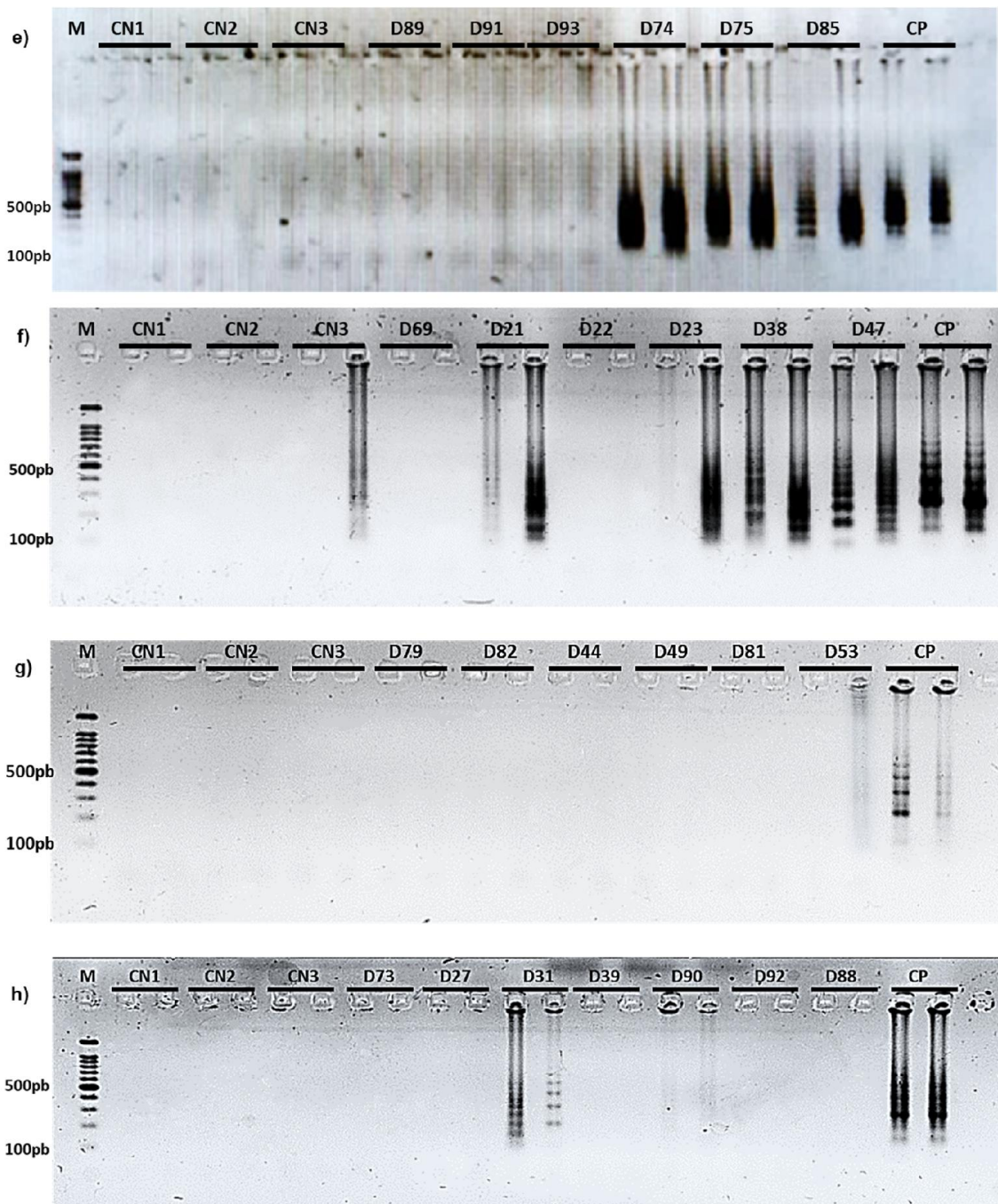


Figura S2.- Amplificación mediante RT-LAMP del genoma de CHIKV en muestras de pacientes. El ensayo se realizó por duplicado y la visualización fue por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las muestras positivas amplificaron formando diferentes patrones de bandeo. M: Marcador, CN1: Control negativo mix, CN2: Control negativo zona adición de muestras, CN3: Control negativo zona adición de control positivo, CP: control positivo, D: muestras con sospecha de infección por dengue o chikungunya.

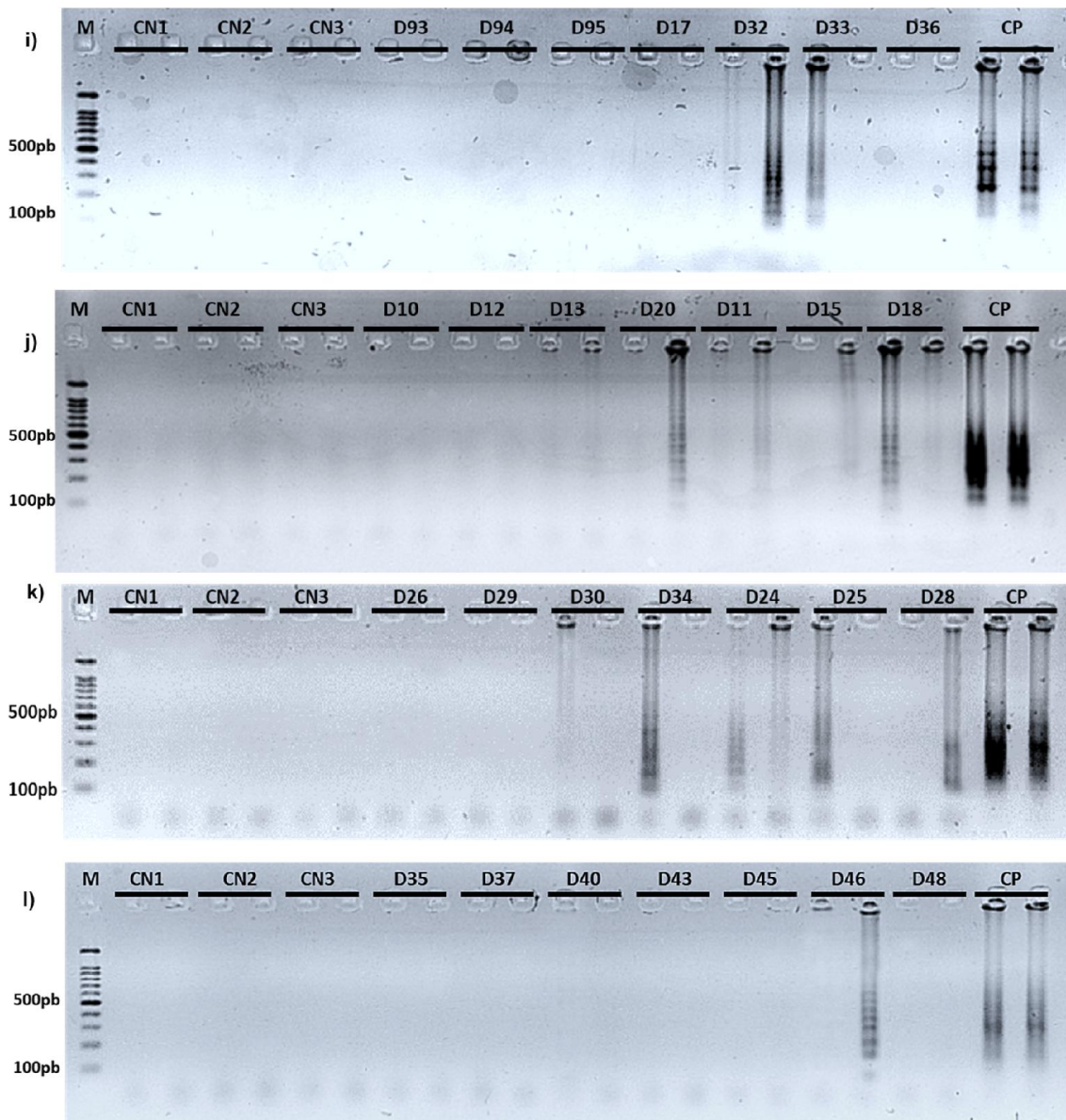


Figura S3.- Amplificación mediante RT-LAMP del genoma de CHIKV en muestras de pacientes. El ensayo se realizó por duplicado y la visualización fue por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las muestras positivas amplificaron formando diferentes patrones de bandeo. M: Marcador, CN1: Control negativo mix, CN2: Control negativo zona adición de muestras, CN3: Control negativo zona adición de control positivo, CP: control positivo, D: muestras con sospecha de infección por dengue o chikungunya.

MUESTRA D41 con un Cq de 4.5

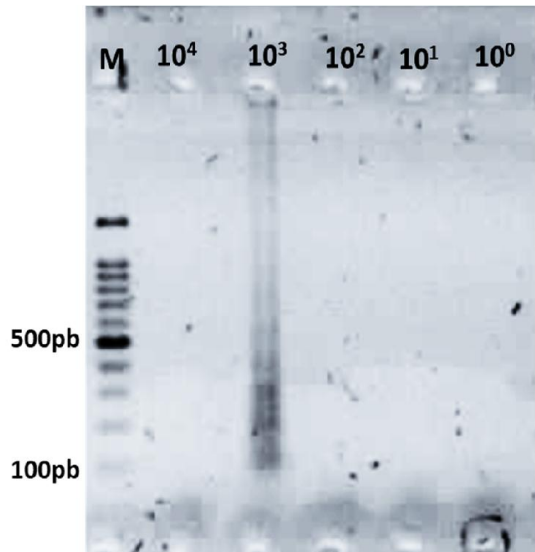


Figura S4: Dilución de muestra con alta carga viral. La visualización de productos se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Únicamente hubo amplificación en la dilución 1:1000.

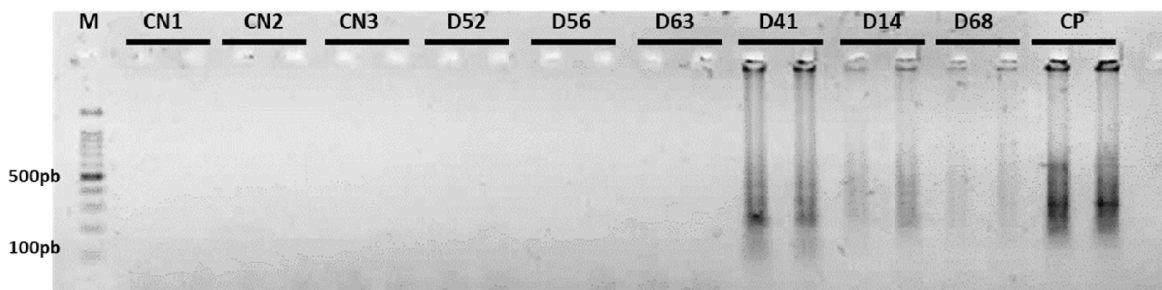


Figura S5: Amplificación mediante RT-LAMP del genoma de CHIKV en muestras de pacientes. La visualización de productos se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las muestras positivas amplificaron formando diferentes patrones de bandeo. A las muestras D41, D14 y D68 se les realizó la dilución 1:1000. M: Marcador, CN1: Control negativo mix, CN2: Control negativo zona adición de muestras, CN3: Control negativo zona adición de control positivo, CP: control positivo, D: muestras con sospecha de infección por Dengue o Chikungunya.

ABREVIATURAS

B3: Backward outer primer

BIP: Backward inner primer

Bst: Polimerasa de *Bacillus Stearothermophilus*

C: Gen d la Cápside

cap: Caperuza en el extremo 5`

CDC: Centro de Control y prevención de Enfermedades

cHDA: Amplificación circular dependiente de helicasa

CHIKV: Virus del Chikungunya

CIENI: Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas

CN: Control negativo

CP: Control positivo

CS: Secuencia de ciclización

D: Dengue

DENV: Virus del Dengue

DGE: Dirección General de Epidemiología

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxinucleótidos Trifosfatados

E1: Gen de la Envoltura 1

ELISA: Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas

F3: Forward outer primer

FIP: Forward inner primer

GAGs Glicosaminoglicanos

HDA: Amplificación dependiente de helicasa

HNB: Azul de hidroxinaftol

IgG: Inmunoglobulina clase G

IgM: Inmunoglobulina clase M

IMDA: Amplificación isotérmica de desplazamiento múltiple

InDRE: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica

kb: Kilo bases
kDa: Kilo Daltones
M: Marcador
MgSO₄: Sulfato de Magnesio
mRNA: RNA mensajero
NASBA: Amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico
NAT: Prueba de ácidos nucleicos
nsP: Proteína no estructural
OMS: Organización Mundial de la Salud
ORF: Marco abierto de lectura
PAHO: Organización Panamericana de la Salud
Pb: Pares de bases
PHB: Receptor de prohibitina
PtdSer: Fosfatidilserina
RT-qPCR: RT-PCR en tiempo real
RCA: Amplificación de círculo rodante
RdRp: Polimerasa de RNA dependiente de RNA
RE: Retículo endoplásmico
Rfs: Formas replicativas
RIs: Intermediarios replicativos
RNA: Ácido Ribonucleico
RT-LAMP: Amplificación isotérmica mediada por “asa” con retrotranscripción
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción
SDA: Amplificación de desplazamiento de cadena
SINAVE: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SMART: Amplificación mediada por señal de tecnología de RNA,
SPIA: Amplificación isoterma de cebador único
ssRNA: RNA de cadena sencilla
TA: Temperatura ambiente
TMA: Amplificación mediada por transcripción

UAR: Región río arriba del codón AUG

UTR: Región no traducida

WNV: Virus del Oeste del Nilo

YFV: Virus de Fiebre Amarilla

ZIKV: Virus del Zika

Apéndice de figuras

Figura 1.- Triada epidemiológica

Figura 2.- Estructura y organización genómica del DENV

Figura 3.- Ciclo y Replicación del DENV

Figura 4.- Epidemiología DENV 2015

Figura 5.- Epidemiología DENV 2016

Figura 6.- Epidemiología DENV 2017

Figura 7.- Estructura y organización genómica de CHIKV

Figura 8.- Ciclo y replicación viral del CHIKV

Figura 9.- Epidemiología CHIKV 2015

Figura 10.-a) Epidemiología CHIKV 2016 y b) 2017

Figura 11.- Algoritmo para el diagnóstico de DENV, ZIKV y CHIKV en fase aguda InDRE

Figura 12.- Algoritmo para el diagnóstico de DENV, ZIKV y CHIKV en fase convaleciente

Figura 13.- Algoritmo para el diagnóstico de DENV, ZIKV y CHIKV por la CDC

Figura 14.- Reacción de LAMP

Figura 15.- Detección de productos de LAMP

Figura 16.- Amplificación por RT-PCR punto final de los controles de DENV y CHIKV

Figura 17.- Alineamiento de la secuencia consenso DENV y CHIKV

Figura 18.- a) Detección del genoma mediante RT-LAMP de DENV, CHIKV y ZIKV

Figura 19.- Especificidad de primers de DENV

Figura 20.- Sensibilidad de RT-LAMP empleando DENV 2

Figura 21.- Detección del genoma de DENV por RT-LAMP

Figura 22.- Detección del genoma de CHIKV por RT-LAMP

Figura 23.- Detección del genoma de ZIKV por RT-LAMP

Figura 24.- Curva ROC del ensayo de RT-LAMP

Figura 25.- Correlación lineal de Pearson

Figura 26.- Amplificación por RT-PCR punto final de muestras de CHIKV

Figura 27.- Correlación entre los días de inicio de síntomas y el Ratio de IgM-CHIKV y la Cq de la RT-qPCR