



UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y BIOLÓGICAS

TESIS

Estandarización de ensayo de ELISA para determinación  
de anticuerpos IgG e IgM contra proteínas virales de  
Dengue, Chikungunya y Zika.

Para obtener el grado de  
Químico Fármacobiólogo.

PRESENTA:

Donaldo Pastrana Hernández

Directora de Tesis

D.C Martha Eva Viveros Sandoval

MORELIA, MICHOACÁN NOVIEMBRE 2020

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en la ciudad de Morelia, Michoacán.



El presente trabajo de tesis fue financiado mediante el proyecto de investigación “Eficacia protectora y neutralización para seleccionar una vacuna óptima para virus zika”, financiado por el programa Innovate UK, número de referencia: 972216, amparado por el convenio de colaboración R45704/CN002 entre la Universidad Oxford y la UMSNH.



Comité Tutorial:

D.C Martha Eva Viveros Sandoval  
Directora de Proyecto  
Facultad De Ciencias Medicas Y Biológicas

D.C Sandra Edith Lopez Casteñeda  
Epidemiologia Hospital General “Dr. Miguel Silva”

M.C Virginia Campos Cabrera  
Facultad De Químico Farmacobiología

D.C Sergio Gutiérrez Castellanos  
Facultad De Ciencias Medicas Y Biológicas

M.F.B Dafne Vanessa García Chávez  
Facultad de Químico Farmacobiología

D.C Marcia Yvette Gauthereau Torres  
Facultad De Ciencias Medicas Y Biológicas

## Dedicatorias

A mi Padre **Dr. Sebastian Pastrana Torres**. No podría tener un mejor padre. El mejor ejemplo a seguir, comprensivo, trabajador, inteligente, el mejor en su área, agardeciendo por todo lo bueno que dejo en mi vida, sobre todo por su cariño incondicional, estando orgulloso de ser su hijo. Deseando el tiempo que nos faltó, esperando que desde lejos veles por tu CHAPARRITO. RIP.

A mi Madre **Dra. Gisela Hernandez Torrez**. Por el amor mas sincero y la devocion que tienes a tus hijos, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me has dado, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos. Gracias por formarme como una persona de bien, y por ser la mujer que a pesar de todo esta conmigo dándome fuerza y tu consejo. No hay acto, ni palabras para agradecerte.

**A Dra. Irma Hernandez Torres, Enf. Carmen Hernandez Torrez** Mis tias favoritas, desde niño cuidandome, preocupandose por la familia. Recuerdo esas vacaciones que me la pasaba en IMSS. Enamorandome de las carreras de salud. Son un ejemplo a seguir como profesionistas y personas. ¡Gracias por todo el apoyo!

A **Familia Hernandez Torres**. Gracias por sus consejos, ayuda y paciencia durante toda mi vida.

A **Lic. Julio Cesar Farias Mejia**. Unos de mis mas grandes agradecimientos. Por su paciencia, cariño y compresion, es un gran hombre. Doy gracias por estar a mi lado, siempre sera parte de mi vida.

A **Guadalupe Yaret Garcia Rodriguez**, Mi amiga gemela, cortados por la misma tijera, compañera de tantas historias, tantos años.

A **QFB. Jacqueline Garcia Sanchez**. Gracias por estar siempre a mi lado en la unviersidad, en las buenas y en los malos momentos. ¡Eso Mamona!

A **LNH. Emilia Polet M. Ayala**. Gracias por los momentos muy divertidos, por todo el apoyo brindado en todo el tiempo.

A **QFB. Yuritzzi Verduzco Cortez**, Gracias por todo lo aprendido y recorrido, Orgullo ante todo.

A mis compañeros y amigos de la universidad, **Jaret, Lau, Sebastian, Jairo, Chema, Daniel, Valentin, Pato, Lalo**. Fueron gran parte de estos años. ¡Gracias por todo!

## AGRADECIMIENTOS

A la **D.C Martha Eva Viveros Sandoval**. No solamente quisiera extender mi agradecimiento, sino mi admiración, ya que la realización de este trabajo no hubiera sido la misma sin su apoyo, enseñándome muchas cosas al confiar en mi. Gracias por guiarme durante este tiempo.

A la **QFB. Rosa Edith Zavala**. Una de las mejores maestras que conozco, por su preocupación, consejos y enseñarme una vida diferente académicamente. Admitiendo que con el paso del tiempo a tenido razón.

A la **QFB. Carmen Romero Vásquez**. Gracias por brindarme apoyo en momentos muy cruciales de mi vida profesional y personal. Admirando su dedicación y compromiso por el Laboratorio Clínico.

A los compañeros del Laboratorio de Hemostasia y Biología Molecular. **Dra. Sandra, Alan, Nallely, Laura, Kenny, Itzel.**

## Abreviaturas

<b>ELISA:</b>	Enzyme Liked Inmunosorbent Assay. (Prueba de ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima)
<b>IgM:</b>	Inmunoglobulina M.
<b>IgG:</b>	Inmunoglobulina G.
<b>DENV 1-4:</b>	Virus del Dengue 1-2-3-4.
<b>CHIKV:</b>	Virus de Chikungunya.
<b>ZIKV:</b>	Virus de Zika.
<b>ANTI:</b>	Antibody. (Anticuerpo)
<b>ARN:</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RT-PCR:</b>	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. (Transcripción Inversa de Reacción en Cadena de la Polimerasa)
<b>FD:</b>	Dengue Fever. (Fiebre por Dengue)
<b>DHF:</b>	Dengue Hemorrhagic Fever. (Fiebre por Dengue Hemorrágico)
<b>SCD:</b>	Dengue Shock Syndrome. (Síndrome de Choque por Dengue)
<b>AE:</b>	Aedes.
<b>ECM:</b>	Extracellular membrane. (Membrana Extracelular)
<b>RE:</b>	Endoplasmic reticulum. (Reticulo Endoplasmico)
<b>PBS:</b>	Phosphate Buffer Saline. (Solución Amortiguadora de Fosfatos)

## Definiciones

<b>Arbovirus:</b>	Conjunto de virus transmitidos por artrópodos (Arthrodborne Viruses)
<b>Artrópodo:</b>	Invertebrados que forman el dilo mas diverso del reino animal, conformado por un exoesqueleto, en una serie lineal de segmentos ostensibles, con apéndices de piezas articuladas.
<b>Biobanco:</b>	Establecimiento que acoge muestras biológicas asociadas con información clínica, que son recogidas, procesadas, almacenadas y gestionadas, con criterios de excelencia, para ponerlas, al servicio de la sociedad con objeto de promover la investigación biomédica.
<b>Solución Amortiguadora:</b>	Es una mezcla en concentraciones relativamente elevadas de un ácido y su base conjugada.
<b>Dímero:</b>	Consiste en dos subunidades estructuralmente similares denominadas monómeros unidas por enlaces que pueden ser fuertes o débiles.
<b>Hematófago:</b>	Animal que mantiene la habilidad de alimentarse de sangre.
<b>Inmunoglobulinas:</b>	Son glucoproteínas del tipo gamma globulina. Pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor de los linfocitos B y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias y virus.
<b>Leucopenia:</b>	Afección en la que hay un número menor que el normal de leucocitos en la sangre.
<b>Maculopapular:</b>	Es un tipo de erupción, que no se eleva por encima de la superficie de la piel.
<b>Monómero:</b>	Molécula simple, generalmente de peso molecular bajo, que forma cadenas lineales o ramificadas de dos, tres o más unidades.
<b>Trombositopenia:</b>	Afección en la cual hay un número menor que el normal de plaquetas en la sangre.
<b>Viremia:</b>	Es la entrada de virus en el torrente sanguíneo desde donde se pueden extender a todos los órganos.

# Índice

1	RESUMEN	12
2	ABSTRACT	13
3	INTRODUCCIÓN	14
4	ARBOVIRUS	14
5	CICLO DE VIDA DEL MOSQUITO AEDES AEGYPTI	15
6	CICLO DE TRANSMISIÓN DEL ARBOVIRUS	16
7	VIRUS DEL DENGUE	17
7.1	Epidemiología del Dengue en Mexico	18
7.2	Manifestaciones clínicas	19
8	VIRUS DEL ZIKA	20
8.1	Epidemiología de Zika en México	20
8.2	Manifestaciones clínicas	20
9	ESTRUTURA VIRAL DEL DENGUE Y ZIKA	21
9.1	<b>Las proteínas estructurales.</b>	<b>21</b>
9.1.1	La proteína Capside.	21
9.1.2	La proteína M y Proteína precursora de membrana.	22
9.1.3	La proteína E	22
9.2	<b>Proteínas No Estructurales.</b>	<b>23</b>
9.2.1	Proteína NS1	23
9.2.2	Proteína NS2A- NS2B.	25
9.2.3	La proteína NS3.	25
9.2.4	La proteína NS4.	26
9.2.5	La proteína NS5	26
10	VIRUS CHIKUNGUNYA	26
10.1	Estructura viral CHIKV	27
10.2	<b>La proteína E2</b>	<b>27</b>
10.2.1	Producción y purificación de proteína CHIKV E2 recombinante	28

10.3	Epidemiología nivel México CHIKV	28
11	DIAGNÓSTICO DE CONFIRMACIÓN POR ESTUDIOS SEROLÓGICOS	28
11.1	Caso presuntivo	28
11.2	Diagnóstico por RT-PCR	29
11.3	Diagnóstico por ELISA	30
12	ENSAYO INMUNOABSORBENTE DIRECTO LIGADO A ENZIMAS (ELISA)	31
12.1	ELISA Indirecta	31
13	JUSTIFICACIÓN	32
14	OBJETIVO	32
15	MATERIAL Y MÉTODOS	33
15.1	Tipo y clasificacion de proyecto	33
15.2	Universo o poblacion	33
15.3	Sitio de estudio	33
15.4	Muestra	33
15.5	Obtencion de la muestra	33
15.6	Conservacion de la muestra	34
15.7	Materiales y reactivos	34
16	RESUMEN DE CÁLCULOS.	37
16.1	Cálculo pbs/tween 0.05% requerido por placa.	37
16.2	Cálculo proteínas por placa.	37
16.2.1	Calculo proteina NS1 DENV – ZIKV	37
16.2.2	Calculo proteina E2 CHIKV	37
17	ANÁLISIS DE DATOS	38
18	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	38
18.1	Datos demográficos.	38

19	DETERMINACIÓN DEL ESTADO SEROLÓGICO DE LAS MUESTRAS	41
19.1	Primer muestreo	41
19.2	Segundo muestreo	41
20	RESULTADOS	42
20.1	<b>DENGUE VÍRUS IgM – IgG contra proteína NS1.</b>	<b>43</b>
20.1.1	Primer Muestreo.	43
20.1.2	Segundo muestreo.	44
20.2	<b>CHIKUNGUYA VIRUS IgG – IgM contra proteína E2.</b>	<b>44</b>
20.2.1	Primer muestreo.	44
20.2.2	Segundo Muestreo.	45
20.3	<b>ZIKA VIRUS IgG- IgM contra proteína NS1.</b>	<b>46</b>
20.3.1	Primer Muestreo.	46
20.3.2	Segundo muestreo.	47
20.4	<b>Total de Positivos y Negativos</b>	<b>47</b>
20.4.1	Dengue Virus Pos/Neg	47
20.4.2	Chikungunya Virus Pos/Neg	48
20.4.3	Zika Virus Pos/Neg	49
21	DISCUSIÓN	51
22	CONCLUSIONES	53
23	REFERENCIAS	54
24	ANEXOS	56

## Índice de Figuras.

FIGURA 1 FAMILIAS PERTENECIENTES AL GRUPO ARBOVIRUS.....	15
FIGURA 2: CICLO DE VIDA DEL MOSQUITO.....	16
FIGURA 3 CASOS DE DENGUE VIRUS 2018-2019 MEXICO .....	18
FIGURA 4: "CURSO DE LA INFECCION POR DENGUE VIRUS". (SOLOMON & BARRETT, 2003).....	19
FIGURA 5 : PROTEINA NS1 DIMERO.....	24
FIGURA 6: NS1 Balsa Lipídica.....	25
FIGURA 7: FRAGMENTO GEN CODIFICANTE FLAVIVIRUS.....	26
FIGURA 8: IGM DENGUE 1º MUESTREO .....	43
FIGURA 9: IGG DENGUE 1º MUESTREO .....	43
FIGURA 10: IGG DENGUE 2º MUESTREO .....	44
FIGURA 11: IGM CHIKUNGUNYA 1º MUESTREO .....	44
FIGURA 12: IGG CHIKUNGUNYA 1º MUESTREO .....	45
FIGURA 13: IGG CHIKUNGUNYA 2º MUESTREO .....	45
FIGURA 14: IGG ZIKA 1º MUESTREO .....	46
FIGURA 15: IGM ZIKA 1º MUESTREO .....	46
FIGURA 16: IGG ZIKA 2º MUESTREO .....	47
FIGURA 17 POS/NEG IGM DENGUE 1º MUESTREO.....	47
FIGURA 18: POS/NEG IGM/IGG DENGUE 1º-2º MUESTREO .....	48
FIGURA 19: POS/NEG IGM CHIKUNGUNYA 1º MUESTREO .....	48
FIGURA 20: POS/NEG IGM/IGG CHIKUNGUNYA 1º-2º MUESTREO.....	49
FIGURA 22: POS/NEG IGM/IGG ZIKA 1º-2º MUESTREO .....	50

## Índice de Tablas.

TABLA 1 CARACTERISTICAS GENERALES DEMOGRAFICAS Y CLINICAS .....	38
TABLA 2 DISTRIBUCION GEOGRAFICA.....	39
TABLA 3 DISTRIBUCION GEOGRAFICAS.....	39
TABLA 4 DISTRIBUCION GEOGRAFICAS.....	39
TABLA 5 DISTRIBUCION GEOGRAFICAS.....	39
TABLA 6 UBICACION GEOGRAFICAS GOOGLE. (S.F.).....	40
TABLA 7 PUNTO DE CORTE DEL PRIMER MUESTREO IGG - IGM.....	41
TABLA 8 PUNTO DE CORTE DEL SEGUNDO MUESTREO IGG .....	41
TABLA 9 TABLA DE RESULTADOS TOTALES.....	42

## 1 Resumen

**Introducción:** Existen más de 100 tipos de arbovirus que son capaces de infectar directamente al ser humano y causar diferentes morbilidades entre los que podemos resaltar Dengue, Zika y Chikungunya, las cuales tienen manifestaciones que pueden ir desde leves a severas y alcanzan ocasionar secuelas permanentes e incluso la muerte, provocada por hemorragias graves. El espectro de síntomas es muy similar, lo que ocasiona que el diagnóstico diferencial sea muy complicado y, desafortunadamente, la mayor parte de estas infecciones pasan por un cuadro subclínico o no diagnosticado, por lo que se genera la necesidad de realizar un diagnóstico confirmatorio, es de gran importancia para un manejo adecuado de las representaciones clínicas y un eficiente control epidemiológico. En los últimos años se han implementado técnicas de laboratorio para confirmar el diagnóstico clínico por inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) y pruebas rápidas para la detección de las proteínas virales, sin embargo debido a la similitud entre las familias de los flavivirus, se genera uno de los retos de diagnóstico para diferenciar la clasificación de los arbovirus ya que se ha notado reactividad cruzada durante los ensayos de ELISA con los anticuerpos Anti-DENV, Anti-ZIKV dejando como estándar de oro en el manejo clínico al RT-PCR, la cual si bien tiene una alta fiabilidad, depende de factores como el tiempo de la toma de muestra y la conservación de esta para obtener un resultado óptimo. Además, esta prueba solo está disponible en grandes centros de referencia. Por esta razón, es necesaria la implementación de otros recursos diagnósticos que sean eficientes y rápidos donde a través de pruebas específicas y que sean de bajo costo se obtenga un mejor diagnóstico diferencial.

**Objetivo:** Estandarizar una técnica de ELISA para la determinación de inmunoglobulinas de isotipo IgG e IgM usando proteínas de Dengue, Chikungunya y Zika producidas de manera experimental. **Método:** Estudio experimental de investigación descriptivo, prospectivo y transversal. Se incluyeron 119 sujetos aparentemente sanos, obteniendo muestra sanguínea periférica recolectado en tubo con activador de coagulación, se realizó prueba de ELISA para la determinación de anticuerpos IgG e IgM contra proteínas virales de Dengue, Chikungunya y Zika. **Resultados:** De los 116 sujetos de prueba registrados, 43 fueron hombres y 76 femeninos, se analizaron sus antecedentes clínicos obteniendo un 13.4% Dengue, 0.8% Zika, 5.9% Chikungunya. Se estandarizó la técnica de ELISA con estándares internacionales, que permita la utilización de muestras en estudios posteriores. **Conclusiones:** La técnica es reproducible en laboratorios que cuenten con la infraestructura adecuada, vigilando los parámetros de criopreservación de la muestra. Esta técnica permite la realización de estudios posteriores, que involucren un estudio de confirmación de los distintos arbovirus mencionados. Palabras clave: Arbovirus, Enfermedades emergentes, ELISA, biobanco.

## 2 Abstract

**Introduction:** There are more than 100 types of arbovirus that are able to directly infect humans and cause different morbidities among which we can highlight, Dengue, Zika and Chikungunya, which have manifestations that can range from mild to severe and reach permanent sequelae and even death, caused by severe bleeding. The spectrum of symptoms is very similar, which causes the differential diagnosis to be very complicated and, unfortunately, most of these infections go through a subclinical or undiagnosed picture, so the need to make a confirmatory diagnosis is of great importance for proper management of clinical representations and efficient epidemiological control. Laboratory techniques have been implemented in recent years to confirm clinical diagnosis by enzyme-linked immunoassay (ELISA) and rapid testing for viral proteins, however due to the similarity between flavivirus families one of the diagnostic challenges is generated to differentiate the classification of arboviruses as cross-reactivity has been noticed during ELISA trials with Anti-DENV antibodies, Anti-ZIKV leaving as a gold standard in clinical management to RT-PCR, which although it has a high reliability, depends on factors such as sampling time and the preservation of it to obtain an optimal result. In addition, this test is only available in large reference centers. For this reason, it is necessary to implement other diagnostic resources that are efficient and fast where through specific tests and that are inexpensive a better differential diagnosis is obtained. **Objective:** To standardize an ELISA technique for the determination of IgG and IgM isotype immunoglobulins using experimentally produced Dengue, Chikungunya and Zika proteins. **Method:** Experimental study of descriptive, prospective and cross-cutting research. 119 seemingly healthy subjects were included, obtaining peripheral blood sample collected in tube with coagulation activator, ELISA was tested for the determination of IgG and IgM antibodies against viral proteins from Dengue, Chikungunya and Zika. **Results:** Of the 116 registered test subjects, 43 were male and 76 female, their clinical history was analyzed obtaining 13.4% Dengue, 0.8% Zika, 5.9% Chikungunya. The ELISA technique was standardized to international standards, allowing the use of samples in subsequent studies. **Conclusions:** The technique is reproducible in laboratories that have the right infrastructure, monitoring the sterility and cryopreservation parameters of the sample. This technique allows further studies, involving a confirmation study of different arboviruses mentioned in the presentation of research. **Keywords:** Arbovirus, Emerging Diseases, ELISA, Biobank.

### 3 Introducción

Las infecciones por arbovirus constituyen un grave problema de salud pública en países tropicales y subtropicales, resaltando nuestro sitio de estudio que es México, dentro de las que destacan infecciones relevantes como lo son el Dengue, Zika y Chikungunya siendo consideradas como las más importantes arbovirosis. Se ha pronosticado epidemiológicamente, que estarán en aumento por consecuencia de la urbanización y movilización humana. Entre los síntomas clínicos comunes asociados directamente a estas arbovirosis encontramos fiebre, cefalea, exantema, eritema e hiperemia conjuntiva, las cuales muestran un tropismo en los vasos sanguíneos y el sistema nervioso central, por esto surge la importancia y necesidad de diseñar un método de diagnóstico confirmatorio y preciso que permita diferenciar a cada uno de los 3 agentes etiológicos. Actualmente, las guías clínicas médicas recomiendan realizar la prueba de RT-PCR para obtener el diagnóstico confirmatorio a estas infecciones. No obstante, es un estudio que implica un costo elevado, precisa el uso de equipos de biología molecular y su disponibilidad es muy limitada. Además, se ha reportado un aumento en la gama de incidencia de resultados no confiables, ya que requiere de una elevada carga viral y un adecuado manejo y preservación de la muestra para obtener resultados confiables. Los ensayos inmunoenzimáticos como la prueba de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) surgen como candidatos potenciales debido a su especificidad, rapidez y el bajo costo que poseen.

### 4 Arbovirus

Los arbovirus son, como lo describe la Organización Mundial de la Salud en 1967; un grupo de “virus, transmitidos por un artrópodo hematofago”, y son capaces de infectar tanto a los vertebrados o invertebrados. En tanto a sus orígenes se relaciona a parte selvático siendo un huésped en los primates y mosquitos de la península Máyala, con el paso del tiempo el virus se fue adaptando paulatinamente de los primates a la especie humana, desarrollándose junto con a la urbanización y domesticación ocasionando una acomodación vital del vector mosquito y, por subsecuente, al contacto con estos virus en ciclos urbanos. (Arredondo-García et al., 2016)

Los arbovirus son un grupo taxonómicamente heterogéneo de más de 500 virus; de estos, aproximadamente 150 causan enfermedad en el hombre, 40 de estos causan síntomas clínicos graves, tales como son el Dengue, Zika, Chikungunya, Fiebre amarilla, Fiebre del Nilo entre otros. Es precisamente debido a cuya vigilancia requiere la guardia de los vectores que las enfermedades causadas por arbovirus son difíciles de prevenir y controlar. (Arredondo-García et al., 2016)

La mayoría de los arbovirus son de un tamaño aproximado de 17-30 nm y solo contienen un genoma ARN monocatenario positivo en caso de la familia Flaviviridae y Togaviridae, poseen en sus membranas proyecciones regulares y una disposición

regular de los capsomeros. Algunos presentan simetría cúbica, helicoidal o en forma de bastoncillos, presentando una envoltura lipídica recubriendo la cápside. (Arredondo-García et al., 2016)

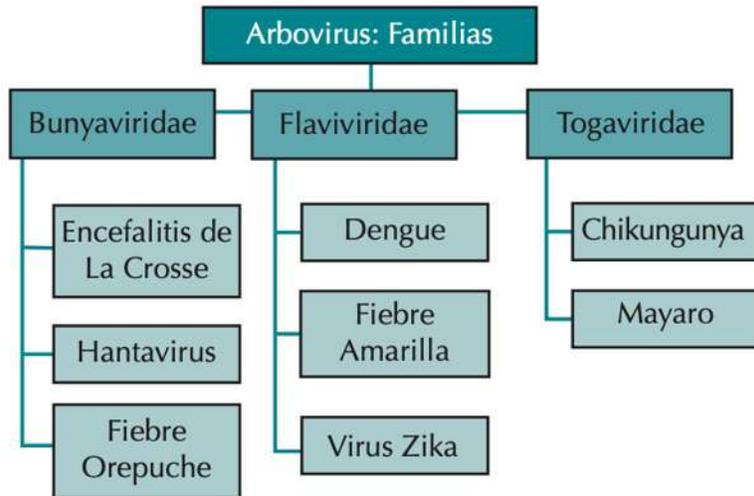


Figura 1 Familias pertenecientes al grupo Arbovirus.

Fuente: Navarrete-Espinosa J, Gómez-Dantés H. Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2006;44(4):347-353.

## 5 Ciclo de vida del mosquito Aedes Aegypti

Aedes Aegypti es un culicido, el cual es vector principal de los arbovirus, cuales son el caso de Dengue, Zika, Chikungunya. El mosquito es originario de África, teniendo un origen completamente selvático donde el mosquito depositaba sus huevos en troncos viejos, hasta adaptándose en doméstico y peridoméstico llevando en una sinantrópia, convirtiendo sus depósitos de huevos de contenedores de agua natural (troncos, plantas de bambú) a contenedores artificiales (contenedores plásticos). (López-Latorre & Neira, 2016)

El mosquito para llegar a un desarrollo adulto tiene que pasar por las siguientes cuatro etapas: Huevo, Larva, Crisálida, Adulto. Teniendo un proceso de 7 a 10 días para convertirse en adulto en temperaturas óptimas de 28°C a 32°C, perdiendo actividad al bajar a 12 a 14 ° C. (López-Latorre & Neira, 2016)

El mosquito es de color negro con franjas blancas en sus patas, los machos tienden a ser más pequeños. Su alimentación se basa en azúcares de néctar y exudados de frutas. Las hembras son hematófagas, utilizando la sangre principalmente humana para el desarrollo de sus huevos, también pueden consumir azúcares con ámbitos alimenticios diurnos pero tiene una gran preferencia hacia los humanos (Eiman et al., 2016)

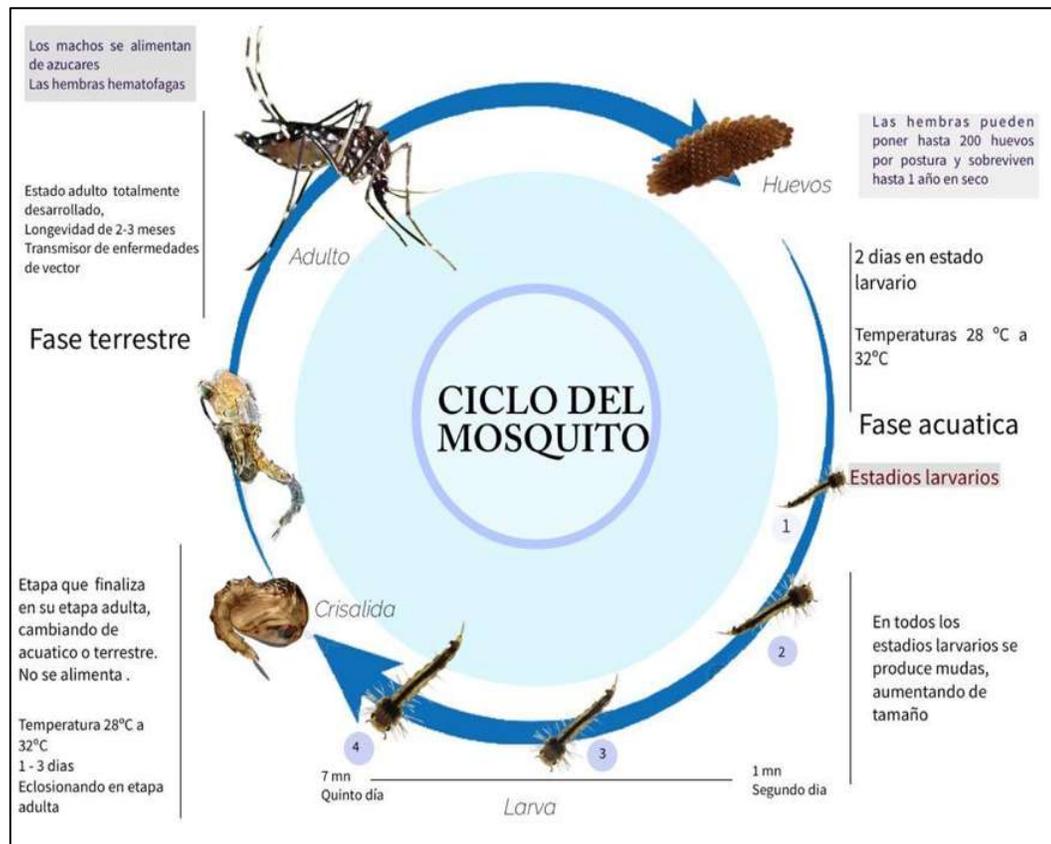


Figura 2: Ciclo de vida del mosquito.

Recopilación de información Fuente: (Eiman et al., 2016)

## 6 Ciclo de transmisión del arbovirus

Las enfermedades transmitidas por vectores involucran una dinámica de interacción de viremias, huéspedes vertebrados (humanos) e invertebrados (mosquito) con el ambiente. Los vectores pueden infectarse mediante la ingesta sanguínea a partir de un huésped virémico propagando los arbovirus con una transmisión transovárica; infectando las células del intestino medio, llega al hemocele y luego diversos tejidos, incluyendo las glándulas salivales. Cuando, las glándulas salivales están infectadas, el artrópodo es capaz de transmitir el virus a otro huésped vertebrado cuando se alimenta de sangre. El riesgo de transmisión a los vertebrados estará en relación con la densidad de población de los vectores, su tipo de alimentación y la eficiencia con la que puedan transmitir el virus (competencia vectorial), entre otros múltiples factores. Los huéspedes humanos pueden desarrollar niveles de viremias suficientemente altos para infectar al mosquito sano durante una comida sanguínea a este se le conoce como reservorio viral o pueden ser huéspedes terminales al no permitir la continuación de la transmisión. Los ciclos de los arbovirus pueden clasificarse en ciclos de mantenimiento y ciclos de amplificación. Los ciclos de mantenimiento son los que permiten la permanencia del virus en la naturaleza

creando enmicidad, en algunas ocasiones se produce alteraciones ecológicas que aumentan la trasmisión de la población del vector, por consecuencia una mayor circulación viral se le conoce como ciclo de amplificación.(Arredondo-García et al., 2016)(López-Latorre & Neira, 2016)

## 7 Virus del Dengue

El DENV penetra a través de la piel durante la picadura del mosquito infectado, entrando el virus a una célula diana, el pH ácido del endosoma favorece la fusión de membranas donde posteriormente ocurre la replicación viral. (López-Latorre & Neira, 2016)

El DENV pertenece a una familia Flaviviridae, del género Flavivirus, proveniente del grupo IV (Virus ARN monocatenario positivo). Es el arbovirus más notable a nivel global, que es causante de la enfermedad que lleva el mismo nombre, ha llegado a extenderse circulando a zonas que no son de carácter endémico, tales como las costas de Estados Unidos y Europa. Sumado a lo anterior, el dengue se ha posicionado como uno de los principales problemas de salud pública internacionalmente que afecta a la especie humana. (Solomon & Barrett, 2003)

Al DENV se le integran 4 serotipos virales, el DENV1, DENV2, DENV3 y por último, el DENV4, los cuales presentan diferencias en la composición de sus genomas y sus antígenos de superficie. La severidad de la enfermedad causada por la infección con el virus del dengue puede variar desde casos asintomáticos a casos fatales. A pesar de que no se sabe a ciencia cierta cuáles son los factores que determinan la evolución de la enfermedad en un paciente, se cree que la infección secuencial con distintos serotipos del virus puede ser un factor desencadenante de la presentación más severa de la enfermedad, y puede llegar a tener consecuencias desafortunadas por la notoria infección conocida como fiebre de dengue (FD) también llamado dengue clásico y dengue hemorrágico (DH), en casos severos, el cual puede llegar a ser fulminante causando un choque hipovolémico (FHD/SCD); dentro los cuales DENV1-2, están relacionados aún más a mayor parte de infección por dengue en México. Es valioso puntualizar que estos serotipos se agrupan según sus variantes genéticas, y para ello se debe analizar exhaustivamente las secuencias de los genes E o NS1.(Akey et al., 2014)

## 7.1 Epidemiología del Dengue en Mexico

Los datos de la Secretaría de Salud (2019) destacan que en México el dengue se ha convertido en una de las infecciones epidémicas de mayor implicancia por sus características socioeconómicas, incrementando el número de casos hemorrágicos entre 1980 y 1995, primero los serotipos DENV-1-2-4 después el DENV-3. El vector del mosquito *Aedes Aegypti* aparece en 1986 en Estados Unidos, sin embargo y en México se demostró su aparición en 1991, en estados como Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nuevo León y San Luis Potosí. Tanto los casos probables como los confirmados han ido en ascenso, esto se observó entre 2018 y 2019. La incidencia de los serotipos circulantes denotan que el DENV-1 es el más abundante dentro de México.



### Casos de Dengue; México, 2018-2019

INDICADOR	2018 SEMANA	2019 SEMANA
DNG	868	3,234
DCSA	924	1,519
DG	131	412
DCSA + DG	1,055	1,931
TOTAL CONFIRMADOS	1,923	5,165
DEFUNCIONES	15	20
LETALIDAD&	1.42	1.04

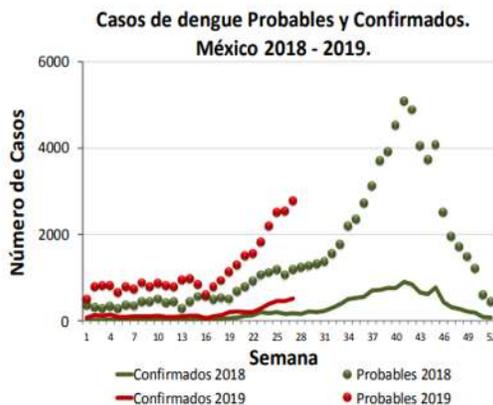


Figura 3 Casos de dengue virus 2018-2019 Mexico

Fuente: (Subsecretar et al., 2019)

## 7.2 Manifestaciones clínicas

Dentro del cuadro clínico de la infección por DENV, uno de los síntomas principales son los cuadros febriles leves, en los casos más severos incluyen cefaleas, artralgias, dolor retro orbital, acompañada por rash cutáneo maculopapular, en el diagnóstico de laboratorio se encuentran leucopenia y trombocitopenia hasta hemorrágicas. (Solomon & Barrett, 2003)

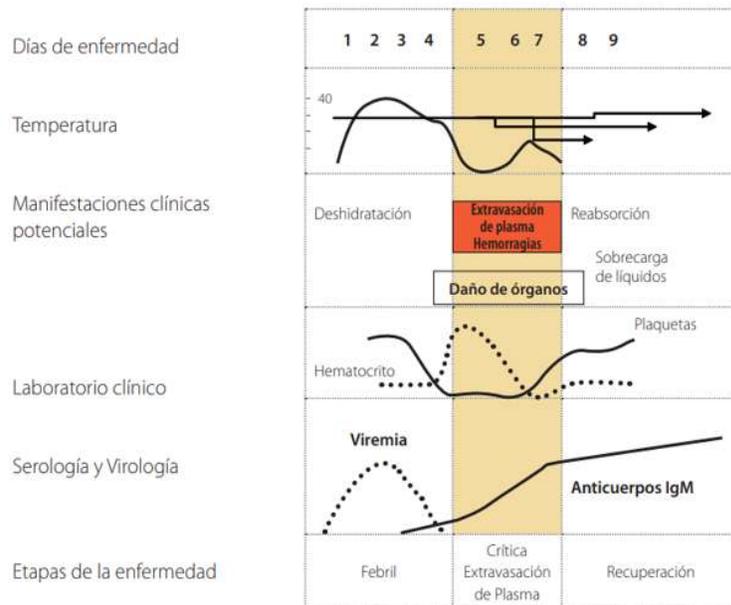


Figura 4: "Curso de la infección por dengue virus". (Solomon & Barrett, 2003)

Clasificando su gravedad en cuatro fases de la viremia; la primera fase de la enfermedad o de incubación, no se presenta de manera sintomática, dando paso a la segunda fase también conocida como fase febril, se acompaña de ruboración facial, eritema cutáneo, mialgias, cefalea y artralgias, con un aumento de la temperatura corporal axilar ( $> 37.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Siguiendo a la diferenciación de Dengue con signos de alerta y sin signos de alerta, la diferencia es el aumento de la permeabilidad vascular con un gran incremento del hematocrito y una defervescencia de la fiebre. La tercera fase o estado crítico, con duración de 24 a 48 horas caracterizado por una fuga plasmática, en casos generales acontece una leucopenia, una baja plaquetaria antes de una hemorragia, la elevación del hematocrito es un indicador para verificar la gravedad del estado del flujo plasmático, manifestando un derrame pleural y ascitis. Sediendo a un cuadro llamado shock de dengue sucede cuando hay una pérdida excesiva del volumen plasmático, ocasionando una acidosis metabólica y coagulación intravascular, subsecuente a esto sucede una falla orgánica múltiple como miocarditis, hepatitis, encefalitis. La cuarta fase o Fase convalecencia, posterior a la fase crítica, cuando el paciente sobrevive entra en fase de recuperación reabsorbe fluidos corporales de manera gradual recuperando la temperatura, bienestar hemodinámico. (MSPA, 2013)

## 8 Virus del Zika

El virus del Zika pertenece a la Familia *Flaviviridae*, del Género *Flavivirus* que proviene del Grupo IV Virus ARN monocatenario positivo, parecido al virus del Dengue, se aisló en 1947 de un mono *Rhesus* en los bosques de Zika (Uganda) situado en África Oriental de ahí su nombre; aislado en los seres humanos en 1968 en Nigeria, años más tarde el 40% de la población contenían anticuerpos anti-ZIKV. Los casos asintomáticos son frecuentes y presentan una clínica muy idéntica a otros Arbovirus (DENV o CHIKV), tanto en la transmisión, como en sus síntomas. En su tropismo se encuentra la cutánea de manera más precisa en el ectodermo.

Durante el brote de Zika el impacto se realizó en la obstetricia y pediatría empezó a tener casos de microcefalia en infantes recién nacidos, las mujeres en gestación tenían un riesgo a estar expuesta o a las complicaciones del síndrome de Guillain-Barre, se le asocio el virus de Zika con los trastornos neurológicos o autoinmunológicos. Dentro de las causas son multifactoriales, similares al virus anterior (Colegio Médico del Perú. & Galán-Rodas, 1972).

### 8.1 Epidemiología de Zika en México

En conjunto con los demás brotes epidemiológicos de otras infecciones de arbovirus, se identificó el primer caso autóctono en México de la enfermedad causada por el virus del Zika, fue reportado en el mes de octubre del 2015 en el estado de Monterrey en un sujeto masculino de 22 años.

Según las autoridades de salud, hasta el 25 de noviembre del 2019 se confirmaron un total de 124 casos de infección por ZIKV, siendo el estado de Jalisco con mayor índice de infectados con 41 casos, seguidos con Morelos con 28 infectados y Sinaloa con 25. Siendo un total de 13 casos de mujeres embarazadas sin reporte de mortalidad fetal (Arredondo-García et al., 2016; Colegio Médico del Perú. & Galán-Rodas, 1972).

### 8.2 Manifestaciones clínicas

La infección por ZIKV es autolimitada, de baja intensidad, con una evolución favorable, entre sus características clínicas tiene mucha semejanza con otros arbovirosis su manifestación clínica es muy parecida a DENV con la variación del umbral de dolor, descartando un signo característico de DENV el shock hemorrágico en un cuadro grave; asimismo, en la infección por ZIKV son más frecuentes el exantema cutáneo y la conjuntivitis.

Con una incubación aproximada de 3 a 12 días con una aparición de síntomas del 75% el restante se presenta de manera asintomática con una aparición de síntomas 2 a 7 días, las manifestaciones clínicas son básicamente: cefalea, artralgia, mialgia, fiebre muy leve, artralgia con dolor leve a intensidad moderada, no incapacitante, edema en extremidades inferiores. La manifestación clínica más significativa para el ZIKV es el exantema maculopapular pruriginoso tipo de erupción cutánea, plana

no mayor su diámetro un centímetro, maculas con descoloramiento de piel, también se presenta una conjuntivitis no purulenta con intolerancia a la luz, con compromiso neurológico causando una reacción auto inmunitaria el síndrome de Guillan-Barre con debilidad muscular, hormigueo en extremidades y pérdida de la función musculo-nerviosa (Cabezas & García, 2017).

## 9 Estructura Viral del Dengue y Zika

El genoma de los flavivirus está compuesto por una única molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de 11 kb de longitud, la cual está conformada a su vez por dos regiones no codificantes. En el extremo 5' del genoma viral encontramos que posee un CAP y, por otra parte, el extremo 3' carece de cola de poliadenilato. El genoma contiene un único marco de lectura abierto (ORF) que se encarga primordialmente de codificar una sola poliproteína viral. Esta proteína se procesa mediante proteasas virales y celulares, que logran dar lugar a tres proteínas estructurales (E, prM, C), localizadas en los viriones, y siete proteínas no estructurales (NS) implicadas en distintas funciones del ciclo replicativo. Dentro de este último grupo cabe destacar que seis de estas proteínas (de NS2A a NS5) forman un importante complejo de replicación en el lado citoplasmático de la membrana ER, donde las enzimas NS3 y NS5 funcionan en un andamio creado por las otras cuatro proteínas transmembranas. Sin embargo, la proteína restante, es decir, la NS1 glucosilada conservada, se asocia con lípidos, ya que el dímero intracelular NS1 se localiza en la membrana de ER, específicamente en el sitio viral de replicación del ARN, es por esto que durante la infección, las partículas de lipoproteínas NS1 secretado interactúan con los componentes del sistema inmunitario. (Velandia & Castellanos, 2011)

### 9.1 Las proteínas estructurales.

#### 9.1.1 La proteína Capside.

La proteína Capside o Core, abreviada como “proteína C”, conforma la núcleo cápside que se relaciona con el ARN viral, donde se forma el core de la partícula. En su forma madura logra alcanzar un peso molecular de 12 kDa, constituida por 26 aminoácidos básicos y 3 ácidos, los cuales crean homodímeros en solución, resultando con una gran afinidad por los ácidos nucleicos y las membranas lipídicas. (Velandia & Castellanos, 2011)

Su estructura secundaria consiste en cuatro hélices alfa que cumplen diferentes funciones, por ejemplo, las hélices 3 y 4 son hidrofóbicas y logran el anclaje de la proteína a la membrana del retículo endoplásmico. En cambio, la hélice 1, ubicada en el extremo N-terminal de la proteína y orientada hacia el citoplasma, posee aminoácidos de carácter básico, los cuales son capaces de unir al ARN genómico recién sintetizado. Todo esto forma el complejo riboproteico o nucleocápside, que

no solo funciona como protector al ARN viral de la degradación, sino que también, promueve la organización del ARN al interior de la partícula viral en proceso de formación. La nucleocápside se estabiliza mediante la interacción de varios homodímeros antiparalelos de la proteína C, que rodean con gran afinidad y especificidad a la hebra de ARN viral.

Por su parte, la hélice 2 posee una cualidad hidrofóbica que interviene durante el ensamblaje de la ribonucleoproteína y de las partículas virales, actuando como una bisagra que favorece el acercamiento del ARN viral al resto de la proteína C, al permanecer anclada en la membrana del retículo endoplásmico. Cabe destacar, que esta misma hélice también recluta partículas lipídicas, presentes en el citoplasma, que promueven la formación de la partícula viral. (Ángel et al., 2012)

#### 9.1.2 La proteína M y Proteína precursora de membrana.

La proteína precursora de membrana (prM) tiene un peso molecular de 26 kDa y se encuentra en los viriones inmaduros en conjunto con la proteína M, juegan un papel importante durante el proceso de maduración de la partícula viral. La proteína precursora de membrana es procesada después de la transducción por la proteasa celular furina, que la divide en dos y genera, por un lado, el péptido pr, y por otro, la proteína M, que queda con un peso molecular de 8 kDa. (Velandia & Castellanos, 2011)

#### 9.1.3 La proteína E

La glicoproteína E posee funciones distintivas como mediar la adsorción de la partícula viral a la célula hospedadora e inducir la fusión de la envoltura viral con membranas de los compartimentos endosomales, los cuales permiten la liberación de la nucleocápsida al citoplasma de la célula hospedadora. (Gómez et al., 2017)

La proteína de envoltura tiene un peso molecular de 50 kDa, la organización de la glicoproteína E sobre la superficie de la partícula proporciona una apariencia de simetría pseudoicosaédrica, poseyendo tres dominios clasificados como I, II y III, respectivamente, y se distribuye especialmente sobre la superficie del virus. Destacando que los dominios II y III de cada una de estas proteínas son factores determinantes en las interacciones entre el virus y los receptores de la membrana plasmática de las células vulnerables, favoreciendo la endocitosis del virus y subsecuentemente las mutaciones y modificaciones posteriores a la transducción que sufre esta proteína en cada ciclo de replicación, sin embargo, puede verse afectado directamente en la eficiencia de la replicación, la virulencia y el tropismo del DENV y/o ZIKV. Finalmente, la glucoproteína E es un inmunógeno del virus, es decir, estimula la respuesta inmune del individuo e induce la producción de anticuerpos neutralizadores. (Gómez et al., 2017)

## 9.2 Proteínas No Estructurales.

Las funciones de cada una de las proteínas no estructurales (*NS, non structural proteins*) del DENV Y ZIKV están relacionadas con la replicación y empaquetamiento viral, estos mecanismos están conectados con el retículo endoplásmico del anfitrión y se clasifican en siete importantes categorías (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). (Exp & Publica, 2003)

### 9.2.1 Proteína NS1

Proteína dimerica altamente conservada, con un peso molecular que varía de 46 a 55 kDa, según el grado de glicosilación creando una importancia para una secreción eficaz, virulencia y replicación viral. La NS1 existe como monómero, dímero (proteína unida a membrana, mNS1) y hexámero (proteína secretada, sNS1) simétrico en forma de barril, ya que transporta una carga de 70 moléculas de lípidos, dando a conocer que la proteína NS1 intracelular es fundamental en el proceso de replicación viral, mientras que se ha informado que la NS1 secretada y unida a la membrana provoca una destacable respuesta inmunitaria. (Rastogi et al., 2016)

En su estructura tridimensional el dímero NS1 sugiere tres dominios funcionales, un  $\beta$ -roll el cual es hidrófobico (1 a 29 aminoácidos), un dominio de  $\alpha / \beta$ - wings que se asemeja al pliegue tipo RIG-I (38– 151 aminoácidos) y una  $\beta$ -ladder central (181 a 352 aminoácidos), estabilizada por enlaces disulfuro.

El dímero NS1 se construye alrededor un dominio de dimerización " $\beta$  roll", que es una estructura de intercambio, cada una estabilizada por un disulfuro (Cys4-Cys15). Mismas que se extienden a lo largo del eje del dímero y se entrelazan para formar una lámina  $\beta$  de cuatro hilos, la cual se curva en una estructura similar a un rollo. El segundo dominio de cada monómero sobresale del  $\beta$  central como un ala. Por su parte, en cada dominio de "Wings" existen dos sitios de glicosilación (Asn130, Asn175), un disulfuro interno (Cys55-Cys143) y dos subdominios discretos. El subdominio  $\alpha / \beta$  comprende una de cuatro hebras, dos hélices  $\alpha$  y una punta distal desordenada (aminoácidos 108-128). Un subdominio de conector discontinuo, (aminoácidos 30-37 y 152-180) empaqueta contra el  $\beta$ -roll y también une con el Wings a través de un enlace disulfuro (Cys179-Cys223). La característica estructural predominante de NS1 es el tercer dominio, llamado  $\beta$ -ladder, que se extiende a lo largo del dímero con sus 18 hebras  $\beta$  dispuestas como los peldaños en forma de escalera. Este dominio de " $\beta$ -ladder" central está formado por la mitad C-terminal de NS1 (aminoácidos 181 - 352), en una disposición en la que cada monómero contribuye con nueve peldaños a la  $\beta$ -ladder antiparalela. (Akey et al., 2014)

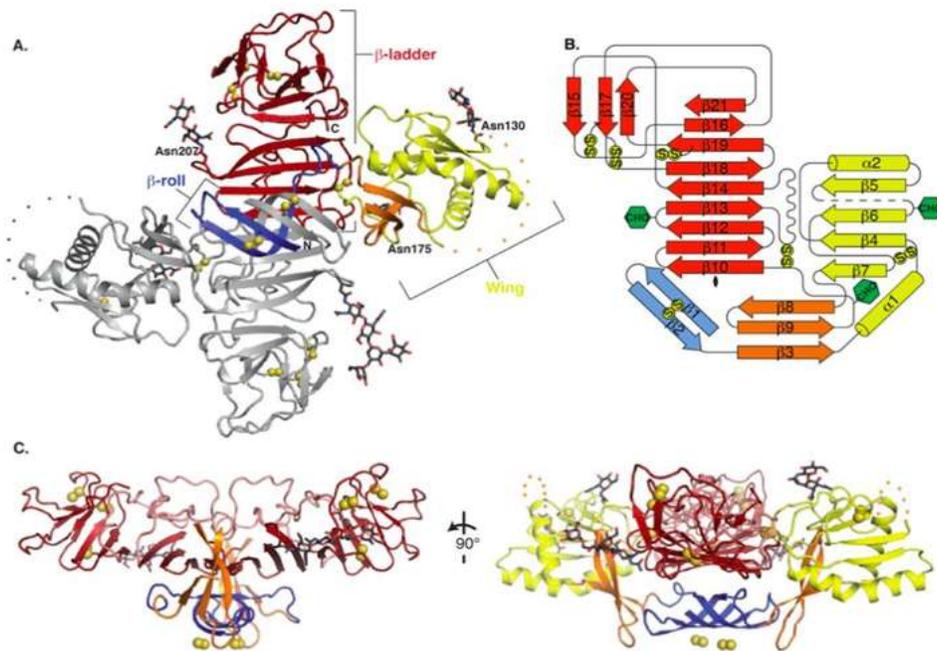


Figura 5 : Proteina NS1 Dimero.

Fuente: (Akey et al., 2014)

La NS1 secretada es una partícula proteolípida hexamérica soluble, un importante marcador en el diagnóstico para la infección por DENV y ZIKV en suero, esto relacionado a que las proteínas del sistema inmunológico se encuentran con el hexámero sNS1. Se han identificado en 108 epítomos lineales NS1, con más frecuencia las partes más accesibles del hexámero NS1, los epítomos se localizan en el dominio de Wings, la punta C-terminal de  $\beta$ -ladder, la presencia de sNS1 en la circulación durante infecciones primarias y secundarias, provocando una mayor concentración de IgG. Informando así que los anticuerpos anti-NS1 reaccionan de manera cruzada con una gama aún más amplia de proteínas del huésped como factores de coagulación, proteínas de adhesión / integrina; componentes de la matrix extracelular (ECM) (Rastogi et al., 2016)

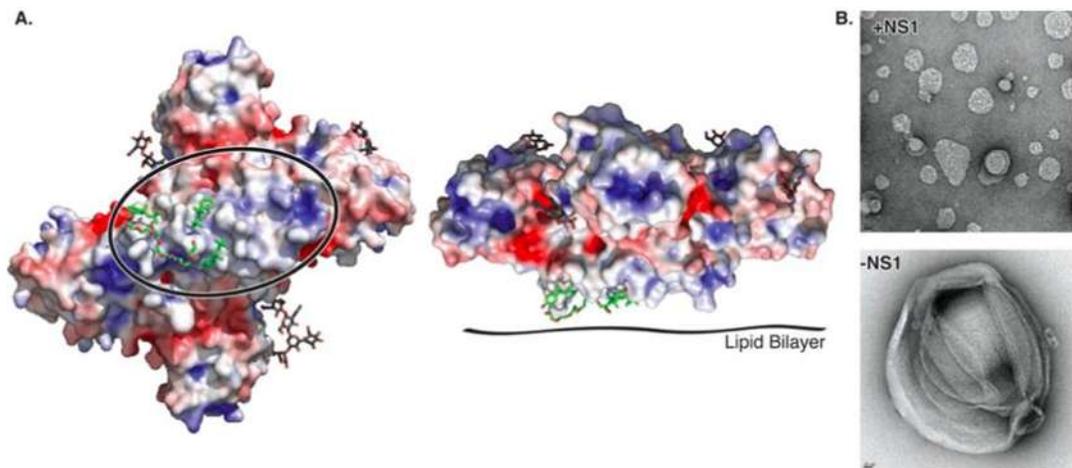


Figura 6: NS1 Balsa lipidica.

Figura: (Akey et al., 2014)

### 9.2.2 Proteína NS2A- NS2B.

Con un peso aproximado de 22 kDa, es una proteína hidrofóbica de membrana involucrada directamente en las reorganizaciones de la membrana que tienen lugar en células infectadas con flavivirus, así como en el ensamblaje de los viriones y la replicación viral. El ARN genómico producido en cada ciclo de replicación se utiliza como nueva plantilla para generar las formas replicativas y los intermediarios replicativos o se asocia dentro de la nucleocápside durante el ensamblaje viral. La proteína NS2B posee una región hidrofóbica que ancla a la membrana RE con el complejo NS2B/NS3, por medio de un proceso preteolítico un dominio hidrofílico actúa como cofactor de la proteasa NS3 y contribuye a su anclaje a las membranas celulares. (Exp & Publica, 2003)

### 9.2.3 La proteína NS3.

La proteína NS3 (70 kDa) es una proteína bipartita, caracterizada por ser trifuncional, es decir, que posee actividad NTPasa, helicasa y serinaproteasa. En el extremo N-terminal un dominio proteasa similar a la tripsina (NS3pro) y en el extremo C-terminal posee un dominio con diferentes actividades enzimáticas, que actúa como trifosfatasa de nucleótidos estimulada por ARN (NTPase) y como helicasa del ARN (NS3Hel); ambas funciones indispensables en la replicación viral. El dominio NS3Pro actúa hidrolizando los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/ NS5 del polipéptido (Exp & Publica, 2003).

En ese sentido, se observó que NS3 mediaba el paso de la forma replicativa del ARN del DENV y ZIKV, a la forma intermedia de la replicación, solo cuando NS5 pasaba a ser desfosforilada citoplasmática se observaba una inmunoprecipitación con NS3, lo cual indicó que la fosforilación de NS5 era primordial para interrumpir su interacción con NS3. (Guzman et al., 2016)

#### 9.2.4 La proteína NS4.

La proteína NS4 comprende dos proteínas de membrana de longitud completa: NS4A y NS4B (127 y 248 aminoácidos, respectivamente), unidos por una región C-terminal de 23 residuos de NS4A (llamado el "fragmento 2K"). El cual se somete a un escote mediado por NS32B para producir NS4A y 2K-NS4B.(Gopala Reddy et al., 2018)

#### 9.2.5 La proteína NS5

Es una proteína que contiene 900 a 905 aa, con un peso molecular 104 kDa. Esta proteína es multifuncional, ya que el extremo N-terminal posee actividad enzimática de metiltransferasa y guanidiltransferasa. Actúa como la única polimerasa durante la replicación y transcripción virales. Aunque estos procesos suceden exclusivamente en el citoplasma de la célula infectada, se ha identificado una señal de localización nuclear en la proteína NS5 que facilita su importación al núcleo.(Velandia & Castellanos, 2011) La forma de NS5 puede catalizar la síntesis de ARN, dependiendo de la conformación de la proteína, la cual se puede encontrar en un estado "Rigido o Cerrado" a bajas temperaturas >28°C, en estado "Movido o Abierto" en altas temperaturas <38°C. La enzima abierta, genera muy pocos oligonucleótidos de ARN, dando origen a moléculas de ARN de cadena doble, en contra del estado rígido imposibilitada de unirse a la estructura doblada hacia atrás del ARN, en subsecuente se une eficazmente a la hebra simple ARN molde como productos hebras de sentido negativo. (Exp & Publica, 2003)

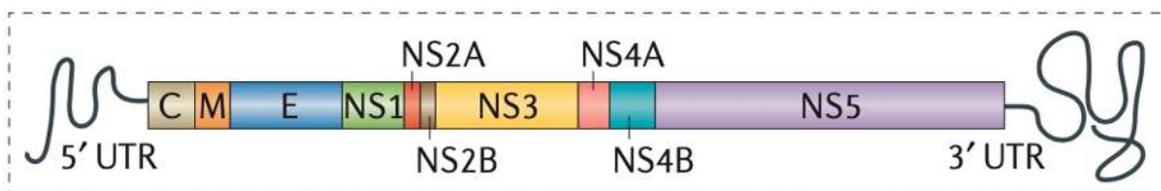


Figura 7: Fragmento gen codificante flavivirus

Fuente : (Guzman et al., 2016)

## 10 Virus Chikungunya

El virus Chikungunya pertenece a la familia *Togaviridae* del género *Alfavirus*, que proviene del grupo IV Virus ARN monocatenario positivo; es una infección emergente en los últimos tiempos, tanto que se ha extendido de África, hasta Europa y países latinoamericanos, llegando por las islas del Caribe provocando una epidemia de gran magnitud, aun no se encuentra la manera efectiva de su transmisión del virus.

Es un arbovirus transmitido por un culicido llamado *Aedes Aegypti*, es un virus ARN de sentido positivo, el nombre Chikungunya proviene del makonde, que es un

lenguaje de un grupo étnico del sureste de Tanzania y de Mozambique, que su significado es “*doblarse por dolor*” es una comparación popular por la artralgia y mialgia incapacitante causada por esta infección (habiendo también fiebre alta y dolor de espalda). Su origen se reporta en Tanzania desde 1952, se encontró en el suero de un paciente que infirieron para una infección por dengue en un brote; se presenta entonces un cuadro semejante a las infecciones de Dengue y Zika, pero aún no se identifica una manera efectiva para diagnosticar con los síntomas o signos, se utilizan pruebas serológicas como son las RT-PCR y ELISA.

Al momento de infectar al huésped es inoculado por el culícido por medio de una picadora, entra al sistema circulatorio encontrándose con los macrófagos, fibroblastos, entre otras células internalizando para llegar a los ganglios linfáticos proximales, infectando además células cercanas para poder expandirse al resto del cuerpo, articulaciones, hígado, músculo y cerebro, generando una respuesta inmunitaria y aumentando en número de mononucleares incluidos los macrófagos, asimismo se encuentran marcadores inmunológicos pro-inflamatorios como interferón alfa, interleucinas, IL-4, IL-10 y INF- $\gamma$  induciendo una respuesta inmunológica completa, esto generaliza una protección a largo plazo de la infección por CHIKV sin embargo los estudios serológicos marcan un margen menor del 30% de anticuerpos en pacientes anteriormente infectados, una característica no convencional de la infección que en ocasiones compromete al sistema nervioso central con presencia de virus y anticuerpos IgM, subsecuentemente se asocia la respuesta inmunitaria innata con artralgia y mialgia produciendo inflamación aguda debido a la cronicidad (Frank Hadley Collins;., 2010).

## 10.1 Estructura viral CHIKV

El CHIKV alcanza un diámetro de entre 60 y 70 nm de diámetro, está constituido por virus de célula diana y por viriones con una bicapa lipídica procedente de la membrana plasmática de la célula infectada. La envoltura posee 240 copas de heterodímeros de las glicoproteínas trans-membranales tipo 1, E1, E2, teniendo reconocimiento de receptor para la célula diana.

## 10.2 La proteína E2

La proteína E1 está estrechamente asociada a otra proteína de membrana, la glicoproteína E2, la cual es sintetizada a partir de la proteína precursora pE2 25 que está constituida por 423 aa; pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y está formada por tres dominios tipo inmunoglobulina (A, B y C). Se encuentra en la envoltura viral formando un heterodímero con la glicoproteína E1 y actúa como ligando de los receptores diana del VCK27. Por ende, las glicoproteínas E1 y E2 son las responsables de la invasión celular del VCK encargadas de mediar el proceso de unión y fusión del virus con la célula huésped y la diseminación viral en el vector (Martínez et al., 2017).

### 10.2.1 Producción y purificación de proteína CHIKV E2 recombinante

La producción y purificación de la proteína CHIKV E2 recombinante se llevó a cabo Innovate UK y el Departamento de Salud y Asistencia Social del Reino Unido (proyectos nº 972216 y 971557), el plásmido de expresión (500 µg) se transfectó individualmente en células HEK-293T usando polietilenimina (PEI) en botellas rotativas (área de superficie de 2125 cm<sup>2</sup>) en condiciones estándar de cultivo celular. Cinco días después de la transfección, las células se descartaron y el medio se filtró a través de filtros desechables de 0,22 µm. Las proteínas secretadas se purificaron del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad con Niquel Sepharose (HisTRAP™, GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido), utilizando el sistema de cromatografía Äkta Start y se eluyeron con 500 mM de imidazol. Finalmente, las proteínas eluidas se dializaron usando un casete Slide-A-Lyzer™ (Fisher Scientific, Reino Unido) contra 1 × PBS. (Kim et al., 2019)

### 10.3 Epidemiología nivel México CHIKV

De acuerdo con los reportes emitidos por la Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, se encontró que en 2019 (en la semana epidemiológica mexicana 52) un total de 9 casos confirmados por infección de Chikungunya, aunque no se reportaron defunciones, destacando los estados de Oaxaca con 3 casos confirmados y Nayarit con 2 casos, se observa que los únicos estados con antecedentes se ubican en zonas con altas temperaturas climáticas. Un año anterior, en el 2018, ya se habían presentado varios casos, llegando a un total de 39 comprobados.

## 11 Diagnóstico de confirmación por estudios serológicos

En el diagnóstico serológico existe una serie de pruebas moleculares para confirmar la infección, se necesita una muestra biológica con sangre del individuo con la presunta infección, habiendo presentado previamente signos y síntomas relacionados con la enfermedad, para las muestras se puede utilizar suero, muestra con suero debe tener más de un día con el cuadro febril, de ahí que por la existencia del DENV en las proteínas virales y ARN viral, se van a presentar las inmunoglobulinas IgG o IgM (Salud, 2016).

### 11.1 Caso presuntivo

Para poder diagnosticar a un paciente con infección por Arbovirus se pasa por un criterio denominado “Diagnóstico presuntivo”, éste se puede aplicar a cualquier persona, sin considerar sexo o edad, pero sí se toma en consideración su origen o cualquier movilización en zonas de riesgo dentro de los últimos días, manifestando fiebre por más de 7 días de duración, y no debe haber alguna otra patología en vías

aéreas superiores, ni de otra etiología definida. En caso de presentarse los síntomas, se requiere ser examinado para ubicar con precisión la presencia de los signos de alarma. (MSPA, 2013).

## 11.2 Diagnóstico por RT-PCR

Durante los múltiples brotes en regiones tropicales del mundo se ha visto la necesidad de detectar de manera rápida y eficaz las infecciones por arbovirosis para esto se necesita que la muestra sea obtenida en los 3 primeros días a partir de haber iniciado el cuadro febril; y aquí, es cuando se encuentra la presencia de la proteína NS1 en caso de DENV, por el método reacción de polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR), la ventaja de esta prueba es su gran especificidad. El ensayo RT-PCR utiliza ácidos nucleicos que amplifican el ARN de los serotipos de DENV 1-4, CHIKV, ZIKV de esta forma se puede medir de manera cualitativa. Se utiliza un PCR junto con oligonucleicos iniciadores y sondas de hidrólisis con doble marcador; las regiones objetivo del ARN viral se transcriben en ADN complementario (ADNc) y se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR); las sondas marcadas con fluorescencia aparecen con fragmentos de ADN amplificados y la intensidad de la señal fluorescente es monitoreada por el instrumento 7500 Fast Dx durante cada ciclo de PCR; la amplificación del objetivo se registra como un aumento de la fluorescencia en ese tiempo en comparación con la señal de fondo.

Esta técnica ha sido la más estandarizada y analizada, en la cual se amplifica un determinado fragmento de ARN a partir de un termociclador, que radica en desnaturalizar por medio de la temperatura que varía entre 45°C y 95°C, esto se logra por una enzima DNA polimerasa termoestable para una acumulación de proteínas específicas; estando sintetizado, sirve como molde específico para el número de copias subsecuentes creando una reacción que amplifica los fragmentos claros, ofreciendo una especificidad ante proteínas virales y material genético en cantidad escasa y creando una susceptibilidad mayor; con lo anterior esta técnica es la más eficiente y rápida para la detección del virus, en comparación de un cultivo celular por aislamiento. Para el diagnóstico por RT-PCR se debe considerar el tiempo de la infección, siendo aproximadamente unos 5 días en presentar síntomas claros (Yábar et al., 1999)

### 11.3 Diagnóstico por ELISA

El ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas ELISA (Enzyme-Linked-Immunoabsorbent Assay, por sus siglas en inglés), descrita por Voller en 1977, es una técnica empleada para evidenciar una reacción antígeno-anticuerpo de forma cualitativa y/o cuantitativa. El ensayo ELISA se utiliza principalmente con fines de diagnóstico, sin embargo, también tienen aplicación en investigación y diversos estudios epidemiológicos, existen distintas variantes las cuales se clasifican según su precisión, sensibilidad y detectabilidad. Las ELISA's pueden detectar enzimas, proteínas, antígenos, hormonas, glicoproteínas o material genético en muestras biológicas; es una prueba versátil ya que puede detectar el virus en cantidades de nanogramos, picogramos por mililitro, la reacción es evidenciada por la aparición o el cambio de color de la muestra y la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo es proporcional a la intensidad de la coloración la cual puede ser evaluada por métodos espectrofotométricos. (Cabezas & García, 2017)

El diagnóstico ELISA, es una prueba inmuno-enzimática indirecta para determinar anticuerpos anti-DENV, después de una primera infección se puede detectar en los 3 primeros días la IgM, hasta los 3 meses que se mantienen en circulación de sangre periférica, la inmunoglobulina de elección puede ser rápida, económica y fácil de realizar; también se puede detectar la IgG, que es una inmunoglobulina con memoria y se puede detectar hasta 14 días después de la infección por DENV. Las infecciones por DENV son caracterizadas por una rápida respuesta del sistema humoral, ELISA es entonces una técnica accesible y de bajo costo para un diagnóstico de confirmación.

La técnica ELISA se realiza con anticuerpos de la muestra del individuo que reaccionará con el antígeno unido a la placa de poliestireno, los anticuerpos no anclados se retiran por medio de lavados; posteriormente, se une una globulina anti-IgG humana formando un complejo inmunológico antígeno-anticuerpo, de igual forma, se utilizan los lavados para eliminar las globulinas no ancladas en el complejo, se agrega un sustrato incoloro cuando se une al complejo y se pasa por una reacción de colorimetría de color azul, se cambia al color amarillo con una solución de paro. Cabe comentar que, esta técnica puede dar falsos negativos, como falsos positivos, con otros arbovirus, también con citomegalovirus y virus Epstein-Barr (Clemen et al., 2019)

## 12 Ensayo Inmunoabsorbente directo ligado a enzimas (ELISA)

Las pruebas serológicas convencionales, como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas de captura de anticuerpos IgM e IgG, se miden exclusivamente los anticuerpos contra la premembrana (prM) y las proteínas estructurales de la envoltura (E) de los flavivirus, se han propuesto anticuerpos contra la proteína no estructural 1 (NS1) como marcadores serológicos de infección natural entre poblaciones con DENV, ZIKV, y se ha desarrollado un ELISA NS1.

Al clasificar la técnica ELISA, se encontró que existen varias y muy diferentes formas de analizarlas, y que en muchas ocasiones presentan características contrapuestas, aunque muy similares en cuanto a sus principios de reacción. Se pueden denominar algunos tipos, como: ELISA no competitiva, ELISA competitiva, ELISA sándwich y la ELISA indirecta. En este caso se va a hacer especial mención al tipo ELISA indirecta.

### 12.1 ELISA Indirecta

En la técnica indirecta de ELISA, se hace referencia a los antígenos que captan a los anticuerpos de modo conjunto y, con ello, se evidencia la interacción de inmunoglobulina-enzima. En la cantidad de anticuerpos en suero de puede verificar la cantidad de enzima enlazada y se cuantifica por la cantidad de sustrato degradado. Esta técnica es específica para ciertas clases de inmunoglobulinas de clase IgG o IgA; en el caso de la IgM puede verificarse con la absorción de IgG, es donde la utilización de antígenos extraídos de microorganismos o fracciones de los mismos son fijados a las placas, están purificadas o recombinadas. La técnica indirecta es muy sensible y basándonos en conjunto, se pueden detectar subtipos de anticuerpos; tal sensibilidad depende de la densidad del epítotope del anticuerpo de estudio en la fase sólida.

### 13 JUSTIFICACIÓN

En gran parte del mundo las arbovirosis son un problema de salud pública, se consideran problemas reemergentes por el riesgo de salud y por las complicaciones patológicas que causan extendiéndose por los continentes buscando alternativas para su detección rápidas, específicamente, en Dengue su forma severa es la más alarmante, despertando una respuesta inmune exacerbada que altera también la hemostasia llevando a manifestaciones hemorrágicas y creando anticuerpos neutralizantes, en los últimos años se ha descrito un aumento potencial de los pacientes infectados, en la semana 42 del 2019 con 26,679 de casos confirmados y un total de 89 defunciones en México, en caso de Zika, la infección es preocupante por su relación con casos de microcefalia y síndrome de Guillan Barrée, la cual es una complicación principal a lactantes, ya que su transmisión del virus no solo es de manera vectorial con la picadura del mosquito, sino también de manera sexual. En el caso de Chikungunya, sus secuelas pueden ser artritis o dolores articulares y que pueden persistir durante meses o incluso años.

En el paso del tiempo se han realizado muchas investigaciones en concepto del entendimiento de los procesos bioquímicos, moleculares y su replicación de los virus Dengue, Zika, Chikungunya. Sin embargo, aún no existe un modelo donde se puedan diagnosticar de manera, rápida, sencilla y eficiente. En este trabajo se propone un protocolo para el diagnóstico mediante proteínas recombinantes de los arbovirus antes mencionados identificando anticuerpos de isotipo IgG e IgM por el método de ELISA.

### 14 OBJETIVO

Estandarizar una técnica de ELISA para determinación de inmunoglobulinas IgM, IgG contra la fracción  $\beta$ -ladder de la proteína no estructural NS1, Dengue, Zika y la proteína de envoltura E2 para Chikungunya.

## 15 Material y métodos

### 15.1 Tipo y clasificación de proyecto

Proyecto de investigación descriptivo, prospectivo y transversal.

### 15.2 Universo o población

Población general con antecedentes y/o infección aguda febril sugerente a Dengue, Chikungunya o Zika, durante periodos de un año.

### 15.3 Sitio de estudio

Laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular. División de Estudios de Posgrado Facultad de Ciencias Médicas Y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### 15.4 Muestra

Pacientes aparentemente sanos con una extracción sanguínea por medio de flebotomía en un tubo de ensayo con tampón rojo, en un periodo comprendido de un año.

El estudio fué realizado en colaboración con la Facultad de Químico Farmacobiología. Todos los sujetos de prueba firmaron una carta de consentimiento informado (formato anexo número X). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital General Dr. Miguel Silva de Morelia.

### 15.5 Obtención de la muestra

Se extrajo sangre periférica por punción en las venas cefálica, cubital o basilica de un aproximado de 4 a 8 horas de ayuno, la muestra fue recolectada en un tubo BD Vacutainer® para Suero con Activador de Coagulación por un profesional que cuenta con la capacitación en el área biomédica. Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas para la obtención de suero y plasma y almacenadas en el Laboratorio a -70°C para su análisis.

## 15.6 Conservación de la muestra

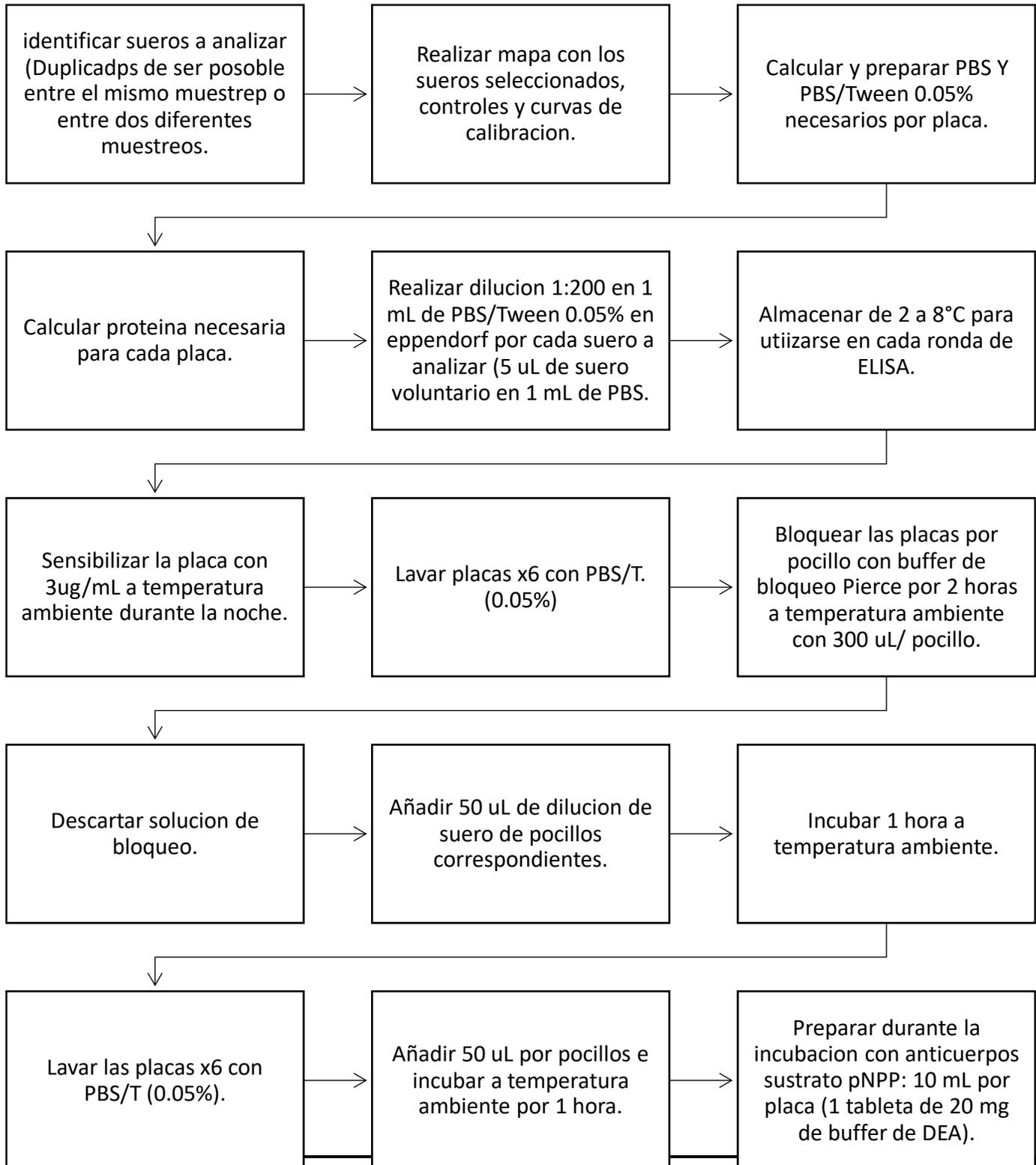
- Realizada la obtención de la muestra en pacientes aparentemente sanos, es de urgencia se cumplan con las condiciones de conservación de las muestras para su posterior análisis.
- Mantener refrigerada (2 a 8°C) después de su recolección para su rotulación e identificación dentro de las primeras 48 horas posterior a su recolección.
- Mantener Congeladas (-10 a -20 °C) Para su almacenaje pasada de las primeras 48 horas, no mayor de 7 días.
- Mantener Congeladas (-70°C) si el procesamiento es después de una semana se debe almacenar adecuadamente para periodos largos, en este estudio fue utilizado para integrar un biobanco para futuros estudios

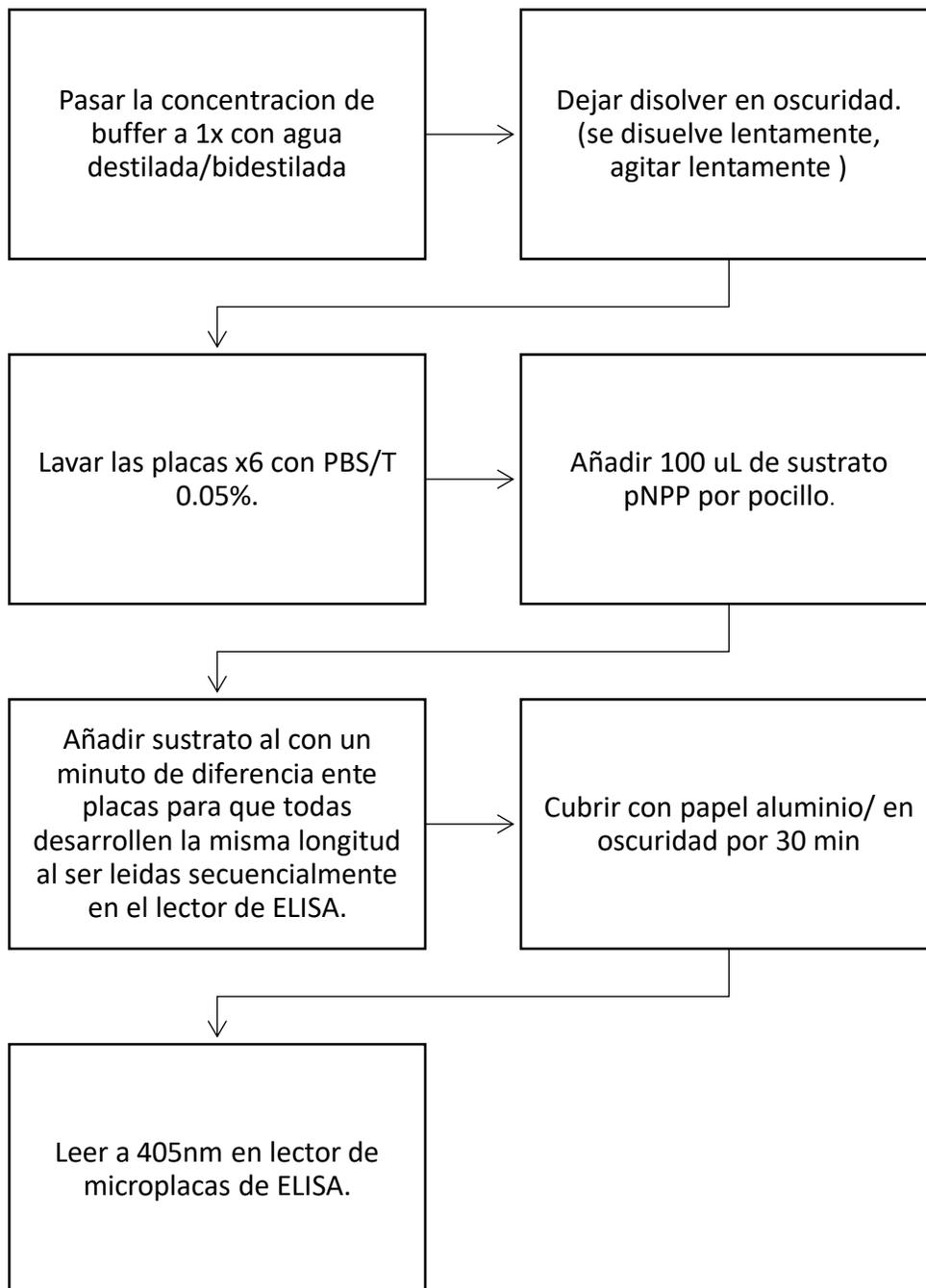
## 15.7 Materiales y reactivos

- Pipetas sencillas y multi-canal.
- Placas para ELISA de 96 pocillos Maxisorp (NUNC).
- PBS (Sigma D-8537) (5 tabletas en 1L de H<sub>2</sub>O destilada).
- PBS/0.05% Tween (anterior + 0.5 mL Tween) (Sigma P3563).
- Buffers de bloqueo libres para proteínas (10229663) Pierce, Thermo Scientific (37572).
- Anticuerpo anti-IgG humano conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma A3187-5mL).
- Anticuerpo anti- IgM humano específico de cadena  $\mu$  producido en cabra (A3275-5mL).
- Solución buffer (amortiguadora): pNPP (Sigma N-2765, tabletas de 20 mg) a 1mg/mL en buffer de dietanolamina (DEA) (Pierce 34064)

# Protocolo de ELISA.

Proteínas recombinantes de arbovirus (DENV NS1, CHIKV E2, ZIKV NS1)/  
Anticuerpos anti-IgM, anti-IgG y anti-isotipos IgG.





## 16 Resumen de cálculos.

### 16.1 Cálculo pbs/tween 0.05% requerido por placa.

$$\begin{aligned}(300\mu\text{L PBS/T})(96\text{ pocillos}) &= 28,800\mu\text{L PBS/T} \\ (28,800\mu\text{L PBS/T})(6\text{ Lavados}) &= 172,800\mu\text{L PBS/T} \\ (172,800\mu\text{L PBS/T})(3\text{ Ciclos de lavado}) &= 518,400\mu\text{L PBS/T} \\ \frac{518,400\mu\text{L PBS/T}}{1,000\mu\text{L}}(1\text{mL}) &= 518.4\text{ mL PBS/T}\end{aligned}$$

**Resultado de PBS/Tween en total de lavados: 518.4 ml PBS/T 0.05%**

$$\begin{aligned}(1\text{ mL PBS/T})(96\text{ pocillos}) &= 96\text{ mL PBS/T} \\ *1\text{ mL por cada suero a analizar.} \\ 518.4\text{ mL PBS/T} + 96\text{ mL PBS/T} &= 614.4\text{ mL PBS/T} \\ 614.4\text{ mL PBS/T} + 5\text{ mL PBS/T por proteina} &= 619.4\text{ mL PBS/T}\end{aligned}$$

\*Se requiere 5 mL PBS/Tween por placa para Antígeno/Proteína a analizar

**Resultado total de PBS/Tween por placa : 619.4 mL**

### 16.2 Cálculo proteínas por placa.

#### 16.2.1 Calculo proteina NS1 DENV – ZIKV

$$\begin{aligned}(3\mu\text{G/mL Proteína NS1})(5\text{ mL PBS/T}) &= 15\mu\text{G Proteína NS1} \\ \frac{15\mu\text{g Proteína NS1}}{0.47\text{ mg/mL concentración DENV NS1 } \beta\text{-ladder}} &= 32\mu\text{L Proteína NS1 } \beta\text{-ladder}\end{aligned}$$

#### 16.2.2 Calculo proteina E2 CHIKV

$$(2\mu\text{g/mL Proteína E2})(5\text{ mL PBS/T}) = 10\mu\text{g Proteína E2}$$

$$\frac{10\mu\text{g Proteinas E2}}{\text{Concentracion CHIKV E2 en stock}}$$

\*Realizar multiplicacion por el numero de placas a analizar

## 17 Análisis de datos

La normalidad de los datos fue evaluada mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov. Las variables cuantitativas se reportaron con media  $\pm$  desviación estándar (DE) cuando tenían una distribución normal o con mediana (rango intercuartilico (RIQ) o valor mínimo – valor máximo) cuando no tenían distribución normal, mientras que las variables cualitativas se reportaron con frecuencias y porcentajes. Para el contraste de variables entre grupos se utilizó T de Student para muestras independientes o ANOVA de una vía con post hoc Tukey. Para la asociación entre variables categóricas se utilizó Chi cuadrada. Para estimar la asociación entre las variables se realizó correlación de Pearson o Spearman de acuerdo al comportamiento de los datos. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos por P valor  $<0.05$ . Se utilizó en el análisis estadístico el software SPSS versión 22 y en la obtención de graficas GraphPad Prism versión 6.01.

## 18 Resultados y discusión.

### 18.1 Datos demográficos.

En el estudio participaron un total de 119 individuos aparentemente sanos, los cuales presentan antecedentes de infección por arbovirosis, en caso de CHIK 7 (5.9%) DENV 16 (13.4%) ZIK 1 (0.8%) con un total de 24 (20.1%), con una población con género masculino 43 (36.1%) y género femenino 76 (63.9%). La edad promedio de 25.9 años con una desviación estándar  $\pm$  11, con una mínima de 18 años y máxima de 85 años. En la tabla se muestran las diversas características clínicas de los pacientes.

<b>Características Generales</b>	
Edad, $x \pm DE$	25.9 $\pm$ 11.6
Sexo, n (%)	
Masculino	43 (36.1%)
Femenino	76 (63.9%)

<b>Características Clínicas</b>	
Antecedentes, n (%)	
Chikungunya	7 (5.9%)
Dengue	16 (13.4%)
Zika	1 (0.8%)
Exantema, n (%)	28 (23.5%)
Artralgias, n (%)	27 (22.7%)
Fiebre, n (%)	28 (23.5%)

Tabla 1 Características Generales Demográficas y Clínicas

Los pacientes están distribuidos geográficamente por varias regiones dentro y fuera del estado de Michoacán.

Tabla 2 Distribucion Geografica

<b>Distribución Geográfica</b>			
<u>Lugar de Origen. n (%)</u>		<u>Lugar de Residencia. n (%)</u>	
Morelia	37 (31.1%)	Morelia	97 (81.5%)
Maravatio	2 (1.7%)	Los Reyes	2 (1.7%)
Oaxaca	1 (0.8%)	Apatzingán	17 (14.3%)
Guerrero	2 (1.7%)	Guanajuato	1 (0.8%)
La Piedad	2 (1.7%)	Villa Madero	1 (0.8%)
Ario de Rosales	1 (0.8%)	Nueva Italia	1 (0.8%)
Taretan	2 (1.7%)		
Tarimbaro	3 (2.5%)		
Huetamo	2 (1.7%)		
Los Reyes	1 (0.8%)		
Puruandiro	1 (0.8%)		
Huandacareo	5 (4.2%)		
Zitácuaro	2 (1.7%)		
Zamora	1 (0.8%)		
Santa Clara	1 (0.8%)		
Jalisco	1 (0.8%)		
Uriangato	1 (0.8%)		
Tzintzunan	1 (0.8%)		
Veracruz	1 (0.8%)		
Hidalgo	1 (0.8%)		
Apatzingán	26 (21.8%)		
CDMX	2 (1.7%)		
Turicato	1 (0.8%)		
Caracuaro	1 (0.8%)		
Cheran	1 (0.8%)		
Guanajuato	4 (3.4%)		
Villa Madero	3 (2.5%)		
Nueva Italia	1 (0.8%)		
Lázaro Cárdenas	6 (5.0%)		
Uruapan	6 (5.0%)		

<u>Lugar por Estado, n (%)</u>	
Michoacán	105 (88.2%)
Guanajuato	6 (5.0%)
CDMX	2 (1.7%)
Oaxaca	1 (0.8%)
Guerrero	2 (1.7%)
Jalisco	1 (0.8%)
Veracruz	1 (0.8%)
Hidalgo	1 (0.8%)



Tabla 6 Ubicación geográficas Google. (s.f.).

Fuente: Mapa de Michoacán, México en Google Earth. Landsat/ Copernicus Data SIO, NOAA, U.S. NAVU, GEBCO INEGI. Data LDEO-Columbia, NSF, NOAA.

La ubicación geográfica de los sitios de estudio. Mapa del estado de Michoacán en México que muestra la ubicación de los sitios de estudio e ilustración de las diferencias geográficas entre los municipios.

## 19 Determinación del estado serológico de las muestras

A través de un análisis estadístico se establecieron puntos de corte para IgG e IgM de cada muestreo, que permitieron clasificar a los voluntarios en positivos y negativos.

### 19.1 Primer muestreo

Realizando con el primer muestreo, el punto de corte con un cálculo estadístico determinado por la media por placa realizada, más media total sumando dos Desviaciones estándar.

Código de identificación	OD (IgG-NS1 DENV)	OD (IgG-NS1 ZIKV)	OD (IgG- E2 CHIKV)
PUNTO DE CORTE	0.4616	0.5047	0.6863

Código de identificación	OD (IgM-NS1 DENV)	OD (IgM-NS1 ZIKV)	OD (IgM-E2 CHIKV)
PUNTO DE CORTE	0.5947	0.4799	0.3947

*Tabla 7 Punto de corte del primer muestreo IgG - IgM*

### 19.2 Segundo muestreo

Siguiendo con el segundo muestreo se calculó el punto de corte teniendo un pool testing como estrategia de refuerzo para el validamiento de nuestra técnica, usando una curva de calibración teniendo nuestras concentraciones contra las densidades ópticas obtenidas.

Código de identificación	OD (IgG-NS1 DENV)	OD (IgG-NS1 ZIKV)	OD (IgG- E2 CHIKV)
PUNTO DE CORTE	0.4883	0.5593	0.5790

*Tabla 8 Punto de corte del Segundo muestreo IgG*

## 20 Resultados

Se reportaron los resultados de los sueros obtenidos de los sujetos de prueba aparentemente sanos, comparando dos tomas de muestras sanguíneas en un lapso de 6 meses, se analizaron por separado para confirmar la infección por los arbovirus (DENV,CHIKV,ZIKV). siguiendo el algoritmo descrito en la tabla n° 9.

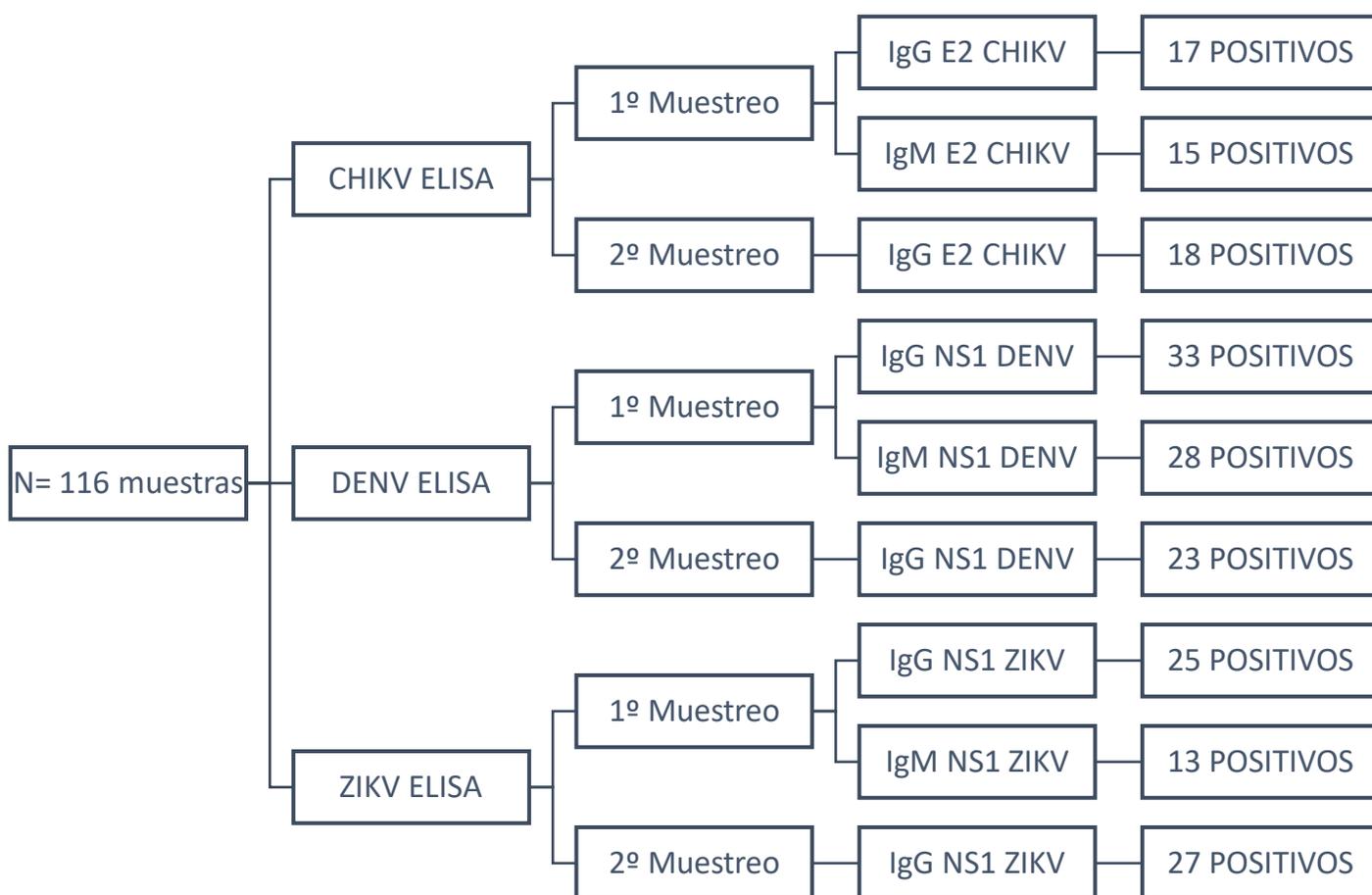


Tabla 9 Tabla de resultados totales

Posteriormente, se buscó correlacionar los títulos de anticuerpos contra las proteínas virales (DENV, CHIKV, ZIKV) de nuestro ensayo de ELISA con el punto de corte con resultados cuantitativos. Probando si nuestras proteínas virales recombinantes experimentales podrían usarse para detectar a los anticuerpos en suero humano. Seleccionando las muestras positivas en los dos muestreos y los sueros de los voluntarios sanos para probar la idoneidad de las proteínas experimentales utilizadas en un ensayo de ELISA.

## 20.1 DENGUE VÍRUS IgM – IgG contra proteína NS1.

### 20.1.1 Primer Muestreo.

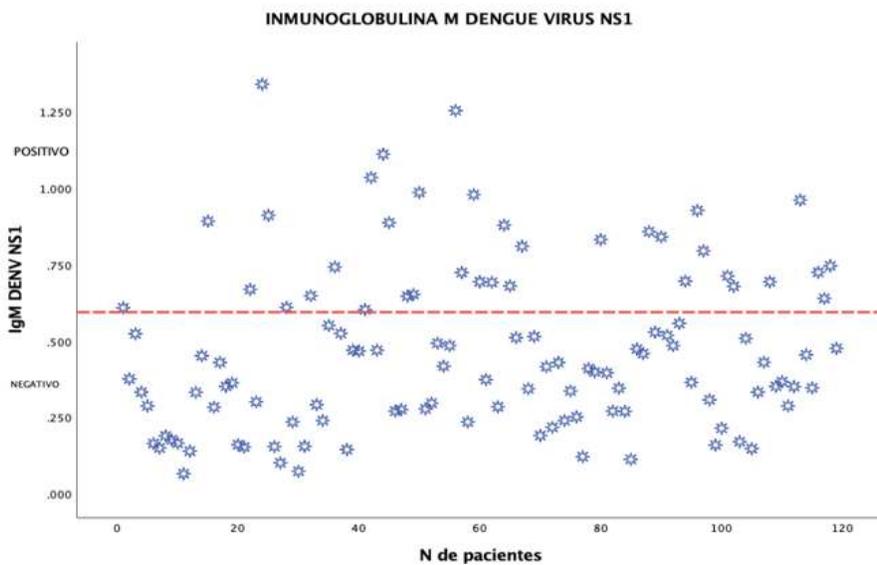


Figura 8: IgM Dengue 1<sup>o</sup> Muestreo

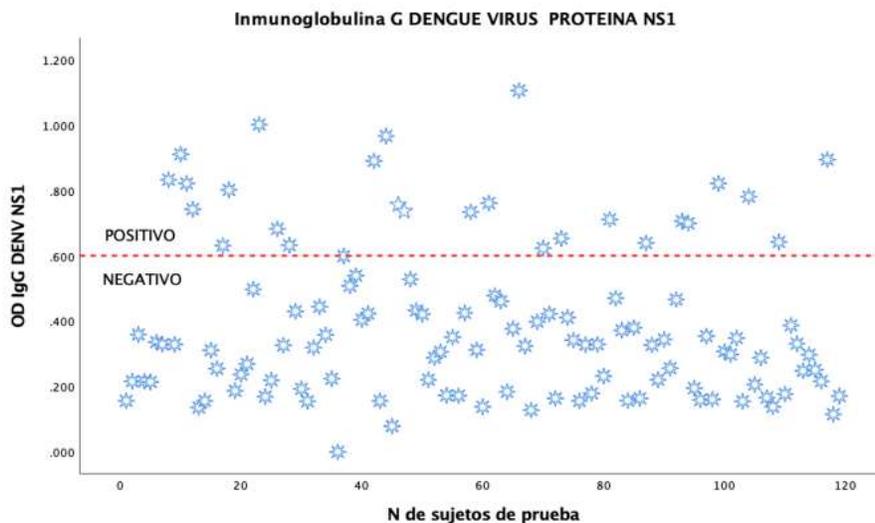


Figura 9: IgG Dengue 1<sup>o</sup> Muestreo

### 20.1.2 Segundo muestreo.

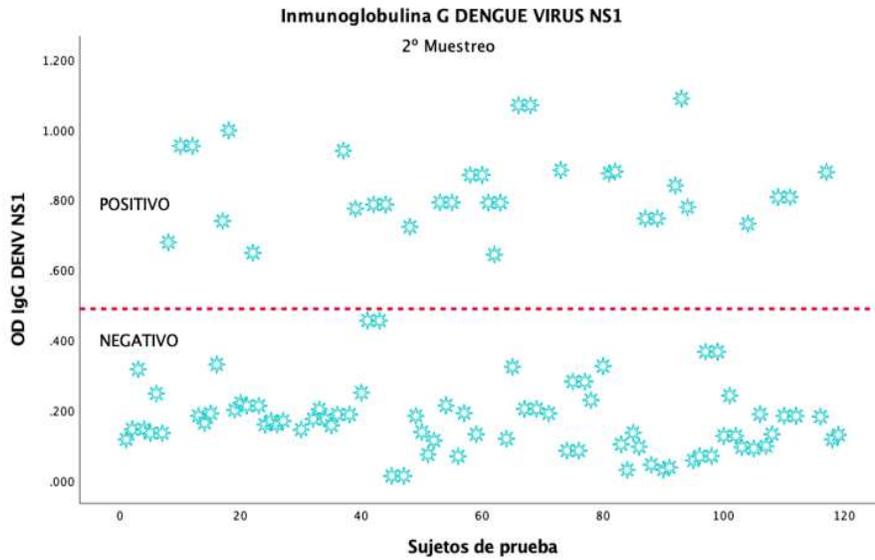


Figura 10: IgG Dengue 2º Muestreo

### 20.2 CHIKUNGUYA VIRUS IgG – IgM contra proteína E2.

#### 20.2.1 Primer muestreo.

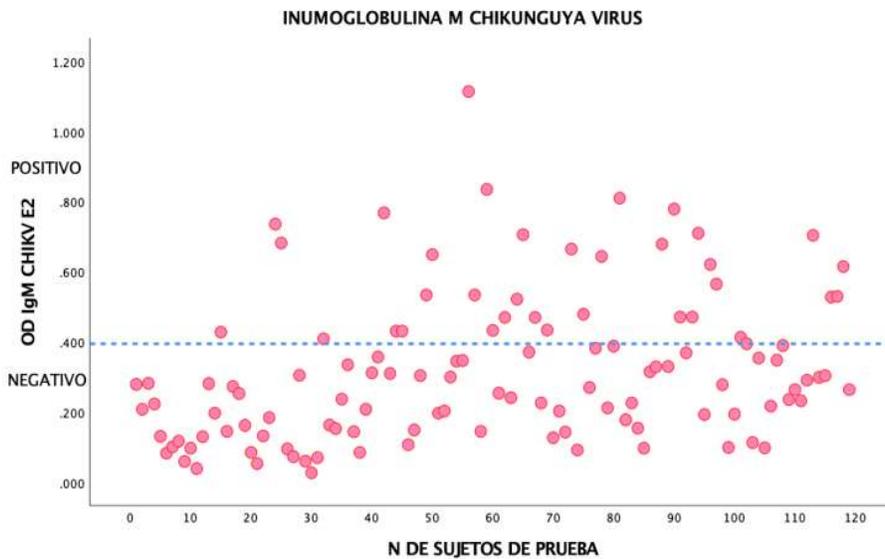


Figura 11: IgM Chikungunya 1º Muestreo

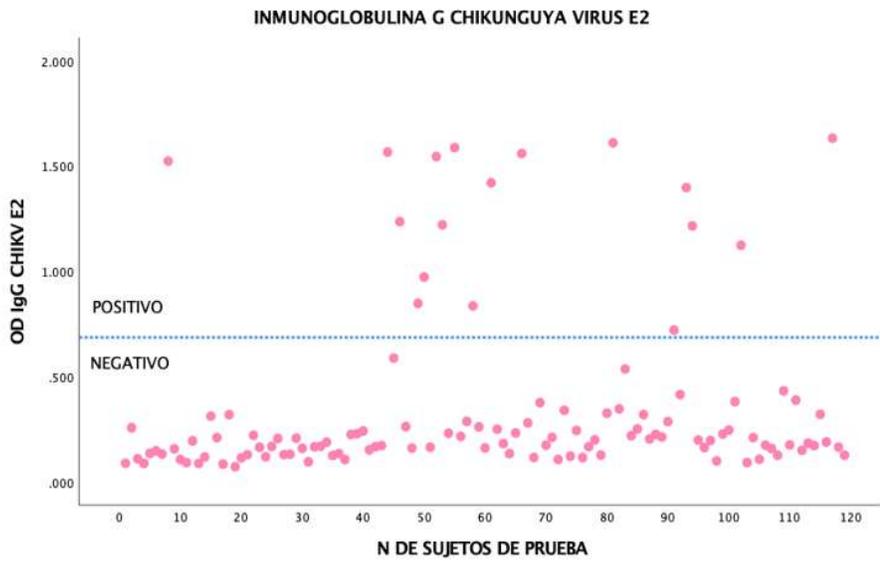


Figura 12: IgG Chikungunya 1º Muestreo

### 20.2.2 Segundo Muestreo.

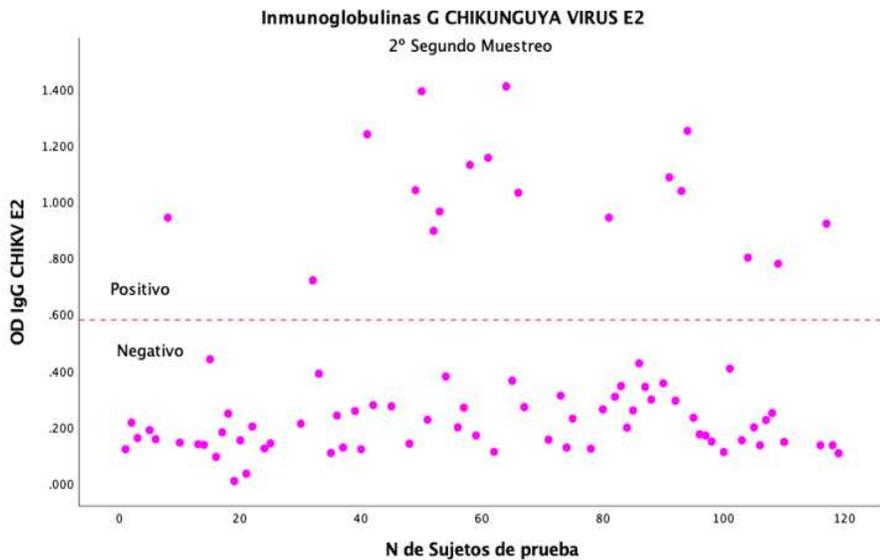


Figura 13: IgG Chikungunya 2º Muestreo

## 20.3 ZIKA VIRUS IgG- IgM contra proteína NS1.

### 20.3.1 Primer Muestreo.

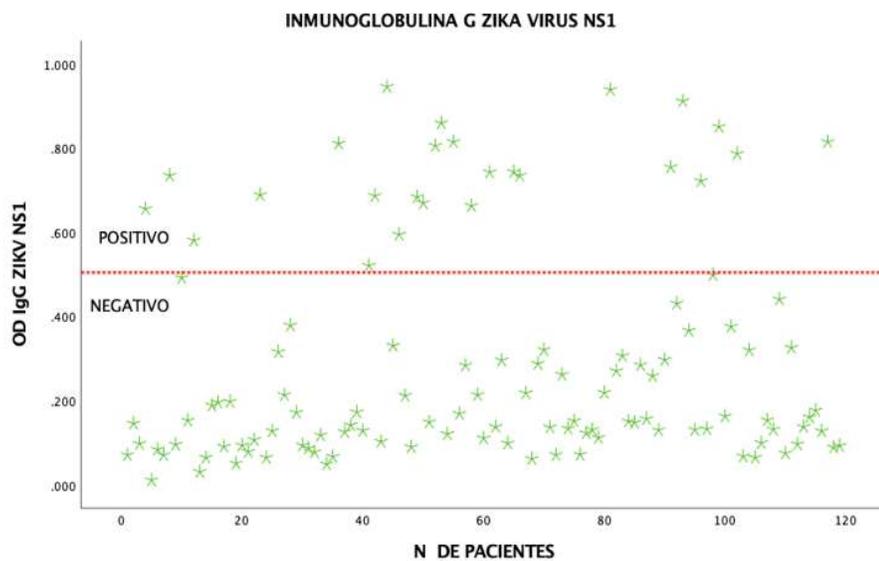


Figura 14: IgG Zika 1º Muestreo

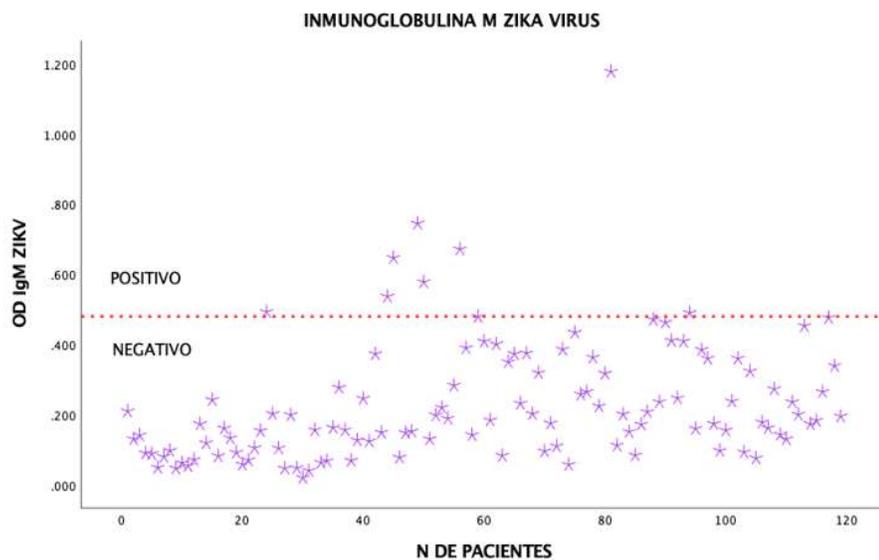


Figura 15: IgM Zika 1º Muestreo

### 20.3.2 Segundo muestreo.

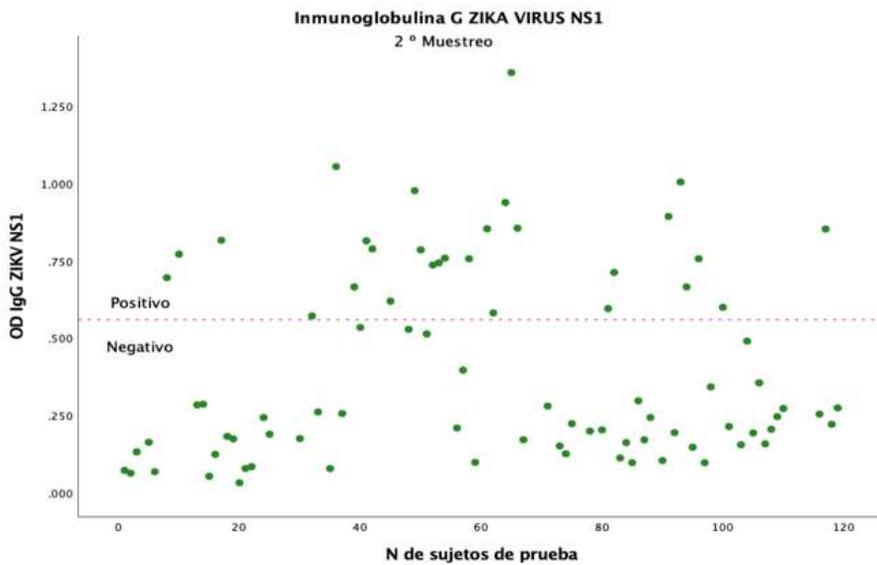


Figura 16: IgG Zika 2º Muestreo

### 20.4 Total de Positivos y Negativos

#### 20.4.1 Dengue Virus Pos/Neg

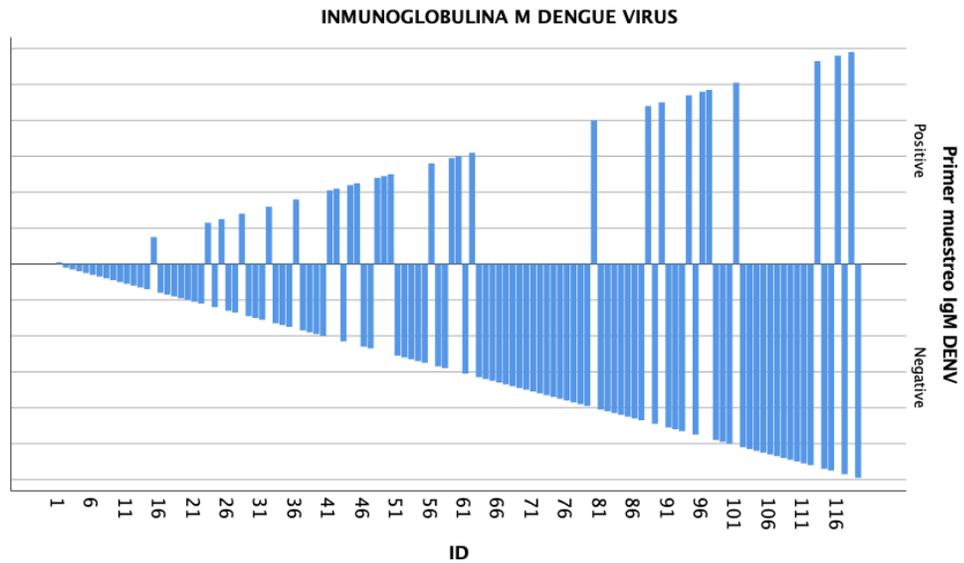


Figura 17 Pos/Neg IgM Dengue 1º Muestreo

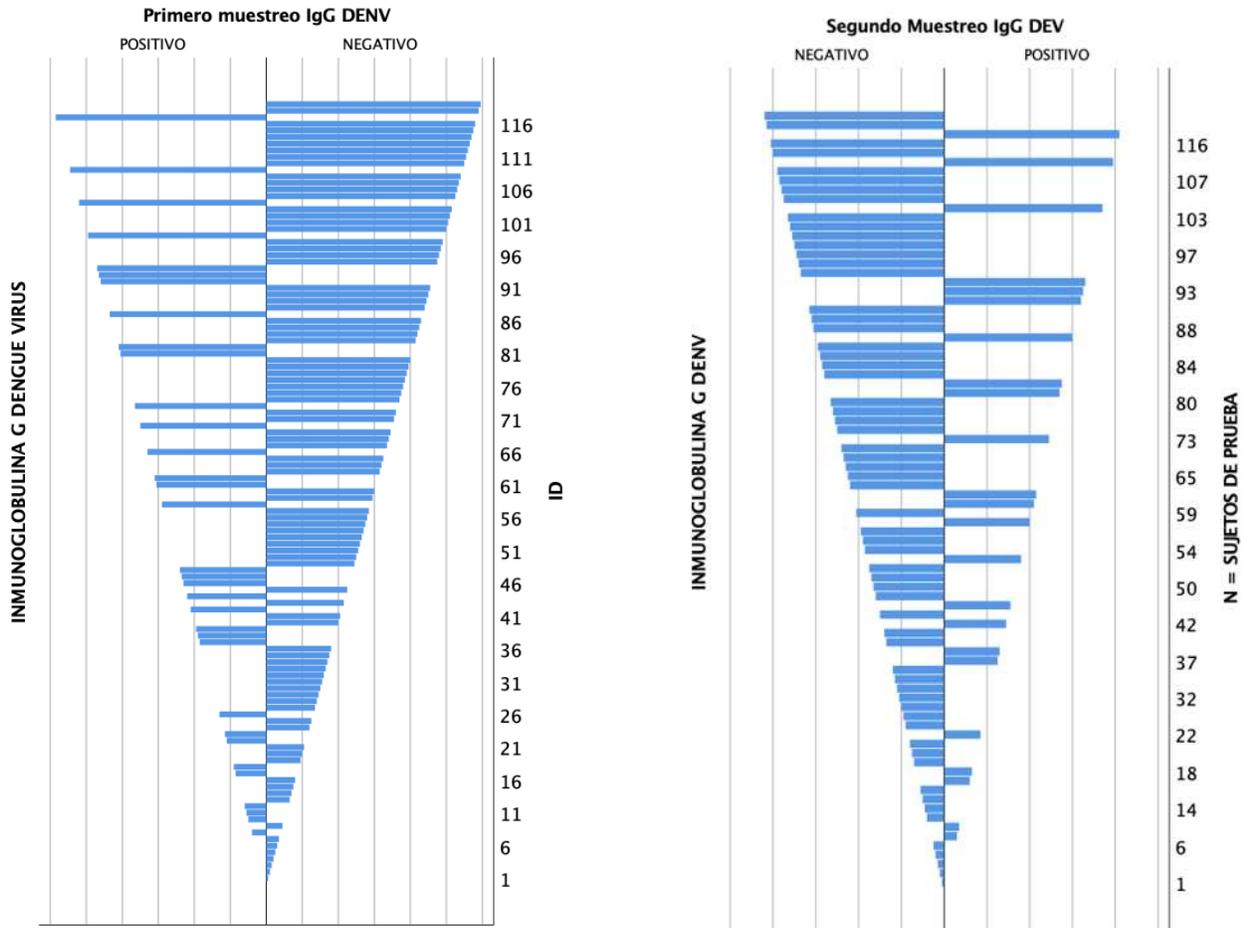


Figura 18: Pos/Neg IgM/IgG Dengue 1º-2º Muestreo

## 20.4.2 Chikungunya Virus Pos/Neg

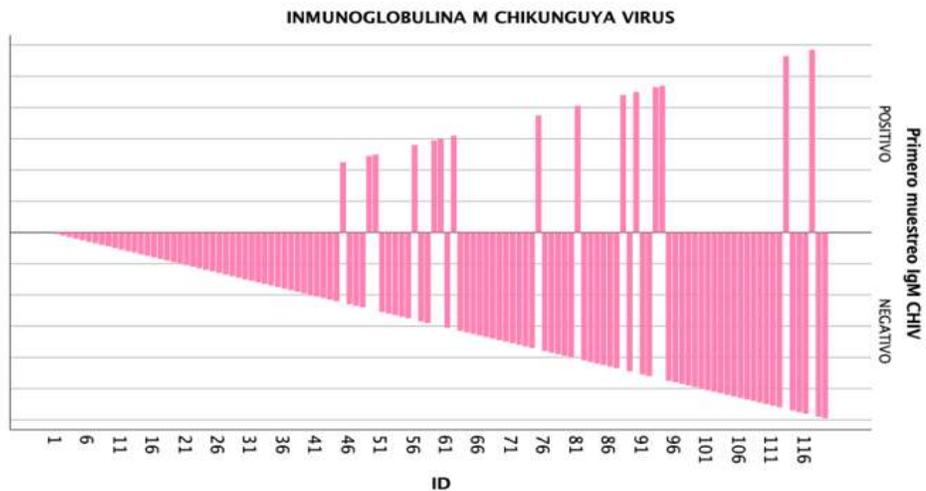


Figura 19: Pos/Neg IgM Chikungunya 1º Muestreo

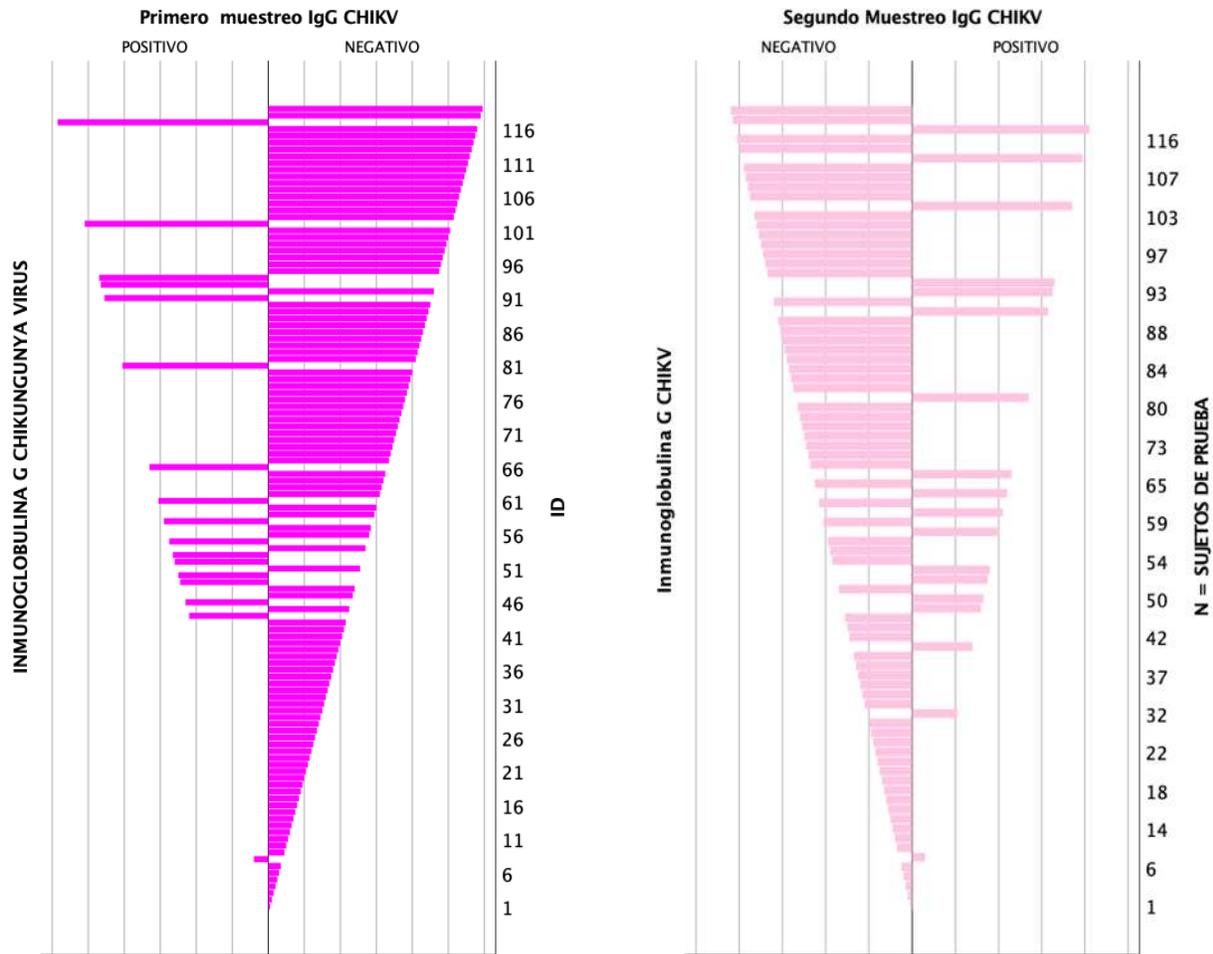


Figura 20: Pos/Neg IgM/IgG Chikungunya 1<sup>o</sup>-2<sup>o</sup> Muestreo

### 20.4.3 Zika Virus Pos/Neg

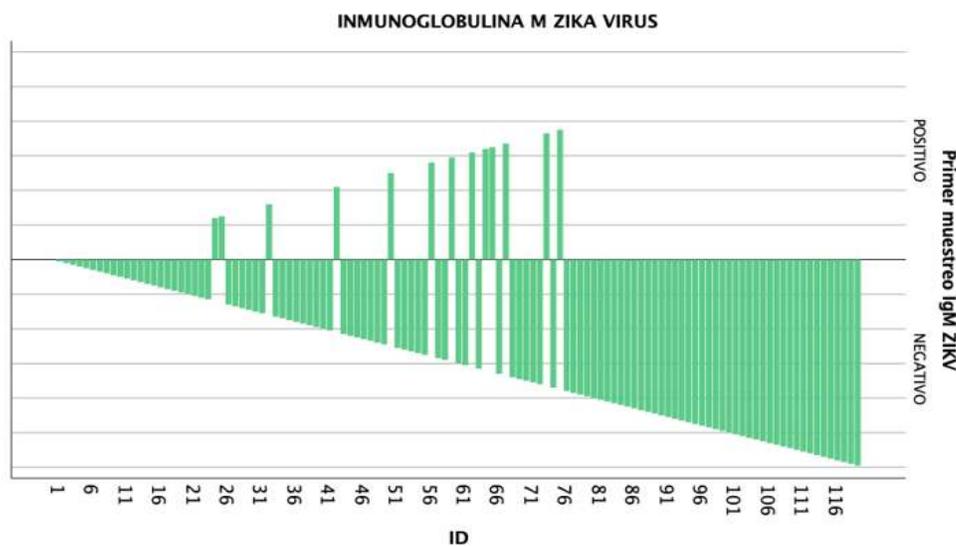


Figura 21: Pos/Neg IgM ZIKA 1<sup>o</sup> Muestreo

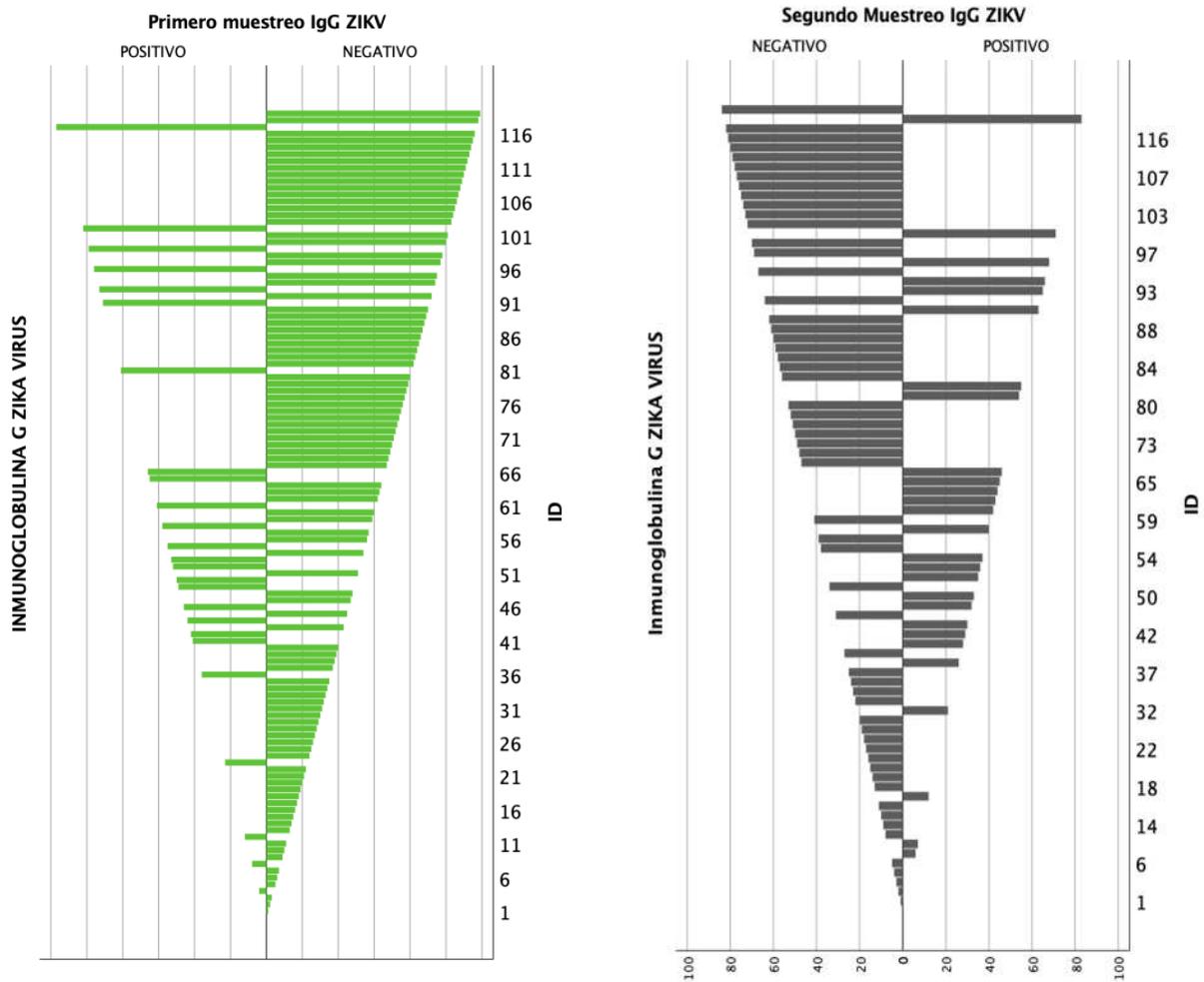


Figura 21: Pos/Neg IgM/IgG Zika 1<sup>o</sup>-2<sup>o</sup> Muestreo

## 21 Discusión

En este estudio, nuestro objetivo fue estandarizar la técnica de ELISA, para determinación de anticuerpos, utilizando proteínas experimentales E2 CHIKV, NS1 DENV- ZIKV y muestras de una cohorte de regiones endémicas para infecciones por arbovirus en México. Recientemente, se ha informado de las proteínas recombinantes producidas en un sistema de expresión de mamíferos basado en células HEK293. En el presente estudio probamos si esta técnica de ELISA podría usarse para detectar anticuerpos anti-CHIKV, anti-DENV, anti-ZIKV en muestras de sujetos de prueba aparentemente sanos.

Nuestros resultados sugieren que tanto la metodología de ELISA generado es capaz de detectar de manera confiable tanto anticuerpos de los isotipos IgG como IgM en sueros de sujetos sanos, pacientes agudos y convalecientes (aquellos que presentaron infección con anterioridad y continúan presentando anticuerpos. Además, nuestros ensayos proporcionaron una mayor sensibilidad.

Muchos ensayos de inmunoabsorción ELISA anti-CHIKV, DENV, ZIKV disponibles comercialmente utilizan antígenos derivados del virus completo, que pueden tener altos costos de producción debido a los pasos de cultivo y purificación del virus, lo que disminuye la asequibilidad y limita su uso en regiones endémicas de países en desarrollo. Un estudio anterior informó que el kit Abcam ELISA, en particular, mostraba variabilidad de lote a lote con algunos kits demostrando menor sensibilidad que otros, a consecuencia de lo anterior el kit tuvo que ser modificado lanzado de nuevo para su comercialización. (Johnson et al., 2017)

El ensayo de ELISA desarrollado tiene una mayor especificidad y también es más rentable que usar los ensayos comerciales de CHIKV. Sin embargo, nuestro ensayo Inmunoabsorbente o ELISA recombinante basado en E2 no detectaría anticuerpos anti-CHIKV E1 y algunos epítomos conformacionales dirigidos a los heterodímeros E1 / E2.

sNS1 es altamente inmunogénico y estimula los títulos altos de los anticuerpos específicos de NS1. Tanto la proteína NS1 como los anticuerpos se han implicado en la patogénesis de la enfermedad. NS1 es también un biomarcador importante para el diagnóstico temprano de la enfermedad, y se ha demostrado que las técnicas ELISA basadas en NS1 producida en células de mamífero ofrecen una mayor especificidad que los ELISA basada en NS1 de dengue/zika producida de manera comercial en bacterias. (Modhiran et al., 2015).

Los protocolos para la producción, purificación y caracterización de glicoproteínas NS1, por transfección transitoria de células HEK293T describen a la proteína de  $\beta$ -ladder de NS1 se obtuvo con alta pureza mediante IMAC, mientras que se llevaron a cabo purificaciones adicionales mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para obtener sNS1 de mayor pureza. (Hinchliffe & Harwood, 2019)

Estas glicoproteínas NS1 recombinantes se pueden utilizar para amplias aplicaciones clínicas, como el serodiagnóstico, también están siendo utilizadas como antígeno en modelos candidatos a vacunas de ZIKV basadas en subunidades y en otras aplicaciones bioquímicas.

Así mismo utilizando las proteínas recombinantes sNS1 DENV/ZIKV, E2 ZIKV para este análisis permitio observar un cambio epidemiológico de una mayor población concentrada proveniente de zonas endémicas como son Lazaro Cardenas, Apatzingan, pero también observando que en lugares no endémicos aumentando en número de positivos como es Morelia, por la gran movilización humana, generando el alcance de este virus y su vector a otras localidades, que es consistente con el aumento en la incidencia de la enfermedad en la población. (Torres-Galicia et al., 2014)

Los porcentajes de nuestros individuos positivos fue relativamente baja ante lo esperado, tomando en cuenta el tiempo de circulación de estos virus desde su reintroducción en México en 1978 después de ser erradicado por 12 años, aun así tomando en cuenta la gravedad de las epidemias que causan creando un factor crítico hacia una inmunización, esperando una inmunidad colectiva (inmunidad de rebaño), que es muy difícil de lograr permitiendo que los virus se propaguen más libremente y conllevaría a una infección masiva sucumbiendo a la Arbovirosis, la población restante se renovaría en unos años sin saber el número de seroprevalencia de los anticuerpos frente a los virus, ni tampoco la población de mosquitos infectados, siendo una medida de salud pública no eficaz con un gran costo de vidas humanas. Lo anterior hace incipiente la necesidad de optar por diseñar vacunas para prevenirlas cuyo beneficio superan los riesgos que implicaría el uso de una vacuna o bien la necesidad de diseñar herramientas de tratamientos específicos para tratarlas y evitar este tipo de infecciones.

## 22 Conclusiones

- Tomando en cuenta la variabilidad de condiciones de trabajo al implementar la técnica, la viabilidad y reproductibilidad fue favorable.
- Las muestras de los sujetos de prueba fueron indispensable conocer los datos serológicos, clínicos, para llevar a cabo la recolección de muestra en tiempo y forma; logrando un biobanco de muestras activas.
- Es de suma importancia llevar a cabo el proceso de preservación y congelación de acuerdo con el protocolo y vigilancia continua de la cadena de frío durante la preservación del biobanco.
- La estandarización de la técnica es reproducible en laboratorios con la infraestructura adecuada, ya que debe realizarse vigilando los parámetros de esterilidad y cuidando la viabilidad de los anticuerpos.
- Este tipo de técnica permite la realización de estudios posteriores, que involucren el estudio de antígenos/anticuerpos de DENV, CHIKV, ZIKV.
- Se requiere de más técnicas que implementen la investigación sobre las enfermedades emergentes, para poder aplicar en beneficio de la población, así como de las instituciones de salud.

## 23 Referencias

- Akey, D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T. J., DelProposto, J., Ogata, C. M., Skiniotis, G., Kuhn, R. J., & Smith, J. L. (2014). Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science*, *343*(6173), 881–885. <https://doi.org/10.1126/science.1247749>
- Ángel, M., Acebes, M., & Saiz, C. (2012). Flavivirus que infectan el sistema nervioso. *Virología*, *15*(May), 58–64.
- Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortna, H. (2016). Arbovirus in Latin America. *Acta Pediátrica de México*, *37*(2), 111–131.
- Cabezas, C., & García, P. (2017). Diagnóstico de la infección por el virus zika. *Anales de la Facultad de Medicina*, *78*(1), 89. <https://doi.org/10.15381/anales.v78i1.13028>
- Clemen, G., Angel, J., Montes, C., Tovar, J., & Osorio, L. (2019). Contribución de la prueba rápida NS1 e IgM al diagnóstico de dengue en Colombia en el periodo pre-zika. *Infectio*, *23*(3), 259. <https://doi.org/10.22354/in.v23i3.790>
- Colegio Médico del Perú., C., & Galán-Rodas, E. (1972). El virus Zika: una revisión de literatura. *El virus Zika: una revisión de literatura*, *33*(1), 35–41. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s1728-59172016000100007](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1728-59172016000100007)
- Eiman, M., Introini, M., & Ripoll, C. (2016). *Directrices para la prevención y control de Aedes aegypti*. 1–78. <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000235cnt-01-directrices-dengue-2016.pdf>
- Exp, M., & Publica, S. (2003). Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus dengue: propuesta de un modelo de replicación del ARN. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *20*(1), 51–57. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2003.201.887>
- Frank Hadley Collins; (2010). *Virus Chikungunya*.
- Gómez, L. A., Montoya, G., Rivera, H. M., & Hernández, J. C. (2017). Características de la estructura molecular de las proteínas E del virus del Zika y E1 del virus de la rubéola y posibles implicaciones en el neurotropismo y en las alteraciones del sistema nervioso. *Biomedica*, *37*, 121–132. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3807>
- Gopala Reddy, S. B., Chin, W. X., & Shivananju, N. S. (2018). Dengue virus NS2 and NS4: Minor proteins, mammoth roles. En *Biochemical Pharmacology* (Vol. 154, pp. 54–63). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.04.008>
- Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*, 1–26. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Hinchliffe, A., & Harwood, W. A. (2019). Production and Purification of Zika Virus NS1 Glycoprotein in HEK293 Cells. *Test*, *2012*, 115–126. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0581-3>
- Johnson, B. W., Russell, B. J., & Goodman, C. H. (2017). Commercial Sources for Diagnostic Assays. *Journal of infectious diseases*, *214*(7), 1–10. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw274.Laboratory>

- Kim, Y. C., López-Camacho, C., Garcia-Larragoiti, N., Cano-Mendez, A., Hernandez-Flores, K. G., Domínguez-Alemán, C. A., Mar, M. A., Vivanco-Cid, H., Viveros-Sandoval, M. E., & Reyes-Sandoval, A. (2019). Development of an E2 ELISA methodology to assess chikungunya seroprevalence in patients from an endemic region of Mexico. *Viruses*, 11(5).  
<https://doi.org/10.3390/v11050407>
- López-Latorre, M. A., & Neira, M. (2016). ( Diptera : Culicidae ) mosquito transmisor de arbovirosis humanas. *Revista Ecuatoriana De Medicina Y Ciencias Biologicas*, 37(2), 11–21.
- Martínez, M. S., Bermúdez, V., Garicano, C., Núñez, V., Palmar, J., Bautista, J., Ramírez, P., & Rojas, J. (2017). Infección por virus Chikungunya: de la clínica a la inmunopatogenia. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 36(5), 132–143.
- Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D. A., Panetta, A. K., Sester, D. P., Liu, L., Hume, D. A., Stacey, K. J., & Young, P. R. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science Translational Medicine*, 7(304), 3863.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3863>
- MSPA. (2013). Guía Para Equipo de Salud |Dengue. *Ministerio de salud, Argentina*, 56.
- Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*, 13(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>
- Salud, S. de. (2016). Clasificación, Diagnóstico y Tratamiento Integral del Dengue. SSA.
- Solomon, T., & Barrett, A. D. T. (2003). Dengue. *Clinical Neurovirology*, 22(64), 469–516. <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v56i1.121>
- Subsecretar, D. E. S., Direcci, S., & Epidemiol, S. (2019). *Panorama Epidemiológico de Dengue*, 2019. 52.
- Torres-Galicia, I., Cortés-Poza, D., & Becker, I. (2014). Dengue en México: incremento en la población juvenil durante la última década. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 71(4), 196–201.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2014.08.003>
- Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33–43. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(11\)70074-1](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(11)70074-1)
- Yábar, C., Carrillo, C., Nolasco, O., & Montoya, Y. (1999). Diagnóstico temprano del virus dengue 1 usando RT-PCR y perspectivas para la caracterización molecular de cepas autóctonas. *Rev. med. exp*, 16(1/2), 31–34.  
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.1999.161-2.735>

## 24 Anexos

### Thermo Scientific™ Tampones de bloqueo sin proteínas Pierce™

Formula :	Líquida.
Tipo de reactivo:	Reactivo de bloqueo.
Aplicación validada:	ELISA, Western Blot.
Descripción:	Tampón de bloqueo (PBS) sin proteínas.
Contenido y almacenamiento:	Una vez recibido, almacene el producto a temperatura ambiente. Después de abrir, almacenar el producto a 4 ° C.

### Sustrato pNPP (Sigma N-2765) 4-nitrofenilfosfato hexahidrato

Formula :	Tabletas.
Tipo de reactivo:	Sustrato.
Aplicación validada:	ELISA, Western Blot.
Descripción:	Sustrato cromogénico para la determinación de fosfatasas ácidas y alcalinas.
Contenido y almacenamiento:	Una vez recibido, almacenar el producto a 4 ° C. El producto se envía a temperatura ambiente.

### Tampones de sustrato Pierce™ para sustratos solubles

Formula :	Líquido
Tipo de reactivo:	Tampón de sustrato
Aplicación validada:	ELISA, Western Blot
Descripción:	Tampón de sustrato de dietanolamina Pierce, 5X.
Contenido y almacenamiento:	Una vez recibido, almacenar el producto a 4 ° C. El producto se envía a temperatura ambiente.

## Carta de consentimiento informado.

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

CARTA DE **CONSENTIMIENTO INFORMADO** PARA PARTICIPAR EN EL PROTOCOLO DE ESTUDIO: Estudio epidemiológico de incidencia y prevalencia de enfermedades causadas por los arbovirus Zika, Dengue y Chikungunya.

**INTRODUCCION:** La siguiente información describe el protocolo al cual se le está invitando para participar de forma activa. El investigador deberá responder cualquier duda que surja a partir de la lectura de ésta.

**PROPOSITO DEL ESTUDIO:** Estudiar la incidencia y prevalencia real de infecciones causadas por arbovirus, en personal de riesgo.

**PROCEDIMIENTO:** Ha sido elegido para participar en este estudio, si usted desea participar, contestará un cuestionario y proporcionará muestra de sangre para medir los niveles de células inmunológicas y anticuerpos específicos contra Dengue, Chikungunya y Zika. Sus muestras serán utilizadas en diferentes estudios de laboratorio por los investigadores que participan en este estudio.

**BENEFICIOS PARA PARTICIPANTES:** Los resultados aportarán información nueva e importante para posteriormente realizar estudios clínicos fase I y II de modelos de vacunas.

**CONFIDENCIALIDAD.** La información obtenida durante el desarrollo de este estudio es absolutamente confidencial y no puede ser utilizada con otro fin. Usted será informado acerca de cualquier hallazgo de importancia para su salud durante el desarrollo de este estudio.

**PARTICIPACION VOLUNTARIA:** Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que lo desee. Además sé que puedo pedir información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio. Recibiré, si así lo solicito una copia de los resultados de laboratorio de los estudios que se me practiquen. Debo informar, tan pronto como sea posible a los investigadores de cualquier cambio importante que ocurra en mi salud, incluyendo el consumo de medicamentos, suspensión o inicio de algún hábito (p. ej. tabaquismo, alcoholismo) o cambio de domicilio. Sé que las muestras obtenidas sólo podrán ser utilizadas para los fines de este estudio. Los costos del estudio los cubrirán los fondos de la unidad de investigación y el paciente no pagará por los estudios paraclínicos propios del proyecto de investigación.

He comprendido el contenido de esta carta de consentimiento informado, mis dudas han sido resueltas y voluntariamente acepto participar en este estudio.

\_\_\_\_\_  
FIRMA DEL INVESTIGADOR Y FECHA.

\_\_\_\_\_  
NOMBRE, FIRMA DEL PACIENTE Y FECHA

\_\_\_\_\_  
FIRMA DE TESTIGO I Y FECHA

\_\_\_\_\_  
FIRMA DE TESTIGO II Y FECHA