

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**“SERO-EPIDEMIOLOGÍA, ASILAMIENTO, TITULACIÓN Y
GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE Y OTROS ARBOVIRUS
AISLADOS EN PACIENTES DE LA CIUDAD DE REYNOS, TAMAULIPAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

STEPHANIE VIRIDIANA LAREDO TISCAREÑO

REYNOSA, TAMPS.

AGOSTO 2018

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**“SERO-EPIDEMIOLOGÍA, ASILAMIENTO, TITULACIÓN Y
GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE Y OTROS ARBOVIRUS
AISLADOS EN PACIENTES DE LA CIUDAD DE REYNOS, TAMAULIPAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

STEPHANIE VIRIDIANA LAREDO TISCAREÑO

REYNOSA, TAMPS.

AGOSTO 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 29 del mes de Junio del año 2018, la que suscribe Stephanie Viridiana Laredo Tiscareño alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro B140994, adscrita al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez, Dr. Juan Santiago Salas Benito y cede los derechos del trabajo titulado "Sero-epidemiología, aislamiento, titulación y genotipificación del virus del dengue y otros arbovirus aislados en pacientes de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas.", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones Bld. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Stephanie Viridiana Laredo Tiscareño



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 12:00 horas del día 04 del mes de Julio del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada: Sero-epidemiología, aislamiento, titulación y genotipificación del virus del dengue y otros arbovirus aislados en pacientes de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas.

Presentada por el alumno:

Laredo	Tiscareño	Stephanie Viridiana					
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)					
		Con registro: B 1 4 0 9 9 4					

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez

Dr. Juan Santiago Salas Benito

Dr. Erick de Jesús de Luna Santillana

Dr. Carlos Ignacio Machain Williams

Dr. Víctor Ricardo Moreno Medina

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez



INSTITUTO POLITÉCNICO
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA
GENÉTICA

ÍNDICE

Sección	Página
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
AGRADECIMIENTOS	viii
DECICADORIA	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
JUSTIFICACIÓN	xiii
HIPÓTESIS	xiv
OBJETIVOS	xv
Objetivo General	xv
Objetivos particulares	xv
CAPÍTULO I: Introducción	
1.1 Introducción general	1
1.2 Flavivirus	3
1.2.1 Virus del Dengue	4
1.2.1.1 Origen y Epidemiología del VDEN	6
1.2.1.2 Epidemiología del VDEN en las Américas y México	8
1.2.1.3 Ciclo de Transmisión del VDEN	9
1.2.1.4 Manifestaciones clínicas por VDEN	10
1.2.1.5 Replicación del VDEN	12
1.2.1.6 Formas graves de la enfermedad por VDEN	14
1.2.1.7 Tratamiento y vacuna contra el VDEN	17
1.2.2 Virus del Oeste del Nilo	18
1.2.2.1 Epidemiología de VON en México	19
1.2.2.2 Ciclo de Transmisión del VON	20
1.2.2.3 Manifestaciones clínicas por VON	21

1.2.2.4 Vacunas candidatas anti-VON	22
1.2.3 Virus del Zika	23
1.2.3.1 Epidemiología del VZIK	23
1.2.3.2 Epidemiología del VZIK en México	24
1.2.3.3 Ciclo de Transmisión del VZIK	25
1.2.3.4 Manifestaciones clínicas por VZIK	26
1.2.3.5 Patogenicidad por VZIK	27
1.2.3.6 Alternativas de vacuna contra VZIK	28
1.3 Alfavirus	29
1.3.1 Virus del Chikungunya	29
1.3.2 Epidemiología del VCHIK en México	31
1.3.3 Manifestaciones clínicas por VCHIK	32
1.3.4 Genoma del VCHIK	33
1.3.5 Replicación del VCHIK	34
1.3.6 Patogenicidad por VCHIK	36
1.3.7 Recientes tratamientos contra el VCHIK	37
1.4 Referencias	39

**CAPÍTULO II: Vigilancia para flavivirus cerca de la frontera México-EUA:
co-circulación de los serotipos 1, 2 y 3 de dengue y virus del Oeste
del Nilo en Tamaulipas, norte de México**

Resumen en español	57
Resumen en inglés	58
2.1 Introducción	59
2.2 Métodos	61
2.3 Resultados	65
2.4 Discusión	77
2.5 Conclusión	81
2.6 Referencias	82

**CAPÍTULO III: Vigilancia de arbovirus cerca de la frontera México/EUA:
aislamiento y análisis de secuencia del virus de chikungunya en
pacientes con síntomas similares a dengue en Reynosa, Tamaulipas**

Resumen en español.....	90
Resumen en inglés	91
3.1 Introducción	92
3.2 Métodos	93
3.3 Resultados	96
3.4 Discusión	100
3.5 Conclusión	101
3.6 Referencias	102

CAPÍTULO IV: Detección del anticuerpo IgE anti-dengue a partir de sueros con
infección reciente por VDEN en pacientes de la ciudad de Reynosa,
Tamaulipas

Resumen en español.....	106
Resumen en inglés	107
4.1 Introducción	108
4.2 Métodos	109
4.3 Resultados	114
4.4 Discusión	117
4.5 Conclusión	118
4.6 Referencias	120

ANEXOS

Capítulo II

PRNT.....	124
Genotipificación del VDEN	131
Filogenia de VDEN	132

Capítulo III

Aislamiento viral de VCHIK	136
Genotipificación de VCHIK	137
Secuencias del genoma completo del aislado CH-R-1950	144
Secuencia de las proteínas estructurales del aislado CH-R-1972	149
Secuencia de las proteínas estructurales del aislado CH-R-2295	151

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Capítulo I	
Cuadro 1. Clasificación de VDEN en genotipos de acuerdo a su secuencia nucleotídica	5
Cuadro 2. Modificación de la clasificación de gravedad por dengue	11
Cuadro 3. Vacunas candidatas en ensayos clínicos contra el VON en humanos	22
Cuadro 4. Características clínicas de arbovirus	27
Cuadro 5. Ensayos actuales de vacunas contra VZIK	28
Capítulo II	
Cuadro 1. Cebadores empleados para la detección de los serotipos de VDEN en la investigación clínica	64
Cuadro 2. Número de casos sospechosos y confirmados por dengue en Reynosa, Tamaulipas, 2014 a 2016	66
Cuadro 3. Detección del RNA del virus del dengue en suero en fase aguda en pacientes de dengue en Reynosa, Tamaulipas, 2014 a 2016	71
Cuadro 4. Número (%) de participantes en la investigación del estudio de campo con resultados basales de ELISA positivos, equívocos y negativos	72
Cuadro 5. Datos de los historiales de viaje, descubrimientos clínicos y serológicos de los pacientes que se seroconvirtieron	75
Cuadro 6. Hallazgos serológicos de los participantes seleccionados en la investigación de campo, incluyendo a todos los IgM contra flavivirus basales	76

Capítulo III

Cuadro 1. Resultados demográficos, clínicos, y de laboratorios de pacientes de Chikungunya	98
---	----

Capítulo IV

Cuadro 1. Participantes en la investigación clínica e investigación de campo con resultados positivos a IgE anti-dengue	116
Cuadro 2. Hallazgos serológicos de los participantes seleccionados en la investigación clínica y de campo	116

Anexos

Capítulo II

Cuadro 1. Secuencias de VDEN usadas en el estudio de la filogenia	133
Cuadro 2. Secuencia de nucleótidos y posición de los cebadores (DV1) consenso (río arriba) y de (DSP1-4) tipo-específico río abajo	133

Capítulo III

Cuadro 1. Cebadores utilizados para el ensayo RT-PCR y secuenciación del genoma de VCHIK	140
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
<i>Capítulo I</i>	
Figura 1. Mosquitos vectores de arbovirus y clasificación de arbovirus	2
Figura 2. Estructura y organización general del genoma de los flavivirus	3
Figura 3. Origen del vector de dengue y expansión mundial del VDEN	7
Figura 4. Períodos de incubación extrínseco e intrínseco del VDEN	9
Figura 5. Ciclo de infección del VDEN	13
Figura 6. Respuesta Inmunológica a una infección por Dengue	15
Figura 7. Potenciación mediada por anticuerpos [ADE].....	16
Figura 8. Distribución global en 2006 de VON	19
Figura 9. Revisión del ciclo de transmisión de VON	21
Figura 10. Origen del virus del VZIK y áreas de alto y bajo riesgo de infección	24
Figura 11. Ciclo de transmisión de VZIK	26
Figura 12. Origen, brotes y distribución de VCHIK	31
Figura 13. Línea de tiempo de la infección, síntomas y biomarcadores de VCHIK ..	32
Figura 14. Estructura y organización del genoma de VCHIK	33
Figura 15. Ciclo de infección de VCHIK.....	35
<i>Capítulo II</i>	
Figura 1. Localización geográfica del área metropolitana Reynosa-McAllen	63
Figura 2. Características de la edad de los pacientes en la investigación clínica basada en hospitales	68
Figura 3. Incidencia semanal de dengue en Reynosa, Tamaulipas en 2014 a 2016 ...	69

Capítulo III

- Figura 1.** Localización geográfica del área metropolitana Reynosa-McAllen94
- Figura 2.** Análisis filogenético de la secuencia del genoma completo de CH-R-1950
y otros aislamientos del virus del chikungunya seleccionados99

Capítulo IV

- Figura 1.** Localización geográfica del área metropolitana Reynosa-McAllen111

Anexos

Capítulo II

- Figura 1.** Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en
placa (PRNT) del VDEN-1 en muestras de suero en diferentes diluciones .124
- Figura 2.** Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en
placa (PRNT) del VDEN-2 en muestras de suero en diferentes diluciones .125
- Figura 3.** Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en
placa (PRNT) del VDEN-3 en muestras de suero en diferentes diluciones .126
- Figura 4.** Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en
placa (PRNT) del VDEN-4 en muestras de suero en diferentes diluciones .127
- Figura 5.** Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en
placa (PRNT) de VON en muestras de suero en diferentes diluciones128
- Figura 6.** Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en
placa (PRNT) de VZIK en muestras de suero en diferentes diluciones129
- Figura 7.** Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en
placa (PRNT) de ESLV en muestras de suero en diferentes diluciones130
- Figura 8.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de
VDEN en muestras de suero de la colonia Nuevo Amanecer en gel de

agarosa al 1%	131
Figura 9. Análisis filogenético de la relación evolutiva de 13 secuencias de VDEN identificados en residentes de Reynosa	132
Figura 10. Mapa del área metropolitana Reynosa-McAllen mostrando las colonias en la ciudad de Reynosa que presentaron anticuerpos anti-arbovirus detectados por PRNT durante el estudio	134
Figura 11. Mapa del área metropolitana Reynosa-McAllen mostrando la circulación de serotipos de VDEN en colonias de la ciudad de Reynosa en 2014 durante el estudio	135
Figura 12. Mapa del área metropolitana Reynosa-McAllen mostrando la circulación de serotipos de VDEN en colonias de la ciudad de Reynosa en 2015 durante el estudio	135
Figura 13. Mapa del área metropolitana Reynosa-McAllen mostrando la circulación de serotipos de VDEN en colonias de la ciudad de Reynosa en 2016 durante el estudio	135

Capítulo III

Figura 1. Aislamiento de VCHIK en células Vero	136
Figura 2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación del aislamiento CH-R-1950 del VCHIK en gel de agarosa al 1%	137
Figura 3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de los aislamientos CH-R-1972 y CH-R-2295 del VCHIK en gel de agarosa al 1%.....	138
Figura 4. Mapa del área metropolitana Reynosa-McAllen mostrando la circulación de VCHIK en diversas colonias de la ciudad de Reynosa en 2015 durante el estudio	139

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE	Potenciación mediada por anticuerpos
AINE	Anti-Inflamatorios No Esteroides
BT	Back Titration; Titulación del virus
CENAPRECE	Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
CO ₂	Dióxido de carbono
DCSA	Dengue con Signos de Alarma
DG	Dengue Grave
dH ₂ O	Agua destilada
DMEM	Medio de cultivo; <i>Dulbecco's Modified Eagles Minimal Essential Medium</i>
D.O.	Densidad óptica
DSSA	Dengue Sin Signos de Alarma
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ESLV	Virus de la Encefalitis de San Luis
ETV	Enfermedades Transmitidas por Vector
FAME	Fármacos Anti-reumáticos Modificadores de la Enfermedad
FAV	Virus de la Fiebre Amarilla
FCHIK	Fiebre por Chikungunya
FD	Fiebre por Dengue
FHD	Fiebre Hemorrágica por Dengue
FVON	Fiebre por Virus del Oeste del Nilo
HRP	Peroxidasa de rábano; <i>Horseradish peroxidase</i>
i.e.	es decir; <i>id est</i>
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
ISU	Universidad Estatal de Iowa; <i>Iowa State University</i>
MP	Membrana Plasmática
nAb	Anticuerpo Neutralizante
NIAID	Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas
nm	nanometros
NS	No estructurales
nt	Nucleótidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Pan Americana de la Salud
ORF	Marco de Lectura Abierto
pb	pares de bases
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos; <i>Phosphate buffered saline</i>

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIE	Periodo de Incubación Extrínseca
PII	Periodo de Incubación Intrínseca
PRNT	Prueba de Neutralización de la Reducción en Placa
PSV	Partículas Similares a Virus
qRT-PCR	Reacción de transcripción inversa y en cadena de la polimerasa cuantitativa múltiplex
RE	Retículo Endoplásmico
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Suero Fetal Bovino
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SNC	Sistema Nervioso Central
SS	Secretaria de Salud
SSD	Síndrome de Shock por Dengue
TBEV	Encefalitis transmitidas por garrapatas
µl	microlitro
UTR	Regiones no traducidas
VCHIK	Virus del Chikungunya; <i>Chikungunya virus (CHIKV)</i>
VDEN	Virus del Dengue; <i>Dengue virus (DENV)</i>
VEEE	Virus de la Encefalitis Equina del Este
VEEO	Virus de la Encefalitis Equina del Oeste
VEJ	Virus de la Encefalitis Japonesa; <i>Japanese encephalitis virus (JEV)</i>
VEEV	Virus de la Encefalitis Equina Venezolana
VGETA	Virus Getah
VLP	Partículas tipo virus
VNNO	Virus o'nyong-nyong
VON	Virus del Oeste del Nilo; <i>West Nile virus (WNV)</i>
VSIN	Virus Sindbis
VZIK	Virus del Zika; <i>Zika virus (ZIKV)</i>
WD	Working Dilution; Dilución de trabajo

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores; Dr. Mario A. Rodríguez-Pérez y Dr. Juan Santiago Salas-Benito, por ofrecerme la oportunidad de vivir esta experiencia de Doctorado.

A la Dra. Ma. Isabel Salazar-Sánchez; por haberme permitido hacer una estancia de investigación por un año y medio en la ENCB-IPN, de la cual me llevo todas las experiencias académicas y sobre todo el que ella me haya encaminado a la lucha por lograr mis objetivos.

Al Dr. Carlos I. Machain-Williams; que ha sido un actor principal para que este gran trabajo haya llegado a un buen término, estoy profundamente agradecida, el que me haya consentido hacer una estancia de investigación en la UADY por un año, donde me permitió ampliar mis habilidades y conocimientos académicos.

Al Dr. Julián E. García-Rejón; por incluirme y hacerme sentir parte del laboratorio de Arbovirología en la UADY y confiar en mi trabajo y persona, nunca había disfrutado una plenitud en el equipo de trabajo.

Al Dr Erick de Jesús De Luna-Santillana; por siempre: compartir y otorgarme el apoyo, emocional y académico en todo este largo camino de trabajo y aprendizaje. ¡Gracias por todo!.

Al Dr. Bradley J. Blitvich; le agradezco infinitamente el haberme aceptado en el laboratorio de Virología de la Univerdidad Estatal de Iowa, para realizar mi primera estancia de investigación internacional y más que nada, que haya depositado en mi persona y en mi trabajo la confianza que rindió frutos en dos publicaciones internacionales de gran relevancia médica en la región. Además, de compartir, aconsejarme académicamente y

hacer platica cada semana en el bar de la esquina acompañados de la respectiva cerveza fría. Pero, principalmente su amistad en todo momento.

A mis entrañables amigos que conocí a lo largo de estas estancias y me brindaron, afecto, amistad, apoyo, cariño, hogar, alimentos, etc; y excelentes momentos, que jamás olvidaré, todos son importantes para mi: Inci, Luis Antonio, Biol. Rosy Cetina, Dra. Nubia Rivero, Dra Alma Dzul, Lucio, Nohemí, Carlos, Laura, Lula, Luis, Jermilla, Chandra, Kristina, Nicholas, Richard, Dra. Mary Sauer, Sra. Debbie Younkin y Johanna.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de la beca de doctorado.

Al Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI) por el apoyo de beca institucional durante el periodo del postgrado.

Y finalmente, al CBG-IPN por haber confiado para poder llevar a cabo mis estudios de doctorado.

DEDICATORIA

A mis padres; Sra. Hilda Tiscareño Vasques de Laredo y el Sr. Manuel Laredo Arías.

A mis hermanas: Srita. Ana Gabriela Laredo Tiscareño y Srita. Jeniffer Montserrat
Laredo Tiscareño

A mi abuela paterna: Sra. María Dolores Arías García⁺

RESUMEN

Los arbovirus transmitidos por mosquitos, han causado enfermedades en humanos durante siglos, sin embargo, debido a la globalización solo algunos arbovirus han escalado a ser una gran amenaza de salud pública mundial. Entre estos arbovirus destacan el virus del dengue (VDEN), virus del Chikungunya (VCHIK), virus del Oeste del Nilo, (VON), virus de la Encefalitis Japonesa (VEJ) y el virus del Zika (VZIK). Conocer la epidemiología de estas enfermedades es esencial para la detección temprana de brotes y para su control. En este contexto, se realizó una investigación clínica, serológica y molecular para conocer la epidemiología del VDEN y otros arbovirus en residentes de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas.

Este trabajo demuestra la circulación simultánea de cinco arbovirus: VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3, VON (primer reporte en Tamaulipas) y VCHIK. En el caso de VCHIK, se realizaron tres aislamientos virales, un aislado generó la primera secuencia del genoma completo de VCHIK en el norte de México y dos aislados para los genes estructurales (C, E3, E2, 6K/TF y E1). Además, se detectaron anticuerpos reactivos anti-VDEN, como IgM en individuos asintomáticos, IgG en individuos con seroconversión e IgE en individuos con infección primaria y secundaria durante la infección aguda por dengue. Finalmente, demostramos que IgE también puede ser utilizado como un posible marcador serológico para detectar infecciones tempranas por dengue.

ABSTRACT

Mosquito-borne arboviruses have caused diseases in humans for centuries. However, due to the high globalization, only a few have escalated to be a major global public health concern. These mosquito-borne arboviruses include dengue virus (DENV), Chikungunya virus (CHIKV), West Nile virus (WNV), Japanese Encephalitis virus (JEV), and Zika virus (ZIKV). Understanding the epidemiology of these diseases is essential for the early detection of outbreaks and for their control. In this context, a clinical, serological and molecular research was conducted to know the epidemiology of VDEN and other arboviruses in residents of the city of Reynosa, Tamaulipas.

This study demonstrates the simultaneous circulation of five arboviruses: DENV-1, DENV-2, DENV-3, WNV (first report in Tamaulipas) and CHIKV. In the case of CHIKV, three strains were isolated, one of them was to generate the first full-genomic sequence of CHIKV in northern Mexico and two isolates generated a full genomic sequence for structural genes (C, E3, E2, 6K/TF y E1). Additionally, anti-DENV antibodies were detected, such as IgM in asymptomatic persons, IgG in individuals with seroconversion and IgE in persons with primary and secondary infection during acute dengue infection. Finally, we demonstrate that IgE could be used as a possible serological marker to detect early dengue infections.

JUSTIFICACIÓN

Los arbovirus se han convertido en un problema grave de salud pública durante la última década, tanto en México como en todo el mundo. El panorama epidemiológico de los arbovirus en México brinda la oportunidad de analizar un problema de salud regional y los factores de riesgo involucrados en la génesis de la enfermedad. Sin embargo, existen pocos reportes en el noreste de México. Este estudio sero-epidemiológico ayudará a realizar un mejor análisis para detectar la prevalencia de los arbovirus en la región.

HIPÓTESIS

La infección viral por VDENV y otros arbovirus es activa y prevalente debido a los factores de alto riesgo existentes en la ciudad de Reynosa, Tamaulipas, ubicada en la frontera entre los Estados Unidos y México.

OBJETIVOS

General

Estimar los índices de exposición al VDEN y otros arbovirus (seroprevalencia, seroconversión y caracterización de serotipos/genotipos circulantes) en muestras de suero donados por la Secretaría de Salud y tomada de los residentes de una colonia de bajo estrato socio-económico y de alto riesgo para arbovirus de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas.

Específicos

1. Realizar un estudio demográfico y socioeconómico para conocer las variables implicadas en la transmisión del VDEN.
2. Efectuar un muestreo longitudinal serológico para estimar los índices de seroprevalencia y seroconversión a VDEN en pacientes sintomáticos y asintomáticos.
3. Definir la filo-geografía de los arbovirus de las muestras de suero de los pacientes colectada y donada.
4. Determinar la utilidad de anticuerpos IgE anti-dengue a partir de sueros con infección.
5. Estimar la titulación de los arbovirus presentes en las muestras de sangre colectada y donada.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

1.1 Introducción General

Los arbovirus (de inglés: arthropod-borne viruses) son los agentes etiológicos más importantes de salud pública a nivel mundial, responsables de enfermedades febriles, y a veces mortales en humanos y animales (Alva-Urcia *et al.*, 2017). Estos patógenos causan una gran alerta y preocupación debido a su amplia distribución y rápida expansión (Kraemer *et al.*, 2015). Los arbovirus son transmitidos por artrópodos, por lo que estas enfermedades son conocidas como Enfermedades Transmitidas por Vector (ETV's) (Institute of Medicine Forum on Microbial Threats, 2008). Estas ETV's son transmitidas horizontalmente por vectores hematófagos hacia sus hospederos vertebrados (Coffey *et al.*, 2008). Entre los vectores de mayor importancia por transmitir el mayor número de ETV's destacan los mosquitos y garrapatas, siendo los primeros los de mayor importancia a nivel mundial (Salas-Benito *et al.*, 2015). Recientemente, los arbovirus han calificado como “Enfermedades Tropicales Desatendidas” y son definidas como un grupo de enfermedades infecciosas tropicales en países en vías de desarrollo que tienen impacto en la salud a largo plazo en poblaciones de bajos ingresos (LaBeaud, 2008). Sin embargo, las arbovirosis no se limitan a las regiones tropicales, por el contrario, se encuentran distribuidas en todos los continentes, con excepción de la Antártida (Gratz, 1999; Gubler, 1998).

Ahora bien, se han registrado alrededor de 300 especies de mosquitos que actúan como vectores de arbovirus; *Aedes spp.* y *Culex spp.* son los géneros más frecuentemente asociadas como vectores con 115 y 105 arbovirus transmitidos, respectivamente (Liang *et al.*, 2015) (Figura 1). No obstante, *Aedes (Stegomyia) aegypti* se destaca entre ellos, ya que actúa como vector primario de los arbovirus de mayor importancia médica, como la fiebre amarilla, dengue y Zika (Ritchie, 2014); muchos otros arbovirus, i.e. Encefalitis Japonesa, virus del Oeste del Nilo, Chikungunya, etc., también representan una amenaza latente en salud pública. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima cientos de millones de infecciones y decenas de miles de muertes atribuidas a enfermedades

arbovirales transmitidas por mosquitos y con más de la mitad de la población mundial en riesgo de infección (Carter *et al.*, 2015).

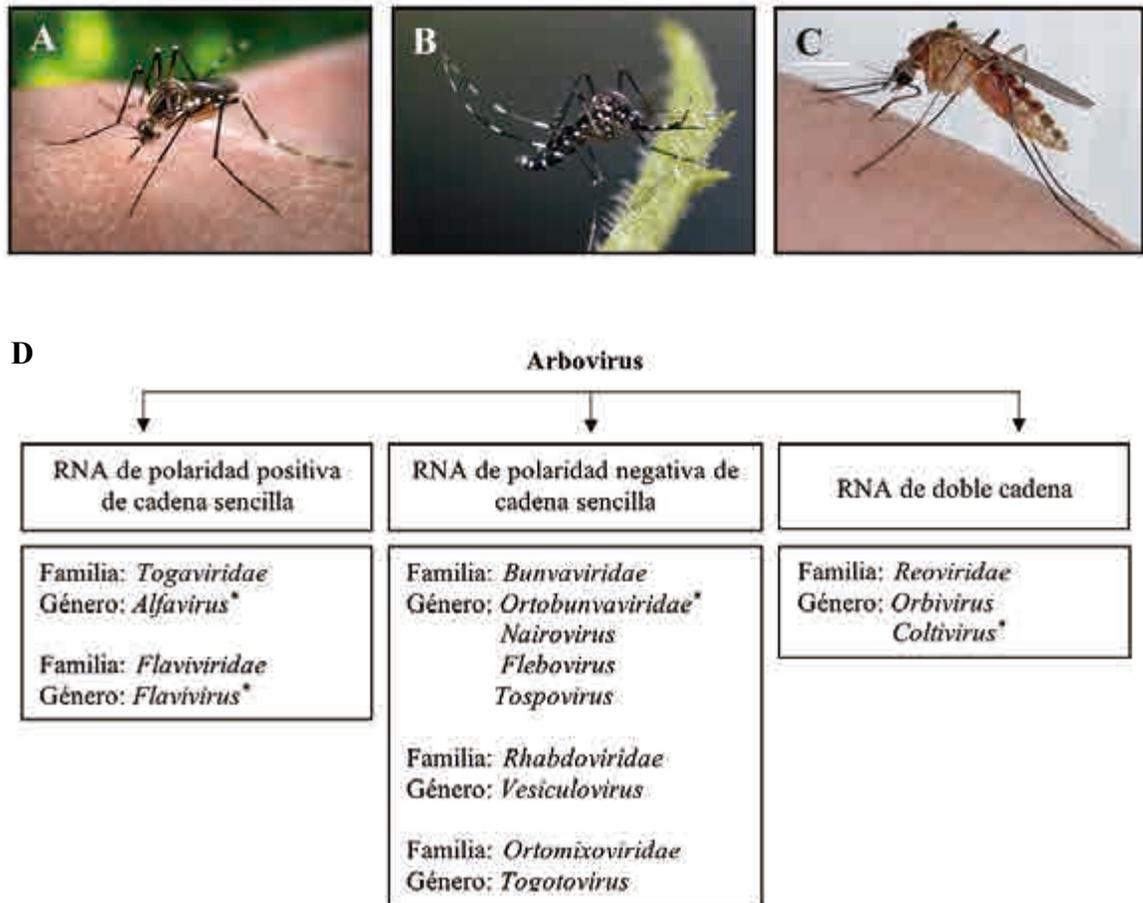


Figura 1. Mosquitos vectores de arbovirus y clasificación de arbovirus. A) *Aedes aegypti*, principal vector responsable de dengue, B) *Aedes albopictus*, segundo vector principal de la transmisión de dengue, C) *Culex quinquefasciatus*. D) Los arbovirus están incluidos en seis diferentes familias taxónomicas virales. *Arbovirus que en humanos causan encefalitis pertenecientes a los arbovirus más representantes para los humanos (Adaptado de Go *et al.*, 2014). Imágenes University of Florida, European Centre for Disease Prevention and Control, from James Gathany, Centers for Disease Control and Prevention.

1.2 Flavivirus

Árboles filogenéticos sugieren que en el continente africano se originó el ancestro de la familia *Culicidae* y garrapatas vectores de *Flavivirus* (Braack *et al.*, 2018). De las 70 especies de flavivirus sólo unas cuantas son patógenas a seres humanos, tales como: fiebre amarilla (FAV), dengue, (VDEN), Virus del Oeste del Nilo (VON), encefalitis de San Luis (ESLV), encefalitis Japonesa (VEJ), encefalitis del Valle de Murray y Encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) (Meltzer, 2012). La característica morfológica de los flavivirus es que tienen un tamaño de aproximadamente 50 nm de diámetro conteniendo un genoma de RNA de cadena sencilla cerca de las 11,000 bases de longitud. El genoma es de polaridad positiva, lo que significa que una vez que entra a la célula de hospedero, actúa como un RNA mensajero e inmediatamente es traducido. El genoma de los flavivirus codifica a un solo marco de lectura abierta (ORF) que se traduce como una poliproteína (Best, 2016). Sin embargo, esta poliproteína es rápidamente escindida por proteasas celulares y virales en tres proteínas estructurales: C, prM y E, y siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, además está flanqueada por regiones no codificantes (UTRs) 5' - y 3' en los extremos terminales (Nemésio *et al.*, 2014; Best, 2016) (Figura 2).



Figura 2. Estructura y organización general del genoma de los flavivirus. A) Partícula viral de los flavivirus. B) Organización genómica de los flavivirus (no a escala) y la poliproteína. El RNA del virión es aproximadamente 11 kb. En la parte superior se muestra el genoma viral con las regiones codificantes de proteínas estructurales y no estructurales y la UTRs 5'-3'. El extremo 5' del genoma tiene un cap de nucleótido metilado para la traducción celular canónica, el extremo 3' no está poliadenilado, forma una estructura de horquilla (Adaptado de Vasilakis *et al.*, 2011).

1.2.1 *Virus del Dengue*

El virus del dengue (VDEN, género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*), ha sido antigénicamente clasificados en cuatro serotipos (VDEN 1-4) (Pepin *et al.*, 2008) y a su vez dentro de cada serotipo de VDEN existe una variación genética bajo la definición filogenética de “genotipos” (Holmes *et al.*, 2003) (Cuadro 1). Más tarde se identificó un quinto serotipo (VDEN-5) descubierto en 2013 (Cucunawangsih *et al.*, 2017). El VDEN-5 se detectó durante el análisis de muestras virales y fue aislado de un granjero de 37 años que admitió estar en el hospital en el estado de Sarawak en Malasia en 2007. Esta infección se cree que fue inicialmente como un caso selvático ordinario causado por VDEN-4 el cual circula entre primates y los mosquitos *Aedes nivalis* en los bosques del sureste de Asia (Mustafa *et al.*, 2015). La secuencia del genoma completo reveló que el virus ocupa una nueva rama en el árbol de la familia de dengue (Normile, 2013).

El VDEN es recientemente considerado como la amenaza emergente más importante para la salud pública mundial que cualquier otro virus transmitido por mosquito (Pyke *et al.*, 2016). Se estimó un promedio de 9221 muertes por dengue ocurridas entre 1990 y 2013, incrementando de 8277 (95% estimación de incertidumbre 5353-10,649) en 1992, llegando a un máximo de 11,302 (6790-13,722) en 2010. Esto produjo un total de 576,900 (330,000-701,200) vidas perdidas atribuidas a dengue en 2013 (Martínez-Vega *et al.*, 2016). A pesar del nivel de incertidumbre del número total de casos, la OMS en 2013 reportó 390 millones de infecciones por dengue (OMS, 2018a).

Cuadro 1. Clasificación de VDEN en genotipos de acuerdo con su secuencia nucleotídica (Vasilaskis *et al.*, 2008)

Serotipo	Genotipo	Distribución geográfica	Región del genoma
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China, Este de África	Secuencia nucleotídica parcial o completa de E/NS1
	II	Tailandia (cepas colectadas en las décadas de 1950 y 1960)	
	II	Cepas Selváticas aisladas en Malasia	
	IV	Islas del oeste del Pacífico y Australia	
	V	América, Oeste de África y algunas Asiáticas	
DENV-2	Asiático I/II	Malasia, Vietnam, China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas	Secuencia nucleotídica de E
	Cosmopolitán	Amplia distribución (Australia, Este y Oeste de África, el Pacífico, e islas del Océano Índico, Subcontinente Índico y Medio Oriente)	
	Americano	América Latina, Caribe, Subcontinente Índico e Islas del Pacífico en las décadas de 1950 y 1960	
	Asiático/Americano	Tailandia, Vietnam y América	
	Selvático	Colectadas de humanos, mosquitos forestales o monos centinelas en el Este de África y Sureste de Asia	
DENV-3	I	Indonesia, Malasia, Filipinas e Islas del Pacífico sur	Secuencia nucleotídica prM/E
	II	Tailandia, Vietnam y Bangladés	
	III	Sri Lanka, India, África y Samoa	
	IV	Puerto Rico, Latinoamérica, América central y Tahití	
DENV-4	I	Tailandia, Filipinas, Sri Lanka y Japón (cepas importadas a Japón del Sureste de Asia)	Secuencia nucleotídica de E
	II	Indonesia, Malasia, Tahití, el Caribe y América	
	III	Tailandia	
	IV	Selváticas	

1.2.1.1 Origen y Epidemiología del VDEN

El sitio geográfico de origen del VDEN ha sido sujeto de especulación intensa; algunos argumentan el origen en África debido al mismo origen de el vector primario *Ae. aegypti*. Sin embargo, el trabajo ecológico y serológico de Smith (SMITH, 1956) y Rudnick (Rudnick *et al.*, 1986) apunta hacia un origen asiático (Vasilaskis *et al.*, 2008). No obstante, en 1780 Benjamín Rush describió un brote de dengue en Filadelfia, EUA y acuñó el término “*fiebre quebranta-huesos*”, pero el crédito debe ser atribuido a David Bylon, un médico oficial quien observó y describió por primera vez en 1779 una epidemia en Jakarta, Indonesia. (Pinheiro *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 2013; Laughlin *et al.*, 2012; Vasilaskis *et al.*, 2008). A pesar de todo, en 1800, ya se había extendido a las ciudades costeras urbanas tropicales del mundo, debido al uso de buques de envío en la expansión comercial, permitiendo de manera lenta pero evidente la introducción del virus y el mosquito a las costas de destino alrededor del mundo (Murray *et al.*, 2013). Luego, durante la segunda guerra mundial, el VDEN fue formalmente descrito en Japón en 1943 y en Hawaii en 1945. Posteriormente, las epidemias comenzaron a reportarse ampliamente en el sureste asiático. Después de la segunda guerra mundial no se reportaron epidemias en América, África y Oceanía en los siguientes 20 años (Braack *et al.*, 2018; Vasilaskis *et al.*, 2008). La calma de las epidemias de dengue en las Américas fue efímera, debido a la interrupción de la campaña del control en la década de 1970 por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (Murray *et al.*, 2013). No obstante, la actividad epidémica empeoró aceleradamente, permitiendo la expansión en más de 128 países principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, causando serios casos de mortalidad y morbilidad (Braack *et al.*, 2018; Guzman *et al.*, 2016; OMS, 2018b) (Figura 3).

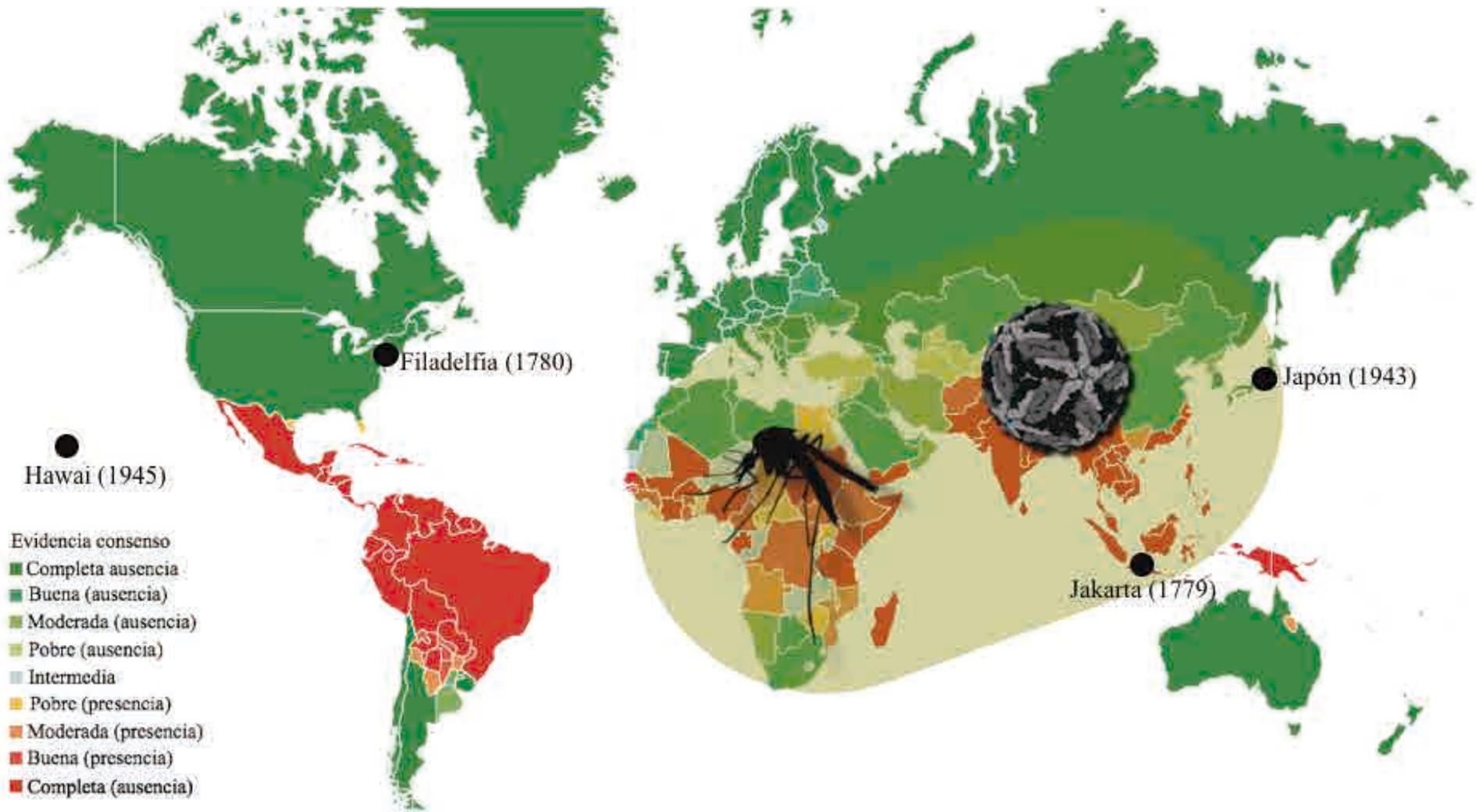


Figura 3. Origen del vector de dengue y expansión mundial del VDEN. El mosquito *Ae. aegypti* se originó en África y Smith y Rudnick apuntan el posible origen de VDEN en Asia (ambos sombreados en café), los primeros registros de brotes por dengue se presentan en puntos negros. La evidencia consenso mundial, riesgo y amenaza de dengue es mostrada con la evidencia consenso en completa ausencia (verde oscuro) hasta la completa presencia (rojo intenso) de dengue. Adaptado de (Guzman *et al.*, 2015)

1.2.1.2 Epidemiología del VDEN en las Américas y México

En las Américas, el VDEN-1 fue reportado por primera vez en 1977 causando una epidemia que comenzó en Jamaica expandiéndose a Cuba, Puerto Rico y Venezuela y eventualmente al resto de los países del Caribe, México y Centroamérica. El VDEN-2 causó la primera epidemia de Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) en Cuba en 1981, durante el mismo año, el VDEN-4 fue introducido en el este de las islas caribeñas. Después, este serotipo se extendió al resto del Caribe, Centro y Sudamérica y México. En 1994, el VDEN-3 fue re-introducido en América. El VDEN-3 inicialmente se expandió a Centroamérica, y más tarde a Puerto Rico, otras islas del Caribe y Sudamérica. La introducción de genotipo asiático del VDEN-2 en América ha estado previamente asociado con las epidemias de Dengue con signos de alarma (DCSA). En 1981, el VDEN-4 probablemente fue importado de las islas del pacífico emergiendo en las Américas causando una serie de brotes en el Caribe, Centro y Sudamérica y México (Pinheiro *et al.*, 1997).

En México, los cuatro serotipos del VDEN han estado circulando en diferentes tiempos, creando diversos escenarios epidémicos, endémicos e hiperendémicos (Dantés *et al.*, 2014). De acuerdo con la OPS en México, se han reportado 570991 casos de dengue durante el 2014 hasta la semana epidemiológica (SE) 17 del 2018 (OPS, 2018a). Los casos de dengue se han extendido principalmente por las regiones tropicales y subtropicales del país. En el estado de Tamaulipas, entre julio y diciembre de 1995 se registraron 4758 casos sospechosos de dengue. Más de la mitad de estos casos (2706) fueron en la ciudad de Reynosa, donde se aislaron de casos humanos los serotipos VDEN-2, 3 y 4 (Laredo-Tiscareño *et al.*, 2012; Ibáñez-Bernal *et al.*, 1997), siendo uno de los más grandes brotes de dengue ocurridos en los últimos 20 años.

1.2.1.3 Ciclo de Transmisión del VDEN

El período de incubación extrínseca (PIE) es el período de incubación viral entre el tiempo cuando un mosquito se alimenta de sangre virémica y el tiempo cuando un mosquito llega a ser infeccioso. El VDEN invade el intestino medio, se replica y eventualmente se disemina a través del mosquito, el cual llega a ser infeccioso una vez que el virus alcanza las glándulas salivales; así completa el PIE entre 8 a 12 días a una temperatura promedio de 28°C. El período de incubación intrínseca (PII) es el tiempo que transcurre entre que un humano llega a ser infectado y que desarrolla los síntomas debido a la infección. Al igual que PIE, el PII varía y el rango de duración de acuerdo con la OMS es de 4-10 días, (de 3-14 días de acuerdo al Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC), pero típicamente de 4-7 días (Chan *et al.*, 2012) (Figura 4).

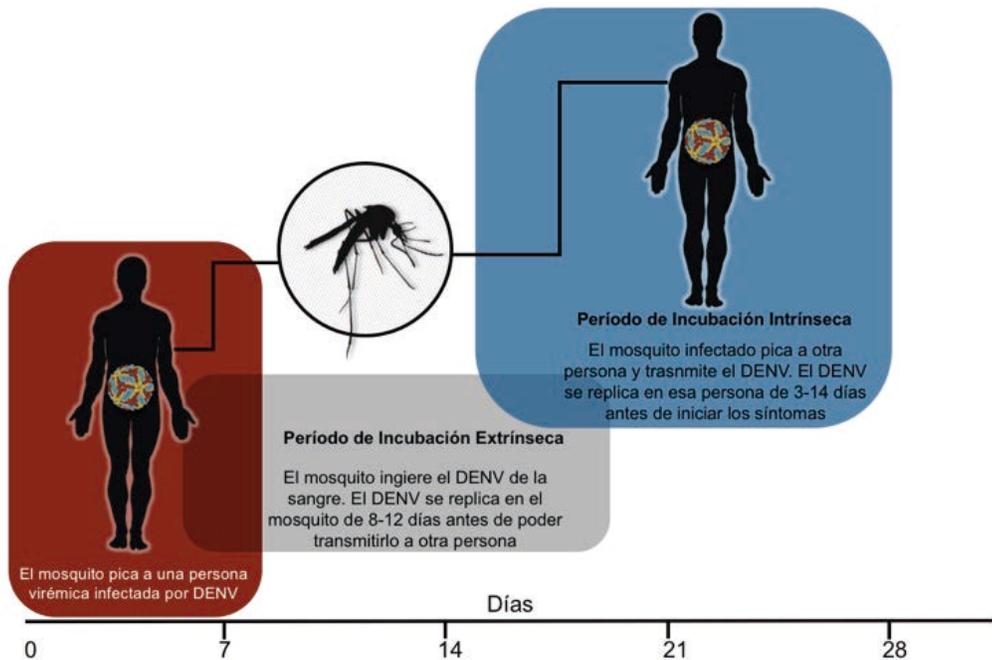


Figura 4. Períodos de incubación extrínseco e intrínseco del VDEN. Adaptado de (CDC, 2018).

1.2.1.4 Manifestaciones clínicas por VDEN

La infección con cualquier serotipo de VDEN puede resultar en diversas presentaciones clínicas, que van desde infecciones asintomáticas (subclínicas) o indiferenciadas y Fiebre por Dengue (FD), hasta la forma más grave de la enfermedad, caracterizada por aumento de la permeabilidad vascular, manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia e hipovolemia, el cual desencadena la falla de órganos y la muerte; esto es referenciado como Fiebre Hemorrágica por Dengue y Síndrome de Shock por Dengue (FHD/SSD) (Durbin, 2016; Gutierrez *et al.*, 2011; Katzelnick *et al.*, 2017). No es sorprendente que las manifestaciones por infección de VDEN sean altamente variables en términos de tiempos de aparición. En consecuencia, la OMS redefinió el esquema de clasificación en 2009 basado en los niveles de gravedad y en agosto del 2016 la Secretaría de Salud en México (SS) lo adoptaría (Villar *et al.*, 2015) (Cuadro 2) como: Dengue sin signos de alarma (DSSA), Dengue con signos de alarma (DCSA) y Dengue grave (DG), la cual comprende DHF y SSD (PHAO, 2016).

Cuadro 2. Modificación de la clasificación de gravedad por dengue, OPS/OMS

*Requieren estricta observación e intervención médica (OPS, 2016).

Dengue sin signos de alarma (DSSA)
<p>Persona que vive o han viajado a áreas con transmisión en los últimos 14 días y presenta fiebre, usualmente de 2 a 7 días de duración, y al menos 2 de los siguientes criterios:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Náusea/vómito2. Exantema3. Dolor de cabeza/dolor retro-orbital4. Mialgia y artralgia5. Petequias o prueba positiva del torniquete6. Leucopenia <p>Los casos también incluyen cualquier que venga de o viva en áreas con transmisión de dengue, con fiebre aguda, usualmente de 2 a 7 días y sin foco aparente</p>
Dengue con signos de alarma (DCSA)*
<p>Cada caso de dengue que, esta cerca y preferiblemente en la defervescencia, presente uno o más de los siguientes signos:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Dolor abdominal intenso o sensibilidad2. Vómito persistente3. Acumulación de fluidos (ascitis, efusión pleural, efusión pericárdica)4. Sangrado de la mucosa5. Letargia/agitación6. Hipotensión postural (lipotimia)7. Agrandamiento del hígado >2 cm8. Incremento progresivo del hematocrito
Dengue Grave (DG)*
<p>Cada caso de dengue que presente una o más de las siguientes manifestaciones:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Shock o dificultad respiratoria debido a la falta grave de plasma. El shock se evidencia por: falta o pulso indetectable, taquicardia, frío extremo, y perfusión capilar >2 segundos, presión del pulso ≤ 20 mmHg; hipotensión en la fase de latencia2. Sangrado grave: basado en la evaluación del médico tratante (ej. Hematemesis, melena, amplia metrorragia, sangrado del sistema nervioso central [SNC])3. Implicación de varios órganos, como insuficiencia hepática (AST o ALT ≥ 1000 IU), SNC (estado mental perturbado), corazón (miocarditis), u otros órganos.

1.2.1.5 Replicación del VDEN

Estructura y función de la proteína E y la proteína M

El primer paso en la infección por VDEN es la unión a los receptores celulares de la célula blanco, donde el dominio III de la proteína viral E interactúa con este receptor (Clyde *et al.*, 2006; Velandia *et al.*, 2011). La interacción induce la internalización del virión mediado por endocitosis y subsecuentemente, tras un cambio en el pH del endosoma, se induce la fusión de la envoltura del virus con la membrana del endosoma mediada por la proteína E que resulta finalmente en la liberación del RNA viral. Después de los procesos de traducción y repliación viral, las nuevas partículas del VDEN pueden presentar a la proteína M en su superficie, y convertirse en infecciosas o “maduras”, o retener en su superficie el precursor de la proteína M (prM) y así permanecer en una forma “inmadura”. Algunas partículas virales pueden tener una mezcla de proteína M y proteína prM en su superficie y estas partículas pueden ser o no infecciosas. (Peeling *et al.*, 2010; Guzman *et al.*, 2016 (Figura 5).

Estructura y función de las proteínas no Estructurales

Las proteínas no estructurales (NS) están involucradas en la replicación viral y el proceso de empaquetamiento que está muy relacionado con el retículo endoplásmico (RE) del huésped y su función secretora. La NS1 existe en tres formas: la forma residente en el RE, la forma anclada a la membrana y la forma secretada. La NS1 es inicialmente sintetizada como un monómero soluble y llega a estar asociada con la membrana después de dimerizarse en el lumen del RE. La NS1 intracelular participa en la fase temprana de la replicación viral del RNA. También la NS1 es transportada a la superficie de la célula donde permanece asociada a la membrana celular o es secretada (sNS1) como una especie hexamérica asociada a lípidos. La sNS1 puede ser detectada en suero, plasma, sangre total o tejidos infectados durante los 0 a 9 días después de iniciado los síntomas, los cuales corresponden aproximadamente a la duración de la fiebre (Peeling *et al.*, 2010; Guzman *et al.*, 2016). Diversos estudios han sugerido que la sNS1 es un principal mediador de la

patogénesis de dengue, debido a que NS1 altera la integridad de la monocapa de las células endoteliales por la liberación de citosinas pro-inflamatorias y quimiocinas (Guzman *et al.*, 2016; Guzman *et al.*, 2015) (Figura 6).

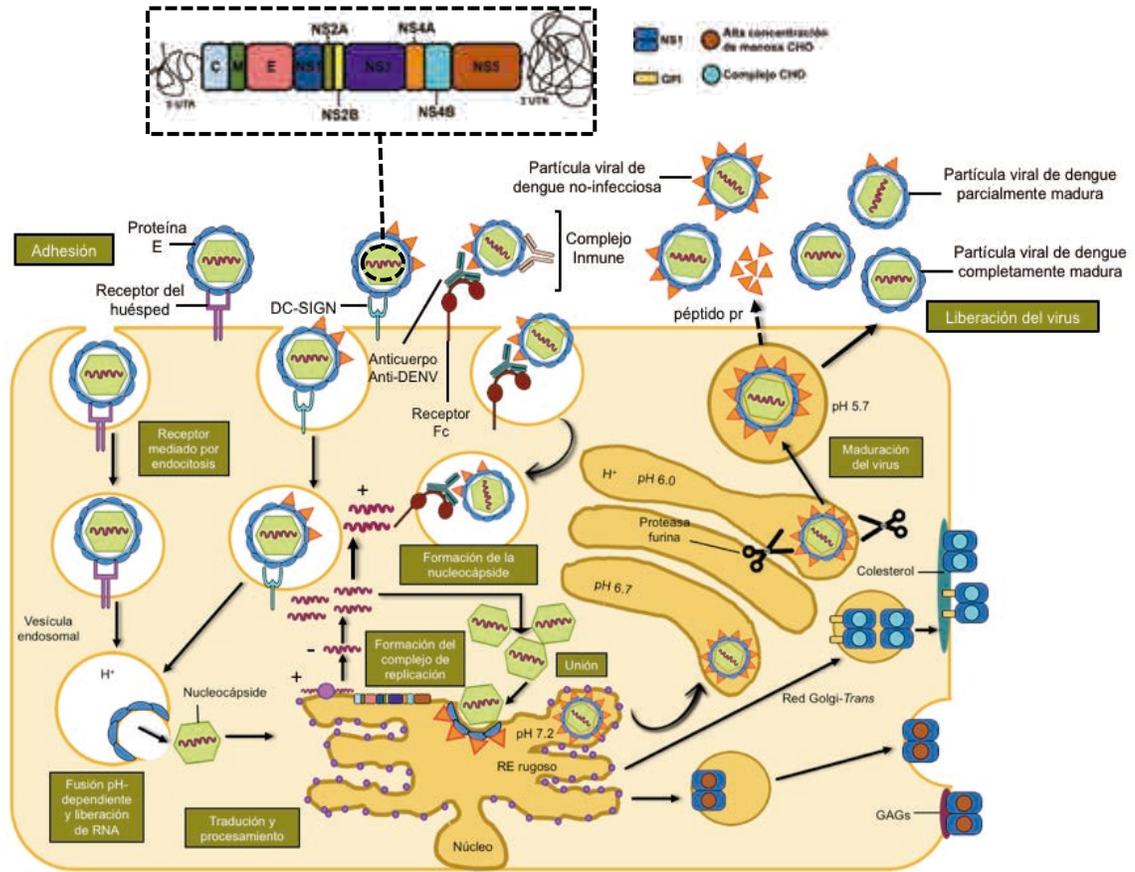


Figura 5. Ciclo de infección del VDEN. Las partículas virales maduras se adhieren a receptores presentes en la célula del huésped por medio de la proteína de envoltura (E). La entrada viral se lleva a cabo a través de endocitosis. En el interior de la célula huésped, los rearrreglos pH dependiente de la proteína E facilita la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal para liberar la nucleocápside, la cual se desensambla para liberar el RNA genómico viral. El RNA genómico es después traducido en una larga poliproteína, la cual es escindida auto catalíticamente por la proteína no estructural 2B (NS2B) o la proteasa viral NS3 y por proteasas del huésped en proteínas individuales. Las proteínas NS liberadas son sitios blanco de replicación en el retículo endoplásmico (RE) derivado de paquetes vesiculares para iniciar la replicación. NS1 está inicialmente asociado con el RE; el monómero es modificado por la adición de una alta concentración del carbohidrato de manosa (CHO), resultando en la asociación de la membrana. Un grupo de NS1 de dengue virus (VDEN) adquiere glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Ambas, NS1 unido a la membrana y NS1 anclada a GPI son llevadas a la superficie celular por una vía desconocida, donde ellos han estado mostrando la asociación con lípidos como el colesterol. Algunos NS1 pueden también secretarse a partir de células del huésped. Mientras, la forma precursora de la proteína de membrana (M) (prM) y la proteína E son integrados a la membrana del RE y se encapsulan para formar la nueva partícula viral para brotar al lumen del RE y formar una partícula inmadura. Esta partícula es llevada por la vía secretora, en el cual en bajo pH de la red *trans* de Golgi que causa un rearrreglo substancial de las proteínas prM y E que permite la escisión de la prM por la proteasa furina para formar la proteína M madura. El virión es liberado de la célula del huésped con la liberación de péptidos pr (flecha punteada). Un subconjunto de partículas virales son liberadas con prM intacto y no son capaz de infectar a nuevas células huésped. Los signos + y - indican la polaridad positiva y negativa del RNA; respectivamente. La cápside C; DC-SIGN, UTR, región no traducida. (Adaptado de Guzman *et al.*, 2016).

1.2.1.6 Formas graves de la enfermedad por VDEN

La infección con un serotipo de VDEN por primera vez es definida como infección primaria y se cree que desarrolla una inmunidad de por vida a la reinfección homotípica (reinfección con el mismo serotipo), pero permanece el riesgo de una infección heterotípica (infección con otro serotipo del VDEN) que también se conoce como infección secundaria (Soghaier *et al.*, 2015; Waggoner *et al.*, 2016).

En la infección primaria, los anticuerpos IgG anti-dengue aparecen lentamente, con bajos títulos entre los 8-10 días después de iniciada la fiebre, mientras que los anticuerpos IgM anti-dengue son detectados alrededor del quinto día después de la aparición de la fiebre y permanecen por 2-3 meses. Mientras que, en la infección secundaria, los anticuerpos IgG anti-dengue aparecen rápidamente, con altos títulos poco después de aparecer la fiebre. En algunos casos la IgM anti-dengue puede ser detectada (Guzman *et al.*, 2015). Así mismo, el incremento de otros anticuerpos ha sido detectado durante los primeros dos meses después de la infección por dengue: IgA entre 15-20 días e IgD entre 10-15 días. La producción y respuesta de IgE es altamente específica, fuerte y más rápida que otros anticuerpos, ya que su máxima respuesta se da tan solo 3 días después de la infección (Míguez, 2011). Se ha observado niveles más altos de IgE total en pacientes infectados por dengue que en pacientes no expuestos. Mientras en los niveles de IgE específicos son más altos en los casos con DCSA y DG que en los casos de DSSA y en individuos sanos (Ruiz *et al.*, 2017) (Figura 6).

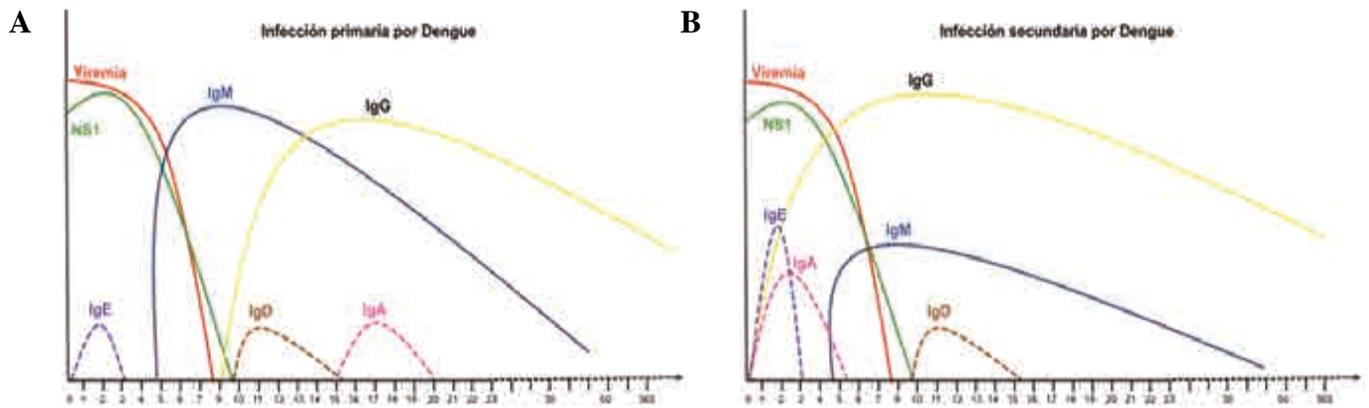


Figura 6. Respuesta Inmunológica a una infección por Dengue. La respuesta inmune adquirida después de una infección por dengue consiste en la producción de anticuerpos IgM e IgG particularmente contra las proteínas de envoltura del virus. La respuesta inmune varía dependiendo si el paciente una infección primaria por dengue (A) versus una secundaria (B) (tuvo una infección por dengue u otra infección por flavivirus en el pasado). Los anticuerpos IgA, IgD e IgE (denotados en línea punteada) en una infección primaria, se presentan casi ausentes, en cambio en una infección secundaria, IgA e IgE son detectables en la primera fase de la enfermedad.

De hecho, muchos estudios epidemiológicos han demostrado que una infección heterotípica por VDEN incrementa el riesgo de DHF/DSS o las formas graves de la enfermedad. Esto puede ser explicado por la teoría de potenciación mediada por anticuerpos (en inglés, *antibody-dependent enhanced* [ADE]). Esta teoría postula que una concentración específica de anticuerpos heterotípicos se unen, pero no neutralizan los nuevos viriones infectantes hacia las células del sistema inmune, las cuales son permisivas al VDEN. Este complejo virus-anticuerpo es reconocido por el receptor Fc que facilita la entrada del virus y la replicación en las células inmuno blanco. Esto inicia las cascadas inmunes que resultan en el aumento de la permeabilidad vascular y en el desarrollo de las formas grave de la enfermedad (Katzelnick *et al.*, 2017; van der Schaar *et al.*, 2009) (Figura 7).

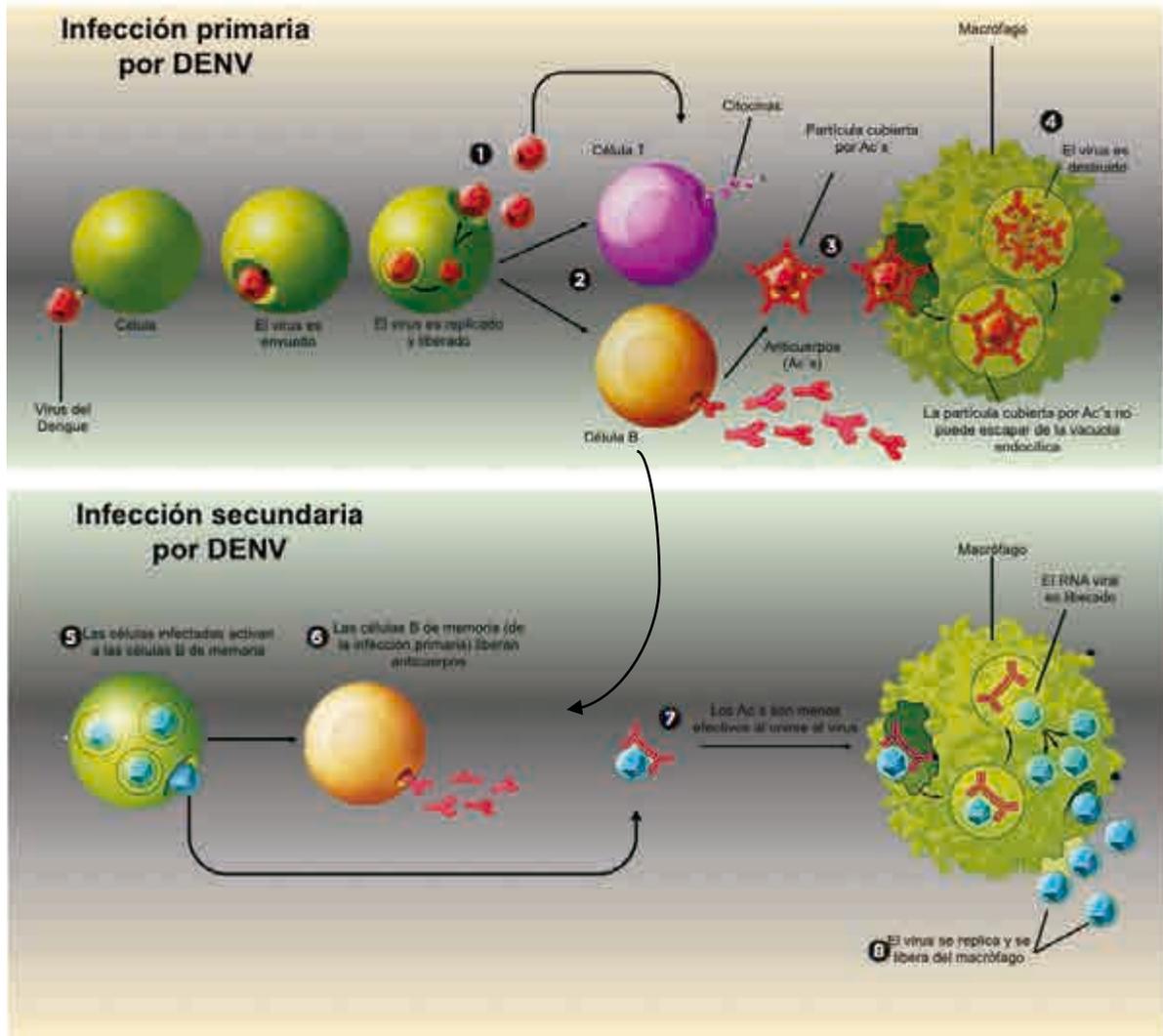


Figura 7. Potenciación mediada por anticuerpos, en inglés *antibody-dependent enhanced* [ADE]. El dengue infecta a una célula cuando ingresa por endocitosis. La proteína de la envoltura del virus sufre rearrreglos para fusionarse a la membrana de la vacuola, liberando su cápside y genoma en el citoplasma, donde se replica y empaqueta a nuevos viriones. 1) La célula infectada también desencadena una reacción inmune, 2) que incluye el reclutamiento de células T, que liberan citocinas pro-inflamatorias, y células B que generan anticuerpos. Estos anticuerpos son específicos para los virus infectantes, y se unen a la envoltura del dengue. 3) Cuando esto pasa, macrófagos y monocitos eliminan de la sangre a los virus cubiertos con anticuerpos-los cuales no pueden escapar de la vacuola endocítica- y los destruyen. Cuando una persona es infectada con un serotipo diferente del dengue 5) las células de memoria creadas durante la primera infección entran en acción, 6) fluyendo en la sangre con los anticuerpos específicos del primer serotipo. Estos anticuerpos, sin embargo, pueden no unirse del todo bien a los nuevos serotipos. 7) Como resultado, cuando los viriones parcialmente cubiertos son tomados los macrófagos y monocitos, ellos pueden escapar a la vacuola endocítica, infectando y replicándose dentro estas células inmunes (Adaptado de Mole, 2013).

1.2.1.7 Tratamiento y vacuna contra el VDEN

No hay tratamiento específico anti-viral para el dengue, el manejo clínico se basa en la terapia de apoyo, descansar y tomar muchos líquidos. El paracetamol puede reducir la fiebre y el dolor de las articulaciones. Sin embargo, no se debe tomar aspirina o ibuprofeno, ya que puede aumentar el riesgo de hemorragia (OMS, 2018b).

Existen diversas vacunas candidatas que han sido desarrollada usando virus vivos atenuados, virus inactivados y vacunas de DNA. Una vacuna contra el dengue ha sido registrada en diversos países (CYD-TDV, o Dengavaxia®); desarrollada por Sanofi Pasteur. Esta es la primera vacuna contra dengue con licencia para prevenir la enfermedad de dengue causado por los cuatro serotipos. CYD-TDV, es una vacuna recombinante con 4 virus vivos atenuados, representado los cuatro serotipos (VDEN 1-4). Cada recombinado monovalente de CYD es obtenido independientemente por el reemplazo de genes que codifican las proteínas prM y E del genoma atenuado del virus de la fiebre amarilla (YF-17D) (OMS, 2018c).

CYD-TDV fue la primera vacuna con licencia para prevenir el dengue. En diciembre 2015 se aprobó por primera en México, seguido de otros países como Filipinas, Brasil, El Salvador, Costa Rica, Paraguay, Guatemala, Perú, Indonesia, Tailandia y Singapur. La vacunación está indicada individuos que viven en áreas endémicas con edades comprendidas entre 9-45 años, con la excepción de Paraguay, en la cual se extendió el límite de edad a 60 años (Godói *et al.*, 2017). CYD-TDV induce una robusta respuesta inmune contra los cuatro serotipos después de cada dosis (tres dosis, en un intervalo de 6 meses), este régimen fue efectivo en menores de 16 años que viven en áreas endémicas de Asia y Latinoamérica, con una tasa de eficacia protectora del 59 y 60%. La eficacia protectora varía con los serotipos: VDEN-3 y VDEN-4 presentaron una eficacia más alta en comparación VDEN-1 y VDEN-2, y una más alta en individuos seropositivos a dengue que en individuos seronegativos, en los primeros 25 meses después de la primera dosis de vacunación. Existe un incremento del riesgo de hospitalización y DG en individuos

seronegativos después de 30 meses de la primera dosis (Scott, 2016; Godói *et al.*, 2017; OMS, 2018c).

1.2.2 *Virus del Oeste del Nilo*

Este es el agente causal de la encefalitis del Oeste del Nilo (VON; familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*) y es el arbovirus más ampliamente distribuido en el mundo (Braack *et al.*, 2018). El VON fue aislado y descrito en la sangre de un paciente febril en Uganda en 1937. Después en 1953 fue identificado en aves (cuervos y columbiformes) en la región delta del Nilo. Antes de 1997 el VON no se consideró patógeno para aves, pero al mismo tiempo en Israel una cepa más virulenta causó la muerte de diferentes especies de aves que presentaban signos de encefalitis y parálisis. La construcción de árboles filogenéticos con un amplio rango de aislados del VON sugieren que este virus se originó en África y se dispersó a los países del Mediterráneo y Europa (Braack *et al.*, 2018; OMS, 2018d). En 1999 un brote circulante del VON en Israel y Túnez fue importado al estado de Nueva York, USA. Desde entonces, el VON se ha dispersado en el hemisferio oeste y ahora se encuentra localizado a través de EUA, Canadá, México, el Caribe y partes de Centro y Sudamérica (Rodríguez *et al.*, 2010; OMS, 2018d) (Figura 8). La invasión del VON en los EUA ha causado el decline regional de múltiples especies de aves y cientos de infecciones y muertes en humanos y caballos (Crowder *et al.*, 2013). En contraste, la introducción del VON en México ha sido relativamente benigna (Rodríguez *et al.*, 2010). Sin embargo, la habilidad del VON para infectar diversas especies sugiere que este virus es específicamente capaz de sobrevivir bajo presión evolutiva comparado con otro arbovirus huésped-restringido que utilizan a unos cuantos huéspedes (Coffey *et al.*, 2008).



Figura 8. Distribución global en 2006 de VON (Reisen, 2013).

1.2.2.1 Epidemiología del VON en México

En México, el VON fue aislado por primera vez en 2003 de cadáveres de cuervo común (*Corvus corax*) en Tabasco (sureste de México). De acuerdo con las investigaciones de los anticuerpos neutralizantes del VON en el este de México y en aves residentes en la península de Yucatán, el virus había brotado en México un año antes. Los bajos números de casos en humanos, equinos, y aves en México que se han reportados han sido principalmente en la frontera con EU, donde el aislamiento de cepas de VON en Tecate, Sonora fue genéticamente relacionado con las cepas de Norteamérica en 2002 circulantes en el suroeste de EUA (Guerrero-Sánchez *et al.*, 2011). Elizondo-Quiroga *et al.*, (2005) reportó el aislamiento del VON en una mujer de 62 años en el estado de Sonora. La paciente no presentó historial de viaje durante 2 meses antes que presentara la infección, ella visitó el hospital local en julio del 2004 con síntomas de fiebre, dolor de cabeza, vómito, artralgia y mialgias. Adicionalmente, en la misma investigación se reportó el VON en *Culex quinquefasciatus* permitiendo el aislamiento del virus de un total de 2297 mosquitos, representando 4 géneros y 11 especies, donde se probaron 238 grupos en el estado de Nuevo León. Mientras en el estado de Tamaulipas, Fernández-Salas y Cols, (2003) reportaron la presencia de anticuerpos anti-VON en aves migratorias y residentes en un estudio de vigilancia en la región de Laguna Madre en el mismo estado durante diciembre del 2001 a marzo del 2003.

De acuerdo con la secretaría de salud, se han reportado 11 casos confirmados por VON desde su aparición en el 2003 hasta las SE 32 del 2012, donde los estados afectados son Chihuahua, Oaxaca, Nuevo León y Sonora (CENAPRECE, 2018).

1.2.2.2 Ciclo de Transmisión del VON

El VON permanece en la naturaleza en un ciclo de transmisión enzoótico que primero involucra mosquitos de especie *Culex* y aves (Figura 9). Las especies de mosquitos que participan en este ciclo son conocidos como vectores de amplificación, y son fuertemente ornitofílicos (se alimenta exclusivamente de sangre de aves). Las especies de mosquitos con hábitos de alimentación oligofílicos (que se alimentan ampliamente en vertebrados) pueden transmitir el VON a humanos, caballos y otros vertebrados no aviares después de alimentarse primeramente de aves virémicas. Estas especies de mosquitos se conocen como vectores puente. Los humanos, caballos y otros vertebrados no aviares son huéspedes incidentales, porque ellos usualmente, aunque no siempre, producen viremias de magnitud insuficiente para infectar a mosquitos susceptibles. Generalmente, un vertebrado puede producir una viremia de $\geq 10^5$ PFU ml⁻¹ para servir como un huésped reservorio (amplificación). Ahora bien, el VON puede infectar a un amplio número de especies de vertebrados y artrópodos y esta es la principal razón por la que este virus se ha extendido con éxito en una amplia región geográfica. Evidencia de infección del VON ha sido detectada en más de 30 especies de mamíferos, diversos réptiles, especies anfibias y en más de 60 especies de mosquitos (Blitvich, 2008).

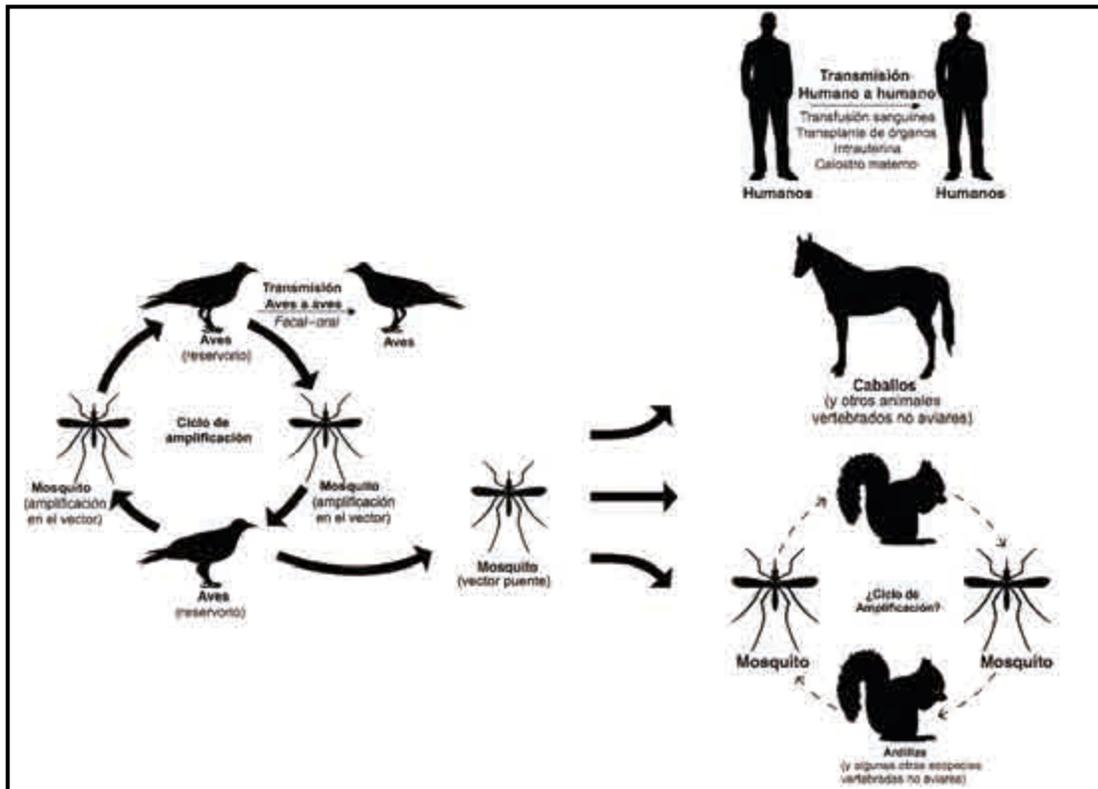


Figura 9. Revisión del ciclo de transmisión de VON. Las flechas solidas gruesas indican las rutas comunes de transmisión. Las flechas delgadas indican las rutas de transmisión que ocurren infrecuentemente. Las flechas delgadas punteadas indican las rutas propuestas de transmisión que no han sido confirmados en la naturaleza (Blitvich, 2008).

1.2.2.3 Manifestaciones clínicas por VON

La viremia de VON es típicamente baja en humanos y equinos, los mosquitos se infectan de las aves donde posteriormente se transmite a los humanos al alimentarse de sangre. Por esta razón las epidemias de VON en los humanos y equinos están usualmente asociadas con brotes recientes epizooticos en aves (Braack *et al.*, 2018). Aproximadamente el 75% de infecciones por VON en humanos son asintomáticas, 25% desarrollan fiebre y menos del 1% están caracterizadas por enfermedad neuroinvasiva (Blitvich *et al.*, 2016). Aunque el paciente se puede recuperar completamente de una infección no complicada por fiebre, se asocia a una fatiga prolongada, mientras que la enfermedad neuroinvasiva puede ser letal o la recuperación requiere cuidado especializado hasta que los síntomas persisten pasados los años (Barrows *et al.*, 2018). Sin embargo, el verdadero impacto de VON en la salud del humano es desconocido debido a que a menudo no se diagnostica (Blitvich *et al.*, 2016).

1.2.2.4 Vacunas candidatas anti-VON

A la fecha, no hay vacunas disponibles contra una infección por VON en humanos, sin embargo, diversos estudios clínicos están en proceso para su elaboración. No obstante, para equinos sí están disponibles (Acharya *et al.*, 2016) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Vacunas candidatas en ensayos clínicos contra el VON en humanos

Nombre de la vacuna (Compañía)	Enfoque de la vacuna	Diseño/características	Estado de desarrollo	Referencia (s)
Chimeri-Vax-WN (Acambis, Sanofi-Pasteur)	Recombinante	VON prM-E y E en remplazo de la cápside y la proteína no estructural de la vacuna contra la fiebre amarilla cepa (17D)	Completa la fase I del ensayo clínico, ensayo de la fase II en desarrollo	(Biedenbender <i>et al.</i> , 2011)
WN-DEN4	Recombinante	Gen prM de VON en un atenuado VDEN-4	Completa la fase I del ensayo clínico, ensayo de la fase II en desarrollo	(Pletnev <i>et al.</i> , 2006)
WN-80E	Proteína de Subunidad	Proteína E recombinante sin el dominio transmembrana	Completa la fase I del ensayo clínico	(Lieberman <i>et al.</i> , 2007), (Lieberman <i>et al.</i> , 2009)
WNVDNA017-00-VP (VCR en colaboración con Vical)	Plásmido basado en vacuna DNA	Véctor plasmídico de DNA que expresa WNV-NY99 prM-Env bajo un promotor de citomegalovirus	En desarrollo la fase I del ensayo clínico	(Martin <i>et al.</i> , 2007), (Ledgerwood <i>et al.</i> , 2011)
HydroVax-001 (OHSU, financiado por NIH)	Inactivado	Inactivación química por H ₂ O ₂	Completa la fase I del ensayo clínico	(CDC, 2015)

1.2.3 *Virus del Zika*

El virus del Zika (VZIK) es un virus de 50 nm de RNA de polaridad positiva y pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Este virus ha emergido en recientes años como uno de los arbovirus más críticos que representa un problema importante de salud pública en todo el mundo (Priyamvada *et al.*, 2017). Análisis filogenéticos demuestran que el VZIK puede ser clasificado en dos principales genotipos: Africano y Asiático/Americano, éste último es responsable de las epidemias recientes (Simonin *et al.*, 2017). El genotipo africano, se divide en dos distintos grupos: 1) Clúster Uganda, involucrado por el prototipo de cepa MR766 e incluye aislados de Senegal y la república Africana Central desde 1947 a 2001 y 2) clúster Nigeria, que involucra cepas aisladas en Nigeria y Senegal de 1968 a 1997. La mayoría de las cepas del genotipo africano se aislaron de vectores enzoóticos. En cambio, el genotipo asiático involucra el prototipo P6-740 aislado en Malasia en 1966, además incluyen cepas aisladas en Camboya, Micronesia y la Francesa Polinesia, extendiéndose el genotipo hacia el sureste de Asia. Dentro de este clúster, un nuevo genotipo (Americano) emergido con la introducción del virus en el hemisferio occidental que ahora incluye cepas de Brasil, Puerto Rico, Haití, Guatemala y Suriname. La característica principal de este genotipo es su intensa diversificación a nuevos territorios (Weaver *et al.*, 2016).

1.2.3.1 *Epidemiología del VZIK*

El VZIK fue descubierto en 1947 en el bosque de Zika en Uganda, aislado de un macaco *Rhesus* centinela febril a través de una red de vigilancia de fiebre amarilla en el área. Un año más tarde VZIK fue aislado en mosquitos *Aedes* en el mismo bosque, apuntando a un potencial ciclo de transmisión selvático involucrando primates no-humanos y mosquitos. El primer caso confirmado del VZIK en humanos fue una infección adquirida en el laboratorio reportado en Uganda en 1964 seguido de casos esporádicos de una infección natural humana en Nigeria e Indonesia (Priyamvada *et al.*, 2017). En 2007, un gran brote de VZIK en humanos se presentó fuera de África y se reportó en las islas de Yap en los estados federados de Micronesia. El siguiente brote ocurrió en la Polinesia Francesa

entre el 2013 y 2014 donde se estimaron 28,000 infecciones. Subsecuentemente, aparecieron brotes en las islas de pacífico incluyendo las islas de Cook, Nueva Caledonia y la isla de Pascua y después en mayo del 2015 en el noreste de Brasil, posiblemente por viajeros infectados. Desde entonces, la transmisión de VZIK se ha reportado a lo largo de Sudamérica, América central, el Caribe, México y EUA. En agosto de 2016, la OPS confirmó 578,148 casos de VZIK en 45 países y territorios en las América (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018). Aunque en el 2017 disminuyeron las infecciones de VZIK en América, la vigilancia continúa ya que no se sabe cuándo y dónde ocurrirá el próximo brote. Modelos predicen que el sur, sureste de Asia y Oceanía están en alto riesgo de futuros brotes, con la posibilidad de transmisión estacional en partes del sureste de EUA, China y Europa (Leonhard *et al.*, 2018). (Figura 10).



Figura 10. Origen del virus del VZIK y áreas de alto y bajo riesgo de infección
(Modificado de Leonhard *et al.*, 2018).

1.2.3.2 Epidemiología de VZIK en México

En México el primer brote del VZIK inicio en el estado de Chiapas cerca de la frontera con Guatemala. Un número importante de pacientes exhibieron conjuntivitis, fiebre y erupción cutánea en Tapachula y localidades cercanas en noviembre del 2015. Sin embargo, el personal médico estaba confundido porque 12 meses antes, la fiebre por

Chikungunya (FCHIK) brotó en la misma región afectada. La mayoría de los casos no presentaron artralgia en las manos y los pies, la cual es típica de FCHIK, esto indicaba que muy probablemente fuera dengue (Guerbois *et al.*, 2016). En México, un incremento de casos confirmados se observó entre la semana 16 y 27 del 2017. Una tendencia similar se observó para dengue en el país durante el mismo período. Aproximadamente, 51% de los casos confirmados de VZIK en las primeras 32 semanas de 2017 correspondieron a los estados de Nayarit (171 casos), Tamaulipas (146 casos) y San Luis Potosí (123 casos) (OPS, 2018b). Durante el 2015-2017 se reportaron 802 casos autóctonos en Tamaulipas de los cuales 692 se confirmaron en mujeres embarazadas (SS, 2018b).

1.2.3.3 Ciclo de Transmisión del VZIK

El VZIK es un arbovirus con dos ciclos de transmisión. El ciclo selvático para mantenerse activo se involucra entre primates no humanos y mosquitos arbóreos en el bosque/selva, mientras en el ciclo urbano implica la transmisión de VZIK de humanos a mosquitos urbanos (Leonhard *et al.*, 2018). El ciclo urbano es mediado predominantemente por *Ae. aegypti*, como principal vector y menormente *Ae. albopictus*; otras especies han sido implicadas (*Ae. africanus*, *Ae. apicoargentus*, *Ae. furcifer*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. opok*, y *Ae. vittatus*) (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018). En el 2011, se reportó que el VZIK no sólo es transmitido por la picadura de mosquitos infectados sino también a través de relaciones sexuales, se cree que esto contribuyó a los brotes de virus en las Américas. Además, el virus puede ser detectado en diferentes fluidos, incluyendo el semen de un hombre con vasectomía (Aliota *et al.*, 2017). La transmisión parental fue documentada por botes en la Polinesia Francesa durante 2013-2014 donde en el calostro materno por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se identificaron secuencias de VZIK, pero reportes de los brotes no indicaron complicaciones como microcefalia (Malone *et al.*, 2016). Dado que la transmisión de VZIK está relacionada con la transfusión de sangre como un riesgo potencial, Musso y Cols., (2014) implementaron una búsqueda molecular con donadores de sangre durante un brote de ZIKA ocurrido en la Polinesia Francesa; este estudio indicó que el 2.8% de los donadores de sangre que se encontraban asintomáticos al momento de la donación resultaron positivos a una infección aguda por VZIK (Figura 11).

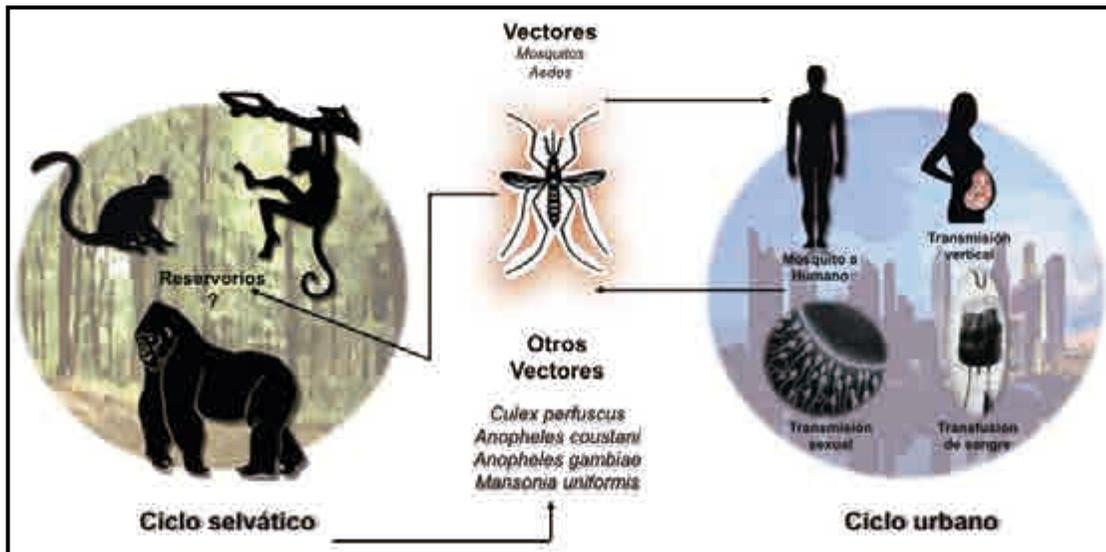


Figura 11. Ciclo de transmisión de VZIK. El ciclo selvático involucra primates no humanos y mosquitos arbóreos en el bosque. Existe evidencia serológica que muestra evidencia que elefantes, cebras, roedores y orangutanes son posibles reservorios de VZIK. El ciclo urbano involucra la transmisión entre humanos y mosquitos en áreas urbanas. (Modificado de Acosta-Ampudia *et al.*, 2018).

1.2.3.4 Manifestaciones clínicas por VZIK

El VZIK tiene un período de incubación (extrínseca o intrínseca) estimada de 3-10 días y puede permanecer asintomática en aproximadamente 80% de los individuos infectados. Cuando son sintomáticos la enfermedad resultante es generalmente leve y comprende una fiebre (37.9°C o por debajo), mialgias, erupción cutánea (duración promedio 6 días), conjuntivitis y artralgias (promedio de 3.5 días, rango de 1 a 14 días) (Durbin *et al.*, 2016; Leonhard *et al.*, 2018; Malone *et al.*, 2016). Estos síntomas son semejantes a otros arbovirus como dengue y Chikungunya, aunque la presencia de conjuntivitis es más específica para VZIK (Leonhard *et al.*, 2018) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características clínicas de arbovirus

	VZIK	VDEN	VCHIK
Fiebre	++	+++	+++
Erupción (maculopapular)	+++	+	++
Conjuntivitis	++	-	-
Artralgia	++	+	+++
Mialgia	+	++	+
Dolor de cabeza	+	++	++
Shock	-	+	+/-
Hemorragia	-	+	+

Reproducido del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Modificación de Leonhard *et al.*, 2018).

1.2.3.5 Patogenicidad por VZIK

Aunque la mayoría de las infecciones por VZIK son asintomáticas o causan sólo síntomas leves, hay evidencia que una infección por VZIK puede conducir complicaciones neurológicas, como síndrome de Guillain-Barré (SGB) en adultos y defectos congénitos en el nacimiento (Stettler *et al.*, 2016). El SGB ha sido descrito como una neuropatía aguda caracterizada por una rápida y progresiva debilidad autolimitante, que puede ser grave acompañada de falla respiratoria, parestesia y dolor entre otras complicaciones (Restrepo-Jiménez *et al.*, 2018).

El impacto clínico del VZIK en una mujer durante el embarazo es significativo porque se tiene la hipótesis de que una infección en mujeres en etapa temprana de gestación puede resultar en el parto de bebés microcefálicos. Inclusive, aunque los bebés crecen con el tiempo, la cabeza permanece pequeña (Noor *et al.*, 2018). Esto es debido a que VZIK infecta preferentemente células progenitoras neurales humanas y lleva a la célula a apoptosis. Como consecuencia de la apoptosis, hay modificación en la formación de mielina e interrupción en la sinaptogénesis que ocurre en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Carod-Artal, 2018).

1.2.3.6 Alternativas de vacuna contra VZIK

Recientemente, varias estrategias contra el VZIK ha sido propuestas. Se han presentado modelos de vacunas de DNA, vacunas RNA, virus vivos/atenuados, virus inactivados y partículas tipo virus. Se ha observado que algunas vacunas bloquean la transmisión de VZIK hacia el feto en ratonas embarazadas. Algunas de estas vacunas se encuentran en las primeras etapas del ensayo clínico en humanos (Culshaw *et al.*, 2018) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Ensayos actuales de vacunas contra VZIK

Fase	Nombre	Cepa	Blanco	Estrategia	Responsable	Referencia
I	VRC-ZKADNA085-00VP	H/PF/2013	prM-E	Vacuna-DNA	Institutos nacionales de Salud	(Larocca <i>et al.</i> , 2016), (Abbink <i>et al.</i> , 2016)
	VRC-ZKADNA090-00-VP	H/PF/2013	prM-E	Vacuna-DNA	Institutos nacionales de Salud	
	GLS-5700	Concenso	prM-E	Vacuna-DNA	GeneOne	(Muthumani <i>et al.</i> , 2016)
	ZPIV	PRVABC59	Virión entero	Virus inactivado	Instituto Armado de Investigación Walter Reed/Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas	(Larocca <i>et al.</i> , 2016), (Abbink <i>et al.</i> , 2016)
	MV-ZIKA		E	Vector viral	Themis	
I/III	mRNA-1325	Micronesia 2007	prM-E	Vacuna mRNA	Moderna Therapeutics	(Richner <i>et al.</i> , 2017)

1.3 Alfavirus

Los Alfavirus son un grupo de 30 arbovirus transmitidos por mosquitos pertenecientes al género *Alfavirus* de la familia *Togaviridae*. Algunos alfavirus, como el virus Sindbis (VSIN) y virus del Chikungunya (VCHIK), pueden causar artritis a largo plazo. Los Alfavirus, como el virus de la encefalitis equina del oeste (VEEO), virus de la

encefalitis equina del este (VEEE) y virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) pueden causar encefalitis fatales en humanos. Otros Arbovirus, como el virus Getah (VGETA), causa fiebre, erupciones en la piel, edema de en las extremidades traseras y agrandamiento de los nodos linfáticos submandibulares en caballos o cerdos (Li *et al.*, 2012; Steel *et al.*, 2013). Los Arbovirus son considerados como una preocupación principal de salud pública debido a la amplia prevalencia de los vectores y la limitada prevención y opciones de tratamiento para la infección (Steel *et al.*, 2013).

1.3.1 Virus del Chikungunya

La fiebre por Chikungunya es causada por un arbovirus (género *Arbovirus*, familia *Togaviridae*), la cual se transmite a los humanos principalmente a través de los mosquitos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (van Genderen *et al.*, 2016). Sin embargo, muchos estudios han revelado que el *Ae. albopictus* muestra una mayor susceptibilidad a VCHIK y una mayor eficiencia a la transmisión del virus que en *Ae. aegypti* (Thavara *et al.*, 2009). Análisis filogenéticos revelan cuatro principales genotipos de VCHIK: Enzoótico Oeste y Este/Centro/Sur Africano (ECSA), asiático, responsable de los recientes brotes en las Américas y el Caribe, y el genotipo endémico/epidémico Océano Indico (IOL). Todos los linajes esencialmente constituyen un solo serotipo y la inmunidad cruzada probablemente regula el periodo natural de las principales epidemias. Por ejemplo, en 2010, 19 años después un brote ocurrido en 1991 causado por el genotipo asiático en Tailandia, más de tercio de individuos previamente infectados presentaron anticuerpos neutralizantes (nAb) contra el genotipo IOL recientemente introducido (Erasmus *et al.*, 2016; Chua *et al.*, 2017).

Exactamente cuándo y dónde se originó el VCHIK no puede ser respondido hoy en día. Sin embargo, el virus se cree que se originó en África, donde aún circula endozoóticamente entre primates no humanos (Weaver, 2014; Weaver *et al.*, 2015a). El VCHIK se encuentra estrechamente relacionado con el virus o'nyong-nyong (VNNO), el cual causó un brote ocurrido en África involucrando a los mosquitos *Anopheles* spp. en la

transmisión. Este virus evolucionó independientemente de su “hermano” VCHIK con una divergencia al menos de cientos de años (Weaver *et al.*, 2015a).

La evidencia histórica sugiere que la emergencia por Chikungunya comenzó a inicios del siglo XVIII en Indonesia y posiblemente en las Américas, presumiblemente a través de veleros que transportaba ingredientes esenciales (Weaver, 2014). Siguiendo con su descubrimiento, el VCHIK fue aislado por primera vez en un hombre y también en mosquitos durante una epidemia de fiebre en Tanzania, entre 1952 y 1953 (Thavara *et al.*, 2009). La baja incidencia de malaria en esta región pudo haber facilitado el reconocimiento de la fiebre por Chikungunya, la cual se describió como un “aparición muy aguda de dolor en las articulaciones, fiebre grave y finalmente erupciones visibles en la piel” (Weaver *et al.*, 2015a). La segunda emergencia documentada de VCHIK comenzó en Kenia en 2004 y un año más tarde se esparció a islas del océano Índico como la isla francesa La Reunión y la India, presumiblemente con viajeros por vía aérea. Después ocurrieron casos autóctonos en Italia y Francia debido a pasajeros infectados provenientes de la India (Weaver, 2014; Dove, 2015). Estos brotes incrementaron la actividad en el Sureste de Asia con más infecciones en más localidades. En el 2007 un pasajero infectado por VCHIK lo introdujo a Italia permitiendo el primer brote de VCHIK en Europa. Mientras en las Américas, en diciembre 2013 se confirmó una infección local en la isla caribeña San Martín, en los posteriores meses se incrementaron los casos y la expansión geográfica. Un año más tarde, 43 países y territorios en las Américas habían reportado transmisiones autóctonas por VCHIK (Johansson, 2015) (Figura 12). En el 2016, se estimó un millón de casos anuales en >100 países y territorios, mientras que en las Américas ha resultado en >1.9 millones de casos sospechosos en >50 países (Erasmus *et al.*, 2016).

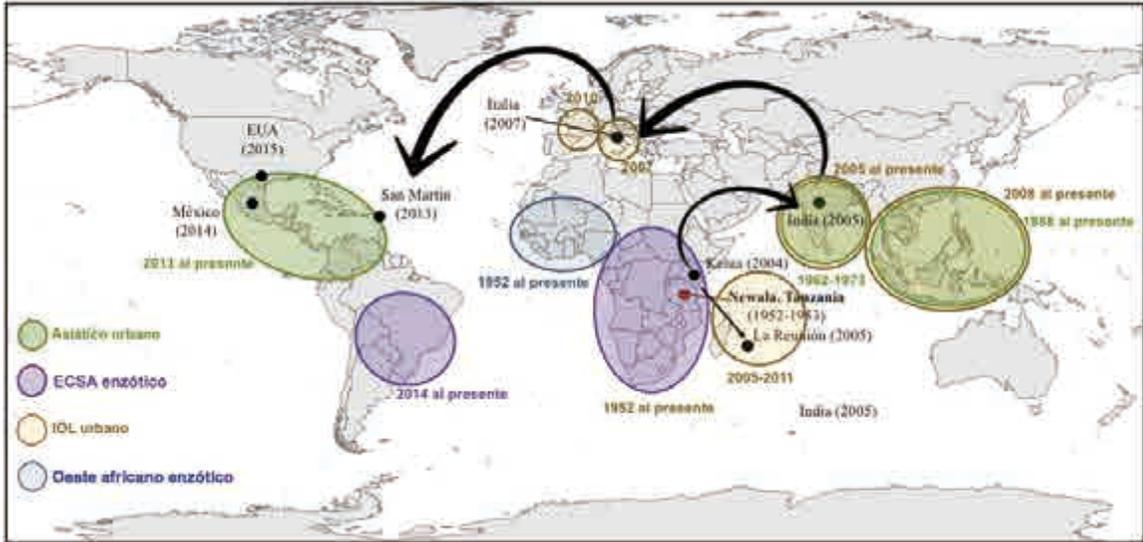


Figura 12. Origen, brotes y distribución de VCHIK. Aislamiento de VCHIK en humano y mosquito durante 1952-1953 indicado con punto rojo. La segunda emergencia por VCHIK se registró en Kenia en 2004 y la expansión de casos autóctonos en los siguientes años que se registraron en Europa y las Américas, se indican con puntos negros. El mapa muestra el origen africano de los linajes enzoóticos de Chikungunya y los patrones de emergencia y los brotes de los genotipos asiático y Océano Índico (IOL) del virus durante los brotes epidémicos desde la década de 1950. (Adaptado de Weaver *et al.*, 2015b).

1.3.2 Epidemiología del VCHIK en México

Posterior a un año de la emergencia de VCHIK en las Américas, en octubre del 2014 entró a México a través de la frontera sur México-Guatemala, pero no fue reportada oficialmente hasta noviembre del mismo año. En México, el genotipo asiático de VCHIK está circulando y la transmisión es por medio *Ae. aegypti*. Desde su introducción en México, el VCHIK siguió tres brotes de emergencia desde su punto de entrada, el estado de Chiapas: a lo largo de la costa del Pacífico, la costa del Golfo de México y la península de Yucatán (Danis-Lozano *et al.*, 2017). Mientras, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), entre diciembre 2014 a diciembre 2017 reportó 11,971 casos por Chikungunya en México, siendo el 2015 el año con más casos reportados (11,286) donde los estados más afectados fueron Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Veracruz (OPS, 2018c). En el caso de Tamaulipas, se confirmaron 87 casos entre 2015 y 2017 (SS, 2018a).

1.3.3 Manifestaciones clínicas por VCHIK

Chikungunya, el cual es traducido como “estar contorsionado” o “que se dobla”, es caracterizado por un abrupto inicio de fiebre acompañado con dolor de articulaciones. Otros comunes signos y síntomas incluyen dolor muscular, dolor de cabeza, náuseas, fatiga y erupción maculopapular. El dolor muscular es a menudo muy debilitante, pero usualmente dura unos días o puede prolongarse por semanas o inclusive años. (Reller *et al.*, 2013; OMS, 2017; Wikan *et al.*, 2012). La fiebre por Chikungunya raramente pone en peligro la vida y es más leve que una infección por dengue ya que no tiene manifestaciones hemorrágicas o shock (Thavara *et al.*, 2009). Aunque el dolor de las articulaciones es considerado como característico por una infección por VCHIK, los síntomas agudos no específicos afectan a 75-95% de casos infectados y se llegan a confundir con otros virus, como Dengue y Zika, que comparten los mismos vectores en las mismas regiones geográficas. Así que puede ser difícil el diagnóstico clínico de VCHIK solamente basado en los síntomas clínicos, especialmente en áreas donde este virus co-circula. Siendo así, las pruebas de laboratorio son esenciales para un diagnóstico por infección por VCHIK (Tuekprakhon *et al.*, 2018) (Figura 13).



Figura 13. Línea de tiempo de la infección, síntomas y biomarcadores de VCHIK. Se muestra la cronología de la replicación viral en relación con los signos clínicos y biológicos de la enfermedad, incluyendo los biomarcadores usados en el diagnóstico para la detección de infección viral por Chikungunya (Weaver *et al.*, 2015b).

1.3.4 Genoma del VCHIK

Como otros alfavirus, el genoma del VCHIK consiste en una hebra de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 11.8 Kb. El genoma del RNA presenta cap 5'-metilguanilato y una cola 3-poliadenilada y codifica dos marcos de lectura abierta (ORF's). El 5'ORF comprende cerca de dos terceras partes del genoma (7424 nucleótidos) y codifica para cuatro proteínas no estructurales (nsP1 a nsP4) que participan en la replicación del genoma. La nsP1 comprende 535 aminoácidos; la nsP2 comprende 798 aminoácidos y es la proteína no estructural más grande de los alfavirus, la cual tiene una carga neta positiva (+21); la nsP3 comprende 530 aminoácidos de largo; y la nsP4 es de 611 aminoácidos de largo, la cual también es la proteína más conservada entre alfavirus. Estas cuatro proteínas no estructurales forman la RNA replicasa con algunas proteínas de la célula huésped. En contraste, el ORF de las proteínas estructurales contiene 3732 aminoácidos y está incluido como un mensajero subgenómico, el cual es traducido por un mecanismo vía cap-dependiente y codifica a tres proteínas estructurales (C, E1 y E2) y dos pequeños péptidos (E3 y 6K/TF), los cuales comprenden 261, 435, 423, 64 y 61 aminoácidos respectivamente. El virión maduro tiene un diámetro de 70 nm (Weaver *et al.*, 2012; Wikan *et al.*, 2012; An *et al.*, 2017) (Figura 14).

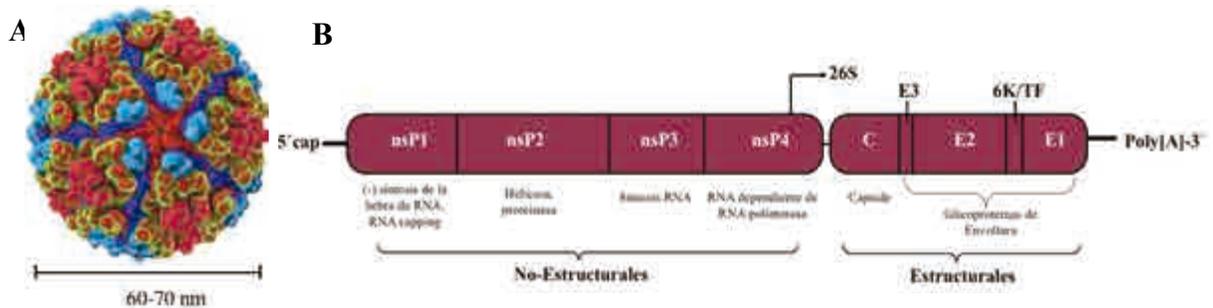


Figura 14. Estructura y organización del genoma de VCHIK. A) Estructura del virión de Chikungunya 60-70 nm de diámetro. B) Organización del genoma del virus del Chikungunya (no escala), incluyendo los marcos de lectura abiertos de la poliproteína de las proteínas estructurales, no estructurales y el promotor subgenómico 26S. VCHIK contiene un RNA de aproximadamente 11.8 kb. El extremo 5' de la molécula de RNA contiene una caperuza de 7-metilguanina mientras que en el extremo 3' esta poliadenilada. Un RNA subgenómico de polaridad positiva referenciado como 26SRNA se transcribe a partir de un RNA intermedio de polaridad negativa.

1.3.5 Replicación del VCHIK

En vertebrados (primates y humanos), los alfavirus pueden infectar un amplio rango de células. Aunque los receptores específicos para VCHIK aún no están completamente determinados, se cree que entra a la célula por una ruta mediada por receptores a través de la glicoproteína E2 y se internaliza a través de endocitosis mediada por clatrina o dependiente de Eps-15 e independiente de clatrina. Con el progreso de la infección, el endosoma llega a ser ácido, induciendo la disociación del heteródmero E2-E1 y un cambio conformacional de la proteína de fusión E1, permitiendo la liberación de la nucleocápside viral en el citoplasma. La nucleocápside se une al ribosoma (considerado como un factor de recubrimiento) para favorecer la liberación del RNA genómico en el citoplasma. Entonces el genoma que codifica para las proteínas no estructurales (nsP1 a nsP4) es traducido dentro de la célula huésped, produciendo la escisión de estas, vía auto-proteolítica. Las proteínas nsP1, 2 y 3 pueden formar la RNA replicasa con la nsP4 y algunas proteínas celulares del huésped. Enseguida, el RNA (-) se sintetiza y es usado como templado para la síntesis de RNA genómico de polaridad positiva y un RNA denominado subgenómico que codifica para las proteínas estructurales. Una vez que las proteínas estructurales (cápside, pE2, 6K y E1) pueden generarse, y escindirse auto-proteolíticamente para separarse de la cápside. La poliproteína pE2-6K-E1 se dirige al retículo endoplásmico (RE) para continuar su procesamiento. Después, la poliproteína pE2-E1 es transportada a la membrana plasmática (MP) después hacia al aparato de Golgi, durante el cual pE2 y E1 forma un heteródmero. La Furina o la proteínasa tipo Furina escinde pE2 en E2 y E3. Mientras, la cápside interactúa con el RNA genómico para encapsidar al genoma y formar la nucleocápside. Finalmente, las nucleocápsides son transportadas a la membrana plasmática (MP) y brotan con la membrana del huésped para formar un virión maduro (An *et al.*, 2017) (Figura 15).

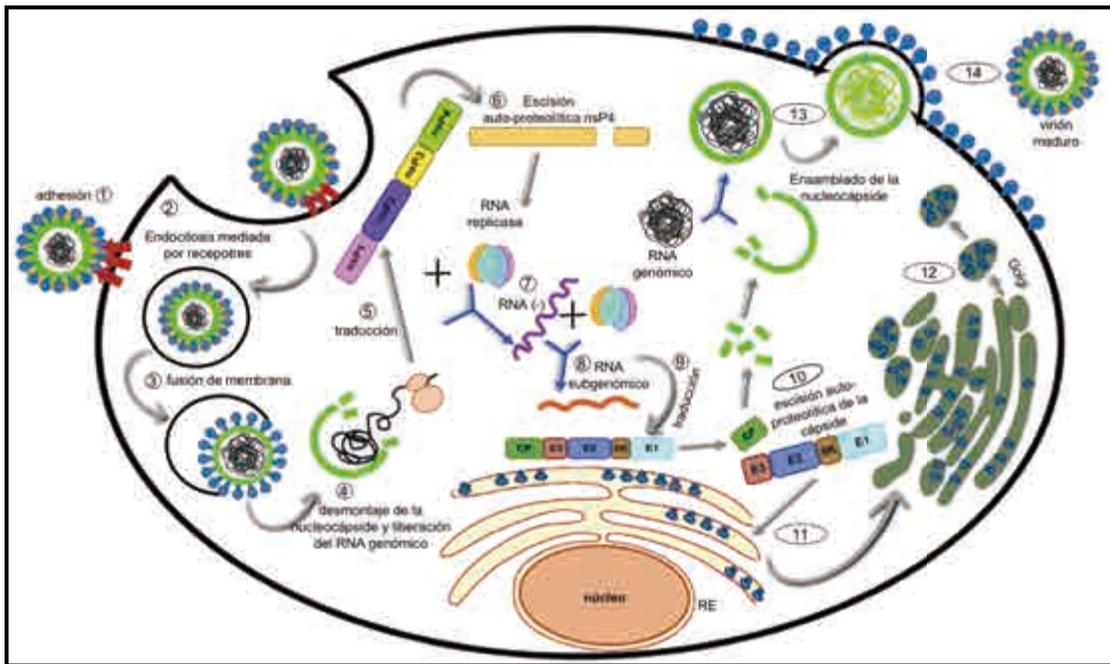


Figura 15. Ciclo de infección de VCHIK. La infección por VCHIK puede ser completada en 14 pasos para generar nuevos virus. 1) La glicoproteína viral E2 se une a los receptores de la superficie celular. 2) Entra a la célula mediada por endocitosis vía dependiente o independiente de clatrina. 3) Bajo un ambiente ácido en el endosoma, el heterodímero E2-E3 se disocia y cambia la conformación de E1, permitiendo a la membrana de la célula del huésped y la envoltura viral la fusión. 4) La nucleocápside se libera en el citoplasma y después se desarma, permitiendo la liberación del RNA genómico. 5) Las proteínas no estructurales son traducidas. 6) La poliproteína se procesa auto-proteolíticamente en nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4. 7) La nsP4 forma la RNA replicasa con nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 y algunas proteínas celulares del huésped. Por consiguiente, el RNA de polaridad negativa (-) se sintetiza. 8) El RNA (-) es usado como molde para la síntesis de RNA de polaridad positiva (+) y el RNA subgenómico. 9) Las proteínas estructurales son generadas. 10) Se escinde auto-proteolíticamente para separar la proteína de la cápside de la poliproteína pE2-6kE1. 11) La poliproteína pE2-6kE1 se introduce en el retículo endoplásmico para continuar avanzando. 12) Después son transportados del RE a Golgi y por último a la membrana plasmática (MP), la poliproteína se somete a un procesamiento posterior, permitiendo la formación del heterodímero E2-E1 maduro. 13) Las proteínas de la cápside interactúa con el RNA genómico y forma la nucleocápside. 14) Las nucleocápsides son transportadas a la MP y se rodean con la membrana del huésped para formar un virus maduro (Adaptado de An *et al.*, 2017).

1.3.6 Patogenicidad por VCHIK

Las principales complicaciones reportadas son: dolor crónico, disfunción de diversos órganos y encefalitis en la vejez y diversas infecciones neonatales. Aproximadamente el 35% de los pacientes reportan persistencia o recaída de polialtralgia, con poliartritis crónica. Los síntomas incapacitantes pueden perdurar meses a años y son frecuentemente reportados en pacientes mayores a 35 años o cuando los síntomas persisten cuatro meses después de la aparición de los síntomas. Pacientes mayores con morbilidades también puede potencialmente desarrollar complicaciones fatales incluyendo encefalitis, miocarditis e insuficiencia renal. La tasa de casos fatales se estimada globalmente $\sim 1/1000$, donde la muerte ocurre principalmente es pacientes mayores a 75 años (Weaver *et al.*, 2018). Además, el VCHIK está asociado con neuropatía periférica sin enfermedad en el Sistema Nervioso Central (SNC) y se han reportado 72 casos o series, la mayoría de los cuales se describieron como síndrome de Guillain-Barré (SGB) (Mehta *et al.*, 2018).

En la mayoría de las infecciones por VCHIK que ocurren durante el embarazo el virus no se transmite al feto. Sin embargo, existen reportes puntuales de abortos espontáneos después de una infección por VCHIK en la madre. El riesgo más alto de transmisión parece producirse cuando la mujer está infectada en el período intraparto (período del parto y la expulsión del feto y la placenta), momento en el que la tasa de transmisión vertical puede alcanzar un 49%. Los niños generalmente nacen asintomáticos y luego desarrollan fiebre, dolor, erupción y edema periférico. Aquellos que se infectan en el período intraparto pueden desarrollar enfermedad neurológica (por ej., meningoencefalitis, lesiones de la sustancia blanca, edema cerebral y hemorragia intracraneana), síntomas hemorrágicos y enfermedad del miocardio (OPS/CDC, 2011).

1.3.7 Recientes tratamientos contra el VCHIK

Las terapias para pacientes infectados con VCHIK que cursan principalmente con artritis/artralgia consisten en el uso de acetaminofén (Tylenol®) o paracetamol para reducir la fiebre y el dolor. Se recomienda no usar anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) como la aspirina ya que su uso durante la enfermedad puede significar un riesgo de hemorragia y desarrollar potencialmente el síndrome de Reye, y la administración de corticoesteroides probablemente cause inmunosupresión y exacerbe la enfermedad. En pacientes que exhiben una respuesta limitada a los AINE o pacientes en estado crónico por VCHIK, los fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad (FAME) como el metotrexano, hidroxicloroquina y sulfasalazina se han reportado como una alternativa del dolor e hinchazón de las articulaciones (Tharmarajah *et al.*, 2017; CDC, 2016). Después de la reemergencia de VCHIK en 2004, y su rápida expansión a través del Océano Indico y el sureste de Asia y los casos autóctonos ocurridos en Italia en 2007, hubo un nuevo interés en la búsqueda de desarrollar una vacuna contra VCHIK. Una variedad de investigaciones ha desarrollado productos que generarán altos niveles de anticuerpos que proporcionen una inmunidad duradera y requieran un mínimo de necesidades de producción. Las opciones incluyen partículas similares a virus (PSV), vacunas de subunidades, vacunas vectoriales/quiméricas, vacunas de ácidos nucleicos y vacunas vivas atenuadas todas han sido exploradas como vacuna posible (Powers, 2018). Actualmente, la vacuna conocida como MV-CHIKV, es una vacuna recombinante con virus del sarampión atenuado que expresa las proteínas de envoltura y cápside que inducen una robusta respuesta inmune neutralizante (Schwameis *et al.*, 2016). El mecanismo de acción esta bajo investigación. Sin embargo, la capacidad de la vacuna recombinante para producir potencialmente partículas tipo virus (VLPs) como resultado en la formación de epitopes altamente inmunogénicos, supone ser el principal determinante antigénico para la función de MV-CHIKV (Ramsauer *et al.*, 2016). Esta vacuna se encuentra en la fase 1 y 2 del ensayo clínico en la que se planea enlistar a 180 voluntarios adultos y sanos entre 18 y 45 años de edad con financiación del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID). Recientemente el ensayo está en curso en el Colegio Baylor de Medicina en Houston, la universidad Emory de Atlanta y el Colegio de Medicina de la Universidad de

Iowa en la Ciudad de Iowa. Un ensayo de la fase 1 de MV-CHIKV en Austria, se realizó por la fabricante de vacuna Themis Bioscience, donde mostraron que la vacuna es segura e inmunogénica. La compañía se encuentra llevando la fase 2 del ensayo (Lyon, 2017).

1.4 Referencias

Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, Bricault CA, Moseley ET, Boyd M, Kirilova M, Li Z, Ng'ang'a D, Nanayakkara O, Nityanandam R, Mercado NB, Borducchi EN, Agarwal A, Brinkman AL, Cabral C, Chandrashekar A, Giglio PB, Jetton D, Jimenez J, Lee BC, Mojta S, Molloy K, Shetty M, Neubauer GH, Stephenson KE, Peron JP, Zanutto PM, Misamore J, Finneyfrock B, Lewis MG, Alter G, Modjarrad K, Jarman RG, Eckels KH, Michael NL, Thomas SJ, Barouch DH. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science*. 2016 Sep 9;353(6304):1129-32.

Acharya D, Bai F. An Overview of Current Approaches Toward the Treatment and Prevention of West Nile Virus Infection. *Methods Mol Biol*. 2016; 1435:249-91.

Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Castillo-Medina LF, Rodríguez Y, Pacheco Y, Halstead S, Willison HJ, Anaya JM, Ramírez-Santana C. Autoimmune Neurological Conditions Associated with Zika Virus Infection. *Front Mol Neurosci*. 2018 Apr 11; 11:116.

Aliota MT, Bassit L, Bradrick SS, Cox B, Garcia-Blanco MA, Gavegnano C, Friedrich TC, Golos TG, Griffin DE, Haddow AD, Kallas EG, Kitron U, Lecuit M, Magnani DM, Marrs C, Mercer N, McSweegan E, Ng LFP, O'Connor DH, Osorio JE, Ribeiro GS, Ricciardi M, Rossi SL, Saade G, Schinazi RF, Schott-Lerner GO, Shan C, Shi PY, Watkins DI, Vasilakis N, Weaver SC. Zika in the Americas, year 2: What have we learned? What gaps remain? A report from the Global Virus Network. *Antiviral Res*. 2017 Aug; 144:223-246.

Alva-Urcia C, Aguilar-Luis MA, Palomares-Reyes C, Silva-Caso W, Suarez-Ognio L, Weilg P, Manrique C, Vasquez-Achaya F, Del Valle LJ, Del Valle-Mendoza J. Emerging and reemerging arboviruses: A new threat in Eastern Peru. *PLoS One*. 2017 Nov14;12(11):e0187897.

An W, Ge N, Cao Y, Sun J, Jin X. Recent progress on chikungunya virus research. *Viol Sin.* 2017 Dec;32(6):441-453.

Barrows NJ, Campos RK, Liao KC, Prasanth KR, Soto-Acosta R, Yeh SC, Schott-Lerner G, Pompon J, Sessions OM, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev.* 2018 Apr 25;118(8):4448-4482.

Biedenbender R, Bevilacqua J, Gregg AM, Watson M, Dayan G. Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to investigate the immunogenicity and safety of a West Nile virus vaccine in healthy adults. *J Infect Dis.* 2011 Jan 1;203(1):75-84.

Brinkman AL, Cabral C, Chandrashekar A, Giglio PB, Jetton D, Jimenez J, Lee BC, Mojta S, Molloy K, Shetty M, Neubauer GH, Stephenson KE, Peron JP, Zanutto PM, Misamore J, Finneyfrock B, Lewis MG, Alter G, Modjarrad K, Jarman RG, Eckels KH, Michael NL, Thomas SJ, Barouch DH. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science.* 2016 Sep 9;353(6304):1129-32.

Blitvich BJ. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim Health Res Rev.* 2008 Jun;9(1):71-86.

Blitvich BJ, Wang T, Saxena V, Zeng S, Harmon KM, Raymond MD, Goins KM, Reed CR, Mullins RF, Greiner MA. West Nile Virus Infection in Human and Mouse Cornea Tissue. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Nov 2;95(5):1185-1191.

Braack L, Gouveia de Almeida AP, Cornel AJ, Swanepoel R, de Jager C. Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. *Parasit Vectors.* 2018 Jan 9;11(1):29.

Best SM. Flaviviruses. *Curr Biol.* 2016 Dec 19;26(24):R1258-R1260.

Carod-Artal FJ. Neurological complications of Zika virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018 Apr 26:1-12.

Carter JR, Taylor S, Fraser TS, Kucharski CA, Dawson JL, Fraser MJ Jr. Suppression of the Arboviruses Dengue and Chikungunya Using a Dual-Acting Group-I Intron Coupled with Conditional Expression of the Bax C-Terminal Domain. *PLoS One.* 2015 Nov 18;10(11):e0139899.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). 2015. West Nile virus. <http://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/index.html>

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). 2016. Síntomas, Diagnóstico y Tratamiento. <https://www.cdc.gov/chikungunya/symptoms/index.html>

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). 2018. Transmisión por mosquitos. <https://www.cdc.gov/dengue/training/cme/ccm/page45915.html>

Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). 2018. Vectores. http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/aviso_virus_nilo210812.pdf

Chan M, Johansson MA. The incubation periods of Dengue viruses. *PLoS One.* 2012;7(11):e50972.

Chua CL, Sam IC, Chiam CW, Chan YF. The neutralizing role of IgM during early Chikungunya virus infection. *PLoS One.* 2017 Feb 9;12(2):e0171989.

Coffey LL, Vasilakis N, Brault AC, Powers AM, Triplet F, Weaver SC. Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 13;105(19):6970-5.

Crowder DW, Dykstra EA, Brauner JM, Duffy A, Reed C, Martin E, Peterson W, Carrière Y, Dutilleul P, Owen JP. West Nile virus prevalence across landscapes is mediated by local effects of agriculture on vector and host communities. *PLoS One*. 2013;8(1):e55006.

Cucunawangsih, Lugito NPH. Trends of Dengue Disease Epidemiology. *Virology (Auckl)*. 2017 Mar 15; 8:1178122X17695836.

Culshaw A, Mongkolsapaya J, Screaton G. The immunology of Zika Virus. *F1000Res*. 2018 Feb 19; 7:203.

Danis-Lozano R, Díaz-González EE, Trujillo-Murillo KDC, Caballero-Sosa S, Sepúlveda-Delgado J, Malo-García IR, Canseco-Ávila LM, Salgado-Corsantes LM, Domínguez-Arrebillaga S, Torres-Zapata R, Gómez-Cruz O, Fernández-Salas I. Clinical characterization of acute and convalescent illness of confirmed chikungunya cases from Chiapas, S. Mexico: A cross sectional study. *PLoS One*. 2017 Oct 24;12(10):e0186923.

Dantés HG, Farfán-Ale JA, Sarti E. Epidemiological trends of dengue disease in Mexico (2000-2011): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Nov 6;8(11):e3158.

Dove A. Chikungunya is moving fast, but so are researchers in the field. *Nat Med*. 2015 Oct;21(10):1107.

Durbin AP. Dengue Antibody and Zika: Friend or Foe? *Trends Immunol*. 2016 Oct;37(10):635-636.

Elizondo-Quiroga D, Davis CT, Fernandez-Salas I, Escobar-Lopez R, Velasco Olmos D, Soto Gastalum LC, Aviles Acosta M, Elizondo-Quiroga A, Gonzalez-Rojas JI, Contreras Cordero JF, Guzman H, Travassos da Rosa A, Blitvich BJ, Barrett AD, Beaty BJ, Tesh RB. West Nile Virus isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2005 Sep;11(9):1449-52.

Erasmus JH, Rossi SL, Weaver SC. Development of Vaccines for Chikungunya Fever. *J Infect Dis.* 2016 Dec 15;214(suppl 5):S488-S496. Review.

Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF, Blitvich BJ, González-Rojas JI, Cavazos-Alvarez A, Marlenee NL, Elizondo-Quiroga A, Loroño-Pino MA, Gubler DJ, Cropp BC, Calisher CH, Beaty BJ. Serologic evidence of West Nile Virus infection in birds, Tamaulipas State, México. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2003 Winter;3(4):209-13.

Go YY, Balasuriya UB, Lee CK. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res.* 2014 Jan; 3(1):58-77.

Godói IP, Lemos LL, de Araújo VE, Bonoto BC, Godman B, Guerra Júnior AA. CYD-TDV dengue vaccine: systematic review and meta-analysis of efficacy, immunogenicity and safety. *J Comp Eff Res.* 2017 Mar;6(2):165-180.

Gratz NG. Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol.* 1999; 44:51-75. Review.

Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis.* 1998 Jul-Sep;4(3):442-50.

Guerrero-Sánchez S, Cuevas-Romero S, Nemeth NM, Trujillo-Olivera MT, Worwa G, Dupuis A, Brault AC, Kramer LD, Komar N, Estrada-Franco JG. West Nile virus infection of birds, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2011 Dec;17(12):2245-52.

Guerbois M, Fernandez-Salas I, Azar SR, Danis-Lozano R, Alpuche-Aranda CM, Leal G, Garcia-Malo IR, Diaz-Gonzalez EE, Casas-Martinez M, Rossi SL, Del Río-Galván SL, Sanchez-Casas RM, Roundy CM, Wood TG, Widen SG, Vasilakis N, Weaver SC. Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. *J Infect Dis.* 2016 Nov 1;214(9):1349-1356.

Gutierrez G, Standish K, Narvaez F, Perez MA, Saborio S, Elizondo D, Ortega O, Nuñez A, Kuan G, Balmaseda A, Harris E. Unusual dengue virus 3 epidemic in Nicaragua, 2009. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Nov;5(11):e1394.

Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Aug 18; 2:16055.

Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015 Jan 31;385(9966):453-65.

Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.* 2003 May;3(1):19-28.

Ibáñez-Bernal S, Briseño B, Mutebi JP, Argot E, Rodríguez G, Martínez-Campos C, Paz R, de la Fuente-San Román P, Tapia-Conyer R, Flisser A. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med Vet Entomol.* 1997 Oct;11(4):305-9.

Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats. Vector-Borne Diseases: Understanding the Environmental, Human Health, and Ecological Connections, Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US); 2008.

Johansson MA. Chikungunya on the move. *Trends Parasitol.* 2015 Feb;31(2):43-5.

Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, Balmaseda A, Harris E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017 Nov 17;358(6365):929-932.

Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Van Bortel W, Hendrickx G, Schaffner F, Elyazar IR, Teng HJ, Brady OJ, Messina JP, Pigott DM, Scott TW, Smith DL, Wint GR, Golding N, Hay SI. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. 2015 Jun 30; 4:e08347.

LaBeaud AD. Why arboviruses can be neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 Jun 25;2(6):e247.

Laredo-Tiscareño SV, Guo, X, Bocanegra-García, V. Virus del dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular. *CienciaUAT [en línea]* 2012, 6 (Enero-Junio):[Fecha de consulta: 10 de mayo de 2018].

Larocca RA, Abbink P, Peron JP, Zanotto PM, Iampietro MJ, Badamchi-Zadeh A, Boyd M, Ng'ang'a D, Kirilova M, Nityanandam R, Mercado NB, Li Z, Moseley ET, Bricault CA, Borducchi EN, Giglio PB, Jetton D, Neubauer G, Nkolola JP, Maxfield LF, De La Barrera RA, Jarman RG, Eckels KH, Michael NL, Thomas SJ, Barouch DH. Vaccine protection against Zikavirus from Brazil. *Nature*. 2016 Aug 25;536(7617):474-8.

Laughlin CA, Morens DM, Cassetti MC, Costero-Saint Denis A, San Martin JL, Whitehead SS, Fauci AS. Dengue research opportunities in the Americas. *J Infect Dis*. 2012 Oct 1;206(7):1121-7.

Ledgerwood JE, Pierson TC, Hubka SA, Desai N, Rucker S, Gordon IJ, Enama ME, Nelson S, Nason M, Gu W, Bundrant N, Koup RA, Bailer RT, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS; VRC 303 Study Team. A West Nile virus DNA vaccine utilizing a modified

promoter induces neutralizing antibody in younger and older healthy adults in a phase I clinical trial. *J Infect Dis.* 2011 May 15;203(10):1396-404.

Leonhard SE, Lant S, Jacobs BC, Wilder-Smith A, Ferreira MLB, Solomon T, Willison HJ. Zika virus infection in the returning traveller: what every neurologist should know. *Pract Neurol.* 2018 Apr 4. pii: practneurol-2017-001789.

Li J, Zhu W, Wang H, Li J, Zhang Q, He Y, Li J, Fu J, Li D, Liang G. Rapid, specific detection of alphaviruses from tissue cultures using a replicon-defective reporter gene assay. *PLoS One.* 2012;7(3):e33007.

Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect.* 2015 Mar;4(3):e18.

Lieberman MM, Clements DE, Ogata S, Wang G, Corpuz G, Wong T, Martyak T, Gilson L, Collier BA, Leung J, Watts DM, Tesh RB, Siirin M, Travassos da Rosa A, Humphreys T, Weeks-Levy C. Preparation and immunogenic properties of a recombinant West Nile subunit vaccine. *Vaccine.* 2007 Jan 5;25(3):414-23.

Lieberman MM, Nerurkar VR, Luo H, Cropp B, Carrion R Jr, de la Garza M, Collier BA, Clements D, Ogata S, Wong T, Martyak T, Weeks-Levy C. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant subunit West Nile virus vaccine in rhesus monkeys. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Sep;16(9):1332-7.

Lyon J. Chikungunya Vaccine Trials Begin. *JAMA.* 2017 Jul 25;318(4):322.

Malone RW, Homan J, Callahan MV, Glasspool-Malone J, Damodaran L, Schneider Ade B, Zimler R, Talton J, Cobb RR, Ruzic I, Smith-Gagen J, Janies D, Wilson J; Zika Response Working Group. Zika Virus: Medical Countermeasure Development Challenges. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Mar 2;10(3):e0004530.

Martin JE, Pierson TC, Hubka S, Rucker S, Gordon IJ, Enama ME, Andrews CA, Xu Q, Davis BS, Nason M, Fay M, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Gomez PL, Mascola JR, Chang GJ, Nabel GJ, Graham BS. A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase 1 clinical trial. *J Infect Dis.* 2007 Dec 15;196(12):1732-40.

Martínez-Vega RA, Rodríguez-Morales AJ, Bracho-Churio YT, Castro-Salas ME, Galvis Ovallos F, Díaz-Quijano RG, Luna-González ML, Castellanos JE, Ramos-Castañeda J, Diaz-Quijano FA. A prospective cohort study to assess seroprevalence, incidence, knowledge, attitudes and practices, willingness to pay for vaccine and related risk factors in dengue in a high incidence setting. *BMC Infect Dis.* 2016 Nov 25;16(1):705.

Mehta R, Gerardin P, de Brito CAA, Soares CN, Ferreira MLB, Solomon T. The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review. *Rev Med Virol.* 2018 Apr 19:e1978.

Meltzer E. Arboviruses and viral hemorrhagic fevers (VHF). *Infect Dis Clin North Am.* 2012 Jun;26(2):479-96.

Míguez MJ. In the war of viral infections IgE may play an important role: Antibody kinetics in Dengue. *J Antivir Antiretrovir* 2011, 3:4. (<https://www.omicsonline.org/proceedings/in-the-war-of-viral-infections-ige-may-play-an-important-role-antibody-kinetics-in-dengue-8598.html>)

Mole BM. Antibody-Dependent Enhanced (ADE) Immunity. *TheScientist.* 2013. Mar; Vo. 27 Issue 3. https://www.the-scientist.com/images/March2013/dengue_virus.pdf

Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol.* 2013 Aug 20;5:299-309.

Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, Shan Yan A, Cao-Lormeau VM, Broult J. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* 2014 Apr 10;19(14). pii: 20761. Erratum in: *Euro Surveill.* 2014;19(15):pii/20771.

Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India.* 2015 Jan;71(1):67-70.

Muthumani K, Griffin BD, Agarwal S, Kudchodkar SB, Reuschel EL, Choi H, Kraynyak KA, Duperret EK, Keaton AA, Chung C, Kim YK, Booth SA, Racine T, Yan J, Morrow MP, Jiang J, Lee B, Ramos S, Broderick KE, Reed CC, Khan AS, Humeau L, Ugen KE, Park YK, Maslow JN, Sardesai NY, Joseph Kim J, Kobinger GP, Weiner DB. In vivo protection against ZIKV infection and pathogenesis through passive antibody transfer and active immunisation with a prMEnv DNA vaccine. *NPJ Vaccines.* 2016 Nov 10;1:16021.

Nemésio H, Villalaín J. Membranotropic regions of the dengue virus prM protein. *Biochemistry.* 2014 Aug 19;53(32):5280-9.

Noor R, Ahmed T. Zika virus: Epidemiological study and its association with public health risk. *J Infect Public Health.* 2018 Apr 26. pii: S1876-0341(18)30043-1.

Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science.* 2013 Oct 25;342(6157):415

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2017. Chikungunya, Factores clave. Inglés-<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018*a*. Epidemiología de dengue. Inglés-<http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018*b*. Control de dengue. Inglés-<http://www.who.int/denguecontrol/human/en/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018*c*. Vacunas contra VDEN. Inglés-<http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018*d*. West Nile virus. Inglés-<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus>

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2016. Dengue: guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas. 2.ed. ISBN:978-92-74-11890-0. (<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/31207/9789275118900-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>)

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2018*a*. Indicadores de dengue. <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2018*b*. Epidemiología Regional de Zika. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599&Itemid

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2018*c*. Chikungunya. http://ais.paho.org/hip/viz/ed_chikungunya_amro.asp

Organización Panamericana de la Salud (OPS). Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (OPS/CDC). Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus del Chikungunya en las Américas. 2011. ISBN: 978-92-75-31632-0. http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_Spanish.pdf

Peeling RW, Artsob H, Pelegriño JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, Enria DA, Farrar J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB, Hunsperger E, Kliks S, Margolis HS, Nathanson CM, Nguyen VC, Rizzo N, Vázquez S, Yoksan S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Dec;8(12 Suppl):S30-8.

Pepin KM, Lambeth K, Hanley KA. Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. *BMC Microbiol*. 2008 Feb 8;8:28.

Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*. 1997;50(3-4):161-9. Review.

Pletnev AG, Swayne DE, Speicher J, Rumyantsev AA, Murphy BR. Chimeric West Nile/dengue virus vaccine candidate: preclinical evaluation in mice, geese and monkeys for safety and immunogenicity. *Vaccine*. 2006 Sep 29;24(40-41):6392-404.

Powers AM. Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Dec 13;31(1). pii: e00104-16.

Priyamvada L, Hudson W, Ahmed R, Wrammert J. Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology. *Emerg Microbes Infect*. 2017 May 10;6(5):e33.

Pyke AT, Moore PR, Taylor CT, Hall-Mendelin S, Cameron JN, Hewitson GR, Pukallus DS, Huang B, Warrilow D, van den Hurk AF. Highly divergent dengue virus type 1 genotype sets a new distance record. *Sci Rep*. 2016 Feb 29; 6:22356.

Ramsauer K, Tangy F. Chikungunya Virus Vaccines: Viral Vector-Based Approaches. *J Infect Dis.* 2016 Dec 15;214(suppl 5):S500-S505.

Reisen WK. Ecology of West Nile virus in North America. *Viruses.* 2013 Sep 4;5(9):2079-105.

Reller ME, Akoroda U, Nagahawatte A, Devasiri V, Kodikaarachchi W, Strouse JJ, Chua R, Hou Y, Chow A, Sessions OM, Østbye T, Gubler DJ, Woods CW, Bodinayake C. Chikungunya as a cause of acute febrile illness in southern Sri Lanka. *PLoS One.* 2013 Dec 2;8(12):e82259.

Restrepo-Jiménez P, Rodríguez Y, González P, Chang C, Gershwin ME, Anaya JM. The Immunotherapy of Guillain-Barré Syndrome. *Expert Opin Biol Ther.* 2018 Apr 23.

Richner JM, Himansu S, Dowd KA, Butler SL, Salazar V, Fox JM, Julander JG, Tang WW, Shresta S, Pierson TC, Ciaramella G, Diamond MS. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell.* 2017 Mar 23;169(1):176.

Ritchie A. Dengue vector bionomics: why *Aedes aegypti* is such a good vector. In: Gubler, Duane J., Ooi, Eng Eong, Vasudevan, Subash, and Farrar, Jeremy, (eds.) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.* CABI, Oxfordshire, UK, 2014; pp. 455-480.

Rodríguez Mde L, Rodríguez DR, Blitvich BJ, López MA, Fernández-Salas I, Jimenez JR, Farfán-Ale JA, Tamez RC, Longoria CM, Aguilar MI, Rivas-Estilla AM. Serologic surveillance for West Nile virus and other flaviviruses in febrile patients, encephalitic patients, and asymptomatic blood donors in northern Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010 Mar;10(2):151-7.

Rudnick, A., and Lim, T. W. (1986). Dengue fever studies in Malaysia. *Inst. Med. Res. Malays. Bull.* 23:51–152.

Ruiz, D., Vázquez, S., Villegas, E., Balmaseda, A., Pupo, M., Alvarez, M., Rosario, D., Bendezu, H., Calzada, N. and Guzman, M.G. (2017) Virological and Serological Markers in Dengue Patients from Venezuela and Nicaragua. *Open Access Library Journal*, 4: e3309.

Salas-Benito JS, De Nova-Ocampo M. Viral Interference and Persistence in Mosquito-Borne Flaviviruses. *J Immunol Res.* 2015; 2015:873404.

Scott LJ. Tetravalent Dengue Vaccine: A Review in the Prevention of Dengue Disease. *Drugs.* 2016 Sep;76(13):1301-1312.

Schwameis M, Buchtele N, Wadowski PP, Schoergenhofer C, Jilma B. Chikungunya vaccines in development. *Hum Vaccin Immunother.* 2016 Mar 3;12(3):716-31.

Simonin Y, van Riel D, Van de Perre P, Rockx B, Salinas S. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Sep 21;11(9):e0005821.

SMITH CE. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *J Trop Med Hyg.* 1956 Oct;59(10):243-51.

Soghaier MA, Himatt S, Osman KE, Okoued SI, Seidahmed OE, Beatty ME, Elmusharaf K, Khogali J, Shingrai NH, Elmangory MM. Cross-sectional community-based study of the socio-demographic factors associated with the prevalence of dengue in the eastern part of Sudan in 2011. *BMC Public Health.* 2015 Jun 18;15:558.

Secretaria de Salud (SS). 2018a. Boletín Epidemiológico. (<https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>).

Secretaria de Salud (SS). 2018b. Casos de Zika.
(https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/322273/Cuadro_Casos_ZIKA_y_Emb_SE16_2018.pdf)

Steel JJ, Franz AW, Sanchez-Vargas I, Olson KE, Geiss BJ. Subgenomic reporter RNA system for detection of alphavirus infection in mosquitoes. *PLoS One*. 2013 Dec 19;8(12):e84930.

Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Jaconi S, Mele F, Foglierini M, Pedotti M, Simonelli L, Dowall S, Atkinson B, Percivalle E, Simmons CP, Varani L, Blum J, Baldanti F, Cameroni E, Hewson R, Harris E, Lanzavecchia A, Sallusto F, Corti D. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016 Aug 19;353(6301):823-6.

Tharmarajah K, Mahalingam S, Zaid A. Chikungunya: vaccines and therapeutics. *F1000Res*. 2017 Dec 8;6:2114.

Thavara U, Tawatsin A, Pengsakul T, Bhakdeenuan P, Chanama S, Anantapreecha S, Molito C, Chompoonsri J, Thammapalo S, Sawanpanyalert P, Siriyasatien P. Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2009 Sep;40(5):951-62.

Tuekprakhon A, Nakayama EE, Bartholomeeusen K, Puiprom O, Sasaki T, Huits R, Luplertlop N, Kosoltanapiwat N, Maneekan P, Ariën KK, Shioda T, Leungwutiwong P. Variation at position 350 in the Chikungunya virus 6K-E1 protein determines the sensitivity of detection in a rapid E1-antigen test. *Sci Rep*. 2018 Jan 18;8(1):1094.

van der Schaar HM, Wilschut JC, Smit JM. Role of antibodies in controlling dengue virus infection. *Immunobiology*. 2009;214(7):613-29.

van Genderen FT, Krishnadath I, Sno R, Grunberg MG, Zijlmans W, Adhin MR. First Chikungunya Outbreak in Suriname; Clinical and Epidemiological Features. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Apr 15;10(4):e0004625.

Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Jun 13;9(7):532-41.

Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res*. 2008; 72:1-76.

Villar LA, Rojas DP, Besada-Lombana S, Sarti E. Epidemiological trends of dengue disease in Colombia (2000-2011): a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Mar 19;9(3):e0003499.

Waggoner JJ, Balmaseda A, Gresh L, Sahoo MK, Montoya M, Wang C, Abeynayake J, Kuan G, Pinsky BA, Harris E. Homotypic Dengue Virus Reinfections in Nicaraguan Children. *J Infect Dis*. 2016 Oct 1;214(7):986-93.

Weaver SC. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jun 26;8(6):e2921.

Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu Rev Med*. 2018 Jan 29; 69:395-408.

Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, Shi PY, Vasilakis N. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res*. 2016 Jun; 130:69-80.

Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res.* 2015 Aug; 120:32-9. (a)

Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya Virus Infections. *N Engl J Med.* 2015 Jul 2;373(1):94-5. (b)

Weaver SC, Osorio JE, Livengood JA, Chen R, Stinchcomb DT. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2012 Sep;11(9):1087-101.

Wikan N, Sakoonwatanyoo P, Ubol S, Yoksan S, Smith DR. Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage. *PLoS One.* 2012;7(1):e31102.

CAPÍTULO II

Capítulo II

Vigilancia para flavivirus cerca de la frontera México-EUA: co-circulación de los serotipos 1, 2 y 3 de dengue y virus del Oeste del Nilo en Tamaulipas, norte de México

S. Viridiana Laredo-Tiscareño^{1,2,3}, Javier A. Garza-Hernandez⁴, Ma Isabel Salazar⁵, Erick J. De Luna-Santillana⁶, Chandra S. Tangudu³, Rosa C. Cetina-Trejo², Gloria L. Doria-Cobos⁷, Santos Daniel Carmona-Aguirre⁸, Julian E. Garcia-Rejon², Carlos Machain-Williams², Bradley J. Blitvich^{3*}, Mario Alberto Rodríguez Pérez¹

¹Laboratorio de Biomedicina Molecular, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México; ²Laboratorio de Arbovirología, Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México; ³Department of Veterinary Microbiology and Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa, USA; ⁴Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chihuahua, México; ⁵Laboratorio de Virología e Inmunovirología, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México; ⁶Laboratorio Medicina de Conservación, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México; ⁷Departamento de Epidemiología de la Cuarta Jurisdicción Sanitaria, Secretaría de Salud, Reynosa, Tamaulipas, México; ⁸Secretaría de Salud del Estado de Tamaulipas, Dirección de Epidemiología, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México

The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Aceptado; AJTMH-18-0426

Resumen

Se realizó una investigación clínica, serológica y molecular para determinar la presencia del virus del dengue (VDEN) y otros flavivirus entre residentes de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas. Este fue un estudio de cohorte que consistió en la toma de muestra de sangre de 2355 pacientes con sospecha de infección por dengue y 346 individuos más que fueron asintomáticos. El muestreo se realizó durante una investigación epidemiológica de campo para identificar seroconversiones de flavivirus. Los sueros fueron colectados de pacientes con sospecha de infección por dengue durante la fase aguda de la enfermedad y de individuos asintomáticos reclutados cada 5 a 7 meses durante 19 meses. Los sueros de pacientes sospechosos de dengue se analizaron para la detección del antígeno de VDEN mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) y los sueros antígeno-positivos seleccionados fueron probados por la reacción de transcripción inversa y en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR), específico para el serotipo de VDEN. Los sueros de los individuos asintomáticos se analizaron para la detección de anticuerpos reactivos a flavivirus mediante Inmunoglobulina IgM e IgG usando antígeno de VDEN. De un total de 418 pacientes con sospecha de dengue 81 resultaron positivos (17.7%) a infección por VDEN. El serotipo más frecuente detectado fue VDEN-1 (61 pacientes), seguido por VDEN-2 (16 pacientes) y VDEN-3 (5 pacientes). En el caso de los asintomáticos, un total de 217 (62.7%) individuos presentaron anticuerpos reactivos a flavivirus y nueve individuos sin contacto previo con flavivirus se seroconvirtieron. Los sueros de un subconjunto de pacientes de dengue y participantes en el estudio de campo, incluidos todos aquellos que se seroconvirtieron, se analizaron por la prueba de neutralización de la reducción en placa usando flavivirus seleccionados. El resultado de esta prueba fue la detección de anticuerpos a VDEN-1, VDEN-2, y virus del Oeste del Nilo. En conclusión, proporcionamos evidencia de la co-circulación de múltiples flavivirus en Reynosa, Tamaulipas, en la frontera México-Estados Unidos.

Palabras clave: flavivirus, dengue, Virus del Oeste del Nilo, México, vigilancia

Abstract

A clinical, serological, and molecular investigation was performed to determine the presence of dengue virus (DENV) and other flaviviruses among residents of the city of Reynosa, Tamaulipas on the Mexico-U.S. border. The study cohort consisted of 2355 patients with suspected dengue, in addition to 346 asymptomatic individuals recruited during a household-based epidemiological investigation designed to identify flavivirus seroconversions. Sera were collected from patients with suspected dengue in the acute phase of illness and from asymptomatic individuals at enrolment and every 5 to 7 months for 19 months. Sera from suspected dengue patients were tested for DENV antigen by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and select antigen-positive sera were further tested using a DENV serotype-specific, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Sera from asymptomatic individuals were tested for flavivirus-reactive antibodies by immunoglobulin (Ig) M and IgG ELISAs using DENV antigen. A total of 418 (17.7%) patients with suspected dengue had laboratory-confirmed DENV infections, including 82 patients positive for DENV RNA. The most frequently detected serotype was DENV-1 (61 patients), followed by DENV-2 (16 patients) and DENV-3 (5 patients). A total of 217 (62.7%) asymptomatic individuals contained flavivirus-reactive antibodies at enrolment, and nine flavivirus-naïve individuals seroconverted. Sera from a subset of dengue patients and household participants, including all those who seroconverted, were further tested by plaque reduction neutralization test using selected flaviviruses, resulting in the detection of antibodies to DENV-1, DENV-2, and West Nile virus. In summary, we provide evidence for the co-circulation of multiple flaviviruses in Reynosa, Tamaulipas on the Mexico-U.S. border.

Keywords: flavivirus, dengue, West Nile virus, Mexico, surveillance

2.1 Introducción

El virus del dengue (VDEN) es un virus transmitido por mosquitos del género *Aedes*. Este virus pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. El VDEN tiene cuatro serotipos (VDEN-1 a VDEN-4) y es hiper-endémico en los trópicos y subtrópicos (Brathwaite *et al.*, 2012; Guzman *et al.*, 2016; Murray *et al.*, 2013). El VDEN es el virus transmitido por artrópodos (arbovirus) más importante en términos de impacto global en la salud humana, con más de la mitad de la población mundial que vive en áreas donde existe el riesgo de infección. Se estima que 390 millones infecciones nuevas por VDEN ocurren en todo el mundo cada año, de las cuales 96 millones infecciones producen manifestaciones clínicas (Bhatt *et al.*, 2013). En México, se estima que se producen 139,000 episodios clínicos anualmente (Undurraga *et al.*, 2015).

El VDEN es el agente etiológico de la enfermedad llamada dengue. La Organización Mundial de la salud (OMS) previamente clasificó el dengue en tres categorías de enfermedades: Fiebre por Dengue (FD), Fiebre por Dengue Hemorrágico (FHD) y síndrome del shock por dengue (OMS, 1997). FD es una enfermedad febril no diferenciada, a menudo acompañada de dolor de cabeza, dolor retro-orbital, mialgia, artralgia, erupción, y náusea. La FHD se caracteriza por manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia y hemoconcentración u otra evidencia de fuga vascular, y puede progresar al shock (SSD) y la muerte. El FHD se divide en grados (designados como FHD grados I al IV) basados en la gravedad de la enfermedad. Una limitante de esta clasificación es que no siempre permite la identificación fiable de casos graves por dengue (Balmaseda *et al.*, 2005; Phuong *et al.*, 2004). Para hacer frente a esta preocupación, la OMS revisó los lineamientos para el diagnóstico de dengue en 2009, y ahora los casos son clasificados como dengue sin signos de alarma (DSSA), dengue con signos de alarma (DCSA) y dengue grave (DG) (OMS, 2009). Los DSSA se presentan como una enfermedad febril aguda con al menos dos de los siguientes: náusea/vómito, erupción cutánea, dolores y dolores, leucopenia y una prueba positiva del torniquete. Para cumplir los criterios de DCSA, se debe observar al menos un signo de alarma, con signos de alarmas definidos como dolor abdominal, vómito persistente, acumulación de líquido, sangrado mucoso, letargo, hepatomegalia y aumento del hematocrito con trombocitopenia. El DG se asocia con fugas

graves de plasma, sangrado grave o insuficiencia de órganos. En México, la Secretaría de Salud (SS) incorporó los lineamientos más recientes en su programa nacional de vigilancia del dengue en 2016.

Otros flavivirus transmitidos por mosquitos que actualmente tiene ciclos activos en México son el virus del Oeste del Nilo (VON), el virus de la encefalitis de San Louis (ESLV) y el virus del Zika (VZIK); todos producen presentaciones clínicas que se maquillan sustancialmente con las del dengue. Las infecciones por el VON pueden presentarse como fiebre del Oeste Nilo (WNF), una enfermedad febril pobre, pero acompañada de una variedad de síntomas como dolor de cabeza, mialgias, náuseas, fatiga, debilidad y vómitos (Blitvich *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 2013). La infección por VON puede también ocasionar una enfermedad neuroinvasiva que se manifiesta como encefalitis, meningitis o parálisis flácida aguda. Por otro lado, las infecciones clínicas por ESLV usualmente se caracterizan por una fiebre y varios síntomas no específicos; algunos casos graves progresan a meningitis y encefalitis (Reisen, 2003; Oyer *et al.*, 2014). En el caso del VZIK, los síntomas más comúnmente asociados con la infección son la fiebre, la erupción macular o papular, artritis y la artralgia, sin embargo, manifestaciones más graves pueden ocurrir como es la microcefalia y el síndrome de Guillain-Barré (Petersen *et al.*, 2016; Weaver *et al.*, 2016).

Ahora bien, en este estudio, realizamos una investigación clínica, serológica y molecular para ampliar el conocimiento y el impacto del dengue y otros flavivirus en la salud pública de Reynosa, Tamaulipas.

2.2 Métodos

Área de estudio

Este estudio se realizó en la ciudad Reynosa, una ciudad en el estado de Tamaulipas, al norte de México en la frontera México-Estados Unidos (Figura 1). Reynosa tiene una población estimada de 650,000 habitantes y está ubicada en el área metropolitana binacional de Reynosa-McAllen, junto con McAllen, una ciudad en el Condado de Hidalgo, Texas. McAllen tiene una población estimada de 14,000 habitantes y el Condado de Hidalgo tiene una población estimada de 861,000. El clima en Reynosa es semi-árido y la temperatura media anual y la precipitación son 23.2 °C y 532 mm³, respectivamente.

Colecta del material biológico.

Los sueros fueron colectados durante la fase aguda de la enfermedad. Cada donante brindó su información socio-económica, historial de viaje e historial clínico. Además, antes de cada toma de muestra, a cada paciente se le otorgó una carta de consentimiento informado. Los sueros fueron etiquetados y mantenidos a -86°C hasta su procesamiento.

Población seleccionada para la investigación clínica.

La población seleccionada para esta investigación consistió en pacientes que se presentaron en enero del 2014 a diciembre del 2016 en hospitales y clínicas de la SS en Reynosa por síntomas similares a los del dengue. Los pacientes elegidos del 2014 a 2016 tuvieron que cumplir los criterios clínicos establecidos por la OMS en 1997 y 2009 (OMS, 1997; OMS 2009).

Población muestreada para el estudio de seroconversión.

La población de donantes de sangre consistió en el registro de individuos durante la investigación de campo diseñada para la detección de evidencia de exposición por flavivirus y seroconversiones. Los individuos con síntomas parecidos a los de una infección por flavivirus no fueron excluidos intencionalmente del estudio, pero todos los participantes fueron asintomáticos a la hora del muestreo. El estudio se realizó en la colonia Nuevo Amanecer en Reynosa (Figura 1). Cada casa fue visitada en cuatro ocasiones: marzo 2014, octubre 2014, abril o mayo 2015, y octubre 2015. Los sueros de los participantes del estudio se colectaron en cada visita, a menos que no estuvieran en casa o se negaran a participar. La colección de sueros fue llevada a cabo por enfermeras de la cuarta Jurisdicción de epidemiología de SS de la ciudad de Reynosa.

El consentimiento por escrito para concurrir se obtuvo de cada participante después de una explicación completa del estudio. Si la persona tenía menos de 18 años de edad, el consentimiento por escrito se obtuvo de un padre o tutor legal. En el caso de las personas de 8 a 18 años de edad fue necesario solicitar su aprobación. Los adultos que se negaron a firmar el formulario de consentimiento y los niños que no estaban conformes no fueron incluidos en el estudio. Los niños menores de 2 años de edad fueron ilegibles para su inclusión. Se pidió a una persona de cada hogar que completara un cuestionario para obtener información demográfica y otra información pertinente (por ejemplo, disponibilidad de aire acondicionado). Los datos fueron tratados de forma confidencial y anónima. Todos los protocolos de investigación fueron aprobados por las juntas de revisión institucional en las universidades participantes.

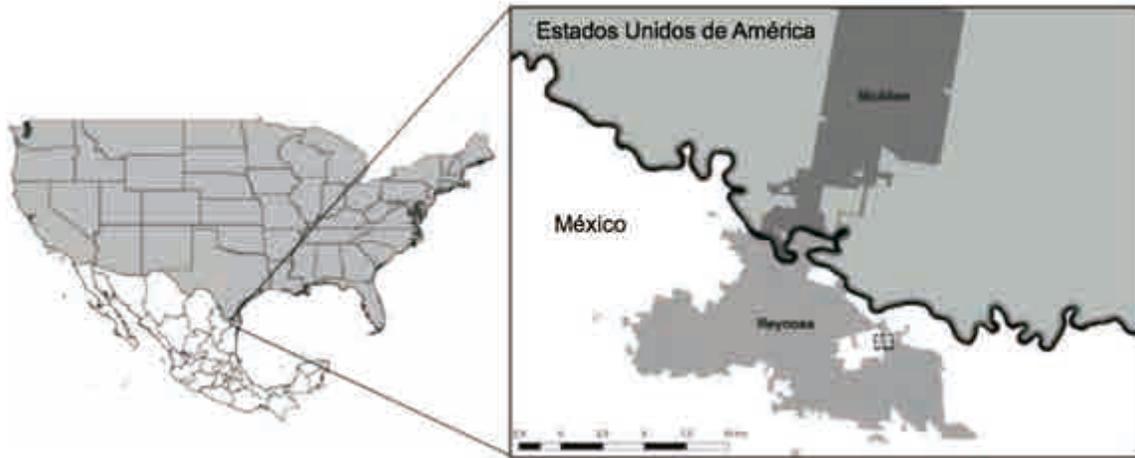


Figura 1. Localización geográfica del área metropolitana Reynosa-McAllen. El rectángulo punteado indicada la colonia Nuevo Amanecer

Ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

Los sueros de todos los pacientes con sospecha de dengue fueron analizados para la detección de la proteína no estructural 1 (NS1) de VDEN por medio de ELISA mediante el kit comercial Panbio Dengue Early ELISA (Inverness Medical Innovations Ltd., Australia) o Platelia™ Dengue NS1 Antigen ELISA. Para el caso del kit Panbio Dengue Early ELISA, los valores de índice se calcularon siguiendo las instrucciones del fabricante, donde los índices tuvieron un rango de valores de < 0.9 , entre 0.9 y 1.1 , y > 1.1 para los casos negativos, equívocos y positivos, respectivamente. Para el caso del kit Platelia™ Dengue NS1 Antigen ELISA, también se calcularon los índices de muestreo siguiendo el protocolo establecido, con índices de < 0.5 , entre 0.5 y 1.0 , y > 1.0 para los casos negativos, equívocos y positivos, respectivamente. Un paciente se consideró positivo a la infección por VDEN cuando la proteína NS1 de VDEN fue detectada.

Ahora bien, todos los sueros también fueron analizados para la detección específica de las inmunoglobulinas IgM e IgG dirigidas contra flavivirus usando ELISA de captura de VDEN Detect™ IgM (InBios Internacional Inc., Seattle, WA, USA) y VDEN Detect™ IgG ELISA (InBios internacional Inc.), respectivamente. Para ambos ensayos, el índice del estado inmune (ISR) se calculó siguiendo las instrucciones del fabricante y los resultados negativo, equívoco y positivo se definió como aquellos que generaron valores ISR de < 1.65 , > 1.65 y < 2.84 , y > 2.84 , respectivamente.

Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa cuantitativa

Se seleccionó aleatoriamente un grupo de los sueros positivos a la proteína NS1 de VDEN y se dividieron en alícuotas. Una alícuota de cada suero positivo se envió al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia epidemiológica (INDRE) en la Ciudad de México para detección de ácidos nucleicos de VDEN. Este protocolo consistió primeramente en extraer el RNA usando el kit viral de ARN QIAamp (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Después se realizó una reacción de transcripción inversa y en cadena de la polimerasa, cuantitativa múltiple (qRT-PCR) diseñada para detectar y diferenciar entre los cuatro serotipos del VDEN. Se utilizaron los cebadores descritos en el Cuadro 1. El protocolo que se utilizó fue el ensayo por la SS para el diagnóstico de dengue (SS, 2015). Las muestras que produjeron en el ciclo de cuantificación (Cq) valores de ≤ 35 y ≥ 39 se consideraron positivas y negativas, respectivamente. Las muestras que produjeron valores de $Cq > 35$ pero < 39 se repitieron por duplicado y si se volvió a obtener el mismo resultado, la muestra se consideró positiva a VDEN 1, 2, 3 o 4.

Cuadro 1. Cebadores empleados para la detección de los serotipos de VDEN en la investigación clínica

Cebador	Secuencia (5'-3')
mFU1	TACAACATGATGGAAAGCGAGAGAAAA
CFD2	GTGTCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC
sonda DEN-1	FAM-TCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGG-BHQ1
sonda DEN-2	Texas Red-AAGAGACGTGAGCAGGAAGGAAGGGGGAGC-BHQ2
sonda DEN-3	Cy5-TGAGAGATATTTCCAAGATACCCGGAGGAG-BHQ3
sonda DEN-4	HEX-TGGAGGAGATAGACAAGAAGGATGGAGACC-BHQ1

Prueba de neutralización de la reducción en placa

Los sueros fueron analizados por la prueba de neutralización de la reducción de placa (PRNT) siguiendo los protocolos estándar Beaty *et al.*, (1995). Las PRNTs se realizaron utilizando VDEN-1 (cepa Hawaii), VDEN-2 (cepa NGC), VDEN-3 (cepa H-87), VDEN-4 (cepa 241), ESLV (cepa TBH-28), VON (cepa NY99-35261-11) y VZIK (cepa PRVABC59). Los virus fueron obtenidos de la Organización Mundial de la Salud en colaboración con el Centro de Referencia e Investigación de Arbovirus sustentado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, División de Enfermedades Infecciosas Transmitidos por Vectores (Fort, Collins, CO). Las PRNTs se realizaron en placas de seis pozos usando células de riñón de mono verde africano (Vero), se depositó 2.5×10^5 células en cada pozo. A continuación, las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagles minimal essential medium por sus siglas en inglés), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina a 37 °C con 5% de CO₂. Este medio permite el crecimiento celular *in vitro* proporcionando los nutrientes esenciales requeridos por la célula.

Los sueros fueron llevados en presencia de factor de suero lábil al 8% (Chappell *et al.*, 1997). Se comenzó con una dilución de 1:40 y los títulos fueron expresados como el recíproco de las diluciones del suero que produjeron $\geq 90\%$ de la reducción en el número de placas (PRNT₉₀). Para los diagnósticos etiológicos, el título de anticuerpos de PRNT₉₀ hacia el virus respectivo requirió ser al menos cuatro veces mayor al de los otros flavivirus probados. Si los títulos de PRNT₉₀ para dos o más virus fue ≥ 1280 , se consideró que el individuo tenía una infección secundaria por flavivirus.

2.3 Resultados

Población seleccionada para la investigación clínica.

Un total de 2355 residentes de Reynosa presentaron sospecha de dengue en 2014 a 2016 (Cuadro 2). La proteína NS1 de VDEN fue detectada por ELISA en sueros de 418

(17.7%) pacientes. La mayoría de los pacientes que fueron confirmados por una infección por dengue se presentaron en 2014 (218 casos), seguidos en 2015 y 2016 (134 y 66 casos, respectivamente). Hubo 309 casos confirmados por FD (183 casos en 2014 y 126 casos en 2015) y 43 casos confirmados por FHD (35 casos en 2014 y 8 casos en 2015). No hubo casos sospechosos o confirmados de SSD.

En 2016, las clasificaciones más recientes de dengue fueron adoptadas por las SS, hubo 63 casos confirmados de DSSA y 3 casos confirmados de DCSA. No hubo casos confirmados de DG. Trece pacientes (dos, nueve y dos pacientes de 2014, 2015 y 2016, respectivamente) mostraron resultados equívocos o indeterminados en la ELISA. Treinta y cinco pacientes fueron hospitalizados, incluyendo 18 pacientes de dengue confirmados. Los pacientes hospitalizados con dengue confirmado presentados en 2014 (17 pacientes) y 2015 (un paciente), todos sobrevivieron.

Cuadro 2. Número de casos sospechosos y confirmados por dengue en Reynosa, Tamaulipas, 2014 a 2016

Clasificación de la enfermedad						
Año	FD	FHD	DSSA	DCSA	DG	Total
ªNúmero (%) de casos confirmados/sospechoso						
2014	187/703 (26.0)	35/58 (60.3)	n/a	n/a	n/a	218/761 (28.6)
2015	126/1064 (11.8)	8/26 (30.8)	n/a	n/a	n/a	134/1090 (12.3)
2016	n/a	n/a	63/491 (12.8)	3/6 (50.0)	0/7 (0.0)	66/504 (13.1)
Total	309/1767 (17.5)	43/84 (51.2)	63/491 (12.8)	3/6 (50.0)	0/7 (0.0)	418/2355 (17.7)

FD, fiebre por dengue; FHD, fiebre hemorrágica por dengue; DSSA; dengue sin signos de alarma; DCSA; Dengue con signos de alarma; DG; dengue grave; n/a no aplicable

ªTrece pacientes con sospecha de dengue (dos, nueve, y dos pacientes de 2014, 2015, y 2016, respectivamente) presentaron resultados equívocos. Otros 657 pacientes con dengue sospechoso (96, 37, y 524 pacientes de 2014, 2015, y 2016 respectivamente) se excluyeron de la población muestreada porque el suero agudo no fue colectado y/o no se realizó una prueba diagnóstica.

El estudio de población consistió en 1005 (42.7%) varones y 1350 (57.3%) mujeres. Hubo 174 varones (41.6%) y 244 mujeres (58.4%) con dengue confirmado. La edad promedio de los pacientes en la población de estudio fue de 26.1 años. Las edades promedio de los pacientes con y sin dengue confirmado fueron de 27.8 y 25.7 años, respectivamente. Los casos confirmados por dengue se presentaron en pacientes de todas las categorías de edad, los pacientes con el mayor número de casos fueron entre 10-14 y 15-19 años de edad (Figura 2A). Los casos confirmados de FD y DSSA también ocurrieron en pacientes de todas las categorías de edad y FHD ocurrió en pacientes de las categorías de mayor edad (Figura 2B). Los tres casos de DCSA ocurrieron en pacientes de 40-44 años. La mayoría de los pacientes con dengue confirmado se presentaron en las semanas epidemiológicas (SEs) 38 a 48, y el auge de los casos ocurrieron en la SE 45 (Figura 3A). Se observaron hallazgos similares en pacientes de dengue no confirmados por laboratorio. Los casos confirmados de FD, FHD, DSSA y DCSA también alcanzaron su pico máximo a finales del año (Figura 3B).

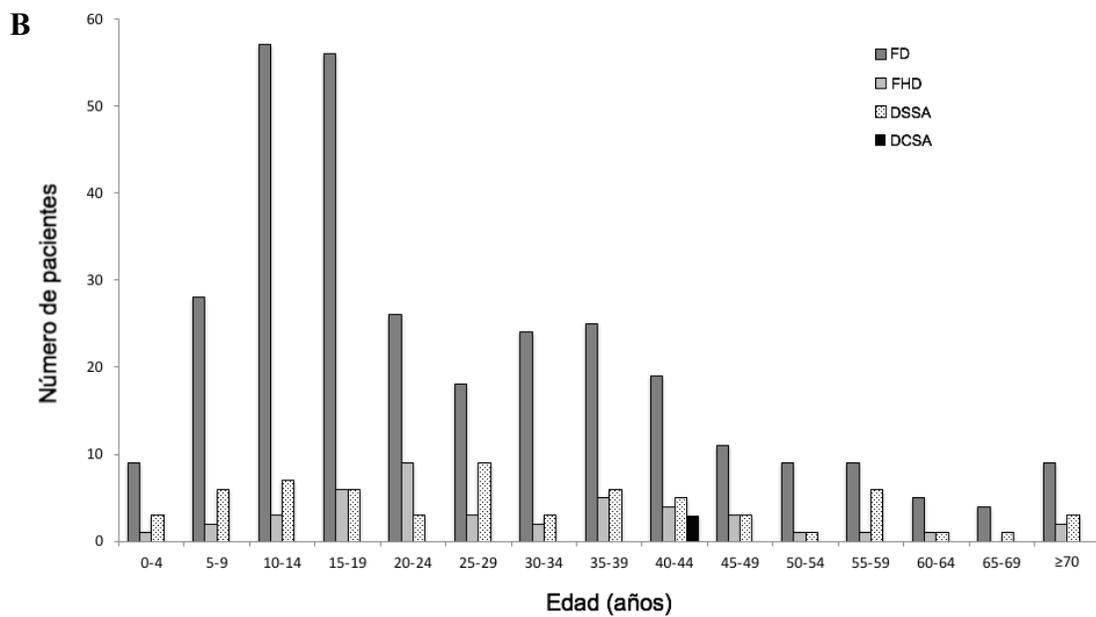
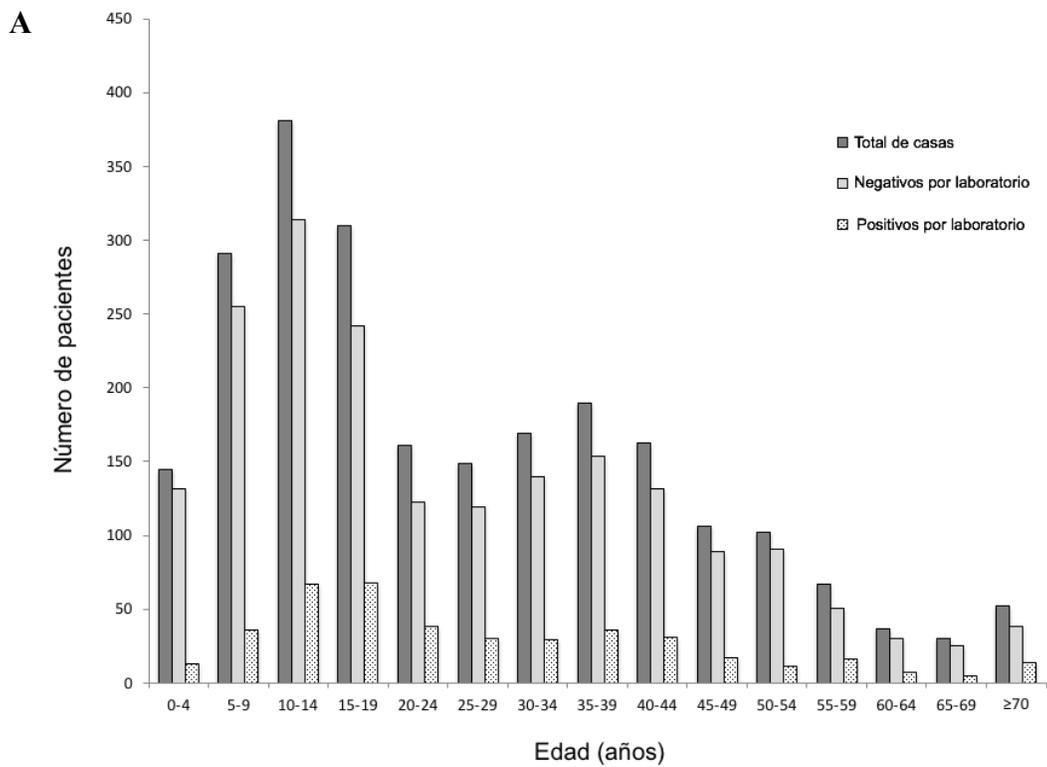
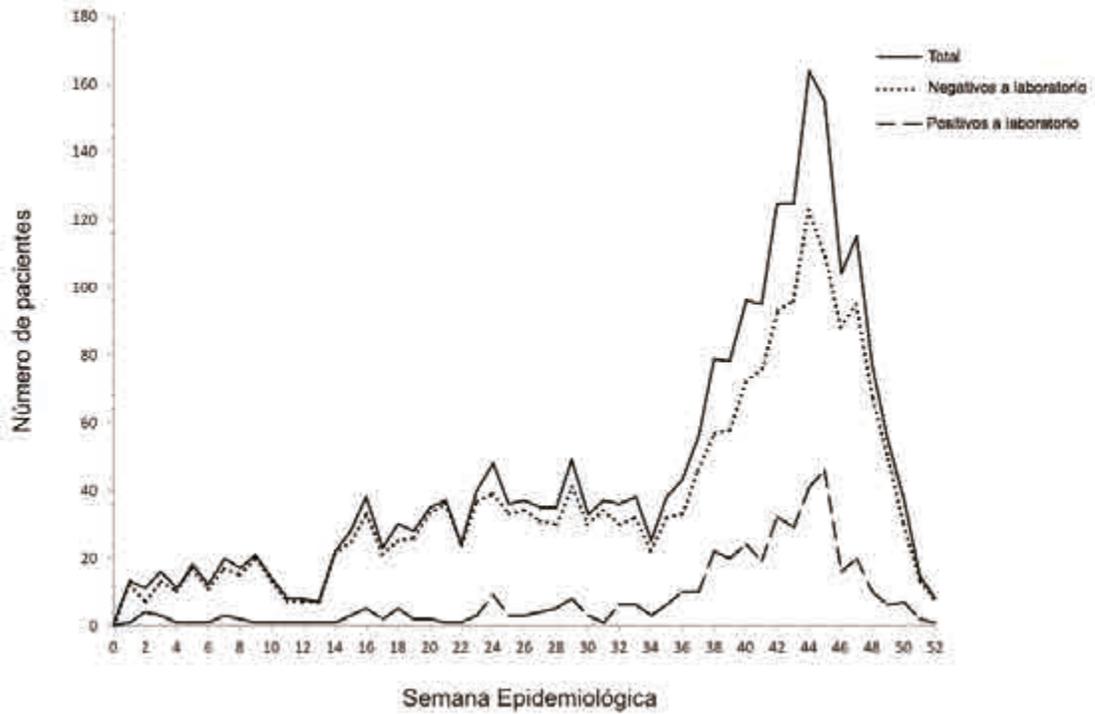


Figura 2. Características de la edad de los pacientes en la investigación clínica basada en hospitales. A) Número de pacientes con sospecha de dengue, con o sin dengue confirmado por laboratorio de acuerdo a la edad. B) Número de pacientes con dengue confirmado, fiebre hemorrágica por dengue, dengue sin signos de alarma, y dengue con signos de alarma de acuerdo a la edad.

A



B

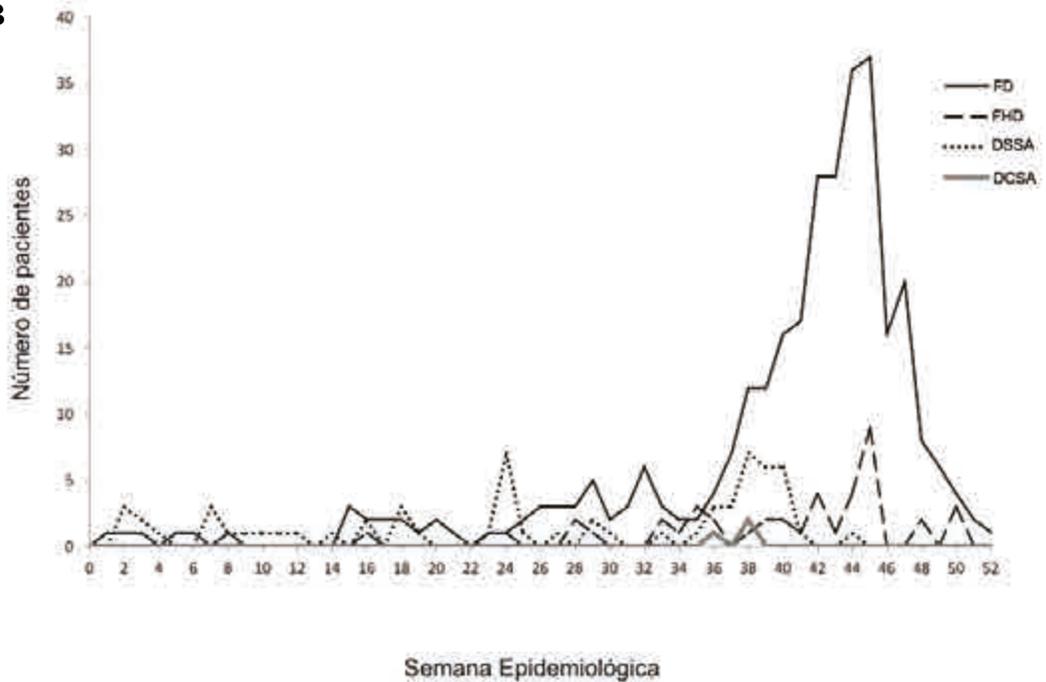


Figura 3. Incidencia semanal de dengue en Reynosa, Tamaulipas en 2014 a 2016. A) Número de pacientes sospechosos de dengue y con o sin confirmación de dengue por laboratorio de acuerdo a la semana epidemiológica. B) Número de pacientes confirmados por dengue, fiebre hemorrágica por dengue, dengue sin signos de alarma y dengue con signos de alarma de acuerdo a la semana epidemiológica.

Los sueros de 85 pacientes confirmados por dengue fueron analizados por qRT-PCR sero-específico. El RNA viral se detectó en 82 pacientes (Cuadro 3). El serotipo más comúnmente detectado fue VDEN-1 (n = 61), seguido por VDEN-2 (n = 16) y VDEN-3 (n = 5). El RNA de VDEN-4 no fue identificado en ningún paciente. El serotipo más común en 2014 fue VDEN-1 (55 de 59 pacientes). El serotipo más común en 2015 y 2016 fue VDEN-2 (11 de 14 y 4 de 6 pacientes, respectivamente). El RNA de VDEN-1 no fue detectado en ningún paciente en 2016. Los historiales de viaje fueron proporcionados por 15 pacientes positivos a VDEN-2, 11 de 12 pacientes de 2015 y 2 de 3 pacientes de 2016 mencionaron que nunca habían salido de Tamaulipas. Los historiales de viaje también fueron proporcionados por 7 pacientes RNA positivos a VDEN-3, con 3 pacientes de 2014, 1 de 2 pacientes de 2015 y ambos pacientes de 2016 mencionaron que nunca habían salido de su estado de residencia.

Población muestreada para el estudio de seroconversión.

Se realizó una investigación sero-epidemiológica longitudinal de campo para estimar la seroprevalencia de flavivirus e identificar las seroconversiones ocasionadas por flavivirus entre los residentes de la colonia Nuevo Amanecer. La población muestreada consistió en 346 participantes de 114 casas. También se visitaron otras seis casas, pero los residentes se negaron a participar. Cada casa participante fue visitada en cuatro ocasiones: marzo 2014, octubre 2014, abril-mayo 2015, y octubre 2015. El número promedio de participantes en el estudio en cada casa fue de 3.0, con un rango de 1 a 10, y ninguno tuvo síntomas consistentes de infección por flavivirus en el registro. La edad promedio de los participantes del estudio fue de 33.7 años (rango: 3 a 95 años). Hubo 143 varones y 203 mujeres. Los sueros fueron colectados de 119 participantes en las cuatro ocasiones y de 61, 71 y 96 participantes en tres, dos o una ocasión, respectivamente. El aire acondicionado fue disponible en 24 (21.1%) hogares.

Cuadro 3. Detección del RNA del virus del dengue en suero en fase aguda en pacientes de dengue en Reynosa, Tamaulipas, 2014 a 2016

Año	Clasificación de la enfermedad	Número total de pacientes	Número de pacientes positivos/analizados por qRT-PCR	Serotipo			
				V DEN-1	V DEN-2	V DEN-3	V DEN-4
				Número de pacientes positivos por of qRT-PCR			
2014	FD	183	53/53	51	-	2	-
	FHD	35	6/6	4	1	1	-
2015	FD	126	14/17	6	8	-	-
	FHD	8	3/3	-	3	-	-
2016	DSSA	63	6/6	-	4	2	-
	DCSA	3	-	-	-	-	-
	DG	-	-	-	-	-	-
Total		418	82/85	61	16	5	-

qRT-PCR, reacción de transcripción inversa y en cadena de la polimerasa cuantitativa; VDEN, virus del dengue; FD, fiebre por dengue; FHD; fiebre hemorrágica por dengue; DSSA, Dengue sin signos de alarma; DCSA, dengue con signos de alarma; DG, dengue grave.

Todos los sueros fueron analizados por ELISA IgG contra flavivirus y los sueros colectados en el registro también fueron analizados para la detección de IgM contra flavivirus. Un total de 217 (62.7%) participantes registrados en el estudio fueron positivos para flavivirus por IgG, incluyendo cuatro participantes que también fueron positivos a IgM y 10 participantes con resultados equívocos o ambiguos para IgM (Cuadro 4). Del resto, 119 (34.4%) participantes fueron negativos para flavivirus tanto para IgM como para IgG, y 10 (2.9%) participantes resultaron equívocos o ambiguos para IgG en el estudio basal. La probabilidad de seroprevalencia incrementó significativamente con la edad, las edades promedio (\pm desviación estándar) calculadas de los participantes positivos y negativos para flavivirus a IgG fue 39.9 (\pm 18.9) y 21.6 (\pm 15.6) años, respectivamente (t-test, $p < 0.0002$). Los índices masculinos y femeninos de los participantes registrados con y sin IgG positivos a flavivirus fueron similares (0.71 y 0.68, respectivamente).

Cuadro 4. Número (%) de participantes en la investigación del estudio de campo con resultados basales de ELISA positivos, equívocos y negativos

Flavivirus IgG ELISA					
		Positivo	Equívoco	Negativo	Total
Número (%) de participantes en el estudio					
Flavivirus IgM ELISA	Positivo	4 (1.2)	0 (0)	0 (0)	4 (1.2)
	Equívoco	10 (2.9)	0 (0)	0 (0)	10 (2.9)
	Negativo	203 (58.7)	10 (2.9)	119 (34.4)	332 (96.0)
	Total	217 (62.7)	10 (2.9)	119 (34.4)	346 (100)

Nueve participantes sin contacto previo con flavivirus se seroconvirtieron durante el periodo de estudio (Cuadro 5). El anticuerpo IgG contra flavivirus fue detectado por primera vez en los sueros colectados en octubre de 2014 (tres participantes), abril o mayo de 2015 (dos participantes) y octubre de 2015 (cuatro participantes). La edad promedio de los participantes que se seroconvirtieron fue 23.7 años, con un rango de 8 a 50 años. Hubo cuatro varones y cinco mujeres. Siete participantes que se seroconvirtieron mencionaron nunca haber salido de Tamaulipas, mientras que los otros dos participantes (designados como MDRR y MLMM) habían recientemente viajado. MDRR había visitado a la familia en Veracruz, en el este de México, y MLMM viajó a Nuevo León, al norte de México durante el período de estudio.

Los sueros de los participantes del estudio que seroconvirtieron fueron analizados posteriormente por PRNT (Cuadro 5). De los siete participantes del estudio que nunca habían viajado, tres individuos fueron seropositivos a VON, un individuo fue seropositivo a VDEN-1, dos individuos fueron seropositivos indeterminados a flavivirus y un individuo no tuvo anticuerpos neutralizantes detectables. El individuo seropositivo a VDEN-1, una mujer de 31 años asignada como SACL, desarrolló síntomas similares a FD en abril de 2015, varios días previo a la colecta del primer suero IgG-positivo a flavivirus. Un individuo seropositivo a VON (mujer de 15 años), designada como IFCF, desarrolló los síntomas similares a WNF poco antes de la colecta de su suero IgG-positivo a flavivirus en octubre de 2015. MDRR y MLMM, los dos individuos que recientemente habían viajado fueron seropositivos para el VON y VDEN-1, respectivamente.

Los sueros de los cuatro participantes del estudio IgM e IgG positivos a flavivirus fueron analizados por PRNT (Cuadro 6). Dos participantes fueron seropositivos a VDEN-1, mientras que un participante tuvo anticuerpos dirigidos contra VDEN-2 y otro el otro participante fue indeterminado. Los dos participantes seropositivos a VDEN-1 y el participante con anticuerpos indeterminados a flavivirus, mencionaron nunca haber viajado fuera de Tamaulipas. Los sueros de cinco participantes del estudio con IgG positivo, pero no a IgM a flavivirus, fueron seleccionados aleatoriamente y también analizados por PRNT. Dos participantes tuvieron anticuerpos contra VDEN-2, mientras que un

participante tuvo anticuerpos contra VDEN-1, otro participante contra VON y un participante fue indeterminado. Los participantes seropositivos a VON y el participante indeterminado, además de uno de los participantes seropositivos a VDEN-2, mencionaron nunca habían viajado fuera de Tamaulipas.

Cuadro 5. Datos de los historiales de viaje, descubrimientos clínicos y serológicos de los pacientes que se seroconvirtieron

Participante	ªViaje	ªEnfermedad	Flavivirus IgG				Título de ¢PRNT ₉₀							Interpretación PRNT
			Fecha de la colecta del suero				VDEN-1	VDEN-2	VDEN-3	VDEN-4	ESLV	VON	VZIK	
			c3/2014	10/2014	4-5/2015	10/2015								
SACL	No	Sí	^e -	^f NT	^g +	+	80	^h --	--	--	--	--	--	VDEN-1
MBCO	No	No	-	+	+	+	80	80	--	--	--	--	--	Flavivirus
AMGO	No	No	-	+	NT	+	--	--	--	--	40	640	--	VON
MDRR	Sí	No	-	+	+	+	--	--	--	--	--	160	--	VON
MLMM	Sí	No	-	-	+	+	640	--	160	--	--	--	--	VDEN-1
MLLN	No	No	-	-	-	+	--	--	--	--	--	640	--	VON
YFVO	No	No	-	-	-	+	--	--	--	--	--	--	--	Negativo
IFCF	No	Sí	-	-	-	+	--	--	--	--	--	320	--	VON
FCLG	No	No	-	-	-	+	--	40	--	--	--	--	--	Flavivirus

^aDefinido como participantes del estudio que viajaron o nunca viajaron fuera de Tamaulipas; ^bSACL desarrollo síntomas característicos de FD en abril 2015 e IFCF desarrollo síntomas característicos de WNF en octubre 2015, diversos días antes a la colecta del primer suero positivo a IgG contra flavivirus; ^cSuero basales colectado (marzo 2014) también se analizaron para la detección de IgM contra flavivirus pero todos fueron negativos; ^dEn la mayoría de los PRNT se uso el suero colectado en octubre 2015; ^enegativo; ^fno analizado (participante del estudio no disponible en la colecta del suero); ^gpositivo; ^h<40

PRNT; prueba de neutralización por reducción en placa; VDEN-1, virus del dengue 1; VDEN-2, virus del dengue 2; VDEN-3, virus del dengue 3; VDEN-4, virus del dengue 4, ESLV; virus de la encefalitis de San Luis; VON; virus del Oeste del Nilo; VZIK, virus del Zika

Cuadro 6. Hallazgos serológicos de los participantes seleccionados en la investigación de campo, incluyendo a todos los IgM contra flavivirus basales

Participante	aViaje	Enfermedad	Datos basales de la ELISA		Título PRNT ₉₀							Interpretación PRNT
			IgM	IgG	VDEN-1	VDEN-2	VDEN-3	VDEN-4	ESLV	VON	VZIK	
BROO	No	No	^b +	+	≥1280	160	160	40	^c --	40	--	VDEN-1
GAPG	No	No	+	+	640	--	80	--	--	320	--	Flavivirus
MMPO	No	No	+	+	640	160	160	40	--	--	--	VDEN-1
ADTO	Yes	No	+	+	--	80	--	--	--	--	--	VDEN-2
GMJO	Yes	No	^d -	+	640	--	80	40	--	40	--	VDEN-1
CDPG	No	No	-	+	--	160	40	--	--	--	80	Flavivirus
MILO	No	No	-	+	160	≥1280	40	--	--	--	--	VDEN-2
CAZF	Yes	No	-	+	--	≥1280	80	--	40	320	--	VDEN-2
MTRO	No	No	-	+	160	160	160	40	80	1280	--	VON

^aDefinido como participantes del estudio que viajaron o nunca viajaron fuera de Tamaulipas; ^bpositivo; ^c<40; ^dnegativo

ELISA, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima; PRNT; prueba de neutralización por reducción en placa; VDEN-1, virus del dengue 1; VDEN-2, virus del dengue 2; VDEN-3, virus del dengue 3; VDEN-4, virus del dengue 4, ESLV; virus de la encefalitis de San Luis; VON; virus del Oeste del Nilo; VZIK, virus del Zika

2.4 Discusión

Proporcionamos evidencia de la transmisión autóctona de múltiples flavivirus en el norte de México. En la investigación de campo, se detectaron anticuerpos contra VDEN-1, VDEN-2 y VON en participantes del este estudio que nunca habían viajado fuera de Tamaulipas. La detección de anticuerpos de VDEN-1 en los participantes de este estudio que presentaron IgM positivo contra flavivirus y que nunca había salido de Tamaulipas sugiere que algunas infecciones VDEN-1 fueron recientes. La detección de anticuerpos contra VDEN-1 y VON en los participantes que seroconvirtieron y no viajaron recientemente, proporciona evidencia adicional de la reciente transmisión autóctona de los virus. El RNA de VDEN-1, VDEN-2, y VDEN-3 fue identificado en los pacientes con síntomas del dengue que se presentaron en los hospitales y las clínicas de la SS. Aunque la información de los historiales de viaje no fue proporcionada para la mayoría de los casos, varios pacientes RNA positivos a VDEN-2 y VDEN-3 nunca habían viajado. Varios casos locales de VDEN-2 y de VDEN-3 ocurrieron en 2015, el mismo año que las seroconversiones a VDEN-1 y VON fueron identificadas. Además, detectamos recientemente varios casos no foráneos adquiridos por el virus de Chikungunya (VCHIK; género *Alphavirus*, familia *Togaviridae*) en Tamaulipas en 2015 (Laredo-Tiscareño *et al.*, 2018). En conjunto, proporcionamos evidencia de la co-circulación de cinco arbovirus de importancia médica en una sola temporada en Tamaulipas, al norte de México.

Ochenta y dos pacientes presentaron RNA positivo a VDEN. La mayoría (74.4%) fue positiva a VDEN-1; el resto había sido infectado con VDEN-2 (19.5%) y VDEN-3 (6.1%). En este sentido, VDEN-1 fue el serotipo dominante en Nuevo León, en el norte de México en 2010 (Leduc-Galindo *et al.*, 2015). Sin embargo, nuestros datos deben ser interpretados con precaución si se utilizan para predecir la identidad del serotipo dominante en Tamaulipas. En primer lugar, los historiales de viaje no se obtuvieron para la mayoría de los pacientes y, por lo tanto, algunas infecciones pueden haber sido adquiridas en otro lugar. En segundo lugar, un mayor número de pacientes fue analizado para el RNA de VDEN en 2014 (n = 59) comparado a 2015 (n = 20) y 2016 (n = 6). Aunque la mayoría de los pacientes RNA positivos a VDEN habían sido infectados con VDEN-1, el serotipo más

frecuentemente detectado en 2015 y 2016 fue VDEN-2, y no hubo evidencia de VDEN-1 en 2016. Estos descubrimientos podrían indicar que se produjo el desplazamiento del serotipo. El fenómeno del desplazamiento de serotipo está bien documentado. Una revisión de los datos de vigilancia a nivel nacional de 2000 a 2011 reveló que el VDEN-2 fue el serotipo dominante en México en 2000 a 2005, seguido de VDEN-1 en 2006 a 2010, y ambos serotipos se detectaron en proporciones similares en 2011 (Dantes *et al.*, 2014). La mayoría de los aislamientos de VDEN-3 fueron en 2000 a 2007, y los aislamientos VDEN-4 fueron no frecuentes.

Se ha reportado la circulación simultánea de los cuatro serotipos VDEN en Tamaulipas. VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4 que fueron aislados de pacientes en Reynosa en 1995; el VDEN-1 fue aislado de pacientes en otro lugar de Tamaulipas en el mismo año (Rawlings *et al.*, 1996). La convergencia de la circulación de los cuatro serotipos también se ha presentado en Sudamérica y Asia. (Shrivastava *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2016; Endy *et al.*, 2002; Castonguay-Vanier *et al.*, 2018). Proporcionamos la evidencia de la co-circulación de tres serotipos. VDEN-4 no fue detectado, pero los datos de vigilancia a nivel nacional han mostrado que el VDEN-4 fue el serotipo menos común en México en 2000 a 2011 (Dantes *et al.*, 2014). Muchos otros estudios también reportaron la concurrente circulación de tres serotipos (Caron *et al.*, 2013; Ridde *et al.*, 2016; De Simone *et al.*, 2004; Humayoun *et al.*, 2010; Lorono-Pino *et al.*, 1999).

El máximo/pico de los casos de dengue se presentó en septiembre a noviembre. Otros estudios realizados en el norte de México reportan hallazgos similares. (Leduc-Galindo *et al.*, 2015; Rawlings *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2016; CDC, 2007). La temporada de dengue coincide con el auge de proliferación de mosquitos que dependen de las condiciones climáticas para la producción favorable de mosquitos. El cincuenta y ocho por ciento de los pacientes con dengue confirmado fueron mujeres. Otros estudios realizados en la frontera México-Estados Unidos también reportan la presencia de dengue un poco más en mujeres que en hombres, aunque es importante destacar que a menudo los casos sospechosos de dengue se presentan un poco más en mujeres que en hombres (Jones *et al.*, 2016; CDC, 2007; Brunkard *et al.*, 2007). En cuanto a esto, el 57% de todos los pacientes

muestreados en el estudio fueron mujeres. El auge de los casos de dengue se presentó durante la niñez; casi un tercio de los casos fueron de 10 a 19 años de edad, y los números más bajos ocurrieron en aquellos mayor a 50 años. Se ha reportado un patrón similar de distribución de los grupos de edad en otras partes de México. (Leduc-Galindo *et al.*, 2015; Lorono-Pino *et al.*, 2004; Gunther *et al.*, 2009). La mayoría de los pacientes con sospecha de dengue no presentaron infecciones por VDENV confirmadas por el laboratorio, como se observó en otros estudios de dengue realizados en México (Leduc-Galindo *et al.*, 2015; Lorono-Pino *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2010). En conjunto, las características epidemiológicas de dengue en Reynosa en 2014 a 2016 son similares a las reportadas en muchas otras investigaciones de dengue.

Reynosa se localiza en el área metropolitana binacional de Reynosa-McAllen, junto con McAllen, una ciudad en el Condado de Hidalgo, Texas. El número de casos de dengue reportados en nuestro estudio excede en gran medida al número de casos de dengue reportados en el Condado de Hidalgo en el mismo período de tiempo según datos publicados por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de EU. Dos casos de dengue (ambos importados) ocurrieron en el Condado de Hidalgo en 2014, sin casos de dengue reportados en 2015 y 2016 (CDC, 2018). Ocho casos de dengue (todos importados) ocurrieron en condados de Texas ubicados en la frontera de los Estados Unidos/México en 2014 a 2016 (CDC, 2018). Esto es un agudo contraste con los 418 casos de dengue identificados en nuestra investigación hospitalaria.

Otros estudios realizados en la frontera México-Estados Unidos también han reportado una incidencia de dengue mucho mayor en México en comparación con EU (Rawlings *et al.*, 1996; CDC, 2017; Brunkard *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2008; Reiter *et al.*, 2003; Clark, 2008). Un ejemplo es un estudio sero-epidemiológico realizado en campo en 2005 en las ciudades fronterizas contiguas de Matamoros, Tamaulipas y Brownsville, Texas (Ramos *et al.*, 2008). La población de estudio consistió en 132 participantes de 111 hogares en Matamoros y 141 participantes de 118 hogares en Brownsville. Los anticuerpos reactivos a VDENV fueron detectados por ELISA en 42 (31.8%) participantes de Matamoros y 6 (4.3%) participantes de Brownsville. Treinta (22.7%) participantes de Matamoros y 4

(2.8%) participantes de Brownsville tuvieron infecciones recientes. Los factores ambientales y socioeconómicos que afectan al contacto mosquito-humano, como el aire acondicionado, parecen ser las principales razones de estas diferencias (Ramos *et al.*, 2008; Reiter *et al.*, 2003). El aire acondicionado estuvo disponible en 29% de los hogares participantes en Matamoros y el 85% de los hogares participantes en Brownsville (Ramos *et al.*, 2008). En otro estudio de campo, el aire acondicionado estuvo disponible en 24% y 82% de los hogares participantes en Nuevo Laredo, Tamaulipas y Laredo, Texas, respectivamente (Reiter *et al.*, 2003). La mayoría (21%) de los hogares en nuestro estudio no tenía aire acondicionado. Otros factores asociados con el incremento de riesgo de infección son la presencia de criaderos de mosquitos, el no uso de repelente de mosquitos, tamaño de lotes más pequeños y bajos ingresos familiares. (Ramos *et al.*, 2008; Reiter *et al.*, 2003; Clark, 2008; Brunkard *et al.*, 2008).

Tres seroconversiones a VON fueron identificadas en la investigación de campo, y un participante del estudio desarrolló manifestaciones clínicas. Éste es el primer caso documentado de VON en Tamaulipas, aunque dos casos han ocurrido en el estado vecino de Nuevo León (Elizondo-Quiroga *et al.*, 2005; Rios-Ibarra *et al.*, 2010). La primera evidencia del VON en Tamaulipas fue reportado en una investigación serológica que identificó anticuerpos a VON en aves residentes en Tamaulipas en 2013 (Fernandez-Salas *et al.*, 2003). Evidencia de infección por VON ha sido detectada en mosquitos y equinos en otros lugares del norte de México (Elizondo-Quiroga *et al.*, 2005; Blitvich *et al.*, 2004; Ibarra-Juarez *et al.*, 2012; Blitvich *et al.*, 2003; Deardorff *et al.*, 2006; Estrada-Franco *et al.*, 2003). A diferencia del dengue, la incidencia de la enfermedad de VON es mucho menor en México en comparación con los Estados Unidos, potencialmente porque la inmunidad preexistente al VDEN protege contra la infección por VON (Blitvich, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010).

Los anticuerpos contra ESLV o VZIK no fueron detectados en ningún participante en la investigación de campo u hospital, aunque estos resultados no fueron inesperados. El ESLV no es una causa común de infección en humanos en México (Reisen, 2003). El VZIK no estuvo presente en México durante la mayor parte del período de estudio ya que el

primer caso detectado se presentó en noviembre de 2015 según la OMS (OMS, 2018). El primer caso confirmado de VZIK en Tamaulipas ocurrió en junio de 2016 en el municipio de Madero (Dr. Carmona, Secretario de Salud de Tamaulipas, datos no publicados). El primer caso confirmado de VZIK en Reynosa ocurrió en agosto de 2016, con un total de 125 casos confirmados y reportados en Reynosa hasta la SE 14 de 2018.

2.5 Conclusión

Proporcionamos evidencia de la circulación simultánea de cuatro flavivirus, VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VON, en Tamaulipas, al norte de México. También recientemente reportamos la transmisión autóctona de VCHIK, un alfavirus, en Tamaulipas (Laredo-Tiscareño *et al.*, 2018). Todos los virus anteriormente mencionados se asociaron con enfermedad a los humanos en las áreas de estudio, demostrando la importante necesidad de seguir realizando una vigilancia y diagnóstico de arbovirus en la frontera México-Estados Unidos.

2.6 Referencias

Andrade EH, Figueiredo LB, Vilela AP, Rosa JC, Oliveira JG, Zibaoui HM, Araujo VE, Miranda DP, Ferreira PC, Abrahao JS, Kroon EG, 2016. Spatial-temporal co-circulation of dengue virus 1, 2, 3, and 4 associated with coinfection cases in a hyperendemic area of Brazil: a 4-week survey. *Am J Trop Med Hyg* 94: 1080-4.

Balmaseda A, Hammond SN, Perez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, Idiaquez W, Harris E, 2005. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 73: 1059-62.

Beaty B, Calisher C, Shope R, 1995. Arboviruses. Lennette E, Lennette D, Lennette E, eds. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections.*: Washington, DC: American Public Health Association, 189–212.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI, 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504-7.

Blitvich BJ, 2008. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim Health Res Rev* 9: 71-86.

Blitvich BJ, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero JF, Lorono-Pino MA, Marlenee NL, Diaz FJ, Gonzalez-Rojas JI, Obregon-Martinez N, Chiu-Garcia JA, Black WCt, Beaty BJ, 2004. Phylogenetic analysis of West Nile virus, Nuevo Leon State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 10: 1314-7.

Blitvich BJ, Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero JF, Marlenee NL, Gonzalez-Rojas JI, Komar N, Gubler DJ, Calisher CH, Beaty BJ, 2003. Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Coahuila State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 9: 853-6.

Brunkard JM, Cifuentes E, Rothenberg SJ, 2008. Assessing the roles of temperature, precipitation, and ENSO in dengue re-emergence on the Texas-Mexico border region. *Salud Publica Mex* 50: 227-34.

Brathwaite Dick O, San Martin JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH, 2012. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 87: 584-93.

Brunkard JM, Robles Lopez JL, Ramirez J, Cifuentes E, Rothenberg SJ, Hunsperger EA, Moore CG, Brussolo RM, Villarreal NA, Haddad BM, 2007. Dengue fever seroprevalence and risk factors, Texas-Mexico border, 2004. *Emerg Infect Dis* 13: 1477-83.

Caron M, Grard G, Paupy C, Mombo IM, Bikie Bi Nso B, Kassa Kassa FR, Nkoghe D, Leroy EM, 2013. First evidence of simultaneous circulation of three different dengue virus serotypes in Africa. *PLoS One* 8: e78030.

Castonguay-Vanier J, Klitting R, Sengvilaipaseuth O, Piorkowski G, Baronti C, Sibounheuang B, Vongsouvath M, Chanthongthip A, Thongpaseuth S, Mayxay M, Phommasone K, Douangdala P, Inthalath S, Souvannasing P, Newton PN, de Lamballerie X, Dubot-Peres A, 2018. Molecular epidemiology of dengue viruses in three provinces of Lao PDR, 2006-2010. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006203.

Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), ArboNet, virus del dengue (localmente adquirido e importado). Disponible en:https://wwwn.cdc.gov/arboNet/maps/ADB_Diseases_Map/index.html Acceso abril 24, 2018 [inglés].

Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), 2007. Dengue hemorrhagic fever--U.S.-Mexico border, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2007 Aug 10;56(31):785-9. Erratum in: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2007 Aug 17;56(32):822.

Chappell WA, Sasso DR, Toole RF, Monath TP, 1971. Labile serum factor and its effect on arbovirus neutralization. *Appl Microbiol* 21: 79-83.

Clark GG, 2008. Dengue and dengue hemorrhagic fever in northern Mexico and south Texas: do they really respect the border? *Am J Trop Med Hyg* 78: 361-2.

Dantes HG, Farfan-Ale JA, Sarti E, 2014. Epidemiological trends of dengue disease in Mexico (2000-2011): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3158.

De Simone TS, Nogueira RM, Araujo ES, Guimaraes FR, Santos FB, Schatzmayr HG, Souza RV, Teixeira Filho G, Miagostovich MP, 2004. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 553-62.

Deardorff E, Estrada-Franco J, Brault AC, Navarro-Lopez R, Campomanes-Cortes A, Paz-Ramirez P, Solis-Hernandez M, Ramey WN, Davis CT, Beasley DW, Tesh RB, Barrett AD, Weaver SC, 2006. Introductions of West Nile virus strains to Mexico. *Emerg Infect Dis* 12: 314- 8.

Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Libraty DH, Green S, Rothman AL, Vaughn DW, Ennis FA, 2002. Spatial and temporal circulation of dengue virus serotypes: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol* 156: 52-9.

Elizondo-Quiroga D, Davis CT, Fernandez-Salas I, Escobar-Lopez R, Velasco Olmos D, Soto Gastalum LC, Aviles Acosta M, Elizondo-Quiroga A, Gonzalez-Rojas JI, Contreras Cordero JF, Guzman H, Travassos da Rosa A, Blitvich BJ, Barrett AD, Beaty BJ, Tesh RB, 2005. West Nile Virus isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerg Infect Dis* 11: 1449-52.

Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Beasley DW, Coffey L, Carrara AS, Travassos da Rosa A, Clements T, Wang E, Ludwig GV, Cortes AC, Ramirez PP, Tesh RB, Barrett AD, Weaver SC, 2003. West Nile virus in Mexico: evidence of widespread circulation since July 2003. *Emerg Infect Dis* 9: 1604-7.

Fernandez-Salas I, Contreras-Cordero JF, Blitvich BJ, Gonzalez-Rojas JI, Cavazos-Alvarez A, Marlenee NL, Elizondo-Quiroga A, Lorono-Pino MA, Gubler DJ, Cropp BC, Calisher CH, Beaty BJ, 2003. Serologic evidence of West Nile Virus infection in birds, Tamaulipas State, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* 3: 209-13.

Gunther J, Ramirez-Palacio LR, Perez-Ishiwara DG, Salas-Benito JS, 2009. Distribution of dengue cases in the state of Oaxaca, Mexico, during the period 2004-2006. *J Clin Virol* 45: 218
22.

Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB, 2016. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16055.

Humayoun MA, Waseem T, Jawa AA, Hashmi MS, Akram J, 2010. Multiple dengue serotypes and high frequency of dengue hemorrhagic fever at two tertiary care

hospitals in Lahore during the 2008 dengue virus outbreak in Punjab, Pakistan. *International Journal of Infectious Diseases* 14: E54-E59.

Ibarra-Juarez L, Eisen L, Bolling BG, Beaty BJ, Blitvich BJ, Sanchez-Casas RM, Ayala-Sulca YO, Fernandez-Salas I, 2012. Detection of West Nile virus-specific antibodies and nucleic acid in horses and mosquitoes, respectively, in Nuevo Leon State, northern Mexico, 2006-2007. *Med Vet Entomol* 26: 351-4.

Jones JM, Lopez B, Adams L, Galvez FJ, Nunez AS, Santillan NA, Plante L, Hemme RR, Casal M, Hunsperger EA, Munoz-Jordan J, Acevedo V, Ernst K, Hayden M, Waterman S, Gomez D, Sharp TM, Komatsu KK, Dengue Investigative T, Arizona Department of Health S, Yuma County Public Health Services District A, Division of Vector-Borne Diseases NCFE, Zoonotic Infections Diseases CDCSJPR, University of A, Division of Global M, Quarantine NCFE, Zoonotic Infectious Diseases CDC, Epidemiology Elective Program CDC, 2016. Binational Dengue Outbreak Along the United States-Mexico Border - Yuma County, Arizona, and Sonora, Mexico, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65: 495-9.

Laredo-Tiscareño SV, Machain-Williams C, Rodríguez-Pérez MA, Garza-Hernandez JA, Doria-Cobos GL, Cetina-Trejo RC, Bacab-Cab LA, Tangudu CS, Charles J, De Luna-Santillana EJ, Garcia-Rejon JE, Blitvich BJ, 2018. Arbovirus surveillance near the Mexico-U.S. border: isolation and sequence analysis of chikungunya virus from patients with dengue-like symptoms in Reynosa, Tamaulipas. *Am J Trop Med Hyg* In press.

Leduc-Galindo D, Gloria-Herrera U, Ramos-Jimenez J, Garcia-Luna S, Arellanos-Soto D, Mendoza-Tavera N, Tavitas-Aguilar I, Garcia-Garcia E, Galindo-Galindo E, Villarreal-Perez J, Fernandez-Salas I, Santiago GA, Munoz-Jordan J, Rivas-Estilla AM, 2015. Characterization of the dengue outbreak in Nuevo Leon state, Mexico, 2010. *Infection* 43: 201-6.

Lorono-Pino MA, Cropp CB, Farfan JA, Vorndam AV, Rodriguez-Angulo EM, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Beaty BJ, Gubler DJ, 1999. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *Am J Trop Med Hyg* 61: 725-30.

Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA, Zapata-Peraza AL, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Garcia-Rejon JE, Diaz FJ, Blitvich BJ, Andrade-Narvaez M, Jimenez-Rios E, Blair CD, Olson KE, Black Wt, Beaty BJ, 2004. Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 71: 485-92.

Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A, 2013. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol* 5: 299-309.

Oyer RJ, David Beckham J, Tyler KL, 2014. West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *Handb Clin Neurol* 123: 433-47.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: New Edition. Geneva.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization, 2nd edn. Geneva, Switzerland.

Organización Mundial de la Salud (OMS), Zika virus infection – Mexico. <http://www.who.int/csr/don/03-december-2015-zika-mexico/en/> Acceso Mayo 5, 2018.

Petersen LR, Brault AC, Nasci RS, 2013. West Nile virus: review of the literature. *JAMA* 310: 308-15.

Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA, 2016. Zika Virus. *N Engl J Med* 374: 1552-63.

Phuong CX, Nhan NT, Kneen R, Thuy PT, van Thien C, Nga NT, Thuy TT, Solomon T, Stepniewska K, Wills B, Dong Nai Study G, 2004. Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the world health organization classification system helpful? *Am J Trop Med Hyg* 70: 172-9.

Ridde V, Agier I, Bonnet E, Carabali M, Dabire KR, Fournet F, Ly A, Meda IB, Parra B, 2016. Presence of three dengue serotypes in Ouagadougou (Burkina Faso): research and public health implications. *Infect Dis Poverty* 5: 23.

Rawlings J, Burgess C, Tabony L, Campman R, Hendricks K, Stevenson G, Vela L, Simpson D, TapiaConyer R, Matus CR, GomezDantes H, Montesanos R, Flisser A, Briseno B, Bernal SI, Medina CC, Flores G, Coello GD, Hayes J, Craig GB, Blackmore MS, Mutebi JP, 1996. Dengue fever at the US-Mexico border, 1995-1996 (Reprinted from *MMWR*, vol 45, pg 841, 1996). *Jama-Journal of the American Medical Association* 276: 1464-1465.

Reisen WK, 2003. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv Virus Res* 61: 139-83.

Rodriguez Mde L, Rodriguez DR, Blitvich BJ, Lopez MA, Fernandez-Salas I, Jimenez JR, Farfan-Ale JA, Tamez RC, Longoria CM, Aguilar MI, Rivas-Estilla AM, 2010. Serologic surveillance for West Nile virus and other flaviviruses in febrile patients, encephalitic patients, and asymptomatic blood donors in northern Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 151-7.

Ramos MM, Mohammed H, Zielinski-Gutierrez E, Hayden MH, Lopez JL, Fournier M, Trujillo AR, Burton R, Brunkard JM, Anaya-Lopez L, Banicki AA, Morales PK, Smith B, Munoz JL, Waterman SH, Dengue Serosurvey Working G, 2008. Epidemic

dengue and dengue hemorrhagic fever at the Texas-Mexico border: results of a household-based seroepidemiologic survey, December 2005. *Am J Trop Med Hyg* 78: 364-9.

Reiter P, Lathrop S, Bunning M, Biggerstaff B, Singer D, Tiwari T, Baber L, Amador M, Thirion J, Hayes J, Seca C, Mendez J, Ramirez B, Robinson J, Rawlings J, Vorndam V, Waterman S, Gubler D, Clark G, Hayes E, 2003. Texas lifestyle limits transmission of dengue virus. *Emerg Infect Dis* 9: 86-9.

Rios-Ibarra C, Blitvich BJ, Farfan-Ale J, Ramos-Jimenez J, Muro-Escobedo S, Martinez-Rodriguez HR, OrtizLopez R, Torres-Lopez E, Rivas-Estilla AM, 2010. Fatal human case of West Nile disease, Mexico, 2009. *Emerg Infect Dis* 16: 741-3.

Secretaría de Salud (SS), 2015. Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de dengue por laboratorio

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/23789/Lineamientos_para_la_vigilancia_epidemiologica_de_dengue.pdf Acceso 9 abril, 2018 [Español].

Shrivastava S, Tiraki D, Diwan A, Lalwani SK, Modak M, Mishra AC, Arankalle VA, 2018. Co circulation of all the four dengue virus serotypes and detection of a novel clade of DENV-4 (genotype I) virus in Pune, India during 2016 season. *PLoS One* 13: e0192672.

Undurraga EA, Betancourt-Cravioto M, Ramos-Castaneda J, Martinez-Vega R, Mendez-Galvan J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB, Harris E, Kuri-Morales P, Tapia-Conyer R, Shepard DS, 2015. Economic and disease burden of dengue in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003547.

Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, Shi PY, Vasilakis N, 2016. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res* 130: 69-80

CAPÍTULO III

Capítulo III

Vigilancia de arbovirus cerca de la frontera México/EUA: aislamiento y análisis de secuencia del virus de chikungunya en pacientes con síntomas similares a dengue en Reynosa, Tamaulipas

S. Viridiana Laredo-Tiscareño^{1,2,3}, Carlos Machain-Williams^{2*}, Mario A.

Rodríguez-Pérez¹, Javier A. Garza-Hernandez⁴, Gloria L. Doria-Cobos⁵, Rosa C. Cetina-Trejo²,

Lucio A. Bacab-Cab², Chandra S. Tangudu³, Jermilia Charles³, Erick J. De Luna-Santillana⁶, Julian E. Garcia-Rejon², Bradley J. Blitvich³

¹Laboratorio de Biomedicina Molecular, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México; ²Laboratorio de Arbovirología, Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México; ³Departamento de Microbiología Veterinaria y Medicina Preventiva, Colegio de Medicina Veterinaria, Iowa State University, USA; ⁴Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chihuahua, México; ⁵Departamento de Epidemiología de la Cuarta Jurisdicción Sanitaria, Secretaría de Salud, Reynosa, Tamaulipas, México; ⁶Laboratorio Medicina de la Conservación, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México

The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Publicado

Laredo-Tiscareño SV, Machain-Williamns C, Rodríguez-Pérez MA, Garza-Hernandez JA, Doria-Cobos GL, Cetina-Trejo RC, Bacab-Cab LA, Tangudu CS, Charles J, De Luna-Santillana EJ, Garcia-Rejon JE, Blitvich BJ. Arbovirus Surveillance near the Mexico-U.S. Border: Isolation and Sequence Analysis of Chikungunya Virus from Patients with Dengue-like Symptoms in Reynosa, Tamaulipas. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Jul; 99 (1): 191-194. doi: 10.4269/ajtmh.18-0117

Resumen

Un total de 1090 residentes de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas, localizada en la frontera México/Estados Unidos, se presentaron en hospitales y clínicas de la Secretaría de Salud de México en 2015 con síntomas característicos de dengue. El antígeno del virus del Dengue (VDEN) se detectó en el suero de 134 (12.3%) pacientes en fase aguda por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima. Los sueros de pacientes seleccionados (n=34) también se analizaron para la detección del RNA de chikungunya (VCHIK) por la reacción en cadena de la polimerasa transcripción inversa cuantitativa. Trece pacientes (38.2%), incluyendo cinco pacientes positivos al antígeno de VDEN, fueron positivos. Los sueros de tres pacientes positivos al RNA de VCHIK fueron analizados posteriormente para el aislamiento del virus en cultivo celular y VCHIK fue recuperado en cada ocasión. El genoma de un aislado y los genes estructurales de dos aislados fueron secuenciados. En conclusión, presentamos evidencia de co-infecciones de VCHIK y VDEN en pacientes que viven cerca de la frontera México/Estados Unidos y proporcionamos la primera secuencia del genoma de un aislado de VCHIK en el norte de México.

Palabras clave: chikungunya, dengue, México, frontera, co-infección

Abstract

A total of 1090 residents of the city of Reynosa, Tamaulipas on the Mexico/United States border presented at hospitals and clinics of the Secretariat of Health, Mexico in 2015 with symptoms characteristic of dengue. Dengue virus (DENV) antigen was detected by enzyme-linked immunosorbent assay in acute sera from 134 (12.3%) patients. Sera from select patients (n = 34) were also tested for Chikungunya (CHIKV) RNA by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Thirteen (38.2%) patients, including five DENV antigen-positive patients, were positive. Sera from three CHIKV RNA-positive patients were further assayed by virus isolation in cell culture and CHIKV was recovered on each occasion. The genome of one isolate and structural genes of the other two isolates were sequenced. In conclusion, we present evidence of CHIKV and DENV co-infections in patients that live near the Mexico/United States border and provide the first genome sequence of a CHIKV isolate from northern Mexico.

Keywords: chikungunya, dengue, Mexico, border, co-infection

3.1 Introducción

El virus Chikungunya (VCHIK, género *Alphavirus*, familia *Togaviridae*) y el virus del dengue (VDEN, familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*) son los agentes etiológicos de la fiebre por Chikungunya (FCHIK) y por dengue, respectivamente (Simmons *et al.*, 2012; Weaver *et al.*, 2018). Ambos virus son transmitidos por mosquitos *Aedes* y son endémicos en los trópicos y subtrópicos. La co-circulación de VCHIK y VDEN presenta un desafío clínico y diagnóstico en países endémicos debido a que las manifestaciones clínicas de estos virus se “mimetizan” sustancialmente. FCHIK se caracteriza por ser una enfermedad febril aguda, que a menudo va acompañada por poliartralgia grave y debilitante que algunas veces persiste durante años, además de el edema periarticular y la aparición de erupción maculopapular. Las complicaciones son raras, pero incluyen disfunción orgánica grave y encefalitis. Dengue generalmente se caracteriza por una enfermedad febril acompañada de dolor de cabeza, artralgia y mialgia, a veces con una erupción macular. En algunos casos, la infección por VDEN puede resultar en un incremento de la permeabilidad vascular, manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia y shock hipovolémico que conduce al desarrollo de una insuficiencia orgánica y la muerte.

El primer caso autóctono de FCHIK en México ocurrió en octubre de 2014 en el estado de Chiapas (Díaz-Quiñonez *et al.*, 2015). El primer caso autóctono de VCHIK en Texas ocurrió en noviembre de 2015 en el condado de Cameron en la frontera de México/Estados Unidos (EGEU, 2018). Actualmente, se han reportado casos de VCHIK en casi todos los estados de México, pero son más comunes en los estados del sur y del centro (Garay-Moran *et al.*, 2017). El estudio más completo para investigar la presencia de FCHIK en el norte de México fue realizado por Gómez-Govea *et al.*, que detectaron RNA de VCHIK en 41 de 101 (40.6%) pacientes en el estado de Nuevo León (Gomez-Govea *et al.*, 2017). Aunque la incursión de VCHIK en México es reciente, VDEN ha estado circulando en el país desde al menos en la década de 1800 (Brathwaite *et al.*, 2012). La incidencia y la gravedad de los brotes por dengue en México han aumentado a un ritmo

alarmante en las últimas décadas y se estima que ocurren 139,000 casos cada año en todo el país (Undurraga *et al.*, 2015). Para extender nuestra comprensión de las consecuencias en la salud pública de la reciente introducción de VCHIK en México, el estudio de las muestras de los pacientes son parte del programa de vigilancia nacional de dengue y se analizaron para detectar infecciones por VCHIK y VDEN y co-infecciones.

3.2 Métodos

Todos los pacientes fueron residentes de Reynosa, una ciudad en el estado de Tamaulipas, al norte de México. Reynosa se localiza en el área metropolitana binacional Reynosa-McAllen, justo enfrente de la frontera México-EU. McAllen es una ciudad del condado de Hidalgo, Texas (Figura 1). Los pacientes se presentaron en hospitales y clínicas de la Secretaría de Salud (SS) de Reynosa entre enero y diciembre del 2015. Para ser incluidos, los pacientes debían cumplir los criterios clínicos para la fiebre por dengue (FD) o fiebre hemorrágica por dengue (FHD) de acuerdo a los lineamientos establecidos por la OMS en 1997 (OMS, 1997). Aunque la OMS revisó los lineamientos en 2009, ahora ha clasificando a los pacientes como dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave, la nueva clasificación de la enfermedad se utilizó por primera vez en México en 2016 (OMS, 2009).

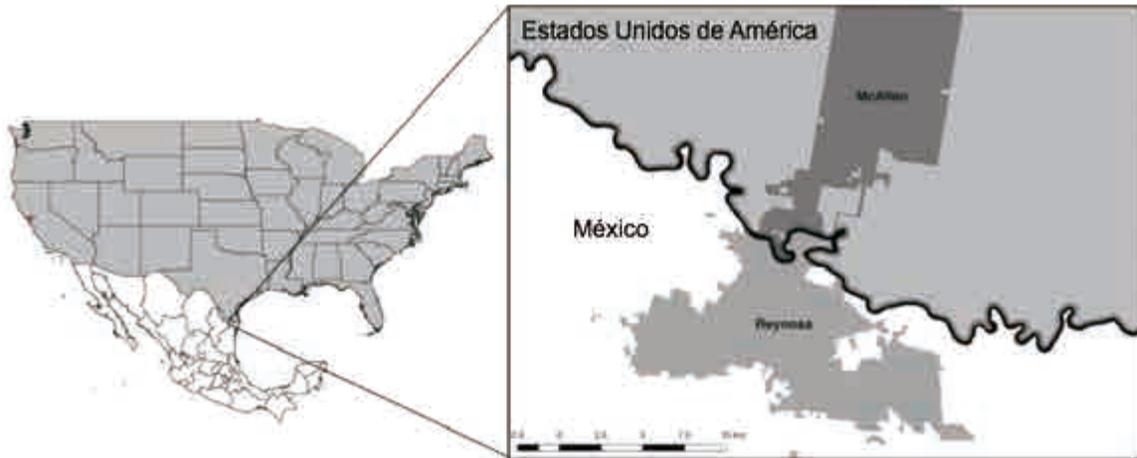


Figura 1. Localización geográfica del área metropolitana Reynosa-McAllen

La información clínica y demográfica fue documentada y los sueros de pacientes en fase aguda se recolectaron. Es obligatorio reportar el dengue en México; por lo tanto, no se requirió el consentimiento informado, sin embargo, se eliminó toda la información identificativa para proteger las identidades de los pacientes. Los sueros se analizaron para la detección de la proteína no estructural 1 (NS1) de VDENV por medio del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) utilizando el kit comercial Panbio Dengue Early ELISA (Inverness Medical Innovations Ltd., Australia) o Platelia™ Dengue NS1 Antigen ELISA (BioRad, Hercules, CA, USA). Las alícuotas de suero seleccionados se enviaron al Instituto Nacional para Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) en la Ciudad de México, donde se extrajo el RNA total utilizando el kit de extracción de RNA viral QIAamp (Qiagen, Valencia, CA, USA) y se evaluaron para la detección de RNA por reacción de transcripción inversa y en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR) usando un protocolo estandarizado establecido por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EU (CDC, 2018). Los sueros analizados por qRT-PCR fueron seleccionados usando un algoritmo establecido por la SS en el cual i) todos los pacientes con artralgia son analizados hasta que se identifica un caso autóctono de FCHIK en el estado, después son analizados aproximadamente el 5%, y ii) aproximadamente el 2% y el 5% de pacientes no artrálgicos con y sin antígeno de VDENV se analizaron, respectivamente. El primer caso autóctono de FCHIK en Tamaulipas ocurrió en julio de 2015 durante la semana epidemiológica (SE) 27 (SS, 2018). Se consideró que los pacientes

tenían infecciones por VDEN y VCHIK si resultaban positivos al antígeno de VDEN y al RNA de VCHIK, en ambos casos avalados por laboratorio.

Los sueros positivos para RNA de VCHIK se seleccionaron y se procedió al aislamiento viral en cultivo celular en dos pases ciegos en células C6/36 de *Ae. albopictus*. Las monocapas de células C6/36 fueron inoculados con 60 ul de la muestra del paciente y se incubo por 1 hora (hr) a 28 °C para su absorción. Las monocapas fueron subsecuentemente mantenidas en medio L-15 (Leibovitz), suplementado con 1% de aminoácidos no-esenciales y 2% de suero fetal bovino. Las células se mantuvieron a 28 °C. Enseguida, se tomó 100 ul del sobrenadante de células C6/36 de *Ae. albopictus*, para continuar con dos pases ciegos más en células de riñón de mono verde africano (Vero). A continuación, se inocularon con 100 ul del sobrenadante anterior y las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (dulbecco modified Eagles minimal essential medium) por sus siglas en inglés, suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina a 37 °C con 5% de CO₂.

El RNA total se extrajo de los sobrenadantes del cultivo celular usando el kit de extracción de RNA viral QIAamp (Qiagen). El genoma completo o los genes de las proteínas estructurales (cápside-E3-E2-6K-E1) de cada aislamiento se amplificó por Reacción Transcriptasa Reversa y en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para el traslapamiento de fragmentos (secuencias de cebadores; ver en *anexos*). Los DNA complementarios se generaron usando Superscript III transcriptasa inversa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y en las PCRs se utilizó DNA *Taq* polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen).

En la reacción del testigo negativo se utilizó dH₂O y en el caso del RNA total fue extraído de células infectadas de un aislado de VCHIK proveniente del estado de Yucatán, como testigo positivo, respectivamente. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit QIAquick PCR (Qiagen) y se secuenciaron utilizando el secuenciador de DNA 3730x1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.3 Resultados

El estudio de corte consistió en 1090 pacientes. De estos, 1065 pacientes manifestaron sospecha de FD y 25 pacientes cumplieron los criterios clínicos para la FHD, incluidos seis pacientes que fueron hospitalizados. Los sueros de 134 pacientes (12.3%) fueron positivos a la prueba de ELISA para el antígeno de VDEN. Otros estudios también han mostrado que la mayoría de los pacientes clínicamente diagnosticados con dengue no presentaron infecciones por VDEN confirmadas por laboratorio (Heringer *et al.*, 2017; Lorono-Pino *et al.*, 2004). En total, 126 pacientes fueron diagnosticados con FD y 8 pacientes fueron diagnosticados con FHD, todos confirmados por laboratorio, respectivamente. Se seleccionaron los sueros de pacientes (n=34) para analizarse por qRT-PCR para la detección de RNA de VCHIK, donde se incluyeron 20 pacientes con FD y 4 pacientes con FHD, todos confirmados por laboratorio. De estos, siete pacientes presentaron artralgia y 27 pacientes no fueron artrálgicos. Treinta y un pacientes analizados por RNA de VCHIK desarrollaron síntomas en octubre o noviembre. Trece pacientes (38.2%), incluidos cuatro pacientes con FD confirmados por laboratorio y un paciente con FHD confirmado por laboratorio, fueron positivos para RNA de VCHIK (Cuadro 1). Todos los pacientes con FCHIK confirmados por laboratorio, desarrollaron síntomas en octubre o noviembre del 2015. La poliartralgia persistió en dos pacientes con FCHIK (R-606 y R-607) durante más de seis meses y ambos también fueron positivos para el antígeno VDEN, lo que sugiere que la co-infección puede resultar en síntomas más graves. Al menos seis pacientes positivos a FCHIK manifestaron no haber viajado fuera de Tamaulipas ese año.

Tres sueros positivos al RNA de VCHIK se seleccionaron aleatoriamente para aislar el VCHIK en cultivo celular. Un aislamiento fue recuperado en cada ocasión. El genoma completo de un aislado (designado como CH-R-1950) y las regiones de la cápside-E3-E2-6K-E1 de dos aislados fueron secuenciados (Genbank, números de acceso MG921596, MG822707 y MG822708). Los alineamientos de las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos deducidas de las regiones de la cápside-E3-E2-6K-E1 de los tres aislados se analizaron utilizando el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) donde se observó un 99.9% -100% y 99.8% -100% de identidad entre sí, respectivamente. La secuencia del genoma de CH-R-1950 se

alineó con todas las demás secuencias de VCHIK en la base de datos de GenBank y mostró tener una mayor identidad de nucleótidos (>99.8%) con los genomas aislados de Chiapas, Nicaragua y otras partes de las Américas. La inferencia filogenética está de acuerdo con estos hallazgos (Figura 2).

Cuadro 1. Resultados demográficos, clínicos, y de laboratorios de pacientes de Chikungunya

Identificación del paciente	Género	Edad (años)	Inicio de la enfermedad (fecha)	Inicio de la enfermedad (SE*)	Viaje†	VDEN NS1 ELISA	Diagnóstico de Dengue	RNA VCHIK‡	Aislamiento de VCHIK
R-143	F§	38	Octubre 3	40	ND	- ¶	-	+	NT#
R-462	F	68	Octubre 14	41	No	-	-	+	NT
R-482	F	28	Octubre 19	42	No	Inconcluso	-	+	NT
R-606	F	67	Octubre 29	43	No	***	FD††	+	NT
R-607	F	51	Noviembre 3	44	Sí	+	FD	+	NT
R-615	M‡‡	33	Noviembre 3	44	No	-	-	+	NT
R-702	F	52	Noviembre 8	45	ND	-	-	+	NT
R-703	F	43	Noviembre 9	45	ND	-	-	+	NT
R-756	M	18	Noviembre 10	45	ND	+	FHD§§	+	NT
R-779	F	29	Noviembre 12	45	No	-	-	+	NT
R-1950	M	28	Noviembre 3	44	No	+	FD	+	+
R-1972	F	62	Noviembre 4	44	ND	+	FD	+	+
R-2295	F	43	Noviembre 10	45	ND	-	-	+	+

VCHIK=virus del chikungunya; VDEN= virus del dengue; ELISA= ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima; SE= semana epidemiológica proteína no estructural 1

NS1=

* Semana Epidemiológica

† Definido como viaje fuera de Tamaulipas en 2015

‡ Valores de Ct ≤ 36 fueron considerados positivos

§ Femenino

|| No documentado

¶ Negativo

No analizado

** Positivo

†† Fiebre por Dengue

‡‡ Masculino

§§ Fiebre Hemorrágica por Dengue



Figura 2. Análisis filogenético de la secuencia del genoma completo de CH-R-1950 y otros aislamientos del virus del Chikungunya seleccionados. Las secuencias de nucleótidos se alinearon usando el programa de alineación múltiple y la transformación rápida de Fourier. Un análisis Bayesiano basado en las cadenas de Markov por el método de Monte Carlo se realizó por el programa de MrBayes usando el tiempo general reversible más sitios invariantes de distribución plus gamma modelo 4. (Ronquist *et al.*, 2003). Cuatro millones de interacciones se usaron para alcanzar la convergencia. Las probabilidades posteriores seleccionadas fueron denotadas como porcentajes bajo los nodos. Las longitudes de las ramas son proporcionales al número de diferencias nucleotídicas. Se mostraron los genotipos Enzoótico Oeste y Este/Centro/Sur Africano (ECSA), asiático, y el genotipo endémico/epidémico Océano Indico (IOL). La secuencia nucleotídica del genoma de VCHIK aislado de Reynosa, pertenece al genotipo asiático (indicado por la flecha negra).

3.4 Discusión

Este es el primer estudio que reporta las manifestaciones clínicas y los hallazgos de laboratorio de un caso autónomo de FCHIK en el norte de México (definido como un estado que limita con los EU). El primer caso de FCHIK en el norte de México ocurrió en Sonora en 2014, pero se asumió que el caso fue importado porque el paciente había viajado recientemente a Chiapas (Martinez-Medina *et al.*, 2017). En otro estudio, se detectó RNA de VCHIK en 41 de 101 (40,6%) pacientes con fiebre en Nuevo León en el 2015 (Gomez-Govea *et al.*, 2017). Treinta y un pacientes positivos al RNA de VCHIK incluidos en este estudio recientemente habían viajado al sur de México. Los historiales de viaje de los otros pacientes no fueron documentados. De acuerdo con la base de datos de las SS, el primer caso autónomo de FCHIK en el norte de México ocurrió en Sonora en la SE 52 del 2014 (SS, 2014). Como ya se señaló, el primer caso autóctono en Tamaulipas ocurrió en la SE 27 de 2015 (SS, 2015).

De acuerdo al Departamento de Servicios de Salud del Estado de Texas, 32 de los 254 condados en Texas están designados como condados fronterizos (definidos dentro de los 100 km de la frontera entre Estados Unidos y México) (DSHS, 2018). Un caso local y tres casos importados de FCHIK ocurrieron en los condados fronterizos de Texas en 2015 (EGEU, 2018). Un caso importado se identificó en el condado de Hidalgo. El número de casos por FCHIK en los condados fronterizos de Texas en 2015 fue considerablemente más bajo que el número de casos reportados sólo en Reynosa. Dos casos de dengue (ambos importados) también ocurrieron en los condados fronterizos de Texas en 2015 y, por lo tanto, también hay una notable diferencia entre el número de casos de dengue reportados en ambos lados de la frontera entre Reynosa y Texas. Otros estudios realizados en áreas metropolitanas binacionales han también reportado una incidencia mucho mayor de dengue en México en comparación con EU (Ramos *et al.*, 2008). Los factores ambientales que afectan el contacto entre mosquitos y humanos (por ejemplo, el aire acondicionado) sugiere ser unas de las razones principales de estas diferencias (Reiter *et al.*, 2003).

3.5 Conclusión

Reportamos la primera secuencia del genoma de VCHIK aislado en el norte de México. Los genes de las proteínas estructurales de otros dos aislados también se secuenciaron. Otra secuencia de VCHIK del norte de México está disponible en la base de datos de Genbank: una región de 457-nt del gen E2 detectada en un paciente de Nuevo León (Gomez-Govea *et al.*, 2017). No se identificó ninguna sustitución de E2 o E1 que previamente se ha mostrado que incrementa la capacidad replicativa del virus en *Aedes albopictus* (Tsetsarkin *et al.*, 2014). También reportamos la evidencia de co-infecciones de VCHIK y VDEN en cinco pacientes en el norte de México. Cinco pacientes del estudio de Nuevo León también podrían haber sido co-infectados con estos virus porque se detectaron RNA de VCHIK e IgM contra VDEN en sus sueros (Gomez-Govea *et al.*, 2017). En conjunto, los datos anteriores denotan la importante necesidad de continuar realizando diagnósticos diferenciales para VCHIK y VDEN en el norte México.

3.6 Referencias

Brathwaite Dick O, San Martín JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Oct;87(4):584-93.

Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Preparación y respuesta a la introducción del virus del chikungunya en las américas. Acceso en: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_English.pdf

Departamento Estatal de Servicios de Salud de Texas. Acceso enero, 2018 en: <https://www.dshs.texas.gov/chs/hprc/counties.shtm>.

Díaz-Quíñonez JA, Ortiz-Alcántara J, Fragoso-Fonseca DE, Garcés-Ayala F, Escobar-Escamilla N, Vázquez-Pichardo M, Núñez-León A, Torres-Rodríguez Mde L, Torres-Longoria B, López-Martínez I, Ruíz-Matus C, Kuri-Morales P, Ramírez-González JE. Complete genome sequences of chikungunya virus strains isolated in Mexico: first detection of imported and autochthonous cases. *Genome Announc.* 2015 May 7;3(3). pii: e00300-15.

Estudio Geológico de los Estados Unidos. Casos del virus del Chikungunya. Acceso en enero, 2018 disponible en <https://diseasemaps.usgs.gov/mapviewer/>.

Garay-Moran C, Roman-Pedroza JF, Lopez-Martinez I, Rodriguez-Martinez JC, Ruiz-Matus C, Kuri-Morales P, Diaz-Quinonez JA, 2017. [Clinical and epidemiological characterization of chikungunya fever in Mexico]. *Rev Panam Salud Publica* 41: e58.

Gomez-Govea MA, Zamudio-Osuna MD, Murillo KDT, Ponce G, Cavazos MED, Tavitas-Aguilar MI, Flores-Suarez AE, Villarreal-Perez JZ, Rodriguez-Sanchez IP, 2017. Chikungunya fever in patients from northeastern Mexico. *Southwestern Entomologist* 42: 143-152.

Heringer M, Souza TMA, Lima M, Nunes PCG, Faria N, de Bruycker-Nogueira F, Chouin-Carneiro T, Nogueira RMR, Dos Santos FB, 2017. Dengue type 4 in Rio de Janeiro, Brazil: case characterization following its introduction in an endemic region. *BMC Infect Dis* 17: 410.

Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA, Zapata-Peraza AL, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Garcia-Rejon JE, Diaz FJ, Blitvich BJ, Andrade-Narvaez M, Jimenez-Rios E, Blair CD, Olson KE, Black Wt, Beaty BJ, 2004. Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 71: 485-92.

Martinez-Medina MA, Canedo-Dorame IA, 2017. [First case of chikungunya fever in Hermosillo, Sonora, Mexico]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 55: 123-127.

Organización Mundial de la Salud (OMS);1997. Fiebre Hemorrágica por Dengue: diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.

Programa Especial para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales; Organización Mundial de la Salud; 2009. Dengue: guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Ginebra: TDR: Organización Mundial de la Salud.

Ramos MM, Mohammed H, Zielinski-Gutierrez E, Hayden MH, Lopez JL, Fournier M, Trujillo AR, Burton R, Brunkard JM, Anaya-Lopez L, Banicki AA, Morales PK, Smith B, Munoz JL, Waterman SH, Dengue Serosurvey Working G, 2008. Epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever at the Texas-Mexico border: results of a household-based seroepidemiologic survey, December 2005. *Am J Trop Med Hyg* 78: 364-9.

Reiter P, Lathrop S, Bunning M, Biggerstaff B, Singer D, Tiwari T, Baber L, Amador M, Thirion J, Hayes J, Seca C, Mendez J, Ramirez B, Robinson J, Rawlings J, Vorndam V, Waterman S, Gubler D, Clark G, Hayes E, 2003. Texas lifestyle limits transmission of dengue virus. *Emerg Infect Dis* 9: 86-9.

Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-4.

Secretaría de Salud México. Boletín Epidemiológico SNdVESÚdI, 2015. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/10564/sem27.pdf> Accessed on January 1, 2018.

Secretaría de Salud México. Boletín Epidemiológico SNdVESÚdI, 2014. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/10890/sem51.pdf>, Accessed on January 1, 2018.

Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen vV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012 Apr 12;366(15):1423-32.

Tsetsarkin KA, Chen R, Yun R, Rossi SL, Plante KS, Guerbois M, Forrester N, Perng GC, Sreekumar E, Leal G, Huang J, Mukhopadhyay S, Weaver SC, 2014. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nat Commun* 5: 4084.

Undurraga EA, Betancourt-Cravioto M, Ramos-Castaneda J, Martinez-Vega R, Mendez-Galvan J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB, Harris E, Kuri-Morales P, Tapia-Conyer R, Shepard DS, 2015. Economic and disease burden of dengue in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003547.

Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu Rev Med.* 2018 Jan 29; 69:395-408.

CAPÍTULO IV

Capítulo IV

Detección del anticuerpo IgE anti-dengue a partir de sueros con infección reciente por VDEN en pacientes de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas.

S. Viridiana Laredo-Tiscareño^{1,2}, Mario A. Rodríguez-Pérez¹,

Rosa C. Cetina-Trejo², Javier A. Garza-Hernandez³,

Erick J. De Luna-Santillana⁴, Julian E. Garcia-Rejon², Carlos Machain-Williams^{2*}

¹Laboratorio de Biomedicina Molecular, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México; ²Laboratorio de Arbovirología, Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México; ³Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chihuahua, México; ⁴Laboratorio Medicina de Conservación, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México

Información no publicada, 2018

Resumen

Un total de 2355 residentes con sospecha de infección por dengue de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas, se presentaron en hospitales y clínicas de la Secretaría de Salud de México durante 2014 al 2016. Mientras que 346 residentes de una colonia endémica por dengue, se incorporaron durante una investigación epidemiológica en campo realizada durante el 2014 y 2015. Los sueros con sospecha a infección por dengue se analizaron para la detección del antígeno del virus del Dengue (VDEN) por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), el cual fue positivo en 418 pacientes (17.7%) en fase aguda. Los sueros de los residentes de la colonia endémica se analizaron para la detección de anticuerpos reactivos a flavivirus por la inmunoglobulina M (IgM) e IgG, encontrado 217 participantes (62.7%) positivos a IgG y 4 participantes a IgM. De los sueros de pacientes antígeno IgM-positivos, se seleccionaron al azar 137 para determinar la presencia de anticuerpos específicos IgE anti-dengue, durante la fase aguda de la infección por dengue entre los residentes de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas. Los sueros de 6 pacientes resultaron positivos a IgE anti-dengue (DS=1.102), de los cuales, tres pacientes fueron positivos a IgM e IgG, un solo paciente fue IgM positivo, pero negativos a IgG y dos pacientes positivos a IgM. En conclusión, proporcionamos evidencia de la detección de IgE específica anti-dengue en muestras de pacientes con infección primaria y secundaria en la fase aguda de la infección por dengue, en Tamaulipas, al norte de México.

Palabras clave: infección aguda, dengue, IgE, Reynosa.

Abstract

A total of 2355 residents with suspected dengue in the city of Reynosa, Tamaulipas, were presented in hospitals and clinics of the Secretariat of Health among 2014 to 2016. In other hand, 346 residents from a dengue-endemic neighborhood were recruited during a household-bases epidemiological investigation during the 2014 and 2015. Sera suspected dengue were tested for DENV antigen by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and it was detected in 418 (17.7%) patients in the acute phase. Sera from a dengue-endemic neighborhood were tested for flavivirus-reactive antibodies by immunoglobulin (Ig) M and IgG, them were detected in 217 (62.7%) participants IgG positive and 4 participants to IgM. Sera from antigen-positive and IgM-positive patients were randomly selected (n = 137) to determine the presence of specific antibodies IgE anti-dengue, during the acute phase of dengue infection among residents of the city of Reynosa, Tamaulipas. Sera from six patients were positive to IgE anti-dengue (DS = 1.102), of which, three patients were positive to IgM and IgG, a single patient with positive IgM, but negatives to IgG and two patient IgM positive. In summary, we provide evidence of specific anti-dengue IgE detection in samples with primary and secondary infection in the acute phase of dengue infection in Tamaulipas, northern Mexico.

Keywords: acute infection, dengue, IgE, Reynosa.

4.1 Introducción

El virus del dengue (VDEN, familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*) ha llegado a ser casi tan importante como la malaria en términos de mortalidad y morbilidad, la cual se estima que causa 207 mil millones de casos clínicos al año, aunque dengue tiene una morbilidad mucho más baja (Horstick *et al.*, 2015). El dengue es causado por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (VDEN 1-4), los cuales se encuentran muy relacionados y comparten una secuencia homóloga del 65-70% (Dejnirattisai *et al.*, 2015). Una infección por VDEN puede resultar en casos sintomáticos como fiebre por dengue (FD) o en una fiebre no diferenciada, pero en la mayoría de los casos se presenta de forma asintomáticos o inaparente, esto es debido a que no son detectados por los programas de vigilancia de los programas de salud u hospitales (Endy *et al.*, 2011; Malavige *et al.*, 2012). Además, el VDEN puede manifestarse en sus formas graves como Dengue con Signos de Alarma (DCSA), y Dengue Grave (DG), [anteriormente Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y Síndrome de Shock por Dengue (SSD), respectivamente] que puede ser fatal en algunos de los casos (Malavige *et al.*, 2012; OMS, 2009).

La infección inicial con un serotipo en particular es conocido como infección primaria y cualquiera infección subsecuente con cualquier otro serotipo es conocido como infección secundaria por dengue (Malavige *et al.*, 2012). En la infección primaria, la inmunoglobulina tipo G (IgG) aparece lentamente con bajos títulos entre los 8 a 10 días después de iniciada la fiebre. Mientras que la inmunoglobulina tipo M (IgM) es detectada alrededor del quinto día después de la aparición de la fiebre y permanece de 2 a 3 meses. En la infección secundaria, los anticuerpos IgG aparecen rápidamente, con altos títulos poco después de aparecer la fiebre y, en algunos casos, la IgM puede ser detectada (Guzman *et al.*, 2015). En las últimas dos décadas, la inmunoglobulina tipo E (IgE) se ha sugerido como marcador serológico de infecciones por dengue, debido a que su presencia es altamente específica, fuerte y más rápida que la de otros anticuerpos, ya que su respuesta se presenta en tan solo 3 días (Míguez-Burbano 2011; Remoue *et al.*, 2007). Algunos autores han descrito la elevación del anticuerpo IgE en pacientes con infección por dengue, donde en pacientes con FHD se observó el incremento de los niveles de IgE total y

específico. Alexeyev y cols., (1994); Vázquez y cols., (2004) mencionan que los niveles de IgE total en pacientes por dengue son más elevados que en sujetos no expuestos por dengue. En pacientes con casos de FHD/SSD los niveles específicos de IgE se representan más que en casos con FD y en individuos sanos (Míguez-Burbano *et al.*, 1999).

En México, el dengue es hiperendémico ya que los cuatro serotipos han sido aislados en el país y el principal vector, *Aedes aegypti*, se ha reportado en 30 estados de la república (Undurraga *et al.*, 2015). Sin embargo, el dengue históricamente se ha transmitido en el norte de México (Champion *et al.*, 2014). En 1995, durante el periodo julio-diciembre, las autoridades de Tamaulipas reportaron 4,758 casos sospechosos de dengue y un gran número de casos (2706) fueron reportados en la ciudad de Reynosa, donde se aislaron los serotipos VDEN-2, 3 y 4 (JAMA, 1996). Recientemente, en el 2016 y 2017 se reportó en el estado de Tamaulipas, 1042 casos DNG y 62 casos de DCSA y DG (SS, 2017; SS, 2018), mientras que, al norte del estado, en Texas, sólo se reportaron 172 casos por dengue en el mismo periodo (JAMA, 1996). El objetivo de este trabajo consistió en realizar la detección de IgE anti-dengue como un posible marcador de detección de dengue en la primera fase de infección en muestras de pacientes con infección en la ciudad de Reynosa Tamaulipas.

4.2 Métodos

Área de estudio

Los participantes de este estudio fueron residentes de la ciudad de Reynosa, perteneciente al estado de Tamaulipas. Esta ciudad fronteriza está localizada en las coordenadas 98 ° 22 ' 12.1 "O, 25 ° 49 ' 35" N, colindando al norte con McAllen, Texas, EU (Figura 1). La ciudad de Reynosa comprende 345 barrios o colonias y es la ciudad más poblada del estado de Tamaulipas, con una población estimada de 650,000 habitantes.

Población seleccionada para la investigación clínica.

El departamento de epidemiología, Jurisdicción IV de la Secretaría de Salud (SS) de la ciudad de Reynosa, proporcionó las muestras que se presentaron en enero del 2014 a diciembre del 2016 con sospecha de dengue provenientes de hospitales y las clínicas de la SS en Reynosa. Para ser elegible e incluidos en el estudio, los pacientes que presentaron en 2014 o 2015 tuvieron que cumplir los criterios clínicos para FD, FHD o SSD, de acuerdo a los lineamientos establecidos por la OMS para el diagnóstico de dengue (OMS, 1999). Los pacientes con FHD no fueron clasificados de acuerdo a su gravedad. Los pacientes que se presentaron en 2016 fueron clasificados de acuerdo a los lineamientos de dengue establecidos por la OMS en 2009 y, por lo tanto, tuvieron que cumplir los criterios clínicos para DNG, DCSA o DG (OMS, 2009). La más reciente clasificación de la enfermedad por dengue no fue utilizada en México antes del 2016. Los pacientes que no vivían en la ciudad de Reynosa no fueron incluidos en la población muestreada.

La información demográfica y clínica fue documentada por los responsables del departamento de epidemiología y la información seleccionada se remitió a nosotros, aunque esto no incluyó la información sobre síntomas específicos (solamente la clasificación de la enfermedad).

Población muestreada para la investigación sero-epidemiológica en campo

Los datos presentes en este estudio fueron obtenidos durante un estudio sero-epidemiológico por exposición a flavivirus. El estudio se realizó en la colonia Nuevo Amanecer donde, de acuerdo a la SS durante el 2013 se presentaron 276 casos de DNG y 337 casos de DCSA y DG, resultando ser la colonia más endémica por dengue en la ciudad de Reynosa en ese año (Figura 1). Cada casa fue visitada durante cuatro ocasiones: marzo 2014, octubre 2014, abril o mayo 2015, y octubre 2015. En cada visita se realizó un interrogatorio clínico para la identificación de signos o síntomas característicos de infección por dengue en todos los participantes durante la toma de la muestra. Los sueros de los participantes del estudio se colectaron en cada visita, a menos que no estuvieran en casa o se negaran a participar.

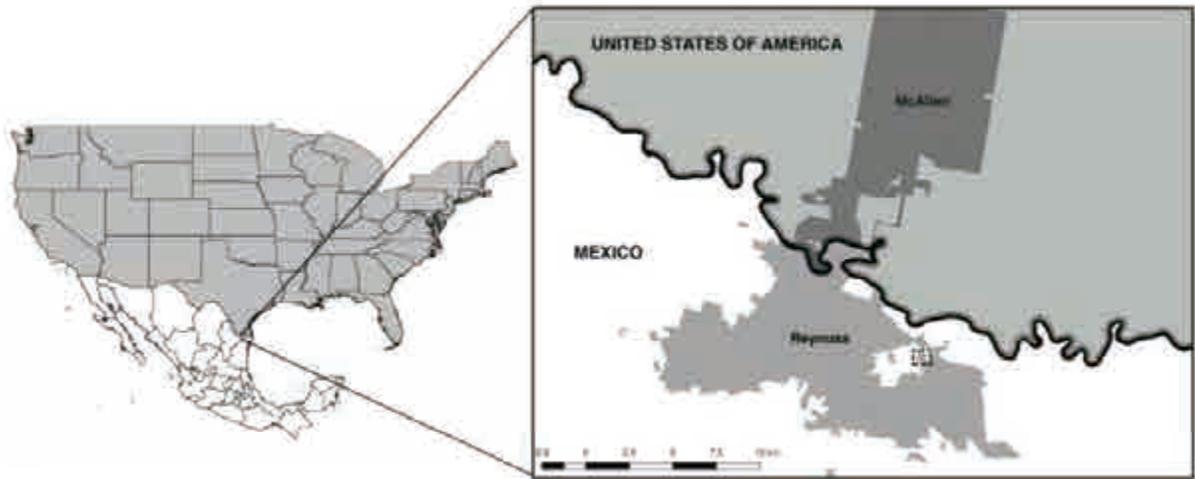


Figura 1. Localización geográfica del área metropolitana Reynosa-McAllen. El rectángulo punteado indica la colonia Nuevo Amanecer

Consentimiento ético

Durante un estudio de sero-epidemiología, el consentimiento por escrito para concurrir se obtuvo de cada participante después de una explicación completa del estudio. Si la persona tenía menos de 18 años de edad, el consentimiento por escrito se obtuvo de un padre o tutor legal. En el caso de las personas de 8 a 18 años de edad fue necesario preguntar para su aprobación. Los adultos que se negaron a firmar el formulario de consentimiento y los niños que no estaban conformes no fueron incluidos en el estudio. Los niños menores de 2 años de edad fueron ilegibles para su inclusión. El protocolo de investigación fue aprobado por la junta de revisión institucional del Instituto Politécnico Nacional.

En el caso de las muestras proporcionadas por la SS, no se requirió de la aprobación ética para analizarlas y publicarlas de acuerdo con la ley de transparencia mexicana. Los casos de información referidos están disponibles en el boletín epidemiológico. Todos los datos fueron tratados de forma confidencial y anónima.

Ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para detección de infecciones recientes por VDEN

Los sueros de todos los pacientes con sospecha de dengue provenientes del departamento de epidemiología fueron analizados para la detección de la proteína no estructural 1 (NS1) de VDEN por medio del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) usando el kit comercial de Panbio Dengue Early ELISA (Inverness Medical Innovations Ltd., Australia) o el kit de Platelia™ Dengue NS1 Antigen ELISA (BioRad, Hercules, CA, USA). Cuando se usó Panbio Dengue Early ELISA, los valores de índice se calcularon siguiendo las instrucciones del fabricante, considerando valores de <0.9 , entre 0.9 y 1.1 , y >1.1 negativos, equívocos y positivos, respectivamente. Cuando se usó Platelia™ Dengue NS1 Antigen ELISA, se calcularon los índices de muestreo siguiendo el protocolo establecido y valores de <0.5 , entre 0.5 y 1.0 , y >1.0 se consideraron negativos, equívocos y positivos, respectivamente. Si el antígeno NS1 de VDEN fue detectado, el paciente se consideró positivo a la infección por VDEN.

Los sueros de todos los participantes muestreados en la investigación de campo fueron analizados para la detección específica de las inmunoglobulinas IgM e IgG contra flavivirus usando ELISA de captura de DENV Detect™ IgM (InBios Internacional Inc., Seattle, WA, USA) y ELISA de captura de DENV Detect™ IgG (InBios Internacional Inc., Seattle, WA, USA), respectivamente. Para el índice del estado inmune (ISR) en ambos, se calcularon siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados negativos, equívoco y positivo se definió como aquellos que generaron valores ISR de <1.65 , >1.65 y <2.84 , y >2.84 , respectivamente.

Criterios de selección de las muestras para el análisis de la detección específica en suero de IgE específica anti-dengue

Las muestras para la detección de anticuerpos IgE anti-dengue en fase aguda de la enfermedad en pacientes confirmados por dengue, se seleccionaron al azar. En el caso de

la investigación clínica, fueron los sueros positivos al antígeno NS1 y en la investigación de campo, los positivos al anticuerpo IgM anti-dengue. En esta misma investigación no se descartó la inclusión de las muestras con resultados equívocos al anticuerpo IgM.

Desarrollo de una ELISA casera para la detección específica en suero de IgE específica anti-dengue

La ELISA casera se desarrolló para medir la IgE específica anti-dengue en muestras de suero, siguiendo el protocolo descrito por Kú-Pech (datos no publicados). Se estableció un inmunoensayo tipo doble sándwich, en el cual se empleó un anticuerpo anti-IgE humano (Seracare, Milford, MA, USA, Núm cat. 5220-0329), el antígeno tetravalente de dengue sin diluir (una mezcla de los cuatro serotipos de VDEN, aislados en células infectadas de C6/36 de *Ae. albopictus*) y un anticuerpo monoclonal anti-flavivirus marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (6B6C-1), que sirvió como un marcador de la reacción de unión antígeno-anticuerpo. En este procedimiento un sustrato de HRP soluble en agua, el ácido 2, 2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS), permite la coloración verde al final de la reacción. Para medir la intensidad de la coloración, las muestras se leyeron a un rango de 405-490 nm. Para estimar los índices para la detección de anticuerpos IgE específicos contra dengue se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula propuesta por Koraka *et al.*, (2003): índice de IgE específico contra dengue = (D.O. muestra - D.O. blanco) / (media de los testigos negativos + 3 x DESVEST), donde la D.O: es la densidad óptica (extinción) de cada muestra. Se definió como positivo y negativo aquellas muestras con un índice ≥ 0.102 y <0.102 , respectivamente.

4.3 Resultados

Investigación clínica

Un total de 2355 residentes de Reynosa presentaron sospecha de dengue en 2014 a 2016. La NS1 de VDEN fue detectada a partir de ELISA en sueros de 418 (17.7%)

pacientes. La mayoría de los pacientes que fueron confirmados con una infección por dengue se presentaron en 2014 (218 casos), seguidos en 2015 y 2016 (134 y 66 casos, respectivamente). Hubo 309 casos confirmados de FD (183 casos en 2014 y 126 casos en 2015) y 43 casos confirmados de FHD (35 casos en 2014 y 8 casos en 2015). No hubo casos sospechosos o confirmados de SSD. En 2016, las clasificaciones más recientes de dengue fueron adoptadas por las SS y entonces hubo 63 casos confirmados de DSSA y tres casos confirmados de DCSA. No hubo casos confirmados de DG. Todos los pacientes con las formas graves de la enfermedad sobrevivieron.

Investigación sero-epidemiología en campo

La población muestreada consistió en 346 participantes de 114 casas. También se visitaron otras seis casas, pero los residentes se negaron a participar. Cada casa participante fue visitada en cuatro ocasiones: marzo 2014, octubre 2014, abril-mayo 2015 y octubre 2015. El número promedio de participantes en el estudio en cada casa fue de 3.0, con un rango de 1 a 10, y ninguno tuvo síntomas consistentes de infección por flavivirus en el registro. La edad promedio de los participantes del estudio fue de 33.7 años (rango: 3 a 95 años). Hubo 143 varones y 203 mujeres. Los sueros fueron colectados de 119 participantes en las cuatro ocasiones y de 61, 71 y 96 participantes en tres, dos o una ocasión, respectivamente.

Un total de 217 (62.7%) participantes registrados en el estudio fueron positivos para flavivirus por IgG, incluyendo cuatro participantes que también fueron positivos a IgM y 10 participantes con resultados equívocos para IgM. El resto, 119 (34.4%) participantes fueron negativos para flavivirus tanto para IgM como para IgG, y 10 (2.9%) participantes resultaron equívocos para IgG basales.

Desarrollo de una ELISA casera para la detección específica en suero de IgE específica anti-dengue

Un total de seis participantes (6/137), tres participantes en cada investigación respectivamente presentaron el anticuerpo IgE anti-dengue por infección reciente, durante el registro en la investigación clínica y sero-epidemiológica de campo transcurrida en 2014 al 2016 (Cuadro 1). De los cuales, tres participantes, designados como AMLO, BROO y GMJO resultaron positivos a IgM e IgG para flavivirus, y un participante, designado como MMPO, resultó equivocado a IgM, pero positivo a IgG, respectivamente, durante 2014. En 2015, no se detectó el IgE anti-dengue en los participantes. Mientras, en 2016, dos participantes designados como GMQO y CDBQ, sólo fueron positivos a IgM para flavivirus, considerándolas como infección primaria por dengue (Cuadro 2).

Cuadro 1. Participantes en la investigación clínica e investigación de campo con resultados positivos a IgE anti-dengue

Paciente	media	DS	Interpretación
AMLO	0.103	0.102	Positivo
BROO	0.126	0.102	Positivo
GMJO	0.102	0.102	Positivo
MMPO	0.121	0.102	Positivo
GMQO	0.136	0.102	Positivo
CDBQ	0.122	0.102	Positivo

DS; desviación estándar

Cuadro 2. Hallazgos serológicos de los participantes seleccionados en la investigación clínica y de campo.

Participante	Fecha de colecta del suero	ELISA		
		NS1	IgM	IgG
AMLO	10/15/14	+ ^a	+	+
BROO	10/18/14	NA ^b	+	+
GMJO	10/25/14	NA	-- ^c	+
MMPO	10/25/14	NA	+	+
GMQO	10/5/16	+	+	- ^d
CDBQ	10/5/16	+	+	-

^aDefinido como participantes positivos; ^bno analizados; ^cequivocados; ^dnegativos

ELISA, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima; IgM; inmunoglobulina M; IgG, inmunoglobulina G; IgE inmunoglobulina E; NS1, proteína no estructural 1.

4.4 Discusión

Durante el curso de la infección por VDEN, el paciente desarrolla una variada respuesta de anticuerpos contra los dímeros de la proteína E y una reacción cruzada con los cuatro serotipos. A pesar de la reactividad cruzada, los anticuerpos son producidos sólo para prevenir una re-infección por el mismo serotipo homólogo. La neutralización sero-específica mediada por anticuerpos puede ser detectada 60 años después de la infección primaria, sugiriendo que los anticuerpos proveen una protección para toda la vida contra el serotipo homólogo (de Alvis *et al.*, 2012). Los métodos inmunológicos comúnmente usados, por ejemplo, la detección de IgM es útil para el diagnóstico de la infección por VDEN, pero su interpretación podría ser un reto dado que la IgM elevada puede deberse o a una reciente infección o una reacción cruzada con otros flavivirus. Mientras que el nivel de IgG permanece elevado por meses o hasta años y un resultado positivo en el ensayo puede indicar una infección pasada, por lo tanto, tiene implicaciones limitadas para la gestión clínica (Lim *et al.*, 2017). Por otro lado, el papel que juega IgE durante la patogénesis o gravedad de la enfermedad por dengue es importante, ya que se conoce que incrementa la permeabilidad vascular (a través de los mediadores de células de mastocitos), la cual es una característica de forma grave de la enfermedad (Inokuchi *et al.*, 2018).

Este es el primer estudio que reporta la detección de IgE anti-dengue en personas en el norte de México (definido como un estado que limita con los EU). Kú-Pech, presentó en su tesis de pregrado, el primer trabajo para la detección de IgE anti-dengue en México en 2015. En el presente estudio proporcionamos evidencia de la presencia de anticuerpos IgE anti-dengue en la fase aguda de la enfermedad en el suero de pacientes con infección primaria y secundaria por dengue. Similares resultados fueron reportados por Míguez-Burbano y cols (1999), donde describió los niveles elevados de IgE en una población expuesta al VDEN. Estos niveles de IgE fueron significativamente elevados en sujetos con una infección pasada por dengue y notablemente más elevados en aquellos durante la fase aguda en una infección primaria o secundaria, en comparación con individuos sin previa exposición a dengue. Por lo tanto, el incremento de IgE en suero durante la fase aguda y sí los niveles de IgG persisten elevados después de la fase de recuperación por una infección

por dengue, puede indicar la presencia de una respuesta específica de IgE y posiblemente refleje memoria inmune. Posteriormente, Koraka y cols (2003) mencionan que la presencia específica de IgE anti-dengue puede estar involucrada en la patogénesis de la enfermedad, ya que se ha observado que sus niveles son r significativamente más altos en pacientes con FHD/SSD comparados con pacientes con FD. Además, Inokuchi y cols (2018) observaron el incremento de la cinética específica de IgE contra VDEN durante el curso de la infección y encontraron que los niveles altos permanecieron durante un periodo largo, pero no se observó diferencia significativa entre los diversos niveles de gravedad. En nuestro estudio, los sueros de los pacientes con las formas graves de la enfermedad no fueron proporcionados por la SS durante la investigación clínica, mientras que, en la investigación de campo, no se presentó ningún caso. Por lo tanto, no se demostró la presencia de IgE anti-dengue en muestras de pacientes con las formas graves de la enfermedad durante el estudio.

La búsqueda de marcadores apropiados durante las infecciones recientes y la prevención de las formas graves de la enfermedad por dengue, se han convertido en una prioridad (Horstick *et al.*, 2015), especialmente en los casos asintomáticos, que ocurren con mayor frecuencia que los sintomáticos, principalmente en las áreas donde simultáneamente ocurren múltiples casos clínicos causados por más de un serotipo del VDEN (Wang *et al.*, 2015; Loroño-Pino *et al.*, 1999). Esto es debido a que, se estima que para el 2030, más de la mitad de la población mundial residirán en áreas tropicales urbanas debido al crecimiento poblacional en áreas urbanas existentes y la migración a las áreas rurales (Messina *et al.*, 2015).

4.5 Conclusión

Proporcionamos evidencia de la detección de IgE específica anti-dengue en muestras con infección primaria y secundaria en la fase aguda de la infección por dengue, en Tamaulipas, al norte de México. El anticuerpo IgE puede considerarse útil como un marcador serológico en una infección temprana y asintomática por dengue, demostrando ser más específica, fuerte y rápida en comparación con los otros anticuerpos, en los

diferentes niveles de la enfermedad. Particularmente en las áreas de riesgo, donde un incremento del número de serotipos que co-circulan en una región particular es un principal indicador hacia la hiper-endemicidad de la enfermedad y al incremento de la frecuencia de los casos graves, demostrando la importante necesidad de seguir realizando una vigilancia y diagnóstico de dengue en México.

4.6 Referencias

Alexeyev OA, Ahlm C, Billheden J, Settergren B, Wadell G, Juto P. Elevated levels of total and Puumala virus-specific immunoglobulin E in the Scandinavian type of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994 May;1(3):269-72.

Champion SR, Vitek CJ. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Habitat Preferences in South Texas, USA. *Environ Health Insights*. 2014 Dec 4;8(Suppl 2):35-42

de Alwis R, Smith SA, Olivarez NP, Messer WB, Huynh JP, Wahala WM, White LJ, Diamond MS, Baric RS, Crowe JE Jr, de Silva AM. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 8;109(19):7439-44.

Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S, Zhang X, Dai X, Rouvinsky A, Jumnainsong A, Edwards C, Quyen NT, Duangchinda T, Grimes JM, Tsai WY, Lai CY, Wang WK, Malasit P, Farrar J, Simmons CP, Zhou ZH, Rey FA, Mongkolsapaya J, Screaton GR. Corrigendum: A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat Immunol*. 2015 Jul;16(7):785.

Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Libraty DH, Green S, Rothman AL, Vaughn DW, Ennis FA, 2002. Spatial and temporal circulation of dengue virus serotypes: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol* 156: 52-9.

Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015 Jan 31;385(9966):453-65.

Horstick O, Tozan Y, Wilder-Smith A. Reviewing dengue: still a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Apr 30;9(4):e0003632.

Inokuchi M, Dumre SP, Mizukami S, Tun MMN, Kamel MG, Manh DH, Phuc LH, Van Thuong N, Van An T, Weiss LN, Turk T, Dang TN, Huong VTQ, Morita K, Huy NT, Hirayama K. Association between dengue severity and plasma levels of dengue-specific IgE and chymase. *Arch Virol*. 2018 May 4.

JAMA. Dengue fever at the US-Mexico border, 1995-1996. From the Centers for Disease Control and Prevention. 1996 Nov 13;276(18):1464-5.

Koraka P, Murgue B, Deparis X, Setiati TE, Suharti C, van Gorp EC, Hack CE, Osterhaus AD, Groen J. Elevated levels of total and dengue virus-specific immunoglobulin E in patients with varying disease severity. *J Med Virol*. 2003 May;70(1):91-8.

Kú-Pech CA, Puerto-Manzano FI, Machain-Williams C, 2015. Inmunoglobulina E en el Diagnóstico de Infección por Virus Dengue mediante Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) [tesis de pregrado]. Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México.

Lim JK, Alexander N, Di Tanna GL. A systematic review of the economic impact of rapid diagnostic tests for dengue. *BMC Health Serv Res*. 2017 Dec 29;17(1):850.

Loroño-Pino MA, Cropp CB, Farfán JA, Vorndam AV, Rodríguez-Angulo EM, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, Beaty BJ, Gubler DJ. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Nov;61(5):725-30.

Malavige GN, McGowan S, Atukorale V, Salimi M, Peelawatta M, Fernando N, Jayaratne SD, Ogg G. Identification of serotype-specific T cell responses to highly conserved regions of the dengue viruses. *Clin Exp Immunol*. 2012 May;168(2):215-23.

Messina JP, Brady OJ, Pigott DM, Golding N, Kraemer MU, Scott TW, Wint GR, Smith DL, Hay SI. The many projected futures of dengue. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Apr;13(4):230-9.

Míguez-Burbano MJ. In the war of viral infections IgE may play an important role: Antibody kinetics in Dengue. *J Antivir Antiretrovir* 2011, 3:4.
(<https://www.omicsonline.org/proceedings/in-the-war-of-viral-infections-ige-may-play-an-important-role-antibody-kinetics-in-dengue-8598.html>)

Míguez-Burbano MJ, Jaramillo CA, Palmer CJ, Shor-Posner G, Velásquez LS, Lai H, Baum MK. Total immunoglobulin E levels and dengue infection on San Andrés Island, Colombia. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 Jul;6(4):624-6.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization, 2nd edn. Geneva, Switzerland

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: New Edition. Geneva.

Remoue F, Alix E, Cornelie S, Sokhna C, Cisse B, Doucoure S, Mouchet F, Boulanger D, Simondon F. IgE and IgG4 antibody responses to Aedes saliva in African children. *Acta Trop*. 2007 Nov-Dec;104(2-3):108-15.

Secretaría de Salud (SS), 2017. Panorama epidemiológico de dengue.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/285237/Pano_dengue_sem_52_2017.pdf Acceso en Mayo [Español].

Secretaría de Salud (SS), 2018. Panorama epidemiológico de dengue.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/178952/Pano_dengue_sem_52_2016.pdf. Acceso en Mayo [Español].

Undurraga EA, Betancourt-Cravioto M, Ramos-Castaneda J, Martinez-Vega R, Mendez-Galvan J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB, Harris E, Kuri-Morales P, Tapia-Conyer R, Shepard DS, 2015. Economic and disease burden of dengue in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003547.

Vázquez S, Pérez AB, Ruiz D, Rodríguez R, Pupo M, Calzada N, González L, González D, Castro O, Serrano T, Guzmán MG. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol.* 2005 Jun;33(2):132-7.

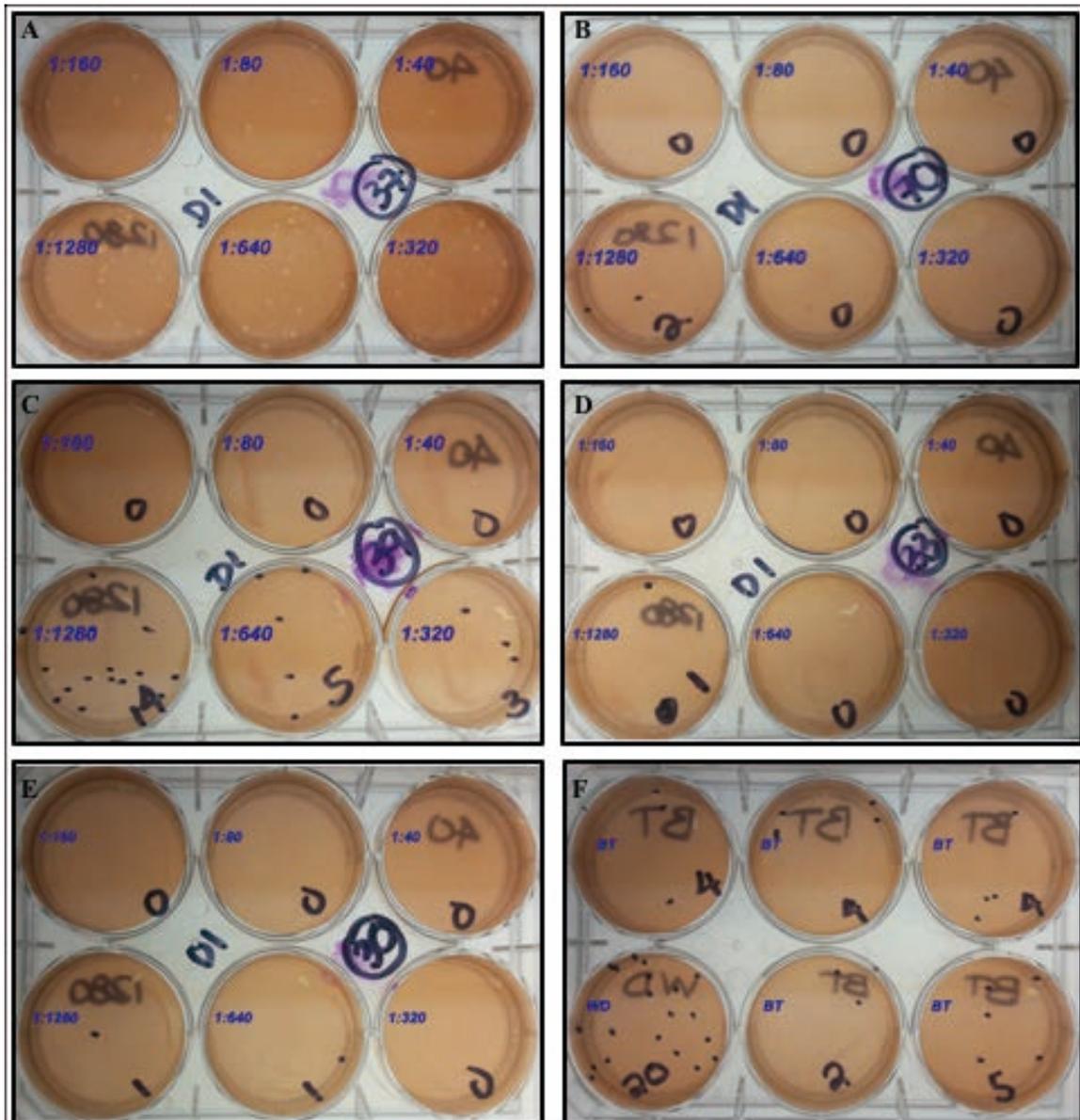
Wang T, Wang M, Shu B, Chen XQ, Luo L, Wang JY, Cen YZ, Anderson BD, Merrill MM, Merrill HR, Lu JH. Evaluation of inapparent dengue infections during an outbreak in Southern China. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Mar 31;9(3):e0003677.

ANEXOS

Anexos

Capítulo II

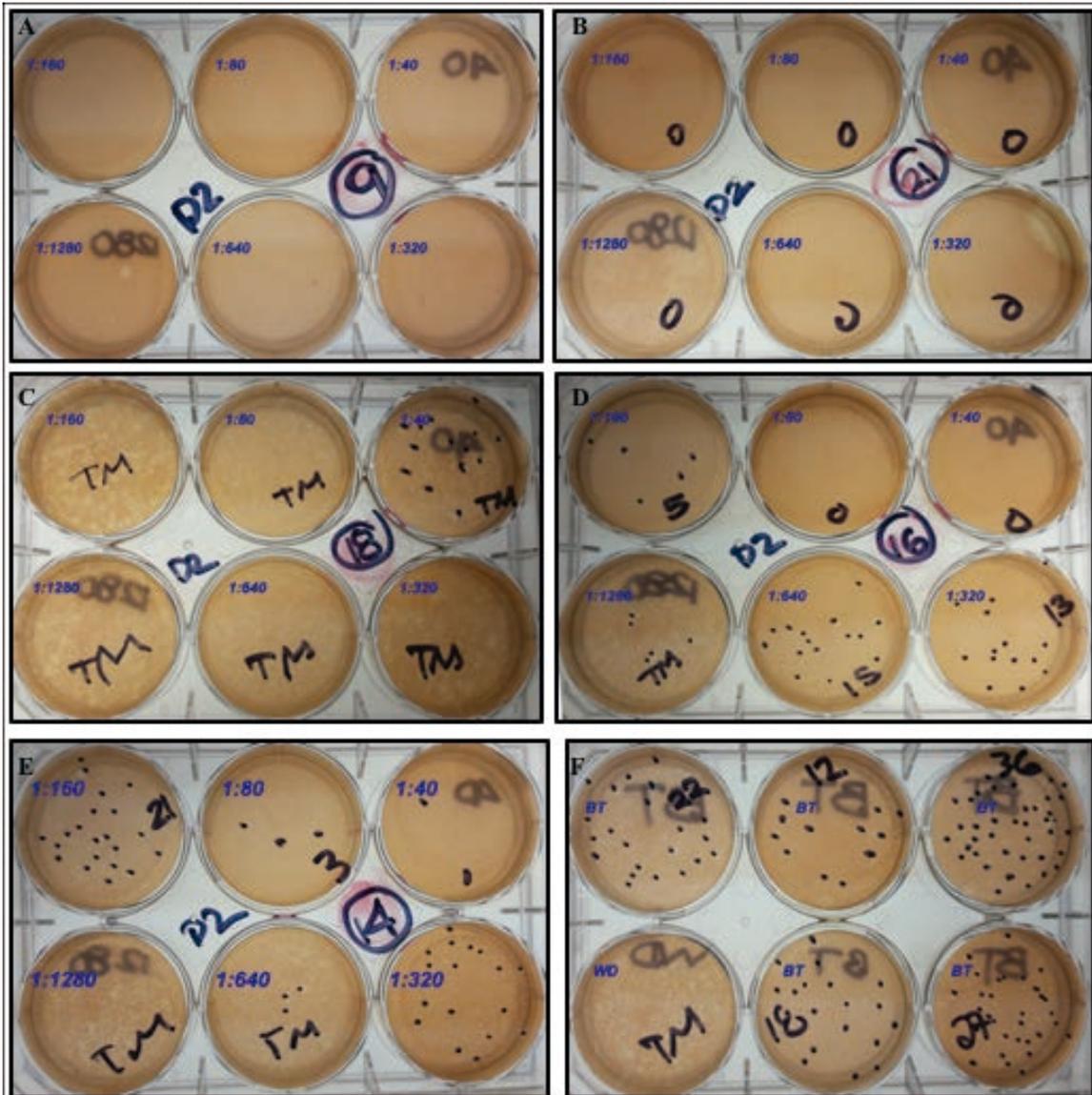
PRNT VDENV-1



BT= titulación del virus
WD= dilución de trabajo

Figura 1. Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en placa (PRNT) del VDEN-1 en muestras de suero en diferentes diluciones. A) Muestra de suero 37. B) Muestra de suero 70. C) Muestra de suero 39. D) Muestra de suero 33. E) Muestra de suero 30. F) Testigos; BT=Titulación del virus, como testigo positivo; WD=dilución de trabajo como testigo negativo.

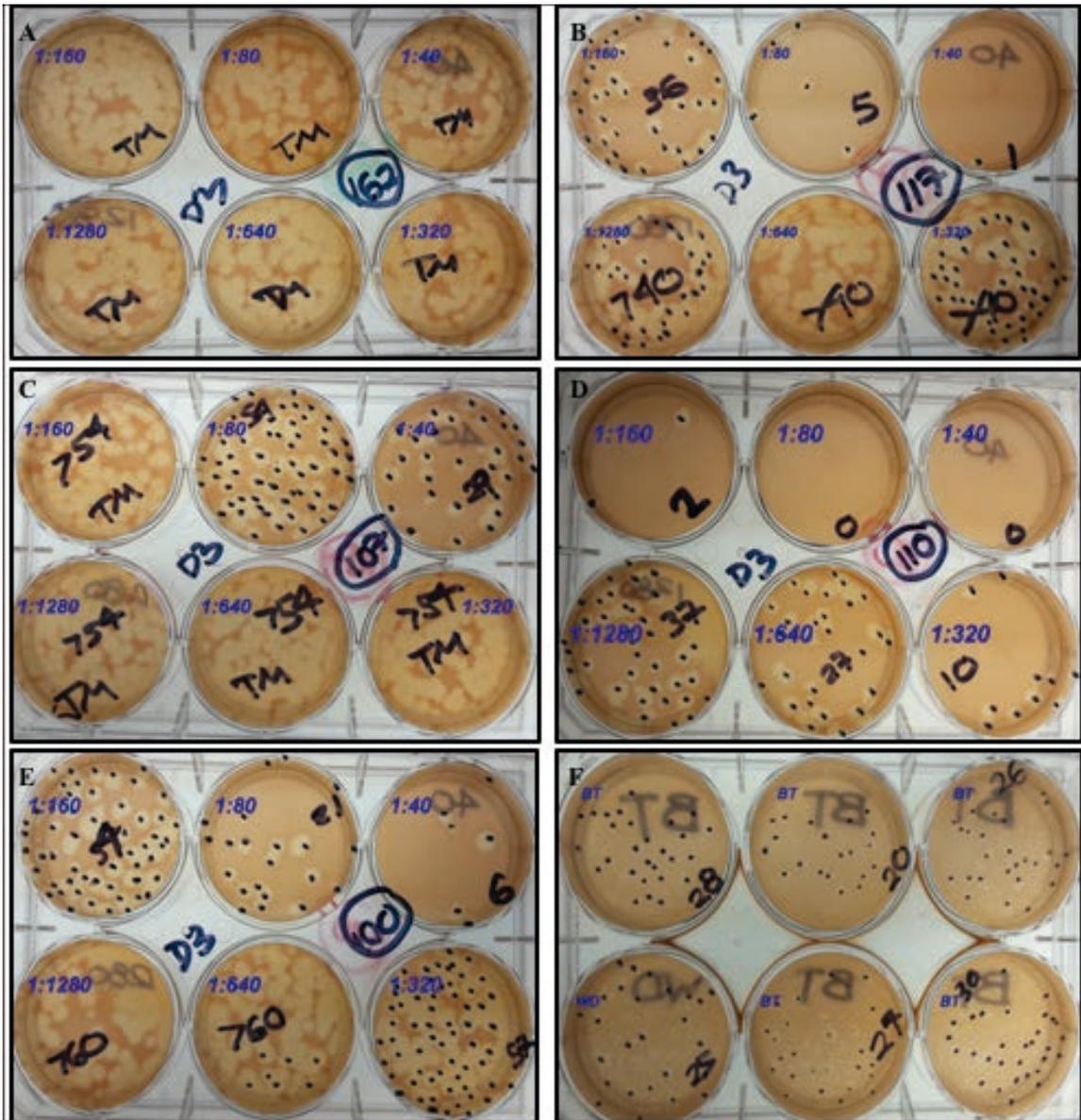
PRNT VDEN-2



BT= titulación del virus
 WD= dilución de trabajo
 TM= Demasiadas placas

Figura 2. Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en placa (PRNT) del VDEN-2 en muestras de suero en diferentes diluciones. A) Muestra de suero 9. B) Muestra de suero 21. C) Muestra de suero 18. D) Muestra de suero 16. E) Muestra de suero 14. F) Testigos; BT=Titulación del virus, como testigo positivo; WD=dilución de trabajo como testigo negativo.

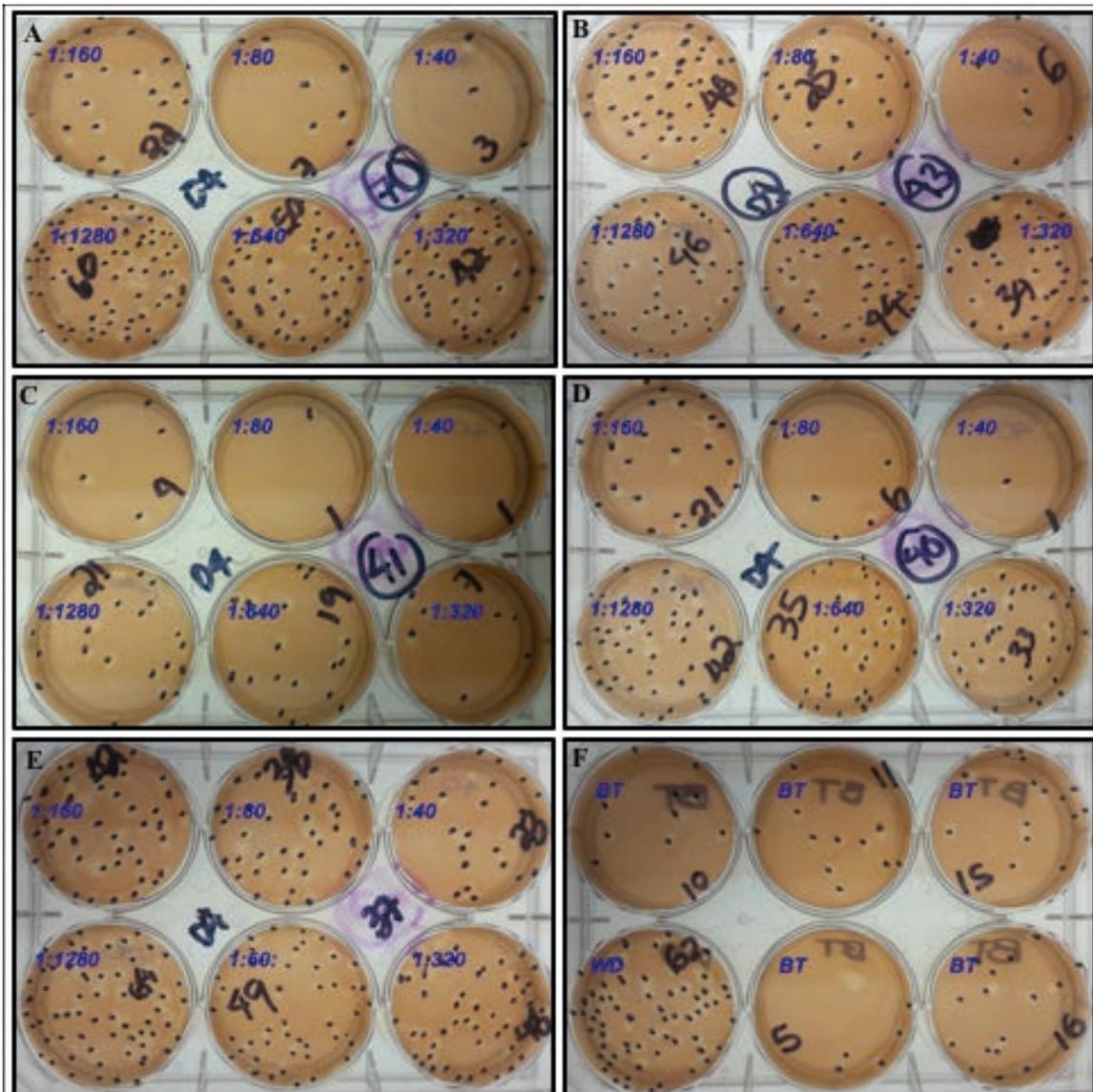
PRNT VDEN-3



BT= titulación del virus
 WD= dilución de trabajo
 TM= Demasiadas placas

Figura 3. Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en placa (PRNT) del VDEN-3 en muestras de suero en diferentes diluciones. A) Muestra de suero 162. B) Muestra de suero 117. C) Muestra de suero 107. D) Muestra de suero 110. E) Muestra de suero 100. F) Testigos; BT=Titulación del virus, como testigo positivo; WD=dilución de trabajo como testigo negativo.

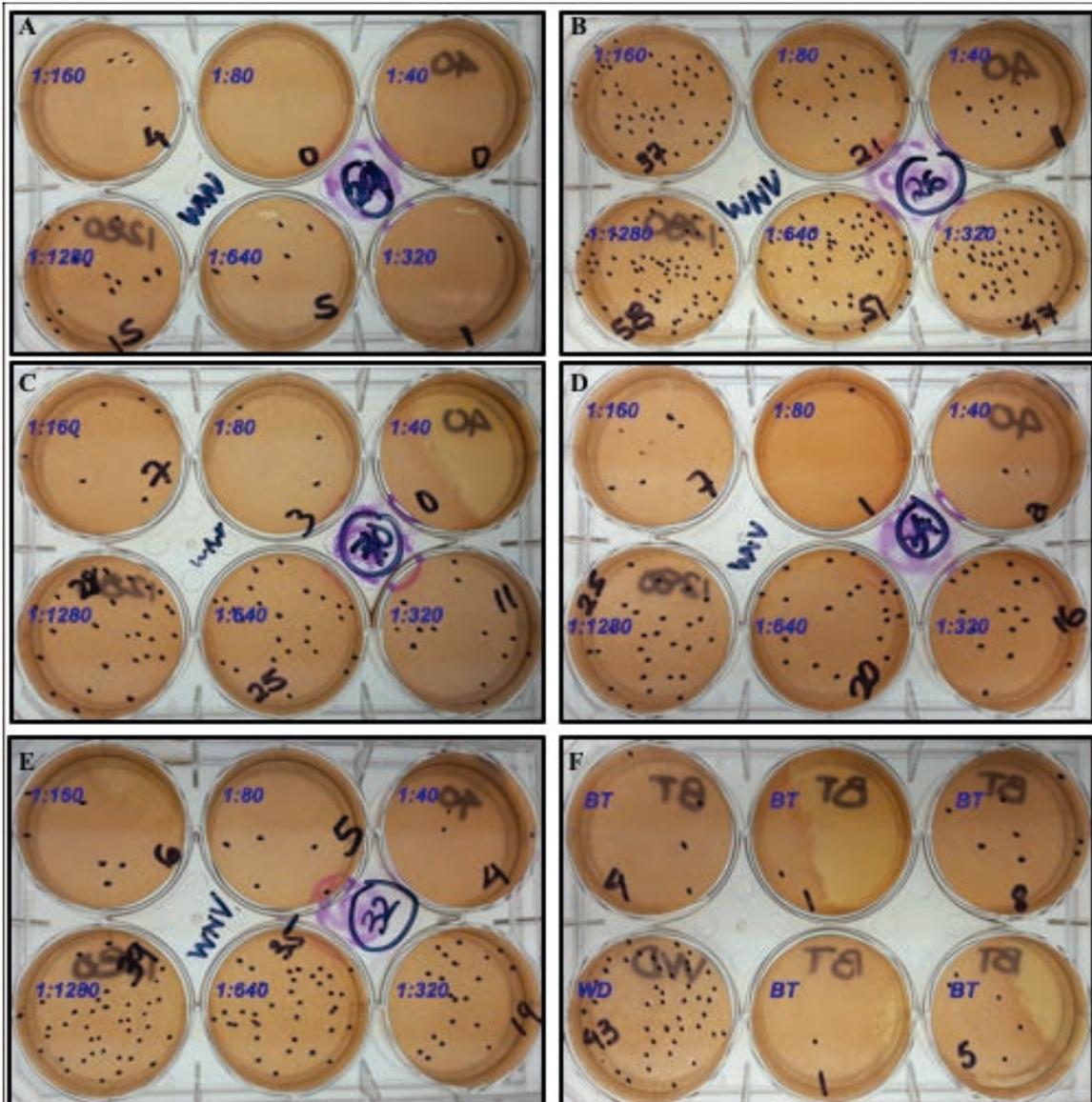
PRNT VDEN-4



BT= titulación del virus
WD= dilución de trabajo

Figura 4. Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en placa (PRNT) del VDEN-4 en muestras de suero en diferentes diluciones. A) Muestra de suero 70. B) Muestra de suero 43. C) Muestra de suero 41. D) Muestra de suero 40. E) Muestra de suero 37. F) Testigos; BT=Titulación del virus, como testigo positivo; WD=dilución de trabajo como testigo negativo.

PRNT-VON



BT= titulación del virus
WD= dilución de trabajo

Figura 5. Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en placa (PRNT) de VON en muestras de suero en diferentes diluciones. A) Muestra de suero 29. B) Muestra de suero 26 C) Muestra de suero 70. D) Muestra de suero 34. E) Muestra de suero 32. F) Testigos; BT=Titulación del virus, como testigo positivo; WD=dilución de trabajo como testigo negativo.

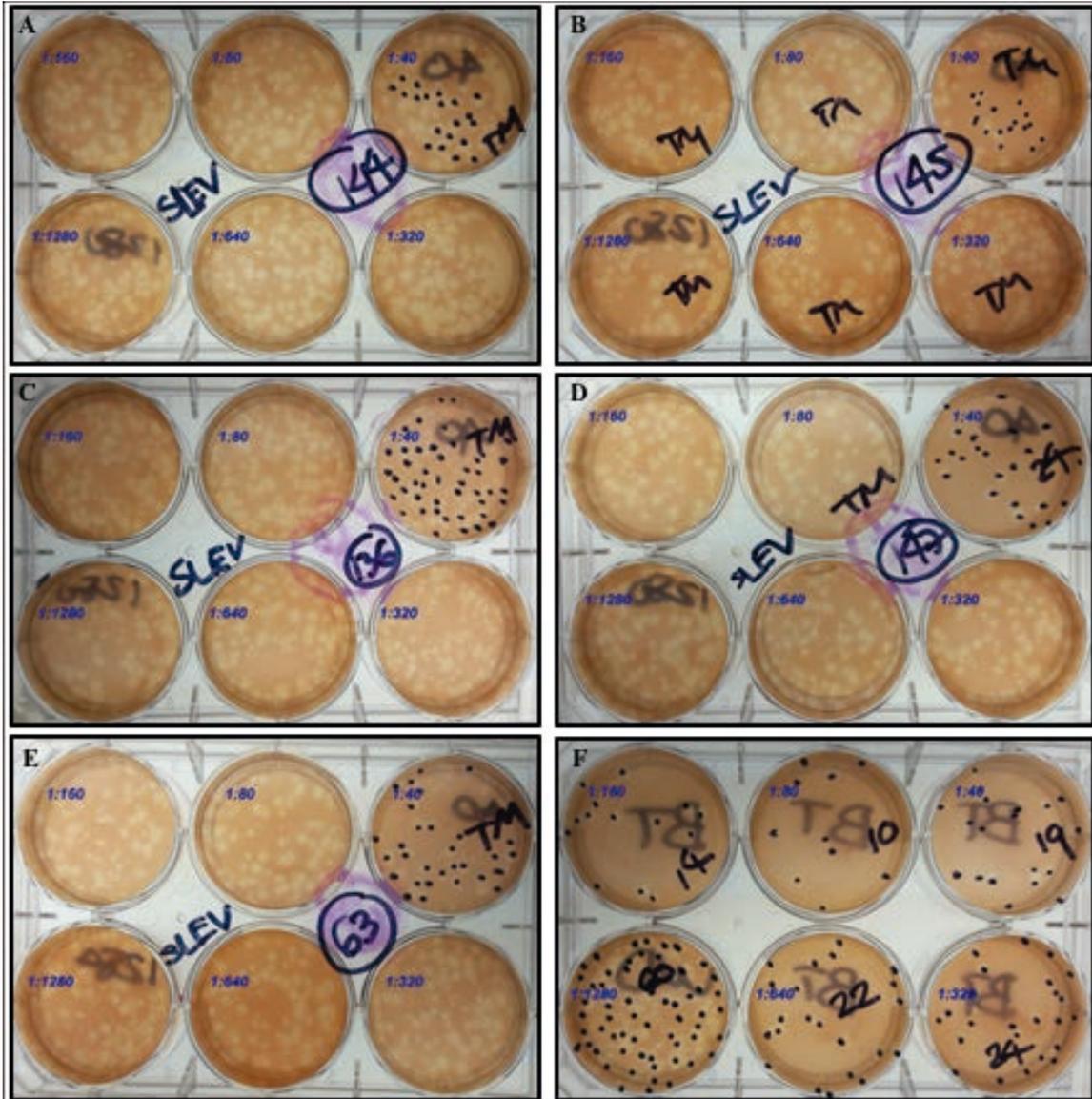
PRNT-VZIK



BT= titulación del virus
 WD= dilución de trabajo
 TM= Demasiadas placas

Figura 6. Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en placa (PRNT) de VZIK en muestras de suero en diferentes diluciones. A) Muestra de suero 162. B) Muestra de suero 133 C) Muestra de suero 145. D) Muestra de suero 100. E) Muestra de suero 153. F) Testigos; BT=Titulación del virus, como testigo positivo; WD=dilución de trabajo como testigo negativo.

PRNT-ESLV



BT= titulación del virus
WD= dilución del trabajo
TM= demasiadas placas

Figura 7. Formación de placas por la prueba de neutralización en reducción en placa (PRNT) de ESLV en muestras de suero en diferentes diluciones. A) Muestra de suero 144. B) Muestra de suero 145 C) Muestra de suero 136. D) Muestra de suero 147. E) Muestra de suero 63. F) Testigos; BT=Titulación del virus, como testigo positivo; WD=dilución de trabajo como testigo negativo.

Genotipificación del VDEN

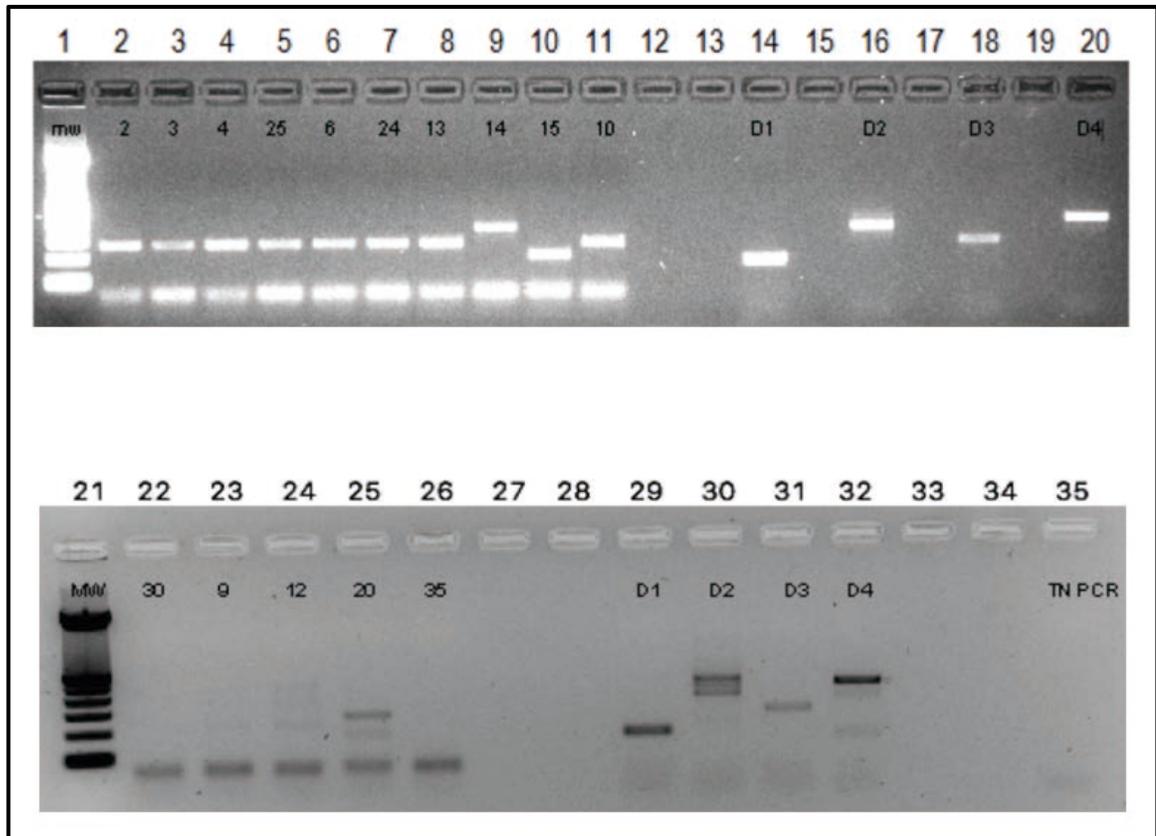


Figura 8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de VDEN en muestras de suero de la colonia Nuevo Amanecer en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Marcador molecular 100 pb, HyperLadder TM 100 pb (Bioline, Alexandria, NSW, AU), carril 2: muestra 1969 (VDEN-3), carril 3: muestra 3309 (VDEN-3), carril 4: muestra 58981 (VDEN-3), carril 5: muestra 59623 (VDEN-2), carril 6: muestra 59904 (VDEN-2), carril 7: muestra 60665 (VDEN-2), carril 8: S25CM1D (VDEN-3), carril 9: D30TM7F (VDEN-2), carril 10: muestra SJAJ (VDEN-1), carril 11: SJAJ en células Vero SJAJ (VDEN-3), carril 14: testigo positivo VDEN-1 (fragmento esperado 169pb), carril 16: testigo positivo VDEN-2 (fragmento esperado 362pb), carril 18: testigo positivo VDEN-3 (fragmento esperado 254pb), carril 20: testigo positivo VDEN-4 (426 pb), carril 21: Marcador molecular 100 pb, carril 23: muestra 879L (VDEN-1), carril 24: muestra 927R (VDEN-1), carril 25: SJAJ (VDEN-3), carril 29: testigo positivo VDEN-1 (fragmento esperado 169pb), carril 30: testigo positivo VDEN-2 (fragmento esperado 362pb), carril 31: testigo positivo VDEN-3 (fragmento esperado 254pb), carril 32: testigo positivo VDEN-4 (426 pb), carril 35: testigo negativo.

Filogenia del VDEN

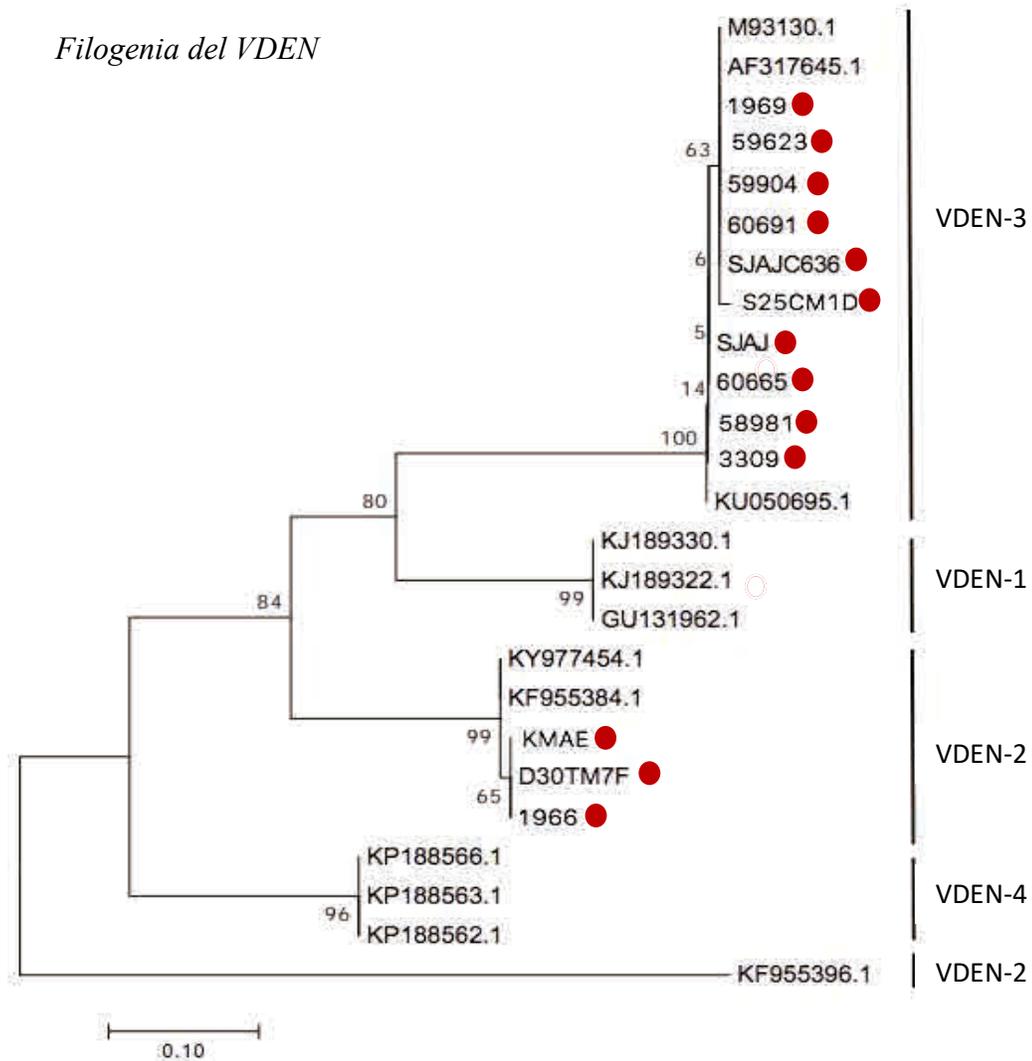


Figura 9. Análisis filogenético de la relación evolutiva de 13 secuencias de VDEN identificados en residentes de Reynosa. Análisis filogenético (método Neighbor-Joining) (Saitou *et al.*, 1987) se analizaron secuencias aisladas de VDEN1-4 pertenecientes al gen de la proteína no estructural 3 (NS3). Las secuencias correspondientes a la ciudad de Reynosa están denotadas en círculos rojos. El árbol esta a escala, la longitud de las ramas son las mismas que las unidades para inferir las distancias evolutivas del árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el parámetro de Kimura 2 (Kimura, 1980). El análisis involucró a 25 secuencias de nucleótidos, los “gaps” y datos faltantes fueron eliminados. Hubo un total de 145 posiciones al final del grupo de datos. El análisis evolutivo fue realizado en MEGA (Kumar *et al.*, 2016).

Referencias

Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987 4:406-425.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 1980 16:111-120.

Kumar S, Stecher G, and Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2016 33:1870-1874.

Cuadro 1. Secuencias de VDENV usadas en el estudio de la filogenia

Identificación y/o No. Acceso Genbank	Serotipo	Hospedero	Localidad	Año
KJ189330.1	1	Humano	México	2007
KJ189322.1	1	Humano	México	2007
GU131962.1	1	Humano	México	2007
KY977454.1	2	Humano	Panamá	2011
KF955384.1	2	Humano	Nicaragua	2001
KMAE	2	Humano	México	2015
D30TM7F	2	Humano	México	2014
1966	2	Humano	México	2015
KF955396.1	2	Humano	México	2008
M93130.1	3	Humano	México	1990
AF317645.1	3	Humano	China	2001
1969	3	Humano	México	2015
59623	3	Humano	México	2015
59904	3	Humano	México	2015
60691	3	Humano	México	2015
SJAJC636	3	Humano	México	2016
S25CM1D	3	Humano	México	2014
SJAJ	3	Humano	México	2016
60665	3	Humano	México	2015
58981	3	Humano	México	2015
3309	3	Humano	México	2016
KU050695.1	3	Humano	Filipinas	1956
KP188566.1	4	Humano	Brasil	2013
KP188563.1	4	Humano	Brasil	2013
KP188562.1	4	Humano	Brasil	2012

Cuadro 2. Secuencia de nucleótidos y posición de los cebadores (DV1) consenso (río arriba) y de (DSP1-4) tipo-específico río abajo (Seah *et al.*, 1995)

Cebador (y orientación)	Secuencia (5'-3')	Región	Posición del nucleótido	Longitud (pb)	Tm (°C)
DV1 (+)	GGRACKTCAGGWTCTCC	NS3			54.3
DSP1 (-)	AGTTTCTTTTCCTAAACACCTCG	NS3	5067-5045	169	54.3
DSP2 (-)	CCGGTGTGCTCRGCYCTGAT	NS3	5279-5260	362	54.3
DSP3 (-)	TTAGAGTYCTTAAGCGTCTCTTG	NS3	5174-5152	265	54.3
DSP4 (-)	CCTGGTTGATGACAAAAGTCTTG	NS3	5342-5320	426	54.3
K, G/T; R, A/G; W, A/T; Y, C/T					

Seah CL, Chow VT, Tan HC, Can YC. Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. *J Virol Methods*. 1995 Feb; 51(2-3):193-200.

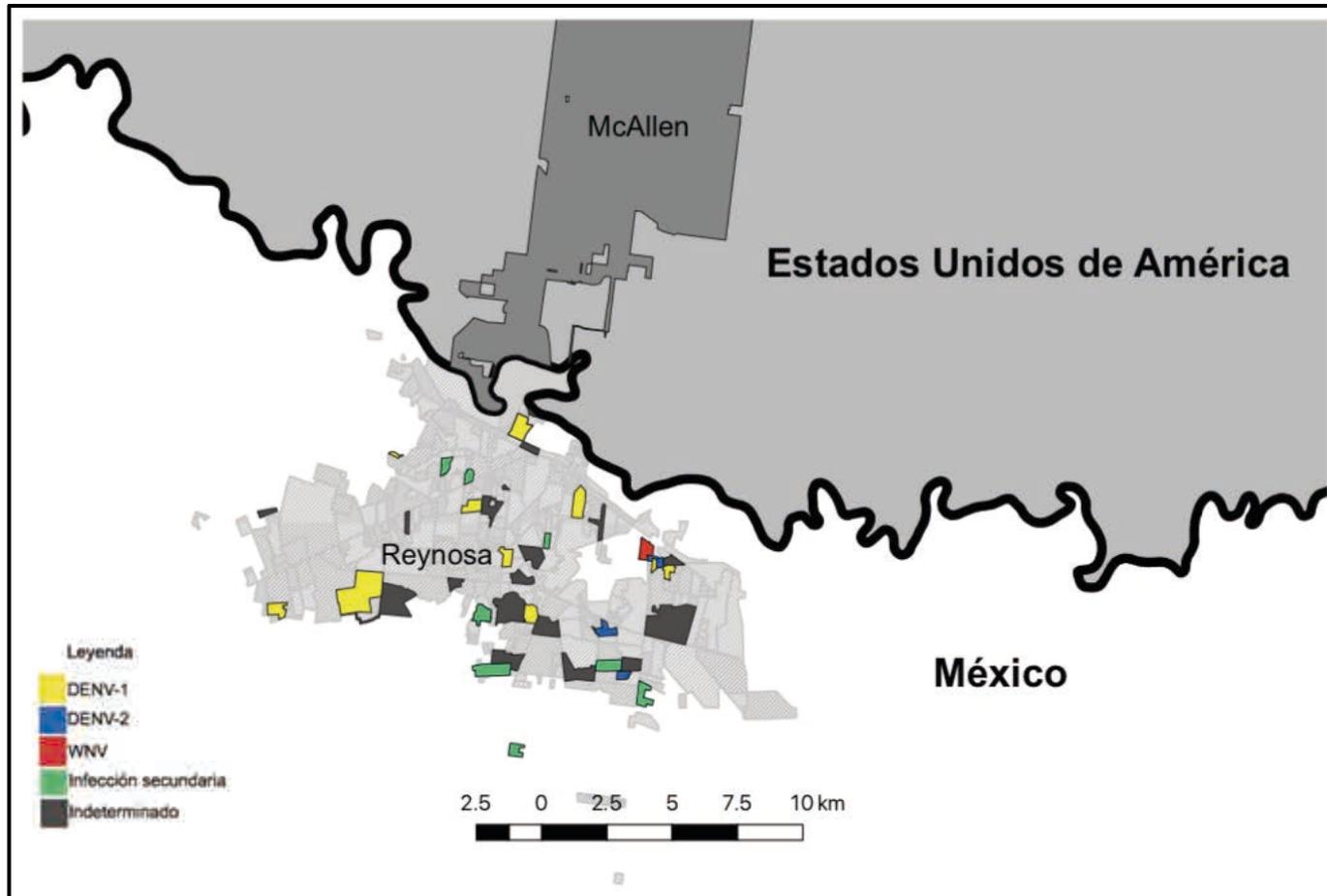


Figura 10. Mapa del área metropolitana Reynosa-McAllen mostrando las colonias en la ciudad de Reynosa que presentaron anticuerpos anti-arbovirus detectados por PRNT durante el estudio. Colonias que presentaron anticuerpos anti-VDEN-1 (denotados en amarillo), anticuerpos anti-VDEN-2 (denotados en azul), anticuerpos anti-VON (denotado en rojo), infecciones secundarias por arbovirus (denotados en verde) e infecciones indeterminados por arbovirus (denotados en gris).

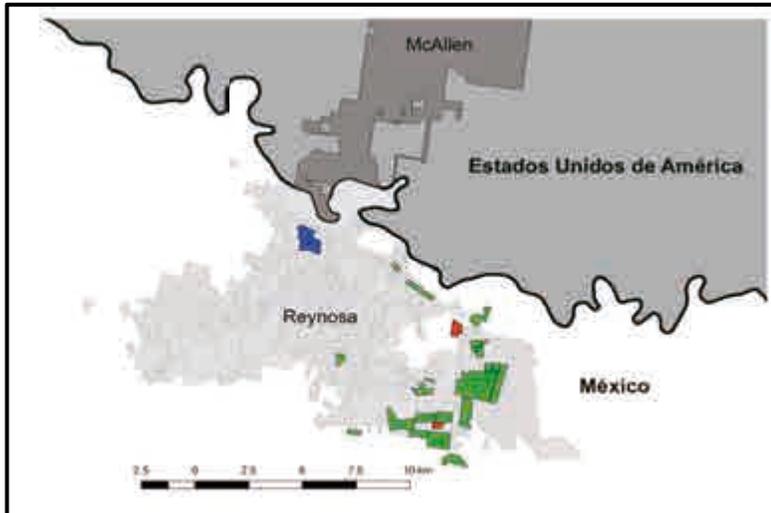


Figura 11. Mapa del área metropolitana Reynosa-McAllen mostrando la circulación de serotipos de VDEN en colonias de la ciudad de Reynosa en 2014 durante el estudio. Colonias con detección de VDEN-1 (denotados en verde), VDEN-2 (denotados en azul), y detección de múltiples serotipos en una sola colonia (denotados en rojo).

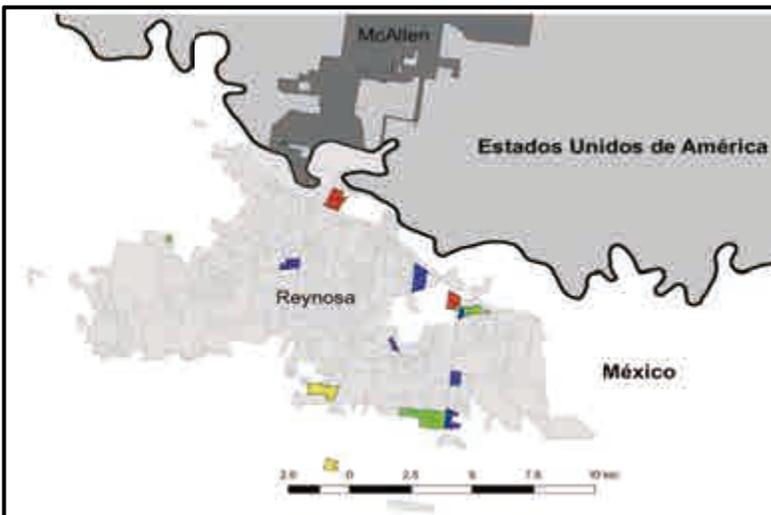


Figura 12. Mapa del área metropolitana Reynosa-McAllen mostrando la circulación de serotipos de VDEN en colonias de la ciudad de Reynosa en 2015 durante el estudio. Colonias con detección de VDEN-1 (denotados en verde), VDEN-2 (denotados en azul), VDEN-3 (denotados en amarillo), y detección de múltiples serotipos en una colonia (denotados en rojo).

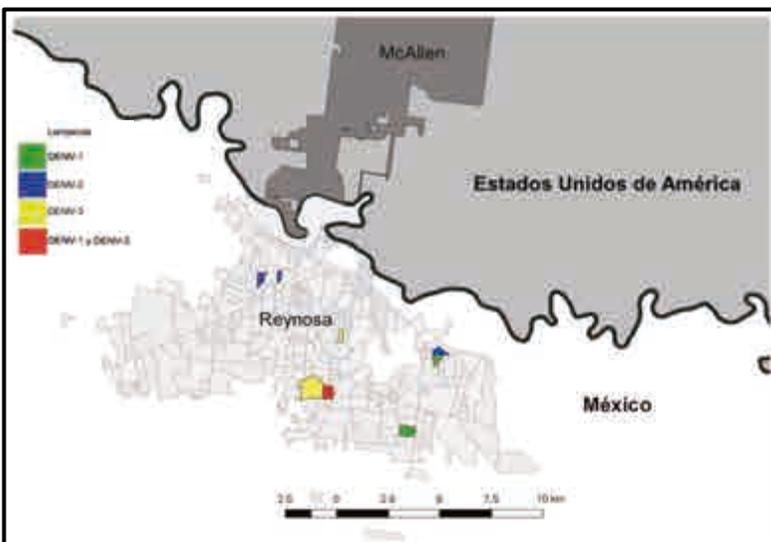


Figura 13. Mapa del área metropolitana Reynosa-McAllen mostrando la circulación de serotipos de VDEN en colonias de la ciudad de Reynosa en 2016 durante el estudio. Colonias con detección de VDEN-1 (denotados en verde), VDEN-2 (denotados en azul), VDEN-3 (denotados en amarillo), y detección de múltiples serotipos en una colonia (denotados en rojo).

Capítulo III

Aislamiento viral de VCHIK

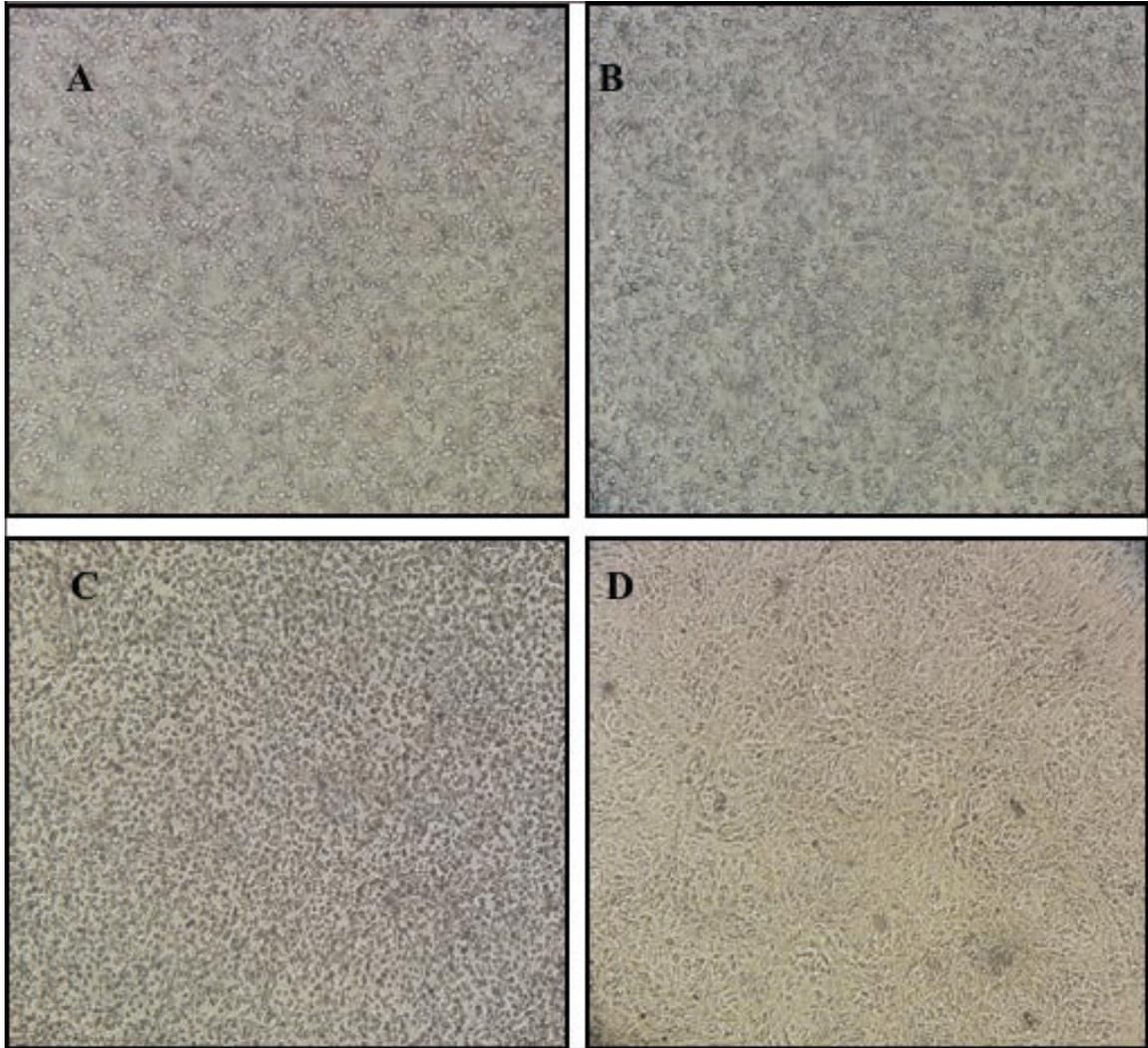


Figura 1. Aislamiento de VCHIK en células Vero. A) muestra CHIKV-R-1972, B) muestra VCHIK-R-1950, C) Muestra CHIKV-R-2295, D) Testigo negativo de células Vero. Las muestras con VCHIK presentaron un Efecto Citopático (ECP) a los tres días post-infección.

Genotipificación de VCHIK

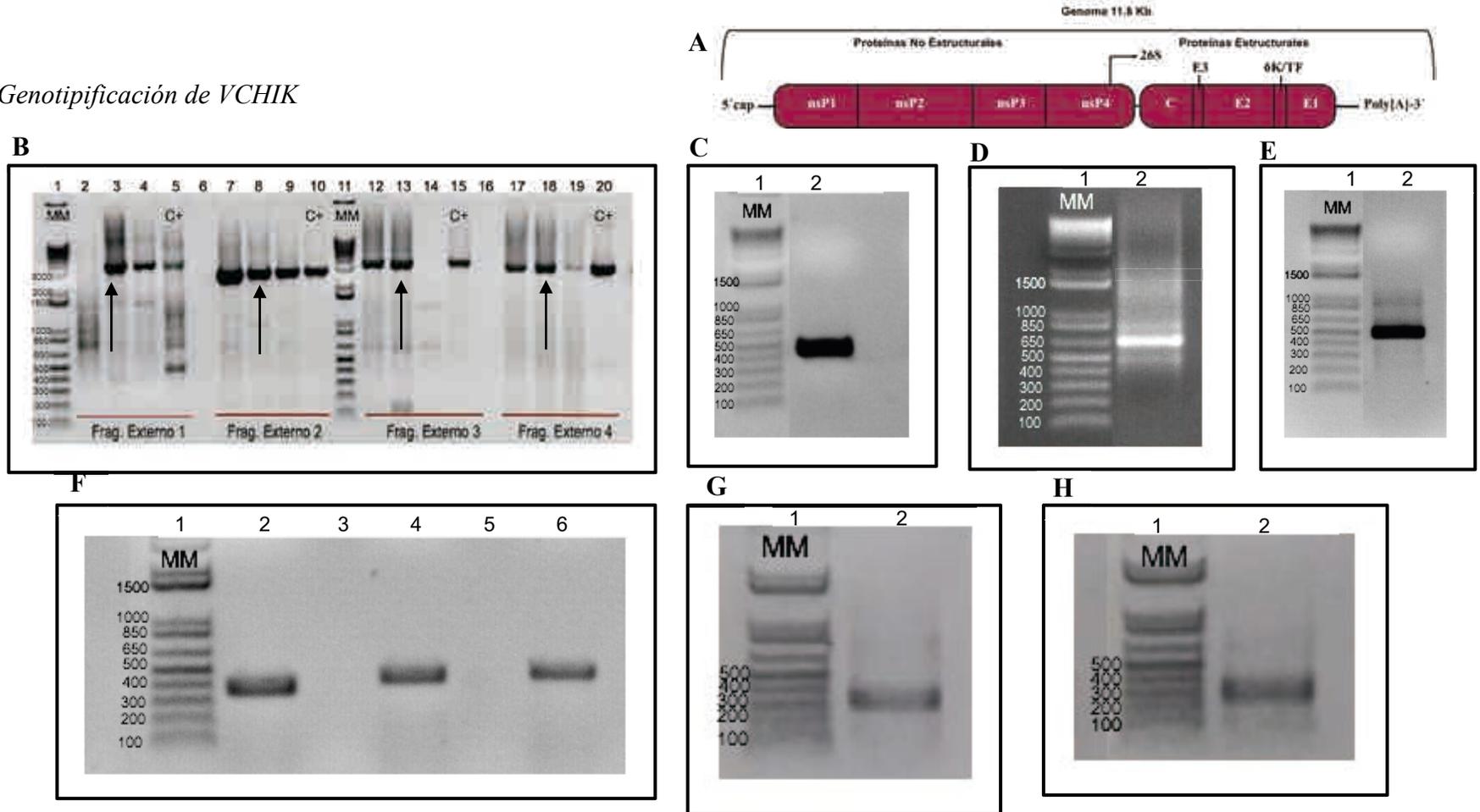


Figura 2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación del aislamiento CH-R-1950 del VCHIK en gel de agarosa al 1%. A) Genoma de VCHIK. B) Carril 1: Marcador molecular 100 pb, TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), carril 3: Región 5'-UTR-NSP2 (fragmento esperado 3421 pb); indicado por la flecha negra, carril 5: aislado de VCHIK del estado de Yucatán (testigo positivo), carril 8: Región NSP2-NSP3 (fragmento esperado 2265 pb); indicado por la flecha negra, carril 10: testigo positivo, carril 11: Marcador molecular 100 pb, carril 13: Región NSP3-E3 (fragmento esperado 3285 pb); indicado por la flecha negra, carril 15: testigo positivo, carril 18: Región C-E1(fragmento esperado 3050 pb); indicado por la flecha negra, carril 20: testigo positivo. C) Carril 1: Marcador molecular 100 pb, carril 2: Región 5'-UTR-NSP1 (fragmento esperado 442 pb). D) Carril 1: Marcador molecular 100 pb, carril 2: Región E1-3'-UTR (fragmento esperado 1477 pb). E) Carril 1: Marcador molecular 100 pb, carril 2: Región 3'-UTR (fragmento esperado 789 pb). F) Carril 1: Marcador molecular 100 pb, carril 2: Región E1 (fragmento esperado 370 pb), carril 4: Región E1-3'-UTR (fragmento esperado 567 pb), carril 6: Región E1-3'-UTR (fragmento esperado 755 pb). G) Carril 1: Marcador molecular 100 pb, carril 2: Región 3'-UTR (fragmento esperado 300 pb). H) Carril 1: Marcador molecular 100 pb, carril 2: Región 3'-UTR (fragmento esperado 300 pb).

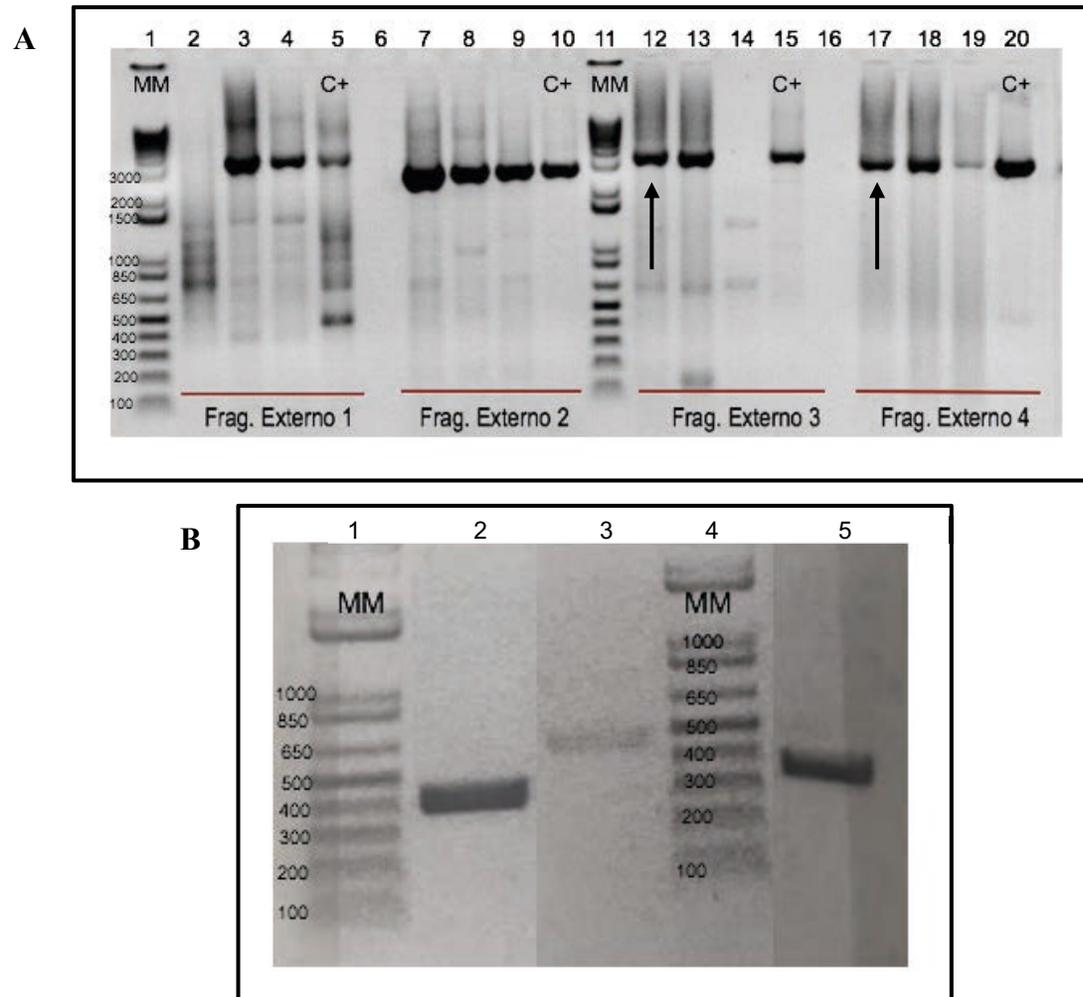


Figura 3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de los aislamientos CH-R-1972 y CH-R-2295 del VCHIK en gel de agarosa al 1%. A) Producto de PCR del aislamiento de CH-R-1972. Carril 11: Marcador molecular 100 pb, TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), carril 12: Región NSP3-E3 (fragmento esperado 3285 pb); indicado por la flecha negra, carril 15: testigo positivo, carril 17: Región C-E1 (fragmento esperado 3050 pb); indicado por la flecha negra, carril 20: testigo positivo. B) Producto de PCR del aislamiento de CH-R-2295. Carril 1: Marcador molecular 100 pb, carril 2: Región C (fragmento esperado 369 pb), carril 3: Región 6K-E1 (fragmento esperado 368 pb), carril 4: Marcador molecular 100 pb, carril 5: Región 3'-UTR (fragmento esperado 388 pb).

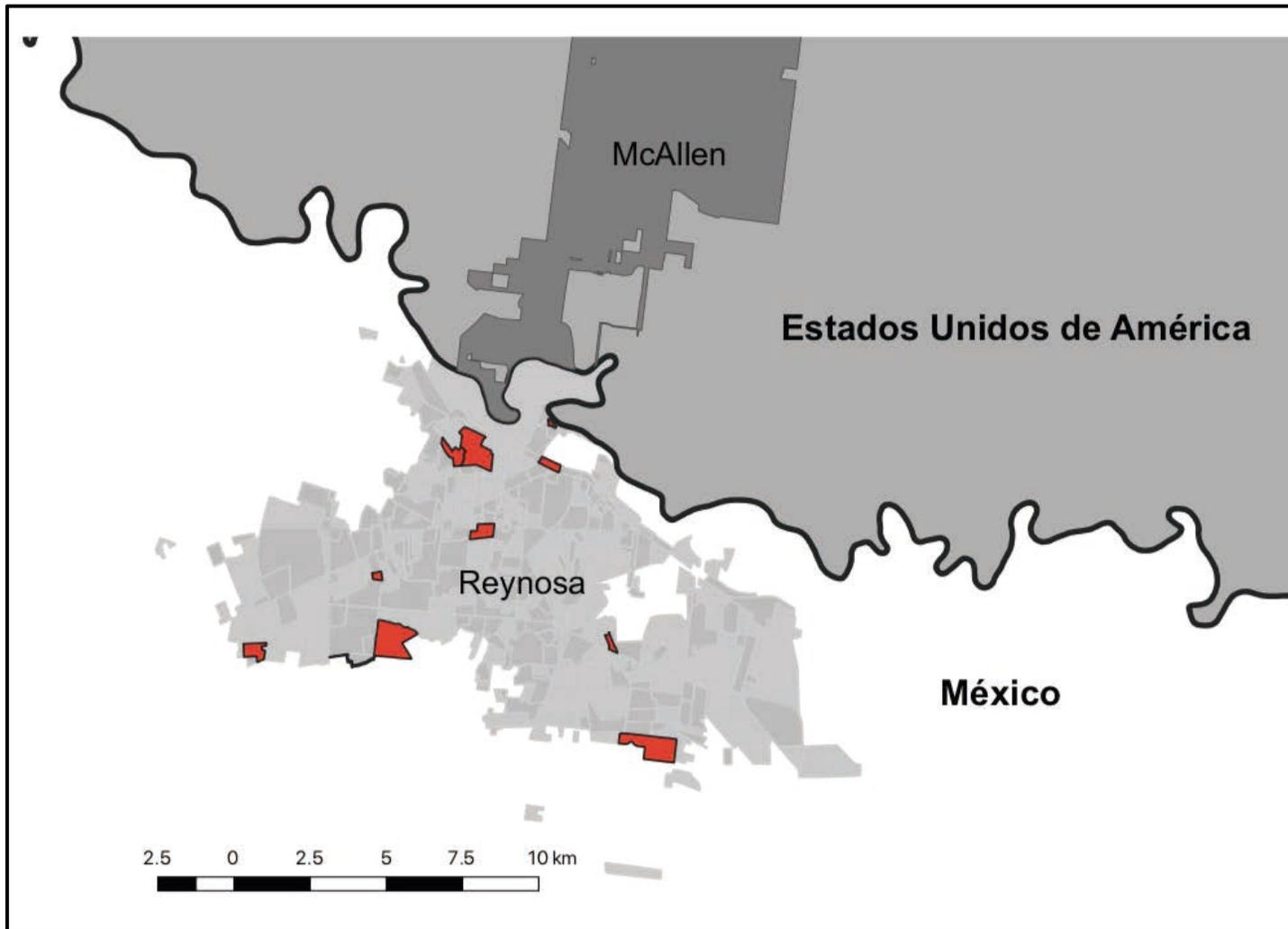


Figura 4. Mapa del área metropolitana Reynosa-McAllen mostrando la circulación de VCHIK en diversas colonias de la ciudad de Reynosa en 2015 durante el estudio. Detección de casos por VCHIK (denotados en rojo).

Cuadro 1. Cebadores utilizados para el ensayo RT-PCR y secuenciación del genoma de VCHIK

Cebador	Secuencia (5'-3')	Región	Posición del nucleótido*	Longitud (bp)	Tm (°C)
SEQ55F	CGTGAGACACACGTAGCCTAC	5'-UTR	1-21	442	57.2
SEQ56R	CGGCCATCACCTCTTGTAAGTC	NSP1	420-442		57.6
P1FW	AGGCCCTGCAACGTGCGTAC	5'UTR	115-135	3421	63.1
P1RW	CCTTTTACTGGGCGGTGTTCCGGC	NSP2	3513-3536		62.8
P1FW	AGGCCCTGCAACGTGCGTAC	5'UTR	115-135	688	63.1
SEQ1R	GACCTACTGAGAACAGCACACGG	NSP1	779-803		61.1
SEQ2F	GGCGTACTGGGTAGGGTTCGACAC	NSP1	584-608	648	63
SEQ3R	GCGACCACGGGAAGCAGGTAGTTCT	NSP1	1207-1232		64.4
SEQ4F	CCGACACGGTAGACGGTCAAAGAGT	NSP1	1021-1046	586	62
SEQ5R	AGGGGTGGTAGAGCCTCATGAGTC	NSP1	1583-1607		61.8
SEQ6F	GTAGTACCAGGCCTGTGGTTCGTCC	NSP1	1419-1443	586	62.7
SEQ7R	GTCCGTGCATCGCAATGTGGTGTAAAC	NSP2	1919-2005		62.2
SEQ8F	CGTGTACGCATAGCGGACGAGCA	NSP1	1822-1845	518	63.3
SEQ9R	CATCACGTCGGTGCTGATTTCTTGGC	NSP2	2314-2340		62.1
SEQ10F	ACTAATCCGCCCTACCACGAATTCGC	NSP2	2142-2168	617	62.4
SEQ11R	CCTCTGAAGCACGTAAACACGAGGTC	NSP2	2733-2759		61
SEQ12F	GACTGCCATTGTGTCGTGTTGCAT	NSP2	2624-2649	622	61.9
SEQ13R	GCGCGTGCATATTTTCATTCAGGGC	NSP2	3222-3246		61.3
P2FW	CGGGCATCTGCAGTCACCAAGTGA	NSP2	3049-3073	2665	63.4
P2RW	GGCAGCACTGACTGGCGTACC	NSP3	5693-5714		63
P2FW	CGGGCATCTGCAGTCACCAAGTGA	NSP2	3049-3073	621	63.4
SEQ14R	ATGTATAGTCCGCTCCGCGGACAC	NSP2	3646-3670		62.5
SEQ15F	CCCTGAGGCAGCGTCCATTCTAGAAA	NSP2	3356-3382	477	62.2
SEQ16R	CCACCCGGTTTGAGCAGTCTCAGTG	NSP2	3808-3833		63.4

SEQ17F	CATCATGTGCTCCTGGTTAGCGGC	NSP2	3573-3597	601	62.2
SEQ18R	CCTTGCAAACACCGTCACCCGGTAA	NSP2	4149-4179		63.4
SEQ19F	AACGCAGCCTTTGTAGGACAGGCC	NSP2	4029-4053	591	63.7
SEQ20R	CAAACACTGTGCAGGGTGCACGCGA	NSP3	4595-4620		63
SEQ21F	GGAGGGAAAGACAGGCTAACCCAGTC	NSP3	4413-4439	659	62.4
SEQ22R	CTCACTCCCGTACAGACTCCTGGG	NSP3	5047-5072		62
SEQ23F	CGTCACCCGACTTCGCATGAACCAT	NSP3	4883-4908	615	63.1
SEQ24R	TCCCCAAATGTGATGGGGAACGTCTC	NSP3	5472-5498		62.5
SEQ25F	CAGCCCTAGAACCGGCCCTAGAC	NSP3	5161-5184	658	63.1
SEQ26R	GTGGACGCACTCTCCTGGAGTTT	NSP3	5796-5820		62.8
P3FW	TCGCGCCGCCTAGAAGAAGGAG	NSP3	5251-5273	3285	63.3
P3RW	TGGTCCTTAATACTGCGCCGCTGG	E3	8512-8536		63.2
SEQ27F	GGAGACTTCTACCCGGTGAAGTGG	NSP3	5547-5572	599	61.2
SEQ28R	GACGGATTGAATGTCGCTCGGTCC	NSP4	6122-6146		61.7
SEQ29F	CGATTGTCCAATCCCGAGTCCGCA	NSP4	5985-6009	512	63.1
SEQ30R	TCCATTGGTACATCCTGCAGCGGC	NSP4	6473-6497		63.6
SEQ31F	TCGCATGCAACCGAGAATACTGGGA	NSP4	6337-6362	622	62.2
SEQ32R	CAACACCCGGCTAGCGATGGTGATA	NSP4	6974-7000		62.5
SEQ33F	CACTTGCGCTTACCGCCTTAATGCT	NSP4	6790-6815	620	61.9
SEQ34R	GGTGGCCATGGACATTACAGCAACT	NSP4	7385-7410		61.5
SEQ35F	AAACCGTTAGCGGCAGGTGACGAA	NSP4	7245-7269	623	63
SEQ36R	CATGCACATTCTCTCTGCGGCC	C	7844-7868		62.1
SEQ37F	CGTGGTACCTCAACAGAAGCCGCG	C	7708-7732	650	63.9
SEQ38R	GCAGGCACATAACTGGAATGGCCAG	C	8333-8358		62.3
SEQ39F	AGGCCGATTCACCATCCCTACAGGTG	C	8140-8166	646	63.9
SEQ40R	TGACGTTCTTACAAATAGCCCGGCC	E2	8760-8786		62.7
P4FW	CGTCACGAAAATCACCCCTGAGGGG	C	8293-8318	3050	63.3

P4RW	TATGCGGTGTGTCTCTTTAGGGACGC	E1	11320-11346		62.1
SEQ41F	GTCCCGTAGCGCTAGAACGCATCA	E3	8610-8634	594	62.8
SEQ42R	CGGCATGGCATTGATCGACCTTGC	E2	9180-9204		63
SEQ43F	CCCAGACACCCCAGATCGCACATTA	E2	9037-9062	611	62.5
SEQ44R	ACGAGGCCACTGACAAAACCTACCGC	E2	9623-9648		63.1
SEQ45F	GAGATCAGGTTAACCGTGCCGACTGA	E2	9467-9493	605	61.9
SEQ46R	AGCTCCATCTCCAATACCATGGGGC	6K	10047-10072		62.6
SEQ47F	TATCCGCTGGCAGCCCTGATTGTC	E2	9859-9884	630	63.1
SEQ48R	GGTGTCCAGGCTGAAGACATTGGC	E1	10465-10489		62.2
SEQ49F	CATCAGCATAACAGGGCTCATAACCGCA	E1	10329-10355	582	62.4
SEQ50R	CAAAGTCTGAGGAATGGGTGCAGGCT	E1	10885-10911		62.8
SEQ51F	TTGGCTAAAAGAACGAGGGGCGTCCG	E1	10699-10724	485	63.1
SEQ52R	CGGAAATGTCTTGGACCCCGAGGG	3'UTR	11160-11184		63.5
SEQ53F	AACGCCGTCACTATTCGGGAAGCT	E1	10976-11000	567	62.5
SEQ54R	GGGGTTGTTTCAGCCCTTTGATCTATGC	3'UTR	11516-11543		61.5
SEQ57F	GTATAGATCTAAGGGCTGAACAACCCC	3'UTR	11367-11394	364	58.3
SEQ58R	GTTATTATTCAGGGGTTGTTTCAGCCC	3'UTR	11705-11731		57.8
SEQ59F	GTCCCCTAAGAGACACACCAT	3'UTR	11648-11669	508	56.1
SEQ60R	CCTACGTCCCTATGGGTACG	3'UTR	12136-12156		56.3
SEQ59F	GTCCCCTAAGAGACACACCAT	3'UTR	11648-11669	528	56.1
SEQ61EXR	TTAAAAACAAAATAACATCTCCTACGTC	3'UTR	12148-12176		52.4
CH-222F	GAAGAGATGTAGGTACTTAAG	3'UTR	11864-11885	300	47.0
3RACE-PCRR	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	3'UTR	12156-12176		61.6
CH-222F	GAAGAGATGTAGGTACTTAAG	3'UTR	11864-11885	300	47.0
CH-444R	GAAATATTA AAAACAAAATAACATC	3'UTR	12151-12176		44.2
100PCRF	GACCATCGATAACGCGGACCTGG	3'UTR	10081-10103	369	61.7

100PCRR	CGAAGAGTGGAGTCTGGCCAT	3'UTR	8320-8341		59.0
200PCRF	CACCTTGGAACCAACGCTATCG	3'UTR	7972-7995	368	58.3
200PCRR	CGTCCTTAACTGTGACGGCATG	3'UTR	10427-10449		58.2
300PCRF	ATCTCCATCGACATACCGGACG	3'UTR	10805-10827	388	61.6
3000PCRR	TCGCCGTAG CGGAAATGTCTTGG	3'UTR	11170-11193		58.3

Secuencia del genoma completo del aislado CH-R-1950

GenBank: MG921596.1 (12160 pb)

>MG921596.1 Chikungunya virus isolate CH-R-1950, complete genome
CGTGAGACACACGTAGCCTACCAGTTTCTTACTGCTCTACTCTGCAAAGCAAGAGATTAATAACCCATCA
TGGATTCTGTGTACGTGGATATAGACGCTGACAGCGCCTTTTTGAAGGCCCTGCAACGTGCGTACCCCAT
GTTTGAGGTGGAACCTAGGCAGGTCACATCAAATGACCATGCTAATGCTAGAGCGTTTCTCGCATCTAGCC
ATAAACTAATAGAGCAGGAAATTGATCCCGACTCAACCATCCTGGATATAGGTAGTGCGCCAGCAAGGA
GGATGATGTCGGACAGGAAGTACCACTGCGTTTTGCCGATGCGCAGCGCAGAAGATCCCGAGAGACTCGC
TAATTATGCGAGAAAGCTCGCATCTGCCGAGAAAAGTCCTGGACAGAAACATTTCTGGAAAGATCGGG
GACTTACAAGAGGTGATGGCCGTGCCAGACACGGAGACGCCAACATTTTGCCTACACACAGATGTCTCAT
GTAGACAGAGAGCAGACGTCGCGATATACCAAGACGTCTATGCTGTACATGCACCCACGTCGCTATATCA
CCAGGCGATTAAAGGAGTCCGAGTGGCGTACTGGGTAGGGTTCGACACAACCCCGTTTCATGTACAACGCT
ATGGCGGGTGCCTACCCCTCATACTCGACAAATTGGGCGGATGAGCAGGTAAGGCTAAGAACATAG
GATTATGTTCAACAGACCTGACAGAAGGTAGACGAGGCAAATTGTCTATCATGAGAGGGAAAAAGCTAAA
ACCGTGCAGCCGTGTGCTGTTCTCAGTAGGGTCAACGCTTTACCCGAAAGCCGCATGCTACTTAAGAGC
TGGCACCTACCATCGGTGTTCCATCTAAAGGGCAAGCTTAGCTTCACATGCCGCTGTGACACAGTGGTTTT
CGTGTGAGGGCTACGTCGTTAAGAGAATAACGATGAGCCCAGGCCTTTATGGAAAAACCACGGGGTATGC
GGTAACCCACCACGCAGACGGATTCTTGATGTGCAAGACTACCGACACGGTAGACGGTGAAAGAGTGTCA
TTCTCGGTGTGCACGTACGTGCCGGCGACCATTTGTGATCAAATGACCGGCATCCTTGCTACAGAAGTCA
CGCCGGAGGATGCACAGAAGCTGTTGGTGGGGCTGAACCAGAGAATAGTGGTTAACGGCAGAACGCAACG
GAACACGAACACCATGAAGAACTACCTGCTTCCCGTGGTGCAGCCAGGCCTTCAGTAAGTGGGCGAAGGAG
TGCCGGAAGGACATGGAAGATGAGAAGCTTTTGGGGGTGAGAGAAAGAACTGACCTGCTGCTGTCTGT
GGGCATTTAAGAAGCAGAAAACACACACGGTCTACAAGAGGCCTGATACCCAGTCAATCCAGAAGGTTCA
GGCCGAATTCGACAGCTTTGTAGTACCAGGCCTGTGGTTCGTCGCGGGTGTCAATCCCGTTGAGGACTAGA
ATCAAGTGGCTGTTACGCAAGGTGCCGAAAGCAGACCTGATCCCATATAGCGGAAATGCCCAAGAAGCCC
AGGATGCTGAAAAAGAAGCAGAGGAAGAACGAGAAGCAGAAGTACTGACTCATGAGGCTCTACCACCCCTACA
GGCAGCACAGGAAGATGTCCAGGTCGAAATCGACGTGGAACAACCTTGAGGATAGAGCTGGTGTGCTGGAATA
ATAGAGACTCCGAGAGGCGCTATTAAGTTACTGCCCAACTAACGGACCACGTCGTGGGGGAGTACCTGG
TACTTTCCCGCAGACCGTATTACGCAGCCAGAAGCTCAGCCTGATCCACGCTTTAGCGGAGCAAGTGAA
GACGTGTACGCATAGCGGACGAGCAGGGAGGTATGCGGTGCAAGCGTACGATGGCCGAGTCTTAGTGCCC
TCAGGCTATGCAATTTTCGCCCCGAAAGACTTCCAGAGTCTAAGCGAAAGCGCAACGATGGTGTACAACGAAA
GAGAGTTTCGTAAACAGAAAGTTACACCACATTGCGATGCACGGACCAGCTCTGAACACTGACGAAGAGTC
GTATGAGCTTGTGAGGGCAGAGAGGACAGAACACGAGTACGTCTACGACGTGGACCAGAGAAGATGCTGC
AAGAAGGAAGAAGCTGCAGGATTGGTACTGGTGGGCGACTTGACTAATCCGCCCTACCACGAATTCGCAT
ACGAAGGGCTAAAAATTCGCCCCGCTTGTCCATATAAAAATTCAGTTCATAGGAGTCTTCGGGGTACCAGG
ATCTGGTAAGTCAGCCATTATCAAGAACCTAGTTACCAGGCAAGACCTGGTACTAGCGGAAAGAAAGAA
AACTGCCAAGAAATCAGCACCGACGTGATGAGACAGAGAGGTCTAGAAATATCTGCACGTACGGTTGATT
CGCTGCTCTTGAATGGATGCAATAGACCAGTGCAGCTGTTGTACGTAGACGAGGCGTTTTCGCTGCCACTC
TGGAACGTTACTTGCCTTGATCGCCTTGGTGGAGACCAAGACTGAAAGTTGTACTTTGTGGTGACCCGAAG

CAGTGCGGCTTCTTCAATATGATGCAGATGAAAGTCAACTACAATCATAACATCTGCACTCAAGTGTACC
ACAAAAGTATTTCCAGGCGGTGTACACTGCCTGTGACTGCCATTGTGTCTGTCGTTGCATTACGAAGGCAA
AATGCGCACTACGAATGAGTACAACATGCCGATTGTAGTGGACACTACGGGCTCAACAAAACCTGACCCT
GGAGACCTCGTGTTAACGTGCTTCAGAGGGTGGGTTAAACAACCTGCAAATTGACTATCGTGGACACGAGG
TCATGACAGCAGCCGCATCCCAAGGGTTAACCAGAAAAGGAGTTTACGCAGTTAGGCAAAAAGTTAACGA
AAACCCACTCTATGCATCAACATCAGAGCACGTCAACGTACTCCTAACGCGTACGGAAGGTAAACTGGTA
TGGAAGACTCTCTGGTGACCCGTGGATAAAGACGCTGCAGAACCACCGAAAGGAAACTTCAAGGCAA
CTATTAAGGAGTGGGAGGTGGAGCACGCATCGATAATGGCGGGCATCTGCAGTCACCAAGTGACCTTTGA
CACGTTCCAAAACAAAGCCAACGTTTGTCTGGGCTAAGAGCTTGGTCCCTATCCTTGAAACAGCGGGGATA
AAACTAAATGATAGGCAGTGGTCCCAGATAATTCAAGCTTTCAAAGAAGACAAAGCATACTCACCCGAAG
TAGCCCTGAATGAAATATGCACGCGCATGTATGGGGTGGATCTAGACAGCGGGCTATTCTCTAAACCGTT
GGTATCTGTGTATTACGCGGATAACCACTGGGATAATAGGCCGGGAGGAAAGATGTTCCGATTCAACCT
GAGGCAGCGTCCATTCTAGAAAGAAAGTACCCGTTTACAAAAGGAAAGTGGAACATCAACAAGCAGATCT
GCGTGACTACCAGGAGGATAGAAGACTTCAACCCTACCACCAACATTATACCGGCCAACAGGAGACTACC
ACACTCATTAGTGGCCGAACACCGCCAGTAAAAGGGGAAAGAATGGAATGGCTGGTTAAACAAGATAAAC
GGACATCATGTGCTCCTGGTTAGCGGCTATAACCTTGCCTACTAAGAGAGTCACCTGGGTAGCGC
CACTAGGTGTCCGCGGAGCGGACTATACATAACCTAGAGCTGGGTCTACCGGCAACACTTGGTAGGTA
TGACCTAGTGGTCATAAACATCCACACACCTTTTCGCATACACCATTACCAACAGTGCGTAGATCACGCA
ATGAAACTGCAAATGCTAGGAGGTGACTCACTGAGACTGCTCAAACCGGGTGGCTCTCTATTGATCAGAG
CATACGGTTACGCAGATAGAACCAGTGAACGAGTAATCTGCGTACTGGGACGTAAGTTTAGATCGTCCAG
AGCATTGAAACCACCATGTATCACCAGTAATACTGAGATGTTCTTCTTATTTAGCAGTTTTGACAACGGC
AGAAGGAATTTTACAACGCATGTTATGAACAATCAACTGAACGCAGCCTTTGTAGGACAGGCCACCCGAG
CAGGATGTGCACCATCATAACCGGTAAAGCGCATGGACATCGCGAAGAACGATGAAGAGTGCGTGGTCAA
CGCCGCCAACCTCGCGGGTTACCGGGTGACGGTGTGTTGCAAGGCAGTATATAAAAAATGGCCGGAGTCC
TTTTAAAAATAGTGCAACACCAGTAGGAACCGCAAAAACAGTTATGTGCGGTACATATCCAGTAATCCATG
CCGTAGGACCAAACCTTCTCAAATTACACGGAGTCCGAAGGGGACCGGGAATTGGCGGCTGCCTATCGAGA
AGTCGCAAAGGAAGTAAGTACTGAGACTGGGAGTAAATAGCGTAGCTATACCTCTCCTCTCCACAGGTGTATAC
TCAGGAGGGAAAGACAGGCTAACCCAGTCACTGAACCACCTCTTTACAGCCATGGACTCGACGGATGCAG
ACGTGGTCACTACTGCCGAGACAAGGAATGGGAGAAGAAAATATCTGAGGCCATACAGATGCGGACCCA
AGTGGAGCTGCTGGATGAGCACATCTCCATAGACTGCGATGTCATTGCGGTGCACCCTGACAGTAGTTTG
GCAGGTAGAAAAGGATACAGCACCGGAAGGCGCACTGTATTATATCTAGAAGGGACACGTTTTCCACC
AGACGGCAGTGGATGTGGCAGAGATACATACTATGTGGCCAAAGCAAATAGAGGCCAATGAGCAAGTCTG
CCTATATGCCCTGGGGGAAAGTATTGAGTCAATCAGGCAGAAATGCCCGGTGGATGATGCAGATGCATCA
TCTCCCCCGAAAACCGTCCCCTGCTTTGCCGTTATGCCATGACTCCTGAACGCGTCAACCGACTTCGCA
TGAACCATGTACAAATATAATTGTGTGTTCTTCAATTTCCCTTCCAAAGTACAAGATAGAAGGAGTGCA
AAAAGTCAAATGCTCCAAGGTAATGTTATTTGATCACAATGTGCCATCGCGCGTAAGTCCAAGGGGAATAC
AGATCTTCCCAGGAGTCTGTACGGGAAGTGAAGTATGACAACGTCATCGACGCATAGTCAGTTTGATCTAA
GCGCCGATGGCGAGACTGCCCGTCCCCTCAGACCTGGATGCTGACGCCCCAGCCCTAGAACCAGCCCT
AGACGACGGGGCGATACATACGACCGGAAACCTTGCGGCCGTGTCTGACTGGGTAATGAGCACCGTACCC
GTCGCGCCGCTAGAAGAAGGAGAGGGGAGAAACCTGACCGTGATATGTGACGAGAGAGAAGGGGAATATAA
CACCCATGGCTAGCGTCCGATTCTTTAGAGCAGAGCAGTGTCCGACCGTACAAGAAACAGCGGAGACGCG

TGACACAGCTATTTCCCTTTTCGGGCACCGCCAAGTATCACCGTGGAATTGAGCCATCCACCGATCTCCTTC
GGAGCACCAAGCGAGACGTTCCCCATCACATTTGGGGACTTCAACGATGGAGAAATCGAAAGCTTGTCTT
CTGAGCTACTAACTTTTCGGAGACTTCCCTACCCGGTGAAGTGGATGATTTGACAGATAGCGACTGGTCCAC
GTGCTCAGACACGGACGACGAGTTATGACTAGACAGGGCAGGTGGGTATATATTCTCGTCGGACACTGGT
CCAGGCCATTTACAACAGAAGTCGGTACGCCAGTCAGTGCTGCCGGTAAACACCCTGGAGGAAGTTCACG
AGGAGAAGTGTACCCACCTAAGCTGGATGAATTAAGGAGCAACTACTACTTAAGAACTCCAGGAGAG
TGCGTCCACGGCCAATAGAAGCAGGTATCAATCACGCAAAGTGGAAAATATGAAAGCAACAATCATCCAG
AGACTAAAGAGAGGCTGTAAACTGTATTTAATGGCAGAGACCCCGAAAGTCCCGACTTATCGGACCGTAT
ACCCGGCGCCTGTGTACTCGCCTCCGATCAACGTCCGATTGTCCAATCCCGAATCCGCAGTGGCAGCATG
TAATGAGTTCTTAGCTAGAACTACCCAAGTGTTCATCATACCAAATCACCGATGAGTATGATGCATAT
CTAGACATGGTGGACGGGTCGGAGAGTTGCTTGGACCGAGCGACATTCAATCCGTCAAACTTAGGAGCT
ACCCGAAACAACATGCTTATCACGCGCCCTCTATCAGAAGCGCTGTACCTTCCCCATTCCAGAACACACT
ACAGAATGTACTGGCAGCAGCCACGAAAAGGAAGTGAACGTACACAGATGAGGGAATTACCCACTTTG
GACTCAGCAGTATTCAACGTGGAGTGTTTTAAAAAATTCGCATGCAACCGAGAATACTGGGAAGAATTTG
CTGCCAGCCCTATCAGGATAACGACTGAGAACCTAACAACTATGTCACTAAATTAAGGGGGCCAAAAGC
AGCAGCGTTGCTTGAAGAACCATAATCTGCTGCCGCTGCAGGATGTACCAATGGATAGGTTTACAGTA
GATATGAAAAGGGACGTGAAGGTAACCTGGCACAAAGCATAACAGAGGAAAGGCCTAAGGTGCAGGTTA
TACAGGCGGCTGAACCCTTGGCAACAGCGTACCTATGTGGAATTCACAGAGAATTGGTTAGGAGATTGAA
CGCCGTCCTCCTACCCAACGTGCATACACTATTTGACATGTCTGCCGAGGACTTCGATGCCATTATAGCC
GCACACTTTAAGCCAGGAGACGCCGTTTTAGAAACGGACATAGCCTCCTTTGATAAGAGCCAGGATGATT
CACTTGCCTTACCGCCTTAATGCTGTTAGAAGATTTGGGAGTGGATCACTCCTTGTGGACCTGATAGA
GGCTGCTTTTGGAGAGATTTCCAGCTGTACCTGCCGACAGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCGCTATGATG
AAATCCGGTATGTTCTAACTCTGTTCTGTCACACATTGTTAAATATCACCATCGCTAGCCGGGTGTTGG
AAGATCGTCTGACAAAATCTGCATGCGCGGCCCTTCATCGGCGACGACAACATAATACATGGTGTCTCTC
CGATGAATTGATGGCAGCCAGATGCGCTACTTGGATGAACATGGAAGTGAAGATCATAGATGCAGTTGTA
TCCCAGAAAGCTCCCTACTTTTGTGGAGGGTTTATACTGCATGATACTGTGACAGGAACAGCTTGCAGGG
TGGCGGACCCGCTAAAAAGGTTATTTAACTGGGCAAACCGTTAGCGGCAGGTGACGAACAAGACGAAGA
CAGAAGGCGGGCGCTGGCTGATGAAGTAATCAGATGGCAACGAACAGGGCTAATAGATGAGCTGGAGAAA
GCGGTGTACTCTAGGTACGAAGTGCAGGGTATATCAGTTGCTGTAATGTCCATGGCCACCTTTGCAAGCT
CCAGATCCAACTTCGAGAAGCTCAGAGGACCCGTCATAACCTTGTACGGCGGTCTAAATAGGTACGCAC
TACAGCTACCTATTTTGCAAAAGCCGACAGCAGGTACCTAAATACCAATCAGCCATAATGGAGTTTATCC
CAACCCAACTTTCTACAATAGGAGGTACCAGCCTCGACCTTGGACTCCGCGCCCTACTATCCAAGTCAT
CAGACCCAGACCGCTCCGCAAAGGAAGGCCGGGCAACTTGCCAGCTGATCTCAGCAGTTAATAAACTG
ACAATGCGCGTGGTACCTCAACAGAAGCCGCGCAAGAATCGGAAGAATAAGAAGCAAAGCAAAGCAGC
AGGCGCCACGAAACAATACGAATCAAAAAGAAGCAGCCCCCAAAAAGAAACCGGTTCAAAAAGAAAAGAA
GCCGGGCCGACAGAGAGAATGTGCATGAAAATCGAAAATGATTGCATCTTCAAGTCAAGCATGAAGGT
AAGGTAACAGGTTACGCGTGCTTGGTAGGGACAAAGTAATGAAGCCAGCACACGTAAAGGGGACCATCG
ATAACGCGGACCTGGCCAAATTTGGCCTTCAAGCGGTCATCTAAGTACGACCTTGAATGCGCGCAGATACC
CGTGCACATGAAGTCCGACGCTTCAAGTTCACCCATGAGAAACCGGAGGGGTAACAACCTGGCACCAC
GGAGCAGTACAGTACTCAGGAGGCCGATTACCCATCCCTACAGGTGCGGGCAAACAGGGGATAGTGGTA
GACCGATCTTCGACAACAAGGGGCGCGTGGTGGCCATAGTTTTAGGAGGAGCTAATGAAGGAGCCCGTAC

AGCCCTCTCGGTGGTGACCTGGAACAAAGACATCGTACGAAAATCACCCCTGAGGGGGCCGAAGAGTGG
AGTCTGGCCATTCCAGTTATGTGCCTGCTGGCAAATACCACGTTCCCCTGCTCCCGGCCCCCTTGCACAC
CCTGCTGCTACGAAAAAGAGCCGGAGAAAACCTTGCGCATGCTTGAAGACAATGTCATGAGCTCCGGGTA
CTATCAGCTGCTACAAGCATCCTTAACATGTTCTCCCCGACGCCAGCGGCGCAGTATTAAGGACCACTTC
AATGTTTATAAAGCCACAAGACCGTACCTAGCTCACTGTCCCAGCTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATA
GTCCCGTAGCGCTAGAACGCATCAGAAACGAAGCGACAGACGGGACGTTGAAAATCCAGGTTTTCCTTGCA
AATCGGAATAAAGACGGATGATAGCCACGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAATCACATGCCAGCA
GACGCAGAGCGGGCCGGGCTATTTGTAAGAACGTGAGCACCGTGCACGATTACTGGAACAATGGGACACT
TCATTCTGGCCCCGATGTCCGAAAGGAGAAACTCTGACGGTGGGGTTCACTGACGGTAGGAAGATCAGTCA
CTCATGTACGCACCCATTTACCATGACCCTCCTGTGATAGGCCGGGAAAAATTCATTCCCAGCCGAG
CACGGTAGGGAACCTTGCAGCACGTACGCGCAGAGCACCGCTGCAACTGCCGAGGAGATAGAGGTAC
ACATGCCCCCAGACACCCAGATCGCACATTAATGTCACAACAGTCCGGCAATGTAAAGATCACAGTCAA
TAGTCAGACGGTGCAGTACAAGTGCAATTGTGGTGAAGTCAAGTGAAGGATTAACCACTACAGATAAAGTG
ATTAATAACTGCAAGGTGCATCAATGCCATGCCGCGGTACCAATCACAAAAATGGCAGTATAATTCCC
CTCTGGTCCCGGTAATGCTGAATTCGGGGACCGGAAAGGAAAAGTTCACATTCCATTTCTCTGGCAAA
TGTGACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGAAACCCACCGTGACGTACGGAAAAACCAAGTCATCATGTTG
CTGTATCCTGACCACCCAACGCTCCTGTCTACAGGAATATGGGAGAAGAACCAAATCAAGAAGAGT
GGGTGACGCATAAGAAGGAGATCAGGTTAACCGTGCCGACTGAGGGGCTCGAGGTCACGTGGGGTAACAA
TGAGCCGTACAAGTATTGGCCGAGTTATCCACAAACGGTACAGCCACGGCCACCCGCATGAGATAATT
CTGTATTATTATGAGCTGTACCCAATGACTGCGGTAGTTTTGTGAGTGGCCTCGTTTACTACTCCTGT
CGATGGTGGGTGTGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATTACACCGTACGAACTGAC
ACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATTAGAACAGCTAAAGCGGCCACATAC
CAGGAGGCCGCGGTATACCTGTGGAACGAGCAGCAGCCTTTATTTTGGATGCAAGCCCTTATTCCGCTGG
CAGCCCTGATTGTCTATGTAAGTGTCTGAGACTCTTACCATGCTGTTGTAAGTGTGACTTTTTTAGC
CGTACTGAGCGTCGGTGCCACACTGTGAGCGCGTACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGA
GTACCGTATAAGACTCTAGTCAACAGACCGGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGGAGCTTCTGTCTG
TCACCTTGAACCAACGCTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTATAAAACCGTTATCCCGTCTCCGTA
CGTGAATGCTGCGGTACAGCAGAGTGAAGGACAAGAGCCTACCTGATTACAGCTGTAAGGTCTTCACC
GGCGTCTACCCATTCATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACACCGAAAATACGCAATTGAGCGAAG
CACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCAGCATAACAGGGCTCATACCGCATCCGC
ATCAGCTAAGCTCCGCGTCTTTACCAAGGAAATAATATCACTGTGGCTGCTTATGCAAACGGCGACCAT
GCCGTACAGTTAAGGACGCTAAATTCATAGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTTCGACAATA
AAATCGTGGTGTACAAAGGCGACGTCTACAACATGGACTACCCGCCCTTCGGCGCAGGAAGACCAGGACA
ATTTGGCGACATCCAAAGTCGCACGCCTGAGAGCGAAGACGTCTATGCTAATACACAACCTGGTACTGCAG
AGACCGTCCGCGGGTACGGTGCACGTGCCGTAATCTCAGGCACCATCTGGCTTCAAGTATTGGCTAAAAG
AACGGGGGGCGTTCGCTGCAGCACACAGCACCATTTGGCTGTCAAATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGAT
GAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCTATCTCCATCGACATAACGGACGCGGCCTTTACCAGGGTTCGTCGAC
GCGCCATCTTTAACGGACATGTCTGTGAGGTATCAGCCTGCACCCATTCCTCAGACTTTGGGGCGTAG
CCATCATTAATATGCAGCCAGTAAGAAAGGCAAGTGTGCAGTGCACCTCGATGACTAACGCCGTCACTAT
TCGGGAAGCTGAAATAGAAGTAGAAGGAACTCTCAGTTGCAAATCTCTTTTTTCGACGGCCCTAGCCAGC
GCCGAATTTTCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCCGAGTGCCATCCACCGAAAGACC

ATATAGTCAATTACCCGGCGTCACACACCACCCTCGGGGTCCAAGACATTTCCGCTACGGCGATGTCATG
GGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTTGTGCGCTGTTGCAGCACTGATCCTAATCGTGGTGCTA
TGCGTGTGTTTTAGCAGGCACTAACTTGACAAGTATGAAGGCATACGCGTCCCTAAAGAGACACAC
CGCATATAGCTAGGAATCAACAGATAAGTATAGATCTAAGGGCTGAACAACCCCTGAATAACAAAATATA
AAAATCAACAAAATCATAAAATAGAAAATAGAAAATAGAAGTAGGTAAGAAGGTATATGTGTCCCCTAA
GAGACACACCATATATAGATAAGCATAGATCAAAGGGCTGAACAACCCCTGAATAATAACAAAATATAAA
AACCAATAAAAATCATAAAATAGAAAATCAACAAAATCATAAAATAGAAAATAGAAAATAGAAGTAGGT
AAGAAGGTATATGTGTCCCCTAAGAGACACACCATATATAGCTAAGAATCAATAGATAAGCATAGATCAA
AGGGCTGAACAACCCCTGAATAATAACAAAATATAAAAACCAATAAAAATCATAAAATAGAAAACCAAAA
ATAGAAGTAGTTCAAAGGGCTATAAAAACCCCTGAATAGTAACAAAATATAAAAATATAAAAATCAAACG
AATACCATAATTGGCAATCGGAAGAGATGTAGGTACTTAAGCTTCTTAAAAGCAGCCGAACCTCGCTTTGA
GATGTAGGCGTAGCACACCGAACTCTTCCATAATTCTCCGAACCCACAGGGACGTAGGAGATGTTCAAAG
TGACTATAAAAACCCCTGAACAGTAATAAAAATATAAAAATTAATAATGAGTACCATAATTGGCAAATGGAAGA
GACGTAGGTACTAGCATACCGAACTCTTCCACAATTCTCCGTACCCATAGGGACGTAGGAGATGTTATTT
TGTTTTTAATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Secuencia de las proteínas estructurales del aislado CH-R-1972

GenBank: MG822707.1 (3747 pb)

>MG822707.1 Chikungunya virus isolate CH-R-1972 structural polyprotein gene, complete cds

```
ATGGAGTTTATCCCAACCCAAACTTTCTACAATAGGAGGTACCAGCCTCGACCTTGGACTCCGCGCCCTA
CTATCCAAGTCATCAGACCCAGACCGCGTCCGCAAAGGAAGGCCGGCAACTTGCCCAGCTGATCTCAGC
AGTTAATAAACTGACAATGCGCGTGGTACCTCAACAGAAGCCGCGCAAGAATCGGAAGAATAAGAAGCAA
AAGCAAAAGCAGCAGGCCGACGAAACAATACGAATCAAAAGAAGCAGCCCCCAAAAAGAAACCGGTTTC
AAAAGAAAAGAAGCCGGGCCGAGAGAGAATGTGCATGAAAATCGAAAATGATTGCATCTTCGAAGT
CAAGCATGAAGGTAAGGTAACAGGTTACGCGTGCTTGGTAGGGGACAAAGTAATGAAGCCAGCACACGTA
AAGGGGACCATCGATAACGCGGACCTGGCCAAATTGGCCTTCAAGCGGTTCATCTAAGTACGACCTTGAAT
GCGCGCAGATACCCGTGCACATGAAGTCCGACGCTTCGAAGTTACCCATGAGAAACCGGAGGGGTACTA
CAACTGGCACCACGGAGCAGTACAGTACTCAGGAGGCCGATTACCATCCCTACAGGTGCGGGCAAACCA
GGGGATAGTGGTAGACCGATCTTCGACAACAAGGGGCGCGTGGTGGCCATAGTTTTAGGAGGAGCTAATG
AAGGAGCCCGTACAGCCCTCTCGGTGGTACCTGGAACAAAGACATCGTCACGAAAATCACCCCTGAGGG
GGCCGAAGAGTGGAGTCTGGCCATTCCAGTTATGTGCCTGCTGGCAAATACCACGTTCCCCTGCTCCCGG
CCCCCTTGACACCCTGCTGCTACGAAAAGAGCCGGAGAAAACCTTGCGCATGCTTGAAGACAATGTCA
TGAGCTCCGGGTACTATCAGCTGCTACAAGCATCCTTAACATGTTCTCCCCGACGCCAGCGGGCGCAGTAT
TAAGGACCACTTCAATGTTTATAAAGCCACAAGACCGTACCTAGCTCACTGTCCCGACTGTGGAGAAGGG
CACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCGCTAGAACGCATCAGAAACGAAGCGACAGACGGGACGTTGAAAATCC
AGGTTTCTTGC AAATCGGAATAAAGACGGATGATAGCCACGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAA
TCACATGCCAGCAGACGCAGAGCGGGCCGGGCTATTTGTAAGAACGTCAGCACCGTGCACGATTACTGGA
ACAATGGGACACTTCATTCTGGCCCGATGTCCGAAAGGAGAAACTCTGACGGTGGGGTTCACTGACGGTA
GGAAGATCAGTCACTCATGTACGCACCCATTTACCATGACCCTCCTGTGATAGGCCGGGAAAAATTTCCA
TTCCCGACCGCAGCACGGTAGGGAACTACCTTGCAGCACGTACGCGCAGAGCACCGCTGCAACTGCCGAG
GAGATAGAGGTACACATGCCCCAGACACCCAGATCGCACATTAATGTCACAACAGTCCGGCAATGTAA
AGATCACAGTCAATAGTCAGACGGTGCAGGTACAAGTGAATTGTGGTGACTCAAGTGAAGGATTAACCAC
TACAGATAAAGTGATTAATAACTGCAAGGTCGATCAATGCCATGCCGCGGTACCAATCACAAAAAATGG
CAGTATAATTCCCCTCTGGTCCCGGTAATGCTGAATTCGGGGACCGGAAAGGAAAAGTTCACATTCCAT
TTCCTCTGGCAAATGTGACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGAAAACCCACCGTGACGTACGGAAAAACCA
AGTCATCATGTTGCTGTATCCTGACCACCAACGCTCCTGTCTTACAGGAATATGGGAGAAGAACCAAAC
TATCAAGAAGAGTGGGTGACGCATAAGAAGGAGATCAGGTTAACCCTGCCGACTGAGGGGCTCGAGGTCA
CGTGGGGTAACAATGAGCCGTACAAGTATTGGCCGAGTTATCCACAAACGGTACAGCCCACGGCCACCC
GCATGAGATAATTCTGTATTATTATGAGCTGTACCCAATGACTGCGGTAGTTTTGTGAGTGGCCTCG
TTCATACTCCTGTGCATGGTGGGTGTGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATTACAC
CGTACGAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATTAGAACAGCTAA
AGCGGCCACATACCAGGAGGCCGCGGTATACCTGTGGAACGAGCAGCAGCCTTTATTTTGGATGCAAGCC
CTTATTCCGCTGGCAGCCCTGATTGTCTATGTAAGTGTCTGAGACTCTTACCATGCTGTTGTAAAATGT
TGACTTTTTTAGCCGTAAGTACTGAGCGTGGTGGCCACACTGTGAGCGCGTACGAACACGTAACAGTGATCCC
```

GAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAACAGACCGGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATG
GAGCTTCTGTCTGTACCTTGGAACCAACGCTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTATAAAACCGTTA
TCCCCTCTCCGTACGTGAAATGCTGCGGTACAGCAGAGTGTAAGGACAAGAGCCTACCTGATTACAGCTG
TAAGGTCTTCACCGGCGTCTACCCATTCATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACACCGAAAATACG
CAATTGAGCGAAGCACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCAGCATAACAGGGCTC
ATACCGCATCCGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATATCACTGTGGCTGCTTATGC
AAACGGCGACCATGCCGTACAGTTAAGGACGCTAAATTCATAGTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACA
CCTTTCGACAATAAAATCGTGGTGTACAAAGGCGACGTCTACAACATGGACTACCCGCCCTTCGGCGCAG
GAAGACCAGGACAATTTGGCGACATCCAAAGTCGCACGCCTGAGAGCGAAGACGTCTATGCTAATACACA
ACTGGTACTGCAGAGACCGTCCGCGGGTACGGTGCACGTGCCGTACTCTCAGGCACCATCTGGCTTCAAG
TATTGGCTAAAAGAACGGGGGGCGTCGCTGCAGCACACAGCACCATTTGGCTGTCAAATAGCAACAAACC
CGGTAAGAGCGATGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCTATCTCCATCGACATAACCGGACGCGGCCTTTAC
CAGGGTCGTCGACGCGCCATCTTTAACGGACATGTCGTGTGAGGTATCAGCCTGCACCCATTCTCAGAC
TTTGGGGGCGTAGCCATCATTAAATATGCAGCCAGTAAGAAAGGCAAGTGTGCAGTGCCTCGATGACTA
ACGCCGTCACTATTCGGGAAGCTGAAATAGAAGTAGAAGGGAACCTCTCAGTTGCAAATCTCTTTTTTCGAC
GGCCCTAGCCAGCGCCGAATTTGCGGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCCGAGTGCCAT
CCACCGAAAGACCATATAGTCAATTACCCGGCGTACACACCACCCTCGGGGTCCAAGACATTTCCGCTA
CGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTTGTCGCTGTTGCAGCACTGATCCT
AATCGTGGTGTATGCGTGTCTGTTTAGCAGGCACTAA

Secuencia de las proteínas estructurales del aislado CH-R-2295

GenBank: MG822708.1 (3747 pb)

>MG822708.1 Chikungunya virus isolate CH-R-2295 structural polyprotein gene, complete cds

```
ATGGAGTTTATCCCAACCCAAACTTTCTACAATAGGAGGTACCAGCCTCGACCTTGGACTCCGCGCCCTA
CTATCCAAGTCATCAGACCCAGACCGGTCCGCAAAGGAAGGCCGGCAACTTGCCAGCTGATCTCAGC
AGTTAATAAACTGACAATGCGCGTGGTACCTCAACAGAAGCCGCGCAAGAATCGGAAGAATAAGAAGCAA
AAGCAAAAGCAGCAGGCCACGAAACAATACGAATCAAAGAAGCAGCCCCCAAAAAGAAACCGGTTTC
AAAAGAAAAAGAAGCCGGGCCGAGAGAGAATGTGCATGAAAATCGAAAATGATTGCATCTTCGAAGT
CAAGCATGAAGGTAAGGTAACAGGTTACGCGTGCTTGGTAGGGGACAAAGTAATGAAGCCAGCACACGTA
AAGGGGACCATCGATAACGCGGACCTGGCCAAATTGGCCTTCAAGCGGTTCATCTAAGTACGACCTTGAAT
GCGCGCAGATACCCGTGCACATGAAGTCCGACGCTTCGAAGTTCACCCATGAGAAACCGGAGGGGTACTA
CAACTGGCACCACGGAGCAGTACAGTACTCAGGAGGCCGATTACCATCCCTACAGGTGCGGGCAAACCA
GGGGATAGTGGTAGACCGATCTTCGACAACAAGGGGCGCGTGGTGGCCATAGTTTTAGGAGGAGCTAATG
AAGGAGCCCGTACAGCCCTCTCGGTGGTGCCTGGAACAAAGACATCGTCACGAAAATCACCCCTGAGGG
GGCCGAAGAGTGGAGTCTGGCCATTCCAGTTATGTGCCTGCTGGCAAATACCACGTTCCCCTGCTCCCGG
CCCCCTTGACACCCTGCTGCTACGAAAAAGAGCCGGAGAAAACCTTGCGCATGCTTGAAGACAATGTCA
TGAGCCCCGGGTACTATCAGCTGCTACAAGCATCCTTAACATGTTCTCCCCGACGCCAGCGGGCGCAGTAT
TAAGGACCACTTCAATGTTTATAAAGCCACAAGACCGTACCTAGCTCACTGTCCCGACTGTGGAGAAGGG
CACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCGCTAGAACGCATCAGAAACGAAGCGACAGACGGGACGTTGAAAATCC
AGGTTTCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGATGATAGCCACGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAA
TCACATGCCAGCAGACGCAGAGCGGGCCGGGCTATTTGTAAGAACGTCAGCACCGTGCACGATTACTGGA
ACAATGGGACACTTCATTCTGGCCCGATGTCCGAAAGGAGAACTCTGACGGTGGGGTTCCTGACGGTA
GGAAGATCAGTCACTCATGTACGCACCCATTTACCATGACCCCTCCTGTGATAGGCCGGGAAAAATTTCCA
TTCCCGACCGCAGCACGGTAGGGAACTACCTTGCAGCACGTACGCGCAGAGCACCGCTGCAACTGCCGAG
GAGATAGAGGTACACATGCCCCAGACACCCAGATCGCACATTAATGTCACAACAGTCCGGCAATGTAA
AGATCACAGTCAATAGTCAGACGGTGCAGTACAAGTGAATTGTGGTGACTCAAGTGAAGGATTAACCAC
TACAGATAAAGTGATTAATAACTGCAAGGTCGATCAATGCCATGCCGCGGTACCAATCACAAAAAATGG
CAGTATAATTCCCCTCTGGTCCCGCGTAATGCTGAATTCGGGGACCGGAAAGGAAAAGTTCACATTCCAT
TTCCTCTGGCAAATGTGACATGCAGGGTGCCTAAAGCAAGAAAACCCACCGTGACGTACGGAAAAACCA
AGTCATCATGTTGCTGTATCCTGACCACCCAACGCTCCTGTCTACAGGAATATGGGAGAAGAACCAAAC
TATCAAGAAGAGTGGGTGACGCATAAGAAGGAGATCAGGTTAACCGTGCCGACTGAGGGGCTCGAGGTCA
CGTGGGGTAACAATGAGCCGTACAAGTATTGGCCGAGTTATCCACAAACGGTACAGCCCACGGCCACCC
GCATGAGATAATTCTGTATTATTATGAGCTGTACCCAATGACTGCGGTAGTTTTGTGAGTGGCCTCG
TTCATACTCCTGTGATGGTGGGTGTGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATTACAC
CGTACGAACTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATTAGAACAGCTAA
AGCGGCCACATAACCAGGAGGCCGCGGTATACCTGTGGAACGAGCAGCAGCCTTTATTTGGATGCAAGCC
CTTATTCCGCTGGCAGCCCTGATTGTCTATGTAAGTGTCTGAGACTCTTACCATGCTGTTGTAAGTGT
TGACTTTTTTAGCCGACTGAGCGTCCGGTGCACACTGTGAGCGCGTACGAACACGTAACAGTGATCCC
```

GAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAACAGACCGGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATG
GAGCTTCTGTCTGTACCTTGGAACCAACGCTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTATAAAACCGTTA
TCCCCTCTCCGTACGTGAAATGCTGCGGTACAGCAGAGTGTAAGGACAAGAGCCTACCTGATTACAGCTG
TAAGGTCTTCACCGGCGTCTACCCATTCATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGACACCGAAAATACG
CAATTGAGCGAAGCACATGTGGAGAAGTCCGAATCATGCAAAACAGAATTTGCATCAGCATAACAGGGCTC
ATACCGCATCCGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTACCAAGGAAATAATATCACTGTGGCTGCTTATGC
AAACGGCGACCATGCCGTACAGTTAAGGACGCTAAATTCATAGTGGGGCCAATGTCTTCAACCTGGACA
CCTTTCGACAATAAAATCGTGGTGTACAAAGGCGACGTCTACAACATGGACTACCCGCCCTTCGGCGCAG
GAAGACCAGGACAATTTGGCGACATCCAAAGTCGCACGCCTGAGAGCGAAGACGTCTATGCTAATACACA
ACTGGTACTGCAGAGACCGTCCGCGGGTACGGTGCACGTGCCGTACTCTCAGGCACCATCTGGCTTCAAG
TATTGGCTAAAAGAACGGGGGGCGTCGCTGCAGCACACAGCACCATTTGGCTGTCAAATAGCAACAAACC
CGGTAAGAGCGATGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCTATCTCCATCGACATAACCGGACGCGGCCTTTAC
CAGGGTCGTCGACGCGCCATCTTTAACGGACATGTCGTGTGAGGTATCAGCCTGCACCCATTCTCAGAC
TTTGGGGGCGTAGCCATCATTAAATATGCAGCCAGTAAGAAAGGCAAGTGTGCAGTGCCTCGATGACCA
ACGCCGTCACTATTCGGGAAGCTGAAATAGAAGTAGAAGGGAACCTCTCAGTTGCAAATCTCTTTTTTCGAC
GGCCCTAGCCAGCGCCGAATTTGCGGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCAGCCGAGTGCCAT
CCACCGAAAGACCATATAGTCAATTACCCGGCGTCACACACCACCCTCGGGGTCCAAGACATTTCCGCTA
CGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTTGTCGCTGTTGCAGCACTGATCCT
AATCGTGGTGTATGCGTGTCTGTTTAGCAGGCACTAA