



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS:

Estudio de seroprevalencia de anticuerpos contra arbovirus chikungunya, dengue y Zika, en individuos aparentemente sanos de la ciudad de Morelia, Michoacán.

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

José Iván González Abarca

Asesor de Tesis:

D. en C. Martha Eva Viveros Sandoval

Co-asesor de Tesis:

D. en C. Arturo Reyes Sandoval

Morelia, Mich. Agosto de 2020

ASESOR DE TESIS

Doctora en Ciencias Químico-Biológicas

Martha Eva Viveros Sandoval

CO-ASESOR DE TESIS

Doctor en Ciencias en Biomedicina Molecular

Arturo Reyes Sandoval

La Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia
del CONACyT

El comité tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, aprobó la memoria de tesis que
presentó:
Licenciado en Médico General JOSÉ IVÁN GONZÁLEZ ABARCA

D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

D. en C. Virginia Angélica Robinson Fuentes

D. en C. Sergio Gutiérrez Castellanos

ABREVIATURAS

ADE	Amplificación dependiente de anticuerpos (<i>antibody dependent enhancement</i>).
Arbovirus	Virus transmitido por artrópodos.
ARN	Ácido ribonucleico.
BH	Biometría Hemática
CCL1/MCP	Citocina quimioatrayente de monocitos.
CHIKF	Fiebre por chikungunya.
CHIKV	Virus de chikungunya.
DC-SIGN	Molécula de adhesión intercelular (<i>Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>).
DENV	Virus de dengue.
DGE	Dirección General de Epidemiología
DHF	Fiebre Hemorrágica por dengue (<i>Dengue Hemorrhagic Fever</i>).
DMEM	Medio estándar (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>).
DSS	Síndrome de choque por dengue (<i>Dengue Shock Syndrome</i>).
Fc	Fracción cristizable de las inmunoglobulinas
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
IL-6	Citocina proinflamatoria.
IL-8	Citocina proinflamatoria.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>).
PRNT	Prueba de neutralización por reducción de placas (<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>).
NS	Proteína no estructural de virus (<i>Non-structural</i>).
NS1	Proteína no estructural implicada en la replicación y patogénesis de infecciones por flavivirus como dengue y Zika.
RANKL	Receptor activador para factor nuclear kappa-beta.
RE	Retículo endoplásmico.
rNS1	Proteína NS1 de tipo recombinante.
sNS1	Proteína hexamérica NS1 soluble.
T CD4+	Célula involucrada en la respuesta inmune de tipo auxiliar.
T CD8+	Célula involucrada en la respuesta inmune de tipo citotóxica.
TNF- α .	Factor de Necrosis Tumoral Alfa (<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>).
ZIKV	Virus de Zika.

ÍNDICE GENERAL

SECCIÓN	PÁGINA
RESUMEN.....	I
SUMMARY.....	II
1. INTRODUCCIÓN	30
2. MARCO TEÓRICO	33
2.1 PROBLEMÁTICA DE LAS ARBOVIROSIS EN EL CONTEXTO MUNDIAL.....	33
2.2 DENGUE.....	36
2.2.1 EPIDEMIOLOGÍA	37
2.2.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS Y FISIOPATOLOGÍA	37
2.2.3 DIAGNÓSTICO.....	41
2.2.4 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN	43
2.3 CHIKUNGUNYA	44
2.3.1 EPIDEMIOLOGÍA	45
2.3.2 CARACTERÍSTICAS Y FISIOPATOLOGÍA.....	46
2.3.3 DIAGNÓSTICO.....	47
2.3.4 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN	48
2.4 ZIKA	48
2.4.1 EPIDEMIOLOGÍA	49
2.4.2 DIAGNÓSTICO.....	49
2.4.3 CARACTERÍSTICAS Y FISIOPATOLOGÍA.....	50
2.4.4 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN.	51
2.5 DETECCIÓN POR MÉTODOS SEROLÓGICOS Y USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	52
2.6 ESTADO SEROLÓGICO DE INDIVIDUOS	53
2.7 RESPUESTA INMUNE CONTRA ARBOVIRUS.	53
2.7.1 RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA FLAVIVIRUS.	53
2.7.2 RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA FLAVIVIRUS.....	55
2.7.3 RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA ALFAVIRUS (CHIKUNGUNYA).....	56
2.7.4 RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA ALFAVIRUS (CHIKUNGUNYA).....	56
2.8 LIMITANTES EN LOS ESTUDIOS SEROEPIDEMIOLÓGICOS.....	57
2.9 ANTECEDENTES DE LOS ESTUDIOS DE SEROPREVALENCIA.	57
2.9.1 ANTECEDENTE DE LOS ESTUDIOS DE SEROPREVALENCIA EN LA POBLACIÓN MUNDIAL.	57
2.9.2 ANTECEDENTES DE LOS ESTUDIOS DE SEROPREVALENCIA EN POBLACIÓN MEXICANA.	58
3. JUSTIFICACIÓN.....	60

4. HIPÓTESIS	61
5. OBJETIVOS	61
5.1 OBJETIVO GENERAL:	61
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	61
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	62
7. METODOLOGÍA	63
7.1 TIPO DE ESTUDIO:	63
7.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS:	63
7.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES.....	64
7.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	64
7.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:	64
7.3.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.	64
7.4 MANEJO DE LA MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA.....	64
7.4.1 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE SUERO Y PLASMA.	64
7.4.2 PROCESAMIENTO DE BIOMETRÍA HEMÁTICA.....	65
7.5 TAMAÑO DE LA MUESTRA POBLACIONAL	65
7.6 OBTENCIÓN DE DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS PRINCIPALES Y ANTECEDENTES.	65
7.7 PROTOCOLO GENERAL PARA REALIZACIÓN DE ELISA INDIRECTO.....	65
7.8 REALIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE ELISA INDIRECTO.	66
7.9 DETERMINACIÓN DE PUNTOS DE CORTE PARA ESTABLECIMIENTO DE SEROPOSITIVIDAD Y SEROCONVERSIÓN EN LOS INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.	67
7.10 PROTOCOLO DE PRNT (<i>PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST</i>).	68
7.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	69
8. RESULTADOS	70
8.1 DATOS DEMOGRÁFICOS DE LA MUESTRA EN ESTUDIO	70
8.1.1 DATOS TOTALES.	70
8.2. VALORES Y PUNTOS DE CORTE PARA DETERMINACIÓN DE SEROPOSITIVIDAD MEDIANTE ELISA.....	72
8.3.1 PREVALENCIA TOTAL.	79
8.3.2 SEROCONVERSIÓN POR PROTEÍNA VIRAL ANALIZADA DE ACUERDO A CADA VARIABLE SOCIODEMOGRÁFICA.	80
8.4 TÍTULACIÓN DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES POR PRNT.....	82
8.4.1 CORRELACIÓN ENTRE TÍTULOS DE PRNT PARA CADA SEROTIPO DE DENV CON OD OBTENIDA POR ELISA INDIRECTO DE IGG/NS1 β -LADDER	83
8.4.2 CORRELACIÓN ENTRE TÍTULOS DE PRNT PARA CADA SEROTIPO DE ZIKV CON OD OBTENIDA POR ELISA INDIRECTO DE IGG/NS1 β -LADDER	85
8.4.3 CORRELACIÓN ENTRE TÍTULOS DE PRNT PARA CADA SEROTIPO DE CHIKV CON OD OBTENIDA POR ELISA INDIRECTO DE IGG/CHIKV E2	85

9. DISCUSIÓN.....	87
11. REFERENCIAS	92
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	107

Índice de figuras

1	Transmisión de infecciones por arbovirus.	Pág. 34
2	Concordancia entre diferentes regiones para la transmisión del virus del dengue.	Pág. 36
3	Ciclo de vida de DENV	Pág. 38
4	Estructura de NS1	Págs. 39 y 40
5	Diagnóstico de dengue	Pág. 34
6	Diagrama de las estructuras glicoproteicas de CHIKV	Pág. 46
7	Representación esquemática de la organización del genoma de los flavivirus y procesamiento de polipéptido a proteínas virales maduras	Pág. 50
8	Distribución de los datos de D.O. en la determinación de IgG e IgM en los sueros de los voluntarios, durante el primer periodo de muestreo.	Pág. 73
9	Distribución de los datos de D.O. en la determinación de IgG en los sueros de los voluntarios durante segundo y tercer periodo de muestreo.	Pág. 73
10	Punto de corte de IgG para cada arbovirus en primer periodo de muestreo	Pág. 74
11	Punto de corte de IgG para cada arbovirus en primer periodo de muestreo	Pág. 75
12	Curvas estándar para los valores de D.O. obtenidos durante el segundo muestreo.	Pág. 76
13	Distribución y punto de corte para cada arbovirus en segundo periodo de muestreo	Pág. 77
14	Curvas estándar para los valores de D.O. obtenidos durante el tercer muestreo	Pág. 78
15	Distribución y punto de corte para cada arbovirus en tercer periodo de muestreo	Pág. 79
16	Correlación PRNT80 DENV-1 con D.O. ELISA IgG/NS1 β -ladder.	Pág. 83
17	Correlación PRNT80 DENV-2 con D.O. ELISA IgG/NS1 β -ladder.	Pág. 83

18	Correlación PRNT80 DENV-3 con D.O. ELISA IgG/DENV NS1 β -ladder	Pág 84
19	Correlación PRNT80 DENV-4 con D.O. ELISA IgG/ DENV NS1 β -ladder	Pág. 84
20	Correlación PRNT80 ZIKV con D.O. ELISA IgG/ZIKV NS1 β -ladder	Pág. 85
21	Correlación PRNT80 CHIKV con D.O. ELISA IgG/ CHIKV E2.	Pág. 85

Índice de tablas

1	Controles con diagnóstico previo de arbovirosis por PCR y ELISA	Pág. 72
2	Seroprevalencia total por virus y variable sociodemográfica	Pág. 80
3	Tasa de seroconversión para chikungunya por variable sociodemográfica	Pág. 81
4	Tasa de seroconversión para dengue por variable sociodemográfica	Pág. 81
5	Tasa de seroconversión para Zika por variable sociodemográfica	Pág. 82
6	Valores de PRNT 80 para cada suero analizado con cada uno de los virus analizados. Se resaltan en verde los considerados positivos para el ensayo	Pág. 82

Resumen

Introducción. Las enfermedades causadas por arbovirus emergentes chikungunya (CHIKV), dengue (DENV) y Zika (ZIKV), son un problema de salud pública a nivel mundial, con amplia distribución en zonas urbanas de regiones tropicales y subtropicales. Estos virus comparten un vector común, las hembras del mosquito del género *Aedes* (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*). La movilidad humana, la urbanización y el uso inconsistente de estrategias de prevención han favorecido el incremento en su distribución. Las manifestaciones clínicas varían desde un curso asintomático o leve, hasta secuelas crónicas y muerte, en algunos casos. Además, estas manifestaciones pueden ser similares entre sí, particularmente en cuanto a síntomas como dolor articular y la fiebre, dificultando la distinción por métodos clínicos. Los datos epidemiológicos sugieren que al menos la mitad de la población mundial (3.6 mil millones de personas) está en riesgo para adquirir infección por DENV, siendo la arbovirosis más ampliamente distribuida. CHIKV, ha aumentado su distribución debido al tráfico aéreo y la movilidad hasta alcanzar las Américas, causando brotes en 2013. En el caso de ZIKV, originalmente presente en la zona ecuatorial de África y Asia; se presentaron brotes en América entre 2015 y 2016. No existe tratamiento específico para ninguna de estas infecciones por arbovirus. El desarrollo de vacunas es considerado actualmente como la estrategia con mayor potencial para el control de estas enfermedades. Este último requiere múltiples enfoques experimentales y epidemiológicos que evalúen la incidencia y prevalencia reales en áreas endémicas. **Objetivo general.** Determinar seroprevalencia y seroconversión de anticuerpos frente a virus CHIKV, DENV y ZIKV en individuos sanos del Hospital General “Dr. Miguel Silva”, la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH y voluntarios de la población general en la ciudad de Morelia, Michoacán, en el período de un año. **Material y métodos.** Tipo de estudio: prospectivo, longitudinal, exploratorio y observacional. Previa obtención de autorización bioética y consentimiento informado por parte los participantes para el estudio, procesamiento y almacenamiento de sangre periférica, se analizaron anticuerpos IgG e IgM en suero contra proteínas estructurales y no estructurales de los tres arbovirus mediante ELISA indirecto. Las muestras se preservaron a -70°C hasta su estudio. Se realizó correlación con otro método diagnóstico serológico estándar. El ELISA se repitió para IgG a los 6 y a los 12 meses después de la primera muestra para determinar seroconversión en el período de un año. **Resultados.** Se analizaron 326 muestras de suero. La prevalencia de IgG para CHIKV, DENV y ZIKV fue de 14.11%, 24.53% y 21.7% respectivamente, resultando menor en IgM. La correlación con un ensayo serológico de neutralización estándar fue positiva en el caso de anticuerpos contra la proteína estructural de CHIKV analizada. Se obtuvo una mayor prevalencia general en voluntarios con procedencia de área endémica, también mayor prevalencia en voluntarios con el antecedente de viaje reciente a un área endémica para DENV y ZIKV y menor prevalencia para ZIKV en personal de salud en comparación a otras ocupaciones. Se obtuvo la tasa de seroconversión a los 6 y 12 meses del inicio del estudio, teniendo un aumento en la prevalencia para los tres virus.

Palabras clave: arbovirus, inmunoglobulina G, ELISA, seroprevalencia, seroconversión.

Summary

Introduction. Diseases caused by the emerging arboviruses chikungunya (CHIKV), dengue (DENV) and Zika (ZIKV) are a public health problem with broad distribution in tropical and sub-tropical urban areas. These viruses share a common vector, female mosquitoes of the genus *Aedes* (*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*). Human mobility, urbanization and the inconsistent use of prevention strategies have favoured an increase in their distribution. Clinical manifestations vary from mild or asymptomatic, to chronic sequels and death in some cases. Furthermore, clinical manifestations can be similar, in particular joint pain and fever, making diagnosis difficult by clinical methods. Epidemiological data suggests that at least half of the world's population (3.6 billion people) is at risk of acquiring the infection by DENV, which is the most widely distributed arbovirolosis. CHIKV distribution has increased due to air traffic and mobility to reach the Americas, causing outbreaks since 2013. In the case of ZIKV, which was confined to the equatorial zone of Africa and Asia; outbreaks have emerged in the Americas between 2015 and 2016. There is no specific treatment for any of these arboviral infections. The development of vaccines is considered now as the strategy with highest potential for the control of these diseases. Vaccine development requires multiple experimental and epidemiological approaches to evaluate the real incidence and prevalence of these infections in endemic areas. **General objective.** To determine seroprevalence and seroconversion of antibodies against CHIKV, DENV and ZIKV in healthy individuals from the General Hospital "Dr. Miguel Silva", the Faculty of Medical and Biological Sciences "Dr. Ignacio Chávez" of the Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo and volunteers from general population in the city of Morelia, Michoacan, during a one-year period. **Materials and methods:** Study type: prospective, longitudinal, exploratory and observational. Bioethical authorization and signed informed consent form by participants were obtained; serum was used to analyze IgG and IgM antibodies against structural and non-structural proteins of the three arboviruses, using indirect ELISA. The samples were preserved at -70°C until they were processed. Correlation with another standard serological assay was performed. ELISA test was repeated at 6 and 12 months after the first sample to determine seroconversion in a one-year period. **Results.** 326 sera samples were analyzed. Prevalence for CHIKV, DENV and ZIKV IgG was 14.11%, 24.53% and 21.7% respectively, while IgM prevalence was lower. Correlation with standard neutralization assay was positive for antibodies against the analyzed structural CHIKV protein. A higher general prevalence was obtained in volunteers with precedence from an endemic area, also higher prevalence in volunteers with the antecedent of recent travel to an endemic area for DENV and ZIKV and lower prevalence for healthcare workers for ZIKV compared to those with other occupations. Seroconversion rate was obtained at 6 months and 12 months since the beginning of the survey, having an increase of prevalence for the three viruses.

Keywords: arbovirus, immunoglobulin G, ELISA, seroprevalence, seroconversion.

1. Introducción

Las infecciones por arbovirus, o virus transmitidos por artrópodos, son un problema importante de Salud Pública a nivel mundial, sobre todo en décadas recientes. Se considera a estos virus como patógenos emergentes y re-emergentes con base en su diseminación geográfica y el creciente impacto en poblaciones susceptibles (Fritzell *et al.*, 2018). Comparten en común la transmisión por un vector artrópodo: las hembras del mosquito del género *Aedes*, predominando en diversas regiones del mundo, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Entre las infecciones por arbovirus transmitidas por estos vectores, destacan los virus chikungunya (CHIKV), dengue (DENV) y Zika (ZIKV) (Weaver *et al.*, 2018).

El incremento en su distribución es favorecido por diversos factores que afectan tanto al vector como al virus, los cuales incluyen la movilidad humana entre distintas regiones del mundo, la urbanización y la poca o nula aplicación de las estrategias de prevención (Weaver *et al.*, 2018). Diversas proyecciones indican que la población mundial incrementará de los actuales 7 mil millones a alrededor de 9.6 millones en 2050. Las consecuencias de dicho aumento favorecerán la diseminación y el impacto de los vectores. Esto debido a la expansión de los entornos urbanos, generando un mayor número de habitats para el mosquito, los cuales corresponden áreas con estancamiento de agua dónde depositan sus huevos y se desarrollan estos vectores (Braack *et al.*, 2018).

Las manifestaciones clínicas de las arbovirosis abarcan un amplio espectro que va desde un curso asintomático o leve hasta secuelas crónicas y desenlaces fatales. Además, hay datos clínicos que se superponen entre las enfermedades por arbovirus, como es el caso de la fiebre. Algunos síntomas característicos como la artralgia y el edema (CHIKV), la fiebre hemorrágica (DENV) y la conjuntivitis (ZIKV) podrían indicar cuál arbovirus es causante de la enfermedad, pero las pruebas de laboratorio son cruciales para un diagnóstico acertado ya que incluso estos síntomas presuntamente característicos se pueden superponer. Esta problemática se acentúa cuando varios arbovirus circulan en una misma área geográfica (Beatty *et al.*, 2011).

Debido a lo ya mencionado, existen varias limitaciones en cuanto a la obtención de los datos epidemiológicos de estas infecciones. La introducción de ZIKV y CHIKV a países endémicos de DENV en diversas regiones de América, impone nuevos retos diagnósticos y epidemiológicos para este y otros arbovirus en general. Además, los individuos que cursan asintomáticos o con síntomas leves, no suelen acudir a recibir atención médica y por tanto representan un sub-registro de casos. En el caso de DENV se cuenta con estimaciones de los casos y de su impacto económico, durante los últimos 40 años (Guzman *et al.*, 2016). CHIKV y ZIKV, en cambio, se han ido estudiando conforme a los brotes que ha habido en los últimos años, sobre todo en América (Weaver *et al.*, 2017).

Las mejores estimaciones de enfermedad por dengue sugieren que al menos la mitad de la población mundial, de aproximadamente 3.6 mil millones, vive en áreas que la sitúan con riesgo para adquirir la infección (Beatty *et al.*, 2009). También se estima que anualmente hay 390 millones de casos en general por DENV a nivel mundial, de los cuales 96 millones son sintomáticos, 2 millones corresponden a enfermedad severa y 21,000 a muertes. El impacto de esto sobre los sistemas de salud incluye el manejo de secuelas que a su vez empeoran la calidad de vida del paciente (Guzmán *et al.*, 2016).

CHIKV ha incrementado su distribución mediante el tráfico aéreo, esparciéndose fuera del continente africano, hasta ser importado a América en 2013. En 2015, se registraron más de un millón de casos sospechosos en 47 países y territorios de Norte y Sudamérica. Mientras que ZIKV estuvo confinado desde su descubrimiento hace más de 60 años, a la región ecuatorial de África y Asia; pero estableciéndose en América Latina y Norteamérica, en 2015 y 2016 (Weaver *et al.*, 2018).

No existe tratamiento específico para ninguna de estas tres infecciones por arbovirus, incluido algún antiviral efectivo disponible. El control de los síntomas y el monitoreo del paciente son los ejes centrales del manejo. Se han desarrollado inmunoterapias pasivas para CHIKV (Couderc *et al.*, 2009) e identificado inhibidores potenciales para los tres virus en otros fármacos empleados originalmente con otros propósitos (Barrows *et al.*, 2016), pero aún no hay fármacos ni protocolos de tratamiento aprobados para estas arbovirosis. Se cuenta también con medidas de soporte

hemodinámico para las complicaciones hemorrágicas y sistémicas por dengue. Aunque lo anterior mejora el curso clínico, éste es variable y siguen persistiendo la mortalidad y las secuelas (Guzman *et al.*, 2016).

Las medidas de prevención incluyen acciones comunitarias y en casa dirigidas al control del vector transmisor, tales como el uso de mosquiteros, la remoción y eliminación de reservorios como estancamientos de agua (contenedores, llantas, baldíos, etc.), uso de repelentes e insecticidas. Sin embargo, estas han sido insuficientes para evitar el aumento de la distribución del vector y la incidencia de casos, además de que algunas pueden ser perjudiciales en el entorno y la población. Persiste el debate de si son empleadas adecuadamente, o si solo no se han realizado de forma permanente y constante (Paixao *et al.*, 2017).

De manera importante y a lo largo del último siglo, el desarrollo de vacunas y su integración a programas de salud ha sido la estrategia con más potencial para disminuir la morbimortalidad de enfermedades infecciosas. El desarrollo de estas, desde su diseño hasta su aplicación en una población y los resultados es un proceso que requiere diversos enfoques. Es necesario contar con datos básicos, biológicos, experimentales y epidemiológicos antes de llegar a una fase clínica.

Los estudios serológicos son la medición más directa del panorama inmunitario de las enfermedades infecciosas, a pesar de que la metodología suele ser difícil de implementar. El desarrollo de herramientas diagnósticas confiables, rápidas y costeables representa una dificultad respecto a los estudios de seroprevalencia para diferenciar infecciones particularmente cuando circulan múltiples virus (Fritzell *et al.*, 2018). Ésta propuesta se enfoca en la obtención de estos datos mediante métodos serológicos y el empleo de proteínas recombinantes de los virus para su estandarización, con el fin de cuantificar la seroprevalencia de anticuerpos contra los mismos y la seroconversión dentro de una población en el periodo de un año.

2. Marco Teórico

2.1 Problemática de las arbovirosis en el contexto mundial.

Las enfermedades causadas por arbovirus representan un problema creciente de Salud Pública a nivel mundial. Estimar el impacto de estas enfermedades es un gran reto debido al gran número de infecciones que cursan de manera asintomática. Dentro del periodo de los años 2000-2018, ha habido un número creciente de casos y diseminación sin precedente para diversos arbovirus, destacando dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV) (Fritzell *et al.*, 2018). Estimados recientes indicaron que el número de casos afectados por cualquiera de estos tres arbovirus incrementó dramáticamente después de 2013, alcanzando los 3 millones para finales del 2015 en el continente americano (Rodríguez-Morales *et al.*, 2016).

Casi todos los virus son zoonóticos con ciclos de transmisión silvestre y muchos de los arbovirus médicamente importantes son transmitidos por mosquitos vectores (Weaver *et al.*, 2018). Más del 50% de los virus del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*; como DENV y ZIKV, causan enfermedad en humanos. El genoma de los *Flavivirus* es de una longitud aproximada de 11,000 bases y comparten epítomos comunes en la proteína de cubierta (E), lo cual puede generar reactividad cruzada en las pruebas serológicas. CHIKV por su parte es miembro del género *Alphavirus*, familia *Togaviridae*; el cual contiene 28 virus conocidos (Paixao *et al.*, 2017).

A pesar de que la modalidad más común de transmisión para los tres arbovirus es por el vector de género *Aedes*, en ZIKV se da también la transmisión horizontal humano a humano; por contacto sexual, transmisión vertical o por transfusión (Paixao *et al.*, 2017). Diversos factores pueden influenciar la dinámica de dicha transmisión, como los factores ambientales, climatológicos, la interacción huésped-patógeno y el desarrollo de inmunidad en la población (WHO, 2009).

Se cree que la evolución de diversas arbovirosis ocurrió en África sub-Sahariana en ciclos silvestres entre primates no humanos (non-human primate, NHPs) y mosquitos del género *Aedes* (Bryant *et al.*, 2007; Haddow *et al.*, 2012). A pesar del conocimiento de estos ciclos silvestres antiguos, los ciclos urbanos, humano-mosquito-humano cobran mayor relevancia en Salud Pública (Fig.1) (Weaver *et al.*, 2018). Además, a lo largo de la historia se han documentado diversas infecciones

de ZIKV y CHIKV esporádicas en África y han habido pequeños brotes urbanos, la mayoría de los grandes brotes han ocurrido fuera de África (Leroy *et al.*, 2009).

La mayoría de las arbovirosis comparten diversas características en común. En primer lugar, su período de incubación es típicamente corto, de 3-10 días. Segundo, la mayoría de los casos cursan con sintomatología leve o asintomáticos. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad por chikungunya, algunos estudios han encontrado casos sintomáticos en menos del 15% en determinadas poblaciones (Weaver *et al.*, 2015; Gallian *et al.*, 2017). En tercer lugar, factores como la urbanización, el incremento en el transporte internacional y el cambio climático, propician los brotes locales y la diseminación global (Wolfe *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2008). Por último, los tres virus comparten huéspedes comunes, como es el caso de los humanos y mosquitos vectores (principalmente *A. aegypti*) (Gardner *et al.*, 2018).

Los datos epidemiológicos con respecto a arbovirosis suelen ser poco confiables debido al curso subclínico habitual, con 75% de casos asintomáticos para DENV, 3-25% para CHIKV y 80% para ZIKV. (Bhatt *et al.*, 2013; Staples *et al.*, 2009; Duffy *et al.*, 2009). Lo anterior también se debe a que la búsqueda de atención médica puede variar enormemente, siendo escasa en muchas poblaciones. Se ha estimado el impacto de los brotes de DENV usando un gran número de métodos empíricos y extrapolativos; sin embargo, los datos más confiables para un abordaje empírico son obtenidos de estudios de seroprevalencia (Wahyono *et al.*, 2017; Undurraga *et al.*, 2013).

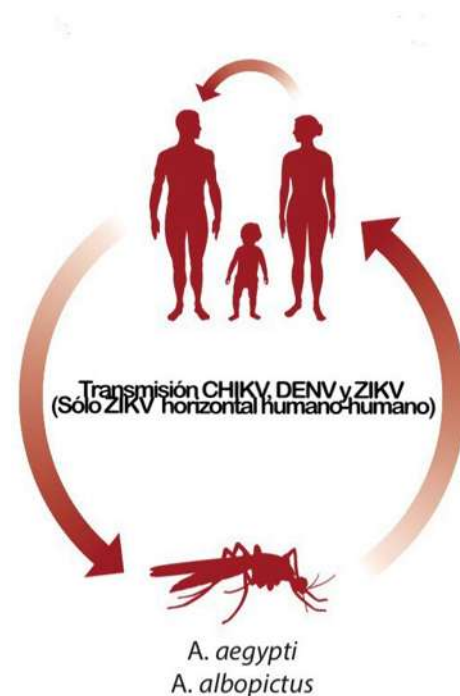


Fig. 1. Transmisión de infecciones por arbovirus. Modificado de Weaver *et al.*, 2018.

Los estudios serológicos proveen un abordaje alternativo para monitorear los niveles de inmunidad en la población y no requieren que las muestras de los participantes sean procesadas en el corto periodo en que presentan síntomas (Wu *et al.*, 2014). Los estudios seroepidemiológicos pueden apoyar el proceso de toma de decisiones, para seleccionar el grupo y edad a ser vacunados en

comunidades endémicas. Pocos estudios se han realizado en México para estudiar la seroprevalencia en individuos aparentemente sanos (Amaya-Larios *et al.*, 2014).

La información acerca de los patrones de seroprevalencia también contribuye en la aprobación de las vacunas y a su integración a programas. En el caso de la única vacuna disponible contra dengue en comercialización, CYD-TDV, la información tanto sobre la distribución de serotipos como la obtenida en los ensayos clínicos han sometido a discusión su eficacia y seguridad (Hernández-Ávila *et al.*, 2016). Sin embargo, los estudios seroepidemiológicos disponibles en la literatura respecto a arbovirus generalmente emplean diseños transversales o en torno a la incidencia durante los brotes y no abordan la seroconversión de los participantes en un periodo estipulado de tiempo.

Muchas regiones de América han experimentado brotes simultáneos por virus transmitidos por mosquitos *Aedes*, como chikungunya, dengue y Zika, resultando en co-infección de humanos por múltiples virus, aunque se sabe poco de las consecuencias de esto. Para comparar directamente las infecciones individuales y las coinfecciones se han compilado diversos datos en la literatura, los cuales aunque no son a gran escala, muestran que la severidad de la enfermedad es similar entre las infecciones individuales y las coinfecciones, en la mayoría de los casos presentando una enfermedad febril tipo dengue (Vogels *et al.*, 2019).

Mediante el uso de sistemas artificiales de membranas, algunos grupos de trabajo han sido capaces de exponer a los mosquitos a alimentación conteniendo uno o más arbovirus. Después de mantener a la hembra alimentada por 1-2 semanas a una temperatura específica, la saliva es colectada. La detección de virus en saliva provee una aproximación para la transmisión potencial a un huésped. Dichos estudios confirman que los mosquitos pueden ser infectados secuencialmente y simultáneamente por múltiples arbovirus, siendo detectables en saliva en hasta el 11.5% de los mosquitos (Vazeille *et al.*, 2010; Chaves *et al.*, 2018).

No existe tratamiento antiviral para ninguna de estas tres infecciones por arbovirus. En los casos de CHIKV y ZIKV no hay vacunas con eficacia probada (Paixao *et al.*, 2017). En el caso de DENV solo existe una vacuna aprobada para comercialización en 5 países, pero con múltiples

controversias respecto a su seguridad y generación de respuestas adversas potenciadas por anticuerpos (Guzmán *et al.*, 2016).

2.2 Dengue

La infección por DENV, es la infección viral transmitida por artrópodos que más rápidamente se ha diseminado en el mundo, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales (Fig. 2) (Guzmán *et al.*, 2016). Aunque antes era relativamente infrecuente, se estima que ahora es la infección por arbovirus más común globalmente, con casos de transmisión en al menos 128 países y poniendo en riesgo a cerca de 4 mil millones de personas (Bhatt *et al.*, 2013; Stanaway *et al.*, 2016). Esta ha incrementado su incidencia más de 30 veces durante las últimas décadas junto con la expansión geográfica de los mosquitos *Aedes* (WHO, 2019).

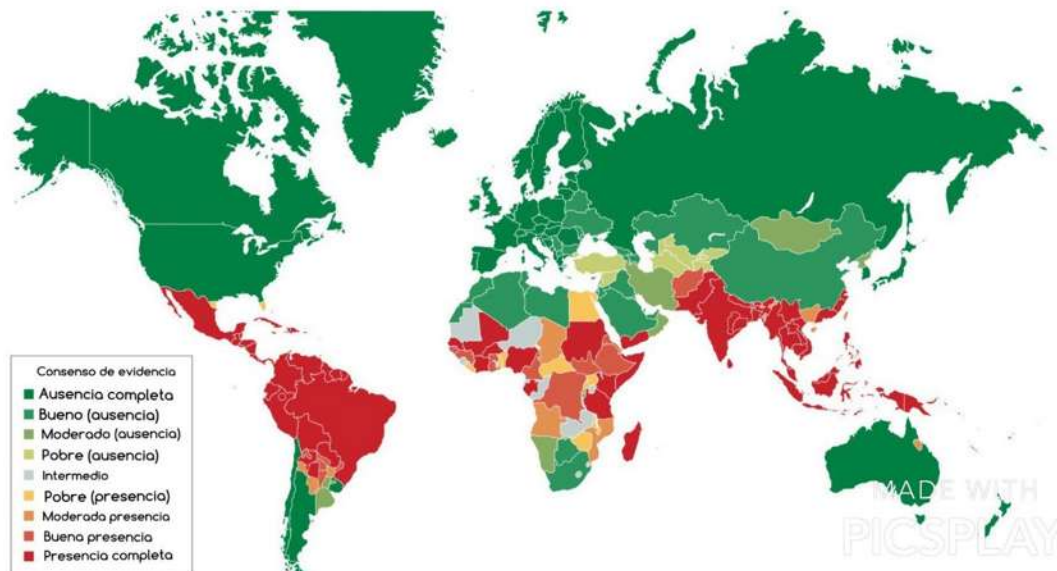


Fig. 2. Concordancia de diferentes regiones para la transmisión de virus del dengue. Modificado de Guzmán *et al.*, 2016.

El término “virus del dengue”, agrupa cuatro virus genética y antigénicamente relacionados, siendo denominados serotipos del 1 al 4 (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). La infección por cualquiera de los cuatro serotipos puede resultar en una gama de manifestaciones clínicas, cuya temporalidad o secuencia puede ser un determinante de la severidad de la enfermedad y su curso (Guzmán *et al.*, 2016). Aunque su origen es incierto, el DENV apareció por primera vez en América aproximadamente al mismo tiempo que la fiebre amarilla, lo cual implica que probablemente ambos hayan sido transportados en barcos de esclavos junto con el mosquito de

origen africano *A. aegypti*. Se cree que los cuatro serotipos han evolucionado independientemente durante unos mil años (Braack *et al.*, 2018).

2.2.1 Epidemiología

De los 50-100 millones de casos de fiebre por dengue mundialmente al año, se pueden extraer 250-500 mil casos por dengue grave (denominado DHF, *dengue haemorrhagic fever* o DSS, *dengue shock syndrome*), reportados cada año, en su mayoría entre niños pequeños, con una tasa de mortalidad que varía del 0.5-5% en países asiáticos (Braack *et al.*, 2018). La infección por DENV puede tener un curso asintomático o fiebre no complicada, o llegar a formas severas de la infección como las de DHF o DSS (Simons *et al.*, 2012).

En México, se presentaron un total de 17, 795 casos confirmados en el año 2016, de los cuales alrededor de 4,000 fueron dengue severo; el 53% correspondientes a los estados de Veracruz, Michoacán, Jalisco, Guerrero y Nuevo León (Secretaría de Salud, 2016). Para la semana epidemiológica número 52 del 2019, correspondiente al 30 de diciembre del mismo año se confirmaron 41,505 casos con 191 defunciones, correspondiendo el 69% de estos a los estados de Jalisco (11,727 casos), Veracruz (10,902 casos), Chiapas, Quintana Roo y Oaxaca. Michoacán se posicionó en el noveno lugar con 1,237 casos.

2.2.2 Características del virus y fisiopatología

Los DENVs pertenecen al género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*. Los cuatro serotipos están formados por una cubierta, siendo partículas virales con un diámetro aproximado de 500 angstroms. El genoma de cada serotipo comprende un RNA de sentido positivo (+), monocatenario de unas 11 kb, que codifica para 10 proteínas. De éstas, hay 3 estructurales: la proteína (M) de membrana, la proteína (E) de cubierta y la proteína (C) de cápside. Las proteínas no estructurales (NS, non-structural), son: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS3B Y NS5. Adicionalmente, NS1 está involucrada con la evasión de la respuesta inmune del huésped (Guzmán *et al.*, 2016). Los factores de riesgo de DENV por parte del huésped humano incluyen la edad, el sexo, obesidad y variantes genéricas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (Nguyen *et al.*, 2005; Anders *et al.*, 2011; Khor *et al.*, 2011). La infección previa por DENV incrementa el riesgo de infección severa con otro serotipo de DENV, ya que anticuerpos no neutralizantes facilitan la

infección de células portadoras del receptor a la fracción Fc de los mismos. Este fenómeno se conoce como amplificación dependiente de anticuerpo (Jentes *et al.*, 2010).

La entrada del genoma de DENV en el citoplasma de la célula hospedera es un proceso de múltiples pasos que comienza con la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula hospedera mediada por receptor, seguido de endocitosis del virus en un endosoma y posteriormente una fusión dependiente de pH entre las membranas virales y endosómicas (Fig. 3). El interior de la partícula viral está formado por un complejo de RNA con proteínas de cápside y rodeado de una membrana lipídica que contiene a las proteínas M y E externamente ancladas, las cuales en conjunto orquestan las interacciones virus-hospedero durante la entrada. La proteína E tiene un arreglo en la superficie de DENV de 90 monómeros estrechamente empaçados, los cuales yacen en la membrana y facilitan la entrada en la célula uniéndose a receptores celulares mediante la fusión de las membranas celular y viral. De sus 3 dominios (DI-DIII), DIII de la proteína E es el responsable de la unión a células hospederas y diversas mutaciones se han identificado en este dominio que afectan la unión a receptor (Kanai *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004; Roehrig, 2003).

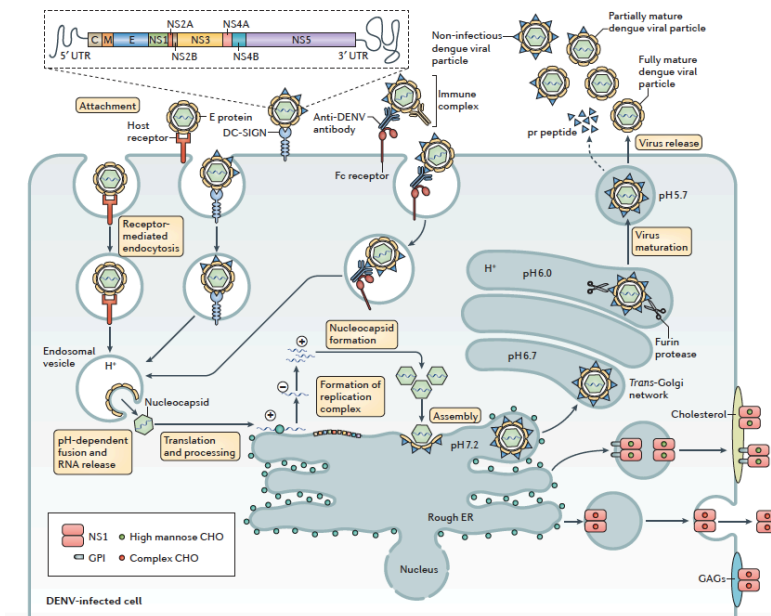
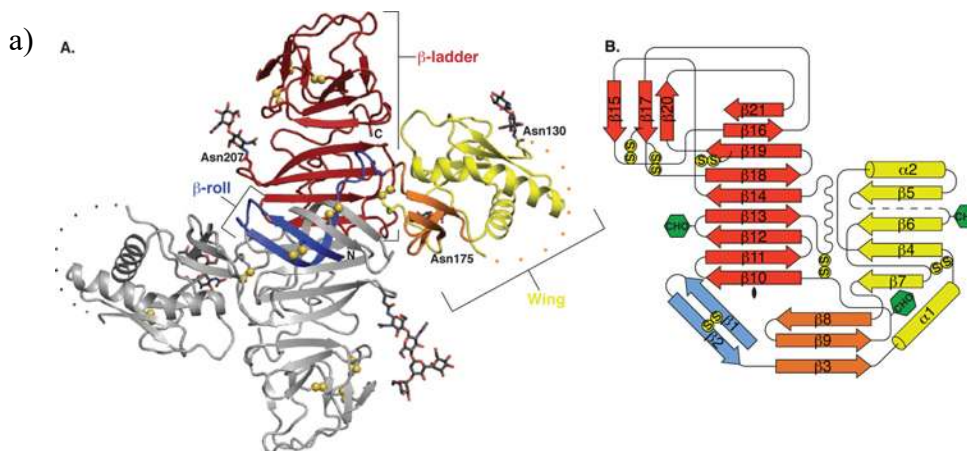


Figura 3. Ciclo de vida de DENV. Las partículas maduras se unen a la célula hospedera mediante la unión de la proteína E (envelope). La entrada del virus es a través de endocitosis mediada por receptor. Dentro, el re-arreglo pH dependiente de E facilita la fusión de las membranas viral y endosómica. Lo anterior genera el desensamble y la liberación del RNA genómico. Las proteínas NS y en particular NS1 son inicialmente expresadas en asociación con el RE. Parte de esta NS1 aparte de estar anclada a membrana o a superficie, puede ser secretada (sNS1). Modificado de Guzman *et al.*, 2016

Las proteínas no estructurales (NS), por otra parte, están involucradas en la replicación y empaquetamiento viral. La proteína NS1 es una glicoproteína de 46 kDa, altamente conservada entre los 4 serotipos de DENV y otros flavivirus (Guzman *et al.*, 2016) que existe en tres formas: la forma residente en el retículo endoplásmico (RE), la forma anclada a membrana y una forma secretada (sNS1). NS1 es inicialmente sintetizada como un monómero soluble y se asocia posteriormente con la membrana después de la dimerización en la luz del retículo endoplásmico (Muller *et al.*, 2013). La NS1 intracelular participa en la replicación viral temprana y se ha encontrado en compartimentos vesiculares inducidos por el virus que engloban complejos de replicación virales (Mackenzie *et al.*, 1996; Akey *et al.*, 2014).

La NS1 asociada a membrana es dimérica, con caras hidrofóbicas e hidrofílicas bien definidas, encarando la membrana del RE y la luz del mismo, respectivamente. La NS1 secretada es un barril abierto hexamérico asociado con lípidos (Akey *et al.*, 2014; Gutsche *et al.*, 2011). Tres dominios distintos han sido identificados en la estructura de NS1; un dominio amino-terminal: β -roll que comprende 29 residuos, seguido del dominio “Wing”, que comprende la posición 30-180 y finalmente un dominio carboxilo-terminal denominado β -ladder, constituido por los residuos 181-352 (Fig. 4). Mientras que los dominios Wing y β -ladder son hidrofílicos, el dominio β -roll es hidrofóbico y más propenso a interactuar con membranas celulares (Alcon-LePoder *et al.*, 2006).



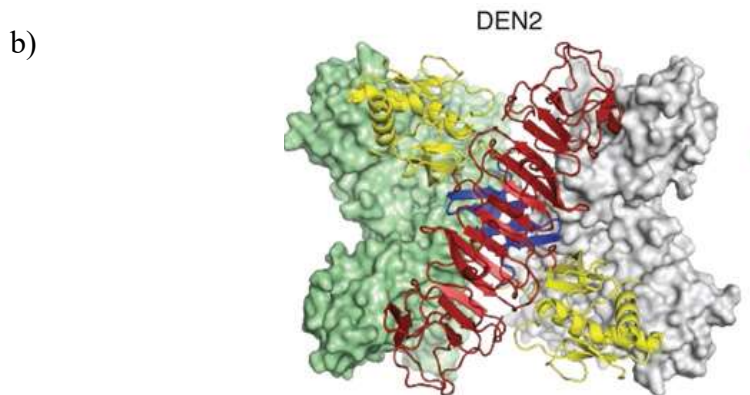


Figura 4. Estructura de NS1. a) El dímero de NS1 con una subunidad en gris y la otra coloreada por dominio (β -roll en azul, wing en amarillo con un subdominio conector en naranja, β -ladder central en rojo). Al lado un diagrama topológico con sitios de glicosilación en verde. b) Hexámero de sNS1 correspondiente a DENV-2. Modificado de Akey *et al.*, 2014.

Se ha sugerido que la NS1 intracelular es un cofactor necesario para la replicación viral del RNA y la morfogénesis del virión y puede jugar un papel en la modulación de la respuesta inmune innata (Alcon-LePoder *et al.*, 2006; Akey *et al.*, 2014). La noción de que los anticuerpos anti-NS1 participan en la patogénesis del dengue procede de resultados de experimentos que demostraron que los anticuerpos monoclonales anti-NS1 tienen reactividad cruzada con el fibrinógeno humano, trombocitos y células endoteliales y producen hemorragia en modelos de ratón (Puerta-Guardo *et al.*, 2013).

La versión soluble sNS1 puede ser detectada en la sangre de pacientes infectados desde el primer día de los síntomas y circular a una concentración de 4 ng/mL hasta 9.48 mg/mL (Duyen *et al.*, 2011) durante la fase aguda, siendo considerada de riesgo para dengue grave una concentración mayor a 600 ng/mL (Libraty *et al.*, 2002). Diversos estudios sugieren que sNS1 es un mediador clave en la patogénesis del dengue. La NS1 recombinante altamente purificada activa los macrófagos de ratones y células mononucleares humanas de sangre periférica mediante receptores TLR4, llevando a la inducción y liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas. En adición, en modelos *in vitro* e *in vivo* de escape vascular, la exposición a rNS1 resultó en la disrupción de la integridad de la monocapa endotelial (Beatty *et al.*, 2015; Modhiran *et al.*, 2015).

DENV es capaz de infectar diferentes tipos celulares *in vitro*, incluyendo células epiteliales, endoteliales, hepatocitos, células dendríticas, monocitos, células de médula ósea y mastocitos. A

pesar de esta habilidad para infectar estas células en condiciones de laboratorio, se sigue estudiando su papel en la patogénesis de DENV. Sin embargo, candidatos a receptores se han descrito en sistemas *in vitro* tales como heparan-sulfato, ICAM3 específico de células dendríticas, receptor de manosa-1 en macrófagos y proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90) (Smit *et al.*, 2011).

Estos estudios sugieren que la NS1 circulante de DENV desencadena disfunción de la barrera endotelial, lo cual incrementa la permeabilidad de las células endoteliales humanas *in vitro*. Estos hallazgos abren una nueva ventana de oportunidad para el desarrollo de medicamentos y vacunas. La trombocitopenia resulta de supresión transitoria de la médula ósea mediada por interferón γ y destrucción periférica aumentada de plaquetas durante las fases febril y convalescente (Mitrakul *et al.*, 1987; Mitrakul *et al.*, 1977). Estudios recientes han reportado que NS1 se une a trombina *in vivo* para formar complejos NS1-trombina. Además, *in vitro*, la rNS1 inhibe la activación de protrombina y prolonga el TTPa en plasma humano deficiente en plaquetas. La liberación heparán-sulfato y condroitín-sulfato (moléculas similares en estructura a la heparina y que simulan su función como anticoagulante), los cuales son probablemente removidos por NS1 del glicocáliz, también pueden contribuir a la hemostasia alterada (Lin *et al.*, 2012).

2.2.3 Diagnóstico

Después del período de incubación (3-7 días), los síntomas aparecen súbitamente, observándose 3 fases. La primera es la fase febril, que se presenta con temperatura $>38^{\circ}\text{C}$, acompañada de cefalea, vómito, mialgias, dolor articular, ocasionalmente rash macular y menos comúnmente se observan petequias y/o equimosis y hepatomegalia. La fase crítica, en la que se desarrolla un síndrome de extravasación (pérdida vascular), que se caracteriza por: hemoconcentración, hipoproteinemia, derrame pleural, ascitis, disminución de la amplitud del pulso, colapso vascular, hipotensión, shock y muerte. La fase de recuperación que se caracteriza por la reversión de la alteración en la permeabilidad vascular, a las 48-72 horas (Simmons *et al.*, 2012).

La enfermedad por dengue es clasificada clínicamente como dengue con o sin signos de alarma y dengue severo (WHO, 2009). La clasificación del 2009 de la OMS reemplazó la anterior clasificación de 1997, la cual pasaba por alto dos fenómenos patológicos asociados con la enfermedad: filtración plasmática y hemostasia anormal (WHO, 1997). Los abordajes diagnósticos

incluyen la detección de viremia, detección de anticuerpos (ELISA) y PCR. La detección de anticuerpos IgM anti-DENV es el método de rutina más utilizado en la práctica. Los títulos de IgM anti-DENV del suero de pacientes en fase aguda, son medidos para la confirmación serológica de la infección, mientras que los pacientes en convalecencia son identificados a través de seroconversión de IgM e IgG (Fig. 5) (Guzmán *et al.*, 2016).

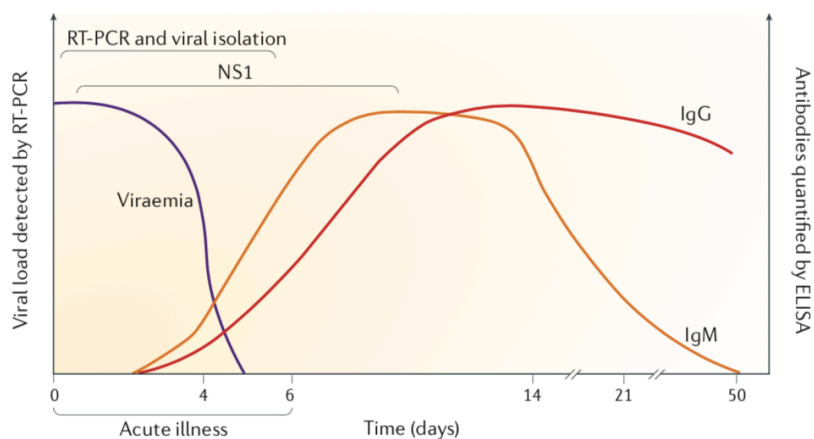


Figura 5. Diagnóstico de dengue. La viremia, el antígeno NS1 y los anticuerpos cambian en el tiempo, dependiendo del estadio de infección. Tomado de Guzman *et al.*, 2016.

En cuanto a la RT-PCR, es altamente específica, pero tiene una sensibilidad relativamente baja, además de consumir tiempo y recursos. La detección de la proteína NS1 más recientemente, ha provisto una ventana de oportunidad para el diagnóstico temprano en fase aguda, pero con sensibilidad y especificidad dependiente del serotipo (Simmons *et al.*, 2012).

La reciente introducción en áreas endémicas de los CHIKV y ZIKV ha impuesto nuevos retos al diagnóstico. Especialmente con DENV y ZIKV, aunque la duración de la viremia es diferente, se presenta reactividad cruzada en las pruebas. Para esto se ha trabajado en adecuarlas y en evaluar kits que evadan este problema. La Organización Panamericana de la Salud recomienda un nuevo algoritmo diagnóstico, con un primer paso de identificación por PCR en tiempo real como diferencial de DENV, ZIKV y CHIKV en una fase aguda; además un segundo paso de ser posible, con un ELISA para diferenciar DENV y ZIKV (PAHO, 2016).

El dengue es una enfermedad muy dinámica y cuya presentación varía dependiendo de cuatro factores principales identificados: el serotipo viral, la genética del huésped, edad, sexo y estado inmunológico del huésped. Cabe destacar la importancia del serotipo, ya que, aunque todos son

transmitidos por mosquitos de género *Aedes* y en principio causan las mismas manifestaciones clínicas, hay algunas diferencias biológicas respecto a estos (Guzmán *et al.*, 2016).

2.2.4 Tratamiento y prevención

En cuanto al tratamiento, no hay uno específico. La fiebre por DENV se trata de manera sintomática y con vigilancia de datos de alarma. En el caso de DHF y DSS, la mayoría de las medidas van encaminadas a la identificación del paciente con riesgo, además del uso de medidas de soporte ante los fenómenos de extravasación y edema. El monitoreo prosigue hasta resolverse, posteriormente a la fase de convalecencia, la cual pasa rápidamente a la recuperación. La Organización Mundial de la Salud ha propuesto clasificaciones, la última de 2009, para identificar y agrupar a los pacientes con sintomatología (WHO, 2014).

Por todo lo anterior, se propone el desarrollo de una vacuna como la medida con mayor potencial en el control de las arbovirosis. Sin embargo, aún no son bien comprendidos varios de los mecanismos de la inmunidad protectora del dengue. Los anticuerpos contra virus son a menudo la correlación más usada de la protección. La mayoría de los anticuerpos neutralizantes reconocen la proteína E, títulos altos de la misma se han correlacionado con protección en modelos animales. No obstante, no hay prueba de que dicha protección esté siempre relacionada, como se ha evidenciado en la ausencia de protección contra DENV-2 en algunos individuos vacunados con títulos altos de anticuerpos (Guzmán *et al.*, 2016).

El desarrollo de una vacuna protectora contra dengue enfrenta varios retos: idealmente, la vacuna debe proteger contra los cuatro serotipos, también debe conferir protección a largo plazo, pero no hay modelo animal que replique exactamente la inmunidad humana contra dengue. Muchas vacunas están actualmente bajo desarrollo, incluyendo algunas en fase III, bajo prueba de seguridad y eficacia. Solo una vacuna ha pasado dicha fase y está disponible para comercialización (Guy & Jackson, 2016).

La vacuna CYD-TDV, Dengvaxia; producida por Sanofi Pasteur fue aprobada en 2015 en México y posteriormente en Brasil, Filipinas, El Salvador y Costa Rica. Sin embargo, en los estudios multicéntricos de fase III, realizados en 5 países de Latinoamérica y 5 países de Asia, se observó

protección en individuos seropositivos, mientras que en aquellos que no habían estado expuestos anteriormente a dengue, paradójicamente se observaron reacciones tipo dengue grave (Hadinegoro *et al.*, 2015).

La protección conferida fue moderada, con cifras globales de 55.7-64.5%, las cuales fueron disminuyendo en el tiempo; actuando aparentemente más como un potenciador de la respuesta inmune innata, que presentando utilidad como vacuna primo-infección. A partir de estas observaciones se ha descrito también una respuesta de tipo inflamatoria, denominada “amplificación mediada por anticuerpos” (ADE, antibody dependent enhancement) que explica las reacciones tipo dengue grave. La amplificación depende del reconocimiento de la fracción Fc de anticuerpos circulantes débilmente neutralizantes que facilitan la entrada de virus, lo que resulta en amplificación de la infección y de la respuesta inflamatoria (Hernández-Ávila *et al.*, 2016).

Actualmente se trabaja en vacunas con diferentes diseños, estos incluyen virus atenuados vivos al igual que CYD-TDV, vacunas de subunidad o VLPs (virus-like proteins), virus inactivados, vacunas de DNA y vacunas de vector viral. Éstas últimas usan diferentes virus como vehículo y están centradas en montar y evaluar una respuesta de anticuerpos contra la proteína E (Guzmán *et al.*, 2016). Se han identificado diversos inhibidores potenciales en fármacos que originalmente son empleadas con otro propósito. Tal es el caso de la Ivermectina, un antihelmíntico que inhibe fuertemente la replicación YFV (virus de la fiebre amarilla), DENV y WNV (virus del Oeste del Nilo) dirigiéndose contra la proteína helicasa NS3 (Mastrangelo *et al.*, 2012).

2.3 Chikungunya

CHIKV pertenece al género Alphavirus, familia *Togaviridae*. La secuenciación del genoma completo de CHIKV ha dado lugar a la identificación de cuatro linajes: África occidental (Waf, *West Africa*), África Este/Central/Sur (ECSA, *East/Central/South Africa*), asiático y linaje Indo-oceánico (IOL, *Indian Ocean Lineage*). La enfermedad por CHIKV fue nombrada por la palabra en Macondo que significa “el que se dobla”, describiendo la postura en pacientes con dolor articular. Esto se hace se notorio al ser el edema periarticular, una manifestación frecuente, reportada en 32-95% de los casos (Hochedez *et al.*, 2006).

La reconstrucción filogenética de la evolución de CHIKV ha identificado que los linajes asiáticos, ECSA (East/Central/South African) y africano occidental hasta 2004 estaban mayoritariamente confinados a las regiones geográficas por las cuales fueron nombrados (Schuffnecker *et al.*, 2016; Wahid *et al.*, 2017). Los ciclos urbanos de transmisión son posibles debido a los altos niveles de viremia desarrollados en individuos infectados (Go *et al.*, 2014) y pueden ser causados derivados de CHIKV silvestre a través de vectores puente, como *Aedes furcifer* (Diallo *et al.*, 2012). Se han reportado casos de transmisión materno-fetal (Ramful *et al.*, 2007) y detección de virus en la leche materna humana (Campos *et al.*, 2017), aunque el impacto de esto en la infección es aún controversial.

La reciente emergencia de CHIKV en el Caribe y su rápida diseminación hacia 45 países en el sur, centro y norte de América expuso el potencial que este tiene para generar una epidemia (Petersen *et al.*, 2016). La emergencia de CHIKV ha sido trazada filogenéticamente hasta África occidental (East/Central/South African, or ECSA lineage). El linaje asiático continúa circulando en la región de Asia, así como más recientemente en Oceanía y actualmente en América. Una re-emergencia moderna del linaje Indo-oceánico (IOL), también del este de África, afectó a islas en el Océano Índico, India, Sureste de Asia y temporalmente Europa. Finalmente, una cepa distinta de ECSA se diseminó directamente a Brazil en 2014 (Nunes *et al.*, 2015).

2.3.1 Epidemiología

CHIKV no se había encontrado en América hasta 2013, pero la presencia de transmisión autóctona del virus fue reportada en la Isla de San Martín en el Caribe en diciembre del mismo año. De ahí se diseminó y fue reportada en 43 países del territorio americano, con 1.1 millones de casos sospechosos reportados (Braack *et al.*, 2018).

Una nueva cepa de ECSA se diseminó en Brasil, resultando en co-circulación con una cepa asiática en Sudamérica. Estos brotes involucraron la transmisión por *A. aegypti*, excepto por algunas cepas IOL que se adaptaron mediante sustituciones glucoproteicas de cubierta para hacer más eficiente su transmisión por *A. albopictus* (Weaver *et al.*, 2017). Para el periodo de enero del 2015 a noviembre de 2016, se reportaron en la región 1.2 millones de casos adicionales (Braack *et al.*,

2017). En 2015 se presentaron 11, 498 casos confirmados de infección por CHIKV en México (SINAVE, 2015).

2.3.2 Características y fisiopatología

CHIKV es un alfavirus de cadena positiva (+) de RNA, familia *Togaviridae*, de 11,5 kb de longitud, contiene cuatro proteínas no estructurales y tres proteínas estructurales: la cápside y dos glicoproteínas que conforman la envoltura (E1 y E2). E1 y E2 son glicoproteínas de superficie de 439 y 423 aminoácidos, respectivamente (Khan *et al*, 2002). Estas contienen los mayores epítomos virales y participan en la unión y entrada del virus en las células objetivo, donde E2 es responsable de la unión a receptor y E1 de la fusión de membrana (Fig. 6) (Voss *et al*, 2010).

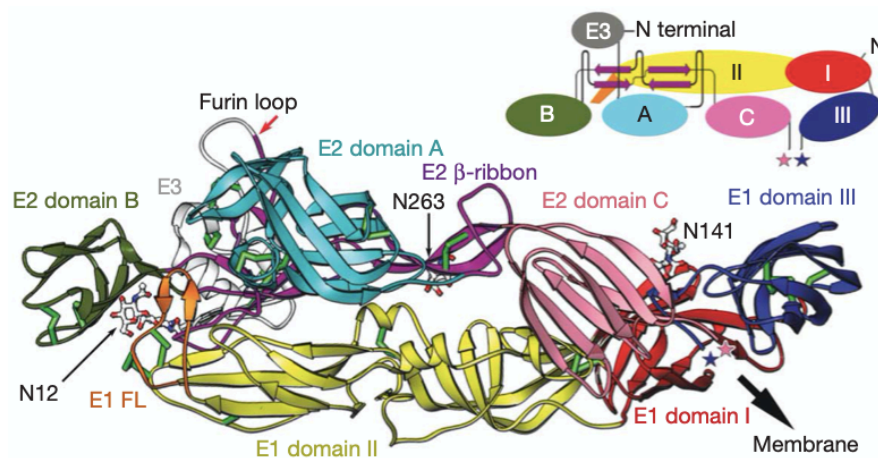


Figura 6. Diagrama de las estructuras glicoproteicas de CHIKV. Los dominios de E1: EI, EII y EIII son mostrados en rojo, amarillo y azul, respectivamente. Los dominios de E2: A, B y C son mostrados en azul, verde y rosa, respectivamente. E1, media la fusión a membrana de célula hospedera. La orquilla de fusión (FL, *fusion loop*) en E1 se representa, esta confiere movilidad al heterodímero. E3 (cápside) se muestra en blanco. Modificado de Voss *et al.*, 2010.

CHIKV infecta una gran cantidad de tejidos, incluyendo hígado, páncreas, músculo y nódulos linfáticos (Weaver *et al.*, 2015). Los fibroblastos localizados en la dermis, cápsulas articulares, fascia muscular e inserciones de músculos tendinosos son importantes blancos virales (Couderc *et al.*, 2008). Los síntomas de dolor articular crónico podrían estar relacionados con la persistencia de células infectadas o antígenos virales, desencadenando respuestas inflamatorias desencadenadas por interleucina-6 (IL-6) y factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago (Assuncao-Miranda *et al.*, 2013). CHIKV es capaz de infectar una gran variedad de líneas celulares adherentes y células primordiales, pero falla en infectar o incluso unirse a las líneas celulares de la sangre (linfocitos y células dendríticas derivadas de monocito). De manera interesante, macrófagos derivados de monocitos parecen ser susceptibles a la infección por CHIKV (Tanabe *et al.*, 2018).

Las infecciones maternas de CHIKV también llevan a transmisión vertical al igual que ZIKV. Esto ocurre comúnmente durante el nacimiento si hay viremia materna (Weaver *et al.*, 2015). Ambas, las infecciones por ZIKV y CHIKV están asociadas a un riesgo incrementado para Síndrome de Guillain Barré (GBS), el mismo que no ha sido cuantificado debido a los restos diagnósticos en las regiones afectadas (Oehler *et al.*, 2013; Wielanek *et al.*, 2007). La transmisión intraparto de una madre virémica a su niño tienen un impacto dramático en el estado del infante. La infección vertical es raramente detectada antes del parto, pero ocurre en alrededor de la mitad de las madres con viremia durante el parto (Torres *et al.*, 2016). La infección neonatal puede llevar a encefalitis en 50% de los casos y a falla respiratoria aguda en un 8%, también puede afectar el desarrollo neurológico (Gerardin *et al.*, 2014).

2.3.3 Diagnóstico

El cuadro clínico es de inicio rápido con duración de 5-7 días; la fiebre alta, el dolor severo, la inflamación articular y un rash exantemático son los síntomas más comunes. Estos tienden a ser mayores en pacientes que sufren de condiciones artríticas crónicas y/o comorbilidades inflamatorias (Tandale *et al.*, 2009). La infección aguda puede dejar durante meses secuelas de poliartralgia. Durante la infección se presenta trombocitopenia moderada y de manera notable se ha reportado una correlación entre el recuento plaquetario bajo, la duración y severidad de la enfermedad (Kularatne *et al.*, 2009).

Diversos kits comerciales de ELISA y ensayos serológicos caseros de CHIKV están disponibles basados en antígenos completos de virus de los cuales se han reportado sensibilidad y especificidad variable (Johnson *et al.*, 2016; Yap *et al.*, 2010). Los anticuerpos IgM anti-CHIKV aparecen tan rápido como a los tres días después de la infección, pero su presencia es usualmente detectada solamente hasta los 3-4 meses. En contraste, los anticuerpos IgG anti-CHIKV están presentes durante años y pueden proveer datos sólidos respecto a la seroepidemiología de CHIKV (Azami *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2011).

Sin embargo, frecuentemente es difícil diferenciar los casos agudos de los convalescientes basados en la sola detección de IgG en áreas altamente endémicas. A pesar de esta dificultad un estudio

internacional reciente reportó que la detección de IgG de infección por CHIKV es más útil que la detección por IgM (Niedrig *et al.*, 2009). Se ha reportado recientemente también una proteína E2 recombinante en células de mamífero, con fines diagnósticos y para la evaluación de vacunas (López-Camacho *et al.*, 2019).

2.3.4 Tratamiento y prevención

No hay tratamiento específico disponible y los antivirales no muestran eficacia. Tampoco hay vacuna aprobada disponible. Actualmente, muchas estrategias de producción de vacunas están en desarrollo, incluyendo: Virus atenuados vivos, vacunas inactivadas, VLPs (viral-like proteins), vacunas de DNA, quiméricas y basadas en subunidad. Varias de estas se encuentran en fase I y II. También hay candidatos en fase preclínica de DNA (CHIKV-IRES, inserto de picornavirus) y de subunidad (basadas en proteínas E1 y E2), ambas estrategias en desarrollo (Tharmarajah *et al.*, 2017).

La inmunoterapia pasiva es promisorio en los neonatos expuestos a CHIKV, inmunoglobulinas humanas anti-CHIKV purificadas de donadores convalescientes exhiben una fuerte actividad *in vitro* contra CHIKV y efectos protectores fuertes en modelos adultos y crías de ratones (Couderc *et al.*, 2009). El desarrollo de vacunas para CHIKV data de 1970 y casi todas las plataformas para desarrollar vacunas han sido empleadas para ambos, incluidas una vacuna de partículas similares a virus (VLPs, *virus like particles*) y una vacuna viva empleando el virus de sarampión como vector (Ramsauer *et al.*, 2015).

2.4 Zika

ZIKV pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, el cual comprende 53 especies de virus, que son transmitidas por vector. ZIKV está muy relacionado filogenéticamente con otros *flavivirus* de importancia médica, tales como el de la encefalitis japonesa (JEV), el del Este del Nilo (WNV), DENV y el de la fiebre amarilla (YFV). ZIKV fue descubierto por primera vez en un mono Rhesus centinela en el bosque de Zika en Uganda en 1947 (Wang *et al.*, 2017). ZIKV se ha diseminado rápidamente a lo largo del continente de América, con más de 170,000 casos confirmados por laboratorio en 48 países hacia el final del 2016 (Besnard *et al.*, 2014).

Además de la transmisión por la picadura de los mosquitos *Aedes*, puede ser transmitido por contacto sexual, transmisión vertical y transfusiones sanguíneas (Weaver *et al.*, 2018). La transmisión sexual, principalmente de hombre a mujer, ha sido detectada en muchos viajeros infectados en epidemias los cuales subsecuentemente fueron transmitidos a sus parejas sexuales en regiones de Norte América y Europa. Estos hallazgos han sido respaldados por la detección de RNA de ZIKV en semen hasta seis meses posteriormente a la infección (Barzon *et al.*, 2016).

2.4.1 Epidemiología

Por muchos años la infección por ZIKV fue esporádica, permaneciendo como una enfermedad leve, quizá siendo sub-reportada debido a que los síntomas son similares a otras enfermedades agudas febriles endémicas en las mismas regiones. El primer brote de ZIKV reportado fuera de África y Asia ocurrió en la isla de Yap, seguido en 2013 de un segundo brote originado en la Polinesia francesa. Desde entonces ZIKV, se ha diseminado ampliamente a través de América (Braack *et al.*, 2018).

ZIKV captó la atención global debido a su rápida diseminación desde la primer detección en Brasil en Mayo del 2015 hacia otros 22 países y territorios de las Américas (Petersen *et al.*, 2016). ZIKV es clasificado en 2 linajes: cepas africana y asiática (Kikuti *et al.*, 2018), pero comparten más del 95% de identidad de aminoácidos con un único serotipo a diferencia de otros virus altamente relacionados como el DENV compuesto de 4 serotipos (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016).

2.4.2 Diagnóstico

Los síntomas clínicos incluyen fiebre, exantema maculopapular, conjuntivitis no purulenta y trombocitopenia moderada que puede estar asociada a hemorragia. La infección por ZIKV se ha asociado a un incremento de 20 veces en casos de microcefalia, el virus se ha identificado en líquido amniótico de embarazadas cuyos fetos presentaron microcefalia. También se ha aislado en diversos fluidos corporales incluyendo el líquido seminal, por lo que se ha sido descrito además como una enfermedad de transmisión sexual. ZIKV se ha asociado con síndromes inmunológicos graves, tales como el síndrome de Guillain-Barré (Fauci *et al.*, 2016).

La detección de RNA de ZIKV en suero está limitada a los primeros 5 días de la enfermedad. La orina puede ser la muestra de elección para aumentar la ventana de detección: la positividad de

PCR es posible debido a una ventana más larga, y la carga viral aumentada facilita la tipificación del virus. Es posible detectar IgM hasta por 2 a 12 semanas. En pacientes con síntomas, el suero debe ser recolectado 4 días después del inicio de la enfermedad. Los tests tanto de IgG como de IgM presentan reactividad cruzada con DENV y otros flavivirus. Existen protocolos para la diferenciación de la causa primaria de la infección, la prueba de neutralización por reducción de placa puede clarificar los resultados ante una situación de reactividad cruzada; sin embargo, es laboriosa y cara (Paixao *et al.*, 2017).

2.4.3 Características y fisiopatología

Cuenta con un genoma similar a la de otros flavivirus como DENV, conformado por diez proteínas, entre estructurales (D, E y M) y no estructurales, que se procesan desde un polipéptido hasta las proteínas maduras (Fig. 7). Contiene un mRNA de 11kb, con múltiples copias de las proteínas de la cápside, las cuales rodean su estructura icosaédrica. Consta de cerca de 500 aminoácidos en la envoltura (E) y aproximadamente 75 aminoácidos en la membrana (M). Contiene cerca de 165 aminoácidos formando prM (forma prematura). Todas ellas ancladas en la membrana lipídica. El genoma también codifica para siete proteínas no estructurales (NS); involucradas en la replicación, ensamble y antagonización de la respuesta innata del huésped a la infección (Slon-Campos *et al.*, 2018).

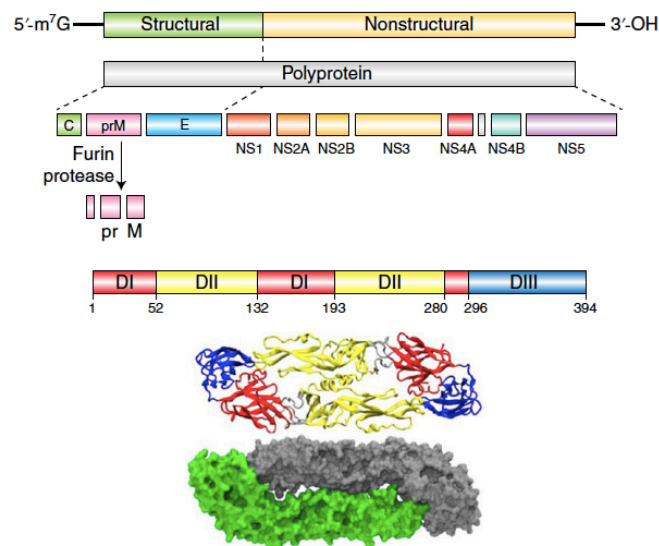


Figura 7. Representación esquemática de la organización del genoma de los flavivirus y procesamiento de polipéptido a proteínas virales maduras. Modificado de Slon-Campos *et al.*, 2018

ZIKV es capaz de infectar una gran cantidad de tejidos y órganos, incluyendo la piel (fibroblastos, queratinocitos epidérmicos, células dendríticas inmaduras) y el ojo (células ganglionares, neuronas bipolares, nervio óptico, córnea y humor acuoso) (Miner *et al.*, 2017; Hamel *et al.*, 2015). La infección de semen, esperma y testículos (células de Leydig, células de Sertoli, espermatogonias) son los principales posibles responsables de la transmisión sexual (Barzon *et al.*, 2016). No se ha determinado si el GBS en ZIKV ocurre como consecuencia de la infección viral o de mecanismos autoinmunes de reactividad cruzada que tengan como blanco neuronas o células gliales (Parra *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). También se desconocen los mecanismos asociados con la invasión cerebral. AXL, un co-receptor de ZIKV expresado en células progenitoras corticales podría explicar dicho tropismo (Nowakowski *et al.*, 2016). Finalmente, ya que ZIKV también es capaz de infectar células nerviosas progenitoras adultas, efectos a largo plazo en la plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria se pueden esperar.

2.4.4 Tratamiento y prevención.

No hay tratamiento médico específico disponible. De acuerdo a la OMS, existen al menos 45 candidatos de vacunas para ZIKV que han estado en fase preclínica. Cinco de estos candidatos, han entrado a ensayos clínicos de Fase I. Debido a que el síndrome por Zika se puede desarrollar por infección en cualquier punto del embarazo, se desconoce si la magnitud de la viremia está asociada con la misma. Podría no ser suficiente por lo tanto que las vacunas contra ZIKV confieran protección ante la enfermedad sintomática, sino también, necesiten ser capaces de prevenir el síndrome congénito por Zika (Durbin & Wilder-Smith, 2017).

El manejo actual es principalmente de soporte. El dolor articular y la mialgia requiere analgésicos y medicamentos no esteroideos. El manejo del GBS requiere monitoreo de la función respiratoria con apoyo ventilatorio cuando se requiera, también las Ig intravenosas o plasma pueden ser útiles (van den Berg *et al.*, 2014). Por otro lado, daptomicina, mefloquina y azitromicina inhibien la replicación *in vitro* de ZIKV (Barrows *et al.*, 2016). La asociación entre ZIKV y GBS genera preocupación que esta manifestación resulte de causa autoinmunitaria, ya que cualquier vacuna de ZIKV podría enmascarar un riesgo similar.

2.5 Detección por métodos serológicos y uso de proteínas recombinantes

El método más ampliamente utilizado para el diagnóstico serológico de las infecciones por los tres arbovirus es el ELISA (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay) indirecto. Entre las ventajas que otorga respecto a otros métodos destacan el ser rápido, sencillo de realizar, menos costoso, fácil de estandarizar y con posibilidad de automatización, pero con algunas limitantes. Sin embargo, otros métodos son más específicos y la detección por ELISA también es dependiente del antígeno a utilizar (Rocha *et al.*, 2013).

El diagnóstico por laboratorio depende del aislamiento de RNA específico de virus o de antígenos, también de la identificación de anticuerpos específicos. La mayoría de los métodos serológicos para la detección de infección por arbovirus usan virus completos como antígeno, lo cual resulta en falsos positivos dada la reactividad cruzada con otros flavivirus. El uso de preparaciones de virus completo implica riesgo biológico (Priya *et al.*, 2014). El uso de proteínas recombinantes evita los problemas asociados con las preparaciones que emplean antígenos de virus completo (Rocha *et al.*, 2013).

Respecto a la reactividad cruzada se han desarrollado y propuesto una serie de proteínas recombinantes cuyo uso dé como resultado un ensayo serológico específico. Muchas de las proteínas empleadas para desarrollar ensayos serológicos también se han aprovechado para generar vacunas basadas en virus como plataforma que exprese dichas proteínas.

Entre los ejemplos de este tipo de abordaje se encuentra el de NS1, proteína no estructural en ZIKV y DENV, entre otros flavivirus, que se ha empleado como base en métodos serológicos para evitar reactividad cruzada entre ambos virus. En el caso de ZIKV se han empleado adenovirus como plataforma para producir vacunas expresando la proteína de cubierta (E) y la proteína de membrana (prM) en una forma secretoria con una delección en su zona de anclaje a la membrana (López-Camacho *et al.*, 2018).

En el caso de los 3 arbovirus se ha empleado a la proteína E como blanco para el desarrollo de vacunas de subunidad y ensayos diagnósticos de IgG e IgM, particularmente para CHIKV se ha empleado a la proteína E2. Las proteínas de cubierta (E) son sumamente importantes como blanco ya que la respuesta por anticuerpos se forma en su mayoría contra éstas. El desarrollar métodos

diagnósticos robustos contra estas no solo ayuda a obtener un mejor diagnóstico, sino también en la validación de muchos candidatos de vacunas que se encuentran en fases de pruebas clínicas (Verma *et al.*, 2016).

2.6 Estado serológico de individuos

De acuerdo la Organización Mundial de la Salud la seroprevalencia define a la proporción de personas en una población que han sido infectadas con un virus, es decir la proporción de individuos seropositivos (WHO, 2014). La seroconversión va del periodo de infección a la presencia de anticuerpos contra el virus, presentes en la sangre.

Se han realizado pocos estudios de seroprevalencia en México de población sana. También es importante señalar que, en el caso de algunos arbovirus, la transmisión puede ser horizontal; por transfusiones o contacto con sangre y otros fluidos. El personal de salud puede estar expuesto a la transmisión por arbovirus mediante el ciclo humano-mosquito-humano, pero también mediante transmisión horizontal; además hay transmisión vertical en la población general, particularmente para ZIKV.

2.7 Respuesta inmune contra arbovirus.

2.7.1 Respuesta inmune humoral contra flavivirus.

El desarrollo de anticuerpos neutralizantes (nAbs) es considerado crucial para la respuesta inmune a infecciones virales. En el caso de los flavivirus, las proteínas E, prM y NS1 son los principales blancos de la respuesta por anticuerpos. La neutralización de flavivirus mediada por anticuerpos sigue un modelo que depende del número de moléculas de anticuerpo que se une al virión. Este umbral depende de la afinidad de los anticuerpos y la accesibilidad a epítomos (Slon-Campos *et al.*, 2018). La afinidad está fuertemente influenciada por la heterogeneidad estructural y explica porqué los anticuerpos altamente neutralizantes usualmente se dirigen a epítomos altamente accesibles, mientras que los anticuerpos pobremente neutralizantes tienden a dirigirse a epítomos crípticos y de poco acceso. Debido a que las superficies expuestas tienen mayor grado de variación entre flavivirus, la mayoría de los anticuerpos monoclonales (mAbs) fuertemente neutralizantes son específicos de tipo, mientras que los anticuerpos que promueven la ADE tienden a tener epítomos con alta reactividad cruzada (Rey *et al.*, 2018).

La hipótesis de amplificación mediada por anticuerpos fue propuesta para explicar el incremento de la patogenicidad de las infecciones por DENV y las infecciones primarias en infantes nacidos de madres inmunes a dengue (Halstead *et al.*, 1973; Halstead *et al.*, 1977). Las partículas virales opsonizadas pueden ser internalizadas en células mieloides por endocitosis mediada por receptor Fc γ , llevando así a una replicación viral mayor y cargas virales pico. La ADE ha sido ya demostrada tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* y casi cualquier anticuerpo presente en concentraciones subneutralizantes tiene potencial para inducir ADE (Pierson *et al.*, 2007).

La demostración del riesgo incrementado de DHF/DSS durante el primer año de vida explica porqué los infantes infectados nacidos de madres inmunes a DENV correlaciona con la declinación de anticuerpos adquiridos de la madre, siendo una de las evidencias más convincentes para la patogénesis mediada por ADE (Kliks *et al.*, 1988). Finalmente, el incremento de hospitalización por dengue sintomático secundario a la vacunación (con Dengvaxia), comparado con vacunas control (Hadinegoro *et al.*, 2015), se cree es resultado de la vacuna que sensibiliza, pero no protege a individuos sin infección previa promoviendo ADE después de una infección natural (Halstead *et al.*, 2016). Estudios sugieren que los anticuerpos que se dirigen a prM y FLE, que son pobremente neutralizantes, son el componente primario en suero responsable de la ADE *in vivo* e *in vitro* (de Alwis *et al.*, 2014).

La infección con cualquier tipo de DENV resulta en inmunidad homotípica a largo plazo con un corto periodo de inmunidad heterotípica (Sabin *et al.*, 1952; Montoya *et al.*, 2013). Solo una pequeña fracción de anticuerpos circulantes en individuos inmunes monotípicamente neutralizan DENV homólogo. Durante meses subsecuentes los anticuerpos se vuelven más específicos a un serotipo de DENV que cause la infección. Estos cambios se han observado *in vivo* y correlacionan con las observaciones *in vivo*. Los humanos inmunes monotípicamente demuestra un periodo inicial corto de protección cruzada contra DENV heterotípico (aproximadamente por dos meses) y un periodo más largo de protección contra la enfermedad severa (aproximadamente 2 años) causada por infecciones heterotípicas de DENV (Wahala *et al.*, 2011). Los anticuerpos neutralizantes circulan de por vida y se piensa que explican la protección a largo plazo contra re-infecciones homotípicas de DENV (Halstead *et al.*, 1974; Guzman *et al.*, 2000).

2.7.2 Respuesta inmune celular contra flavivirus.

La relativa contribución de los linfocitos T a la protección contra dengue aún no es bien entendida, aunque hay evidencia creciente que los componentes, tanto celular como humoral, son requeridos para prevenir la infección, manifestar la enfermedad leve y la enfermedad severa (Yauche *et al.*, 2009; Zompi *et al.*, 2012; Weiskopf *et al.*, 2013). Se han mapeado diferentes epítomos de células T para la mayor parte del proteoma de DENV, tanto en pacientes infectados como en voluntarios vacunados con la vacuna tetravalente viva atenuada. Aunque las células T CD8⁺ tienen como blanco preferencial NS3, NS5 y NS4b, las células T CD4⁺ tienen como blanco preferencial NS1 (Duangchinda *et al.*, 2010; Rivino *et al.*, 2013). En humanos, de manera similar a modelos animales, la filtración excesiva de células T puede llevar a la inmunopatogénesis; de hecho, el daño citotóxico mediado por ambos, células T CD4⁺ y CD8⁺ ha sido descrito en pacientes infectados con YFV y la magnitud de la respuesta de células T está correlacionada con la severidad de la infección por DENV (Mongkolsapaya *et al.*, 2003).

En infecciones subsecuentes de virus con secuencia relacionada, la respuesta secundaria que involucra tantos anticuerpos como células T, puede ser dominada por la llamada de células de memoria generadas durante la respuesta primaria. Debido a que virus infectantes primarios y secundarios pueden diferir substancialmente, la llamada de memoria puede llevar a la movilización de clones de poca afinidad, lo cual puede comprometer la infección secundaria, un proceso llamado “pecado original antigénico” (Webster *et al.*, 1966). Se ha observado que respuestas de células T contra la infección de ZIKV se han movilizado más rápidamente en presencia de inmunidad preexistente contra DENV que en presencia de infección por ZIKV en pacientes sin infección previa DENV. Esta poco claro si estas respuestas de reactividad cruzada son protectoras o a través de un proceso de pecado original antigénico, exacerben la infección por ZIKV (Grifoni *et al.*, 2017).

La necesidad de generar respuestas neutralizantes duraderas y balanceadas contra los cuatro serotipos de DENV para evitar el riesgo de ADE es imperante. Esto se complica aún más por la falta de modelos animales inmunocompetentes para la infección de DENV, la patogénesis y la falta actual de correlatos humanos de protección robustos (Kirkpatrick *et al.*, 2016).

2.7.3 Respuesta inmune humoral contra alfavirus (chikungunya).

En humanos, la IgG anti-CHIKV es detectada durante el periodo de convalecencia temprana, con predominancia del isotipo IgG3. Tanto en humanos como en ratones, la respuesta inmune mediada por anticuerpos anti-CHIKV parece estar dirigida principalmente contra la glicoproteína de envoltura E2. La aparición temprana de estos anticuerpos correlaciona con protección contra complicaciones crónicas de CHIKV (Kam *et al.*, 2012). Aunque las proteínas no estructurales están asociadas con el proceso de replicación viral, estas no están empacadas en los viriones finales. Por lo tanto, las proteínas estructurales (principalmente las proteínas de superficie E2 y E1) son blancos clave en inducir la inmunidad humoral y la mayoría de los anticuerpos en las vacunas contra CHIKV (Powers *et al.*, 2018).

Ambas, tanto la respuesta inmune mediada por anticuerpos en humanos como en ratones, se dirigen primordialmente contra la proteína E2 de CHIKV. Además, se ha estimado que la mayoría de los anticuerpos (70-80%) se dirigen contra un único epítipo lineal (E2EP3) en el extremo N-terminal de la proteína E2 (Kam *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2015). En muestras de plasma de pacientes convalescientes, los anticuerpos anti-E2 mostraron ser más persistentes por hasta 21 meses, a diferencia de anti-E3, anti-cápside y antinsP3 que estuvieron solo presentes en el curso temprano de la enfermedad (Kam *et al.*, 2012). De acuerdo al mapeo de epítopos, los anticuerpos monoclonales producidos solo contra los epítopos en la superficie externa (y que no encaran el interior de la estructura trímica E2/1) fueron neutralizantes (Fong *et al.*, 2014).

2.7.4 Respuesta inmune celular contra alfavirus (chikungunya).

Los monocitos y macrófagos derivados de monocitos parecen tener un papel central en la patología articular asociada a CHIKV. El límite interno de las articulaciones sinoviales está formado por células sinoviales similares a macrófago y sinoviocitos similares a fibroblasto, estos últimos son conocidos por ser importantes para la patogénesis de la artritis reumatoide (Bartok & Firestein., 2010). Cultivos *in vitro* de sinoviocitos son susceptibles a la infección por CHIKV, lo cual resulta en la secreción de IL-6, IL-8, CCL2/MCP y RANKL por parte de las células infectadas. Los sobrenadantes de estos sinoviocitos infectados con CHIKV inducen la migración de monocitos así como la diferenciación de monocitos/macrófagos a células similares a osteoclastos que producen altos niveles de mediadores de la artritis, como IL-6 y TNF- α (Phulkia *et al.*, 2013). En la fase crónica los macrófagos actúan como reservorios celulares de CHIKV y reguladores del balance

local entre linfocitos en tejidos dañados que se han infiltrado con otras células proinflamatorias mononucleares. Dichos infiltrados se han observado en músculos de ratones infectados por CHIKV (Tanabe *et al.*, 2018).

2.8 Limitantes en los estudios seroepidemiológicos

Los estudios seroepidemiológicos presentan limitantes metodológicas como la disponibilidad de recursos humanos y tecnológicos en los lugares en los que se pretenden realizar. También es importante destacar que los servicios de salud y los profesionales clínicos están capacitados para la detección de casos en agudo, durante los brotes. Por último, está también el problema de la reactividad cruzada entre los diversos virus y la imperante necesidad de métodos diagnósticos más fiables (Fritzell *et al.*, 2018).

A pesar de lo anterior, la importancia de los estudios seroepidemiológicos radica en la posibilidad de medir los niveles de inmunidad de la población sin depender de la corta ventana de detección que presentan los individuos con sintomatología en fase aguda (Fritzell *et al.*, 2018).

2.9 Antecedentes de los estudios de seroprevalencia.

2.9.1 Antecedente de los estudios de seroprevalencia en la población mundial.

La seroprevalencia de las arbovirosis se ha estudiado en menor proporción que la incidencia a nivel mundial, debido en gran parte a los retos logísticos que estos estudios implican. Se han empleado diversas estrategias para la obtención de la población objetivo, realizándose estudios en mujeres embarazadas, donadores de sangre, niños, grupos de edad y población general. También se han orientado a la obtención de suero en un área estratégica de reclutamiento como hospitales, centros de donación de sangre, domicilio u otros centros de reclutamiento específicos. Otra diferencia importante han sido las técnicas empleadas para la determinación de seropositividad. Entre las técnicas empleadas destacan el ELISA indirecto (IgG e IgM), ensayos de neutralización por reducción de placas (PRNT, *Plaque Reduction Neutralization Test*) y RT-PCR; siendo el ELISA indirecto de IgG el más predominante en los estudios de seroprevalencia, ya sea solo o en combinación con alguna otra técnica (Fritzell *et al.*, 2018).

En una revisión de la bibliografía de todos los estudios de seroprevalencia CHIKV, DENV y ZIKV publicados de 2010-2018 en inglés y en francés, los tests más reportados fueron ELISA de IgG,

con más de la mitad de los estudios empleando el método indirecto (77% de los estudios), seguido por ELISA de IgM (37.3%) y pruebas de neutralización (PRNT, *Plaque Reduction Neutralization Test* y tests de microneutralización) (25.4%). La mayoría de los tests fueron combinados con otros métodos a excepción de ELISA IgG, el cual fue realizado de manera aislada en un tercio de los casos. Los resultados mostraron que los ensayos de neutralización de virus aún son ampliamente usados, a pesar de su naturaleza tediosa, ya que pueden diferenciar exposición a dengue monotípica de la de múltiples tipos y son considerados el estándar de oro en cuanto a pruebas serológicas de anticuerpos dada su especificidad. Aproximadamente, el 9% de los estudios abordaron las infecciones singulares y múltiples de DENV empleando ensayos de neutralización y uno llevó a cabo PRNT y ELISA de NS1 específico de serotipo de IgG (Fritzell *et al.*, 2018).

Más de la mitad de los estudios que emplearon ELISA de IgG usaron método indirecto, lo cual es recomendado, ya que permite la detección de menores niveles de anticuerpos que el método directo y por lo tanto son más sensibles. La mayoría de los tests comerciales de ELISA IgG tienden a tener alta sensibilidad, pero sufren de baja especificidad debido a la reactividad cruzada con otros arbovirus circulando en un área geográfica específica. Solo los tests de neutralización miden parámetros biológicos de neutralización *in vitro* de los virus y son los tests serológicos más específicos para virus (Fritzell *et al.*, 2018).

2.9.2 Antecedentes de los estudios de seroprevalencia en población mexicana.

La literatura respecto a estudios seroepidemiológicos en nuestro país sobre arbovirosis también es escasa y reporta una prevalencia variable entre diversas regiones. En el mismo se ha estudiado la dinámica de las enfermedades para arbovirus principalmente en su incidencia durante los brotes. Un estudio realizado en estudiantes universitarios durante los meses de septiembre a noviembre del 2005, arrojó una prevalencia de 9.1% empleando ELISA indirecto de IgG contra DENV; siendo probablemente el primer estudio de seroprevalencia en México en individuos aparentemente sanos (Sánchez-Burgos *et al.*, 2008).

También se cuenta con estudios de seroprevalencia en población general del estado de Yucatán en 2014 con una seroprevalencia de 73.6% y en población infantil entre 2015-2016, con seroprevalencia de 46.8% para anticuerpos contra DENV en dicha población (Pavía-Ruz *et al.*,

2018). Por su parte, Sanofi Pasteur realizó diversos estudios de seropositividad en países de América Latina y Asia, encontrando una prevalencia de 10.5% para anticuerpos contra DENV en un área no endémica de la Ciudad de México (n=126) (L'Azou *et al.*, 2018). También se cuenta con un estudio de seroprevalencia de anticuerpos contra DENV en 22 estados de la república con una seropositividad global del 33.5%, en donde se clasificó a Michoacán dentro del grupo de estados con baja seropositividad, con un promedio en dicho grupo de un 13.3% (Amaya-Larios *et al.*, 2018); sin embargo, no se cuenta aún con un estudio independiente en dicho estado. Por lo que respecta a CHIKV solo se cuenta con un estudio en el estado de Morelos, en donde la seropositividad global registrada para anticuerpos contra dicho virus es de un 29.5% en la población general. En el caso de ZIKV solo se cuenta con registros de los casos reportados por la OMS y una estimación con base a dichos datos de noviembre del 2015 hasta agosto del 2016 (Cortés-Escamilla *et al.*, 2018).

3. Justificación

Las infecciones por arbovirus emergentes, chikungunya (CHIKV), dengue (DENV) y Zika (ZIKV) son un grave problema de salud pública. Se estima que dicha problemática no encuentre una solución notoria, especialmente en áreas endémicas o de brote sin un método efectivo para su control, tal como el desarrollo de alguna vacuna.

Para el desarrollo de vacunas y otros medios de prevención es importante contar con datos sobre la prevalencia y distribución, factores de riesgo y seroconversión en la población, principalmente para el diseño y evaluación de la efectividad de los mismos

Los sistemas de vigilancia epidemiológica y los estudios de incidencia han servido principalmente para evaluar la dinámica de estos virus. Sin embargo, pocos son los estudios seroepidemiológicos que evalúen la prevalencia en sujetos aparentemente sanos y la seroconversión en una muestra de la población general. Esta propuesta se enfoca hacia la obtención de estos datos respecto a los arbovirus con mayor distribución en nuestra región.

4. Hipótesis

En la población michoacana existe una prevalencia de sujetos positivos para anticuerpos contra arbovirus CHIKV, DENV y ZIKV mayor a la reportada por los sistemas de vigilancia epidemiológica y a su incidencia, dentro de los mismos periodos del estudio.

5. Objetivos

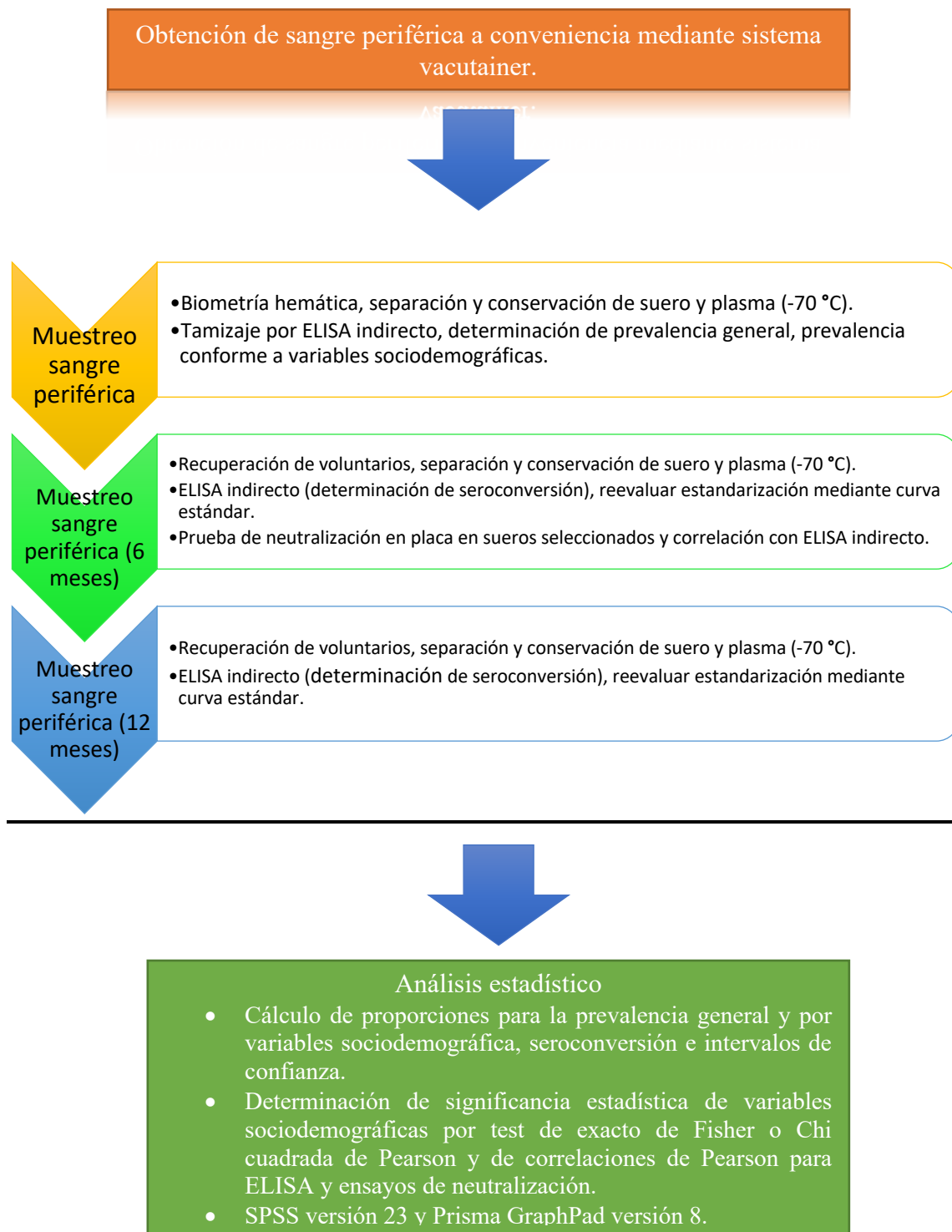
5.1 Objetivo General:

Determinar la seroprevalencia y perfil de anticuerpos en población aparentemente sana del estado de Michoacán, frente a virus CHIKV, DENV y ZIKV en el periodo de un año.

5.2 Objetivos Específicos:

- Estandarizar un ensayo de ELISA indirecto, empleando proteínas recombinantes de los tres arbovirus de interés y analizar su correlación con otro ensayo serológico estándar como es la neutralización por reducción en placa (PRNT).
- Determinar la seroprevalencia de anticuerpos dirigidos contra proteínas estructurales y no estructurales de arbovirus CHIKV, DENV, y ZIKV.
- Correlacionar los datos de seroprevalencia obtenidos con variables sociodemográficas en la población estudiada.
- Determinar la seroconversión de individuos en nuestra muestra poblacional, a los 6 y 12 meses del inicio del estudio.

6. Estrategia experimental



7. Metodología

7.1 Tipo de Estudio:

Prospectivo, longitudinal, exploratorio y observacional.

7.2 Consideraciones éticas:

Este trabajo se basa en el código de Helsinki, en su versión 2013; así como en la NOM-004-SSA3-2012 del expediente clínico en cuanto a los datos del paciente en un cuestionario (Anexo 1) y la obtención de un consentimiento informado (Anexo 2). Al mismo tiempo, con base en la NOM-166-SSA1-1997 referente al funcionamiento correcto del laboratorio clínico se toman las consideraciones para la extracción de la muestra de sangre periférica. La misma se considera un procedimiento de riesgo mínimo para el paciente.

Todo lo anterior previa aprobación del protocolo, incluyendo a los comités de ética del Hospital General “Dr. Miguel Silva” y la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” (Anexos 3 y 4, respectivamente).

El cuestionario (Anexo 1) incluye consideraciones en cuanto a: enfermedades infecto-contagiosas; enfermedades crónicas concomitantes como hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, obesidad (IMC), valoración antropométrica; toma de signos vitales, tales como tensión arterial sistólica y diastólica y temperatura, para valorar estado de salud. Las mismas se anexan a un expediente confidencial de los participantes en el estudio, junto con la carta de consentimiento informado y los resultados de la biometría hemática.

Se anexan cuestionarios (Anexo 1), resultados de biometría hemática y de ELISA indirecto conforme se realizan, en una base de datos confidencial en Excel y SPSS en su versión 23.

7.3 Criterios de selección de participantes

7.3.1 Criterios de inclusión

- Edad igual o mayor a 18 años.
- Individuos aparentemente sanos dedicados al área de la salud interesados en participar, en contacto con pacientes en el Hospital General “Dr. Miguel Silva”.
- Individuos aparentemente sanos que cursen estudios de licenciatura en la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”.
- Individuos sanos residentes de la ciudad de Morelia que deseen participar en el estudio.

7.3.2 Criterios de exclusión:

Edad menor a 18 años, enfermedad grave o crónica mal controlada.

7.3.3 Criterios de eliminación.

- Pacientes que decidan retirarse del estudio en cualquier momento.
- Muestras sanguíneas lipémicas o con hemólisis, así como aquellas no criopreservadas dentro de un tiempo menor a una hora posterior a la toma de muestra.

7.4 Manejo de la muestra de sangre periférica

7.4.1 Obtención y procesamiento de suero y plasma.

Según lineamientos de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, se obtuvieron muestras de sangre venosa mediante venopunción periférica con sistema vacutainer en 2 tubos sin anticoagulante rojos sin gel separador o amarillos con gel separador para un volumen de 5 ml cada uno, 1 tubo (citrato de sodio 3.2%) con 2.7 mL y 1 tubo (EDTA K2) con 3 mL. En total se obtuvieron 4 tubos.

Una vez tomadas las muestras, se transportaron y/o almacenaron los tubos con suero y el tubo con plasma en refrigeración (2 a 8°C). Se permite la retracción del coágulo en el caso de los tubos sin anticoagulante. Después de transportarse al laboratorio de Hemostasia y Biología Vascular, en la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, se centrifugaron a 3 500 g por 15 minutos para separación de suero y plasma.

Se conservaron las muestras a -70 °C hasta realización de ELISA indirecto, distribuidas por alícuotas en microtubos de 1.5mL, procurando obtener 8-10 alícuotas de 200-400 µl para suero y

de 4-5 alícuotas de 200-400 μ l para plasma de cada voluntario. Se almacenaron las alícuotas rotuladas con los siguientes datos: iniciales, siglas del nombre y apellidos del voluntario, número de identificación del voluntario y fecha de procesamiento. Se etiquetaron según tipo de muestra y color de tubo del cual fue obtenida.

7.4.2 Procesamiento de biometría hemática

Ésta se procesó en la clínica universitaria de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” o en el Hospital General “Dr. Miguel Silva”, según el sitio de muestreo, entregándose al personal de laboratorio posteriormente a la obtención de la muestra.

7.5 Tamaño de la muestra poblacional

En este estudio se trabajó con una muestra a conveniencia de voluntarios reclutados en un periodo de tiempo de 3 meses (septiembre a noviembre del 2018). Lo anterior conforme a la disponibilidad de voluntarios en las instituciones en las que se realiza el muestreo.

7.6 Obtención de datos sociodemográficos principales y antecedentes.

Del cuestionario aplicado de acuerdo al Anexo 1 se obtienen diversos datos de la población, mismos que fueron empleados para generar subgrupos y establecer la significancia estadística al compararse los mismos (véase sección 8.3). Se destacaron las principales variables estudiadas en la literatura (edad y sexo) y otras de interés para este trabajo (procedencia, viaje a zona endémica, personal de salud y diagnóstico previo de arbovirosis). Se consideraron como área endémica aquellos municipios con reportes de alto número de casos durante el año previo y de inicio de este estudio de acuerdo a los reportes previos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE, 2019).

7.7 Protocolo general para realización de ELISA indirecto

Se utilizaron como antígenos las proteínas recombinantes estructurales y no estructurales de CHIKV (E2), DENV (NS1 β -ladder) y ZIKV (NS1 β -ladder) en placas de poliestireno con 96 pocillos conforme a cada proteína con la inmunoglobulina de interés: IgG-CHIKV E2, IgG-DENV NS1 β -ladder, IgG-ZIKV NS1 β -ladder, IgM-CHIKV E2, IgM-DENV NS1 β -ladder y ZIKV NS1 β -ladder.

Se realizó un tamizaje con cada variedad de placa, empleándose suero de cada voluntario a una dilución de 1:200, así como también PBS para introducir blancos por duplicado al inicio de cada placa. La densidad óptica (D.O.) de dicho blanco se restó de los valores obtenidos en cada pocillo correspondiente a una muestra. Al no contarse con un *pool* de sueros positivos para las arbovirosis a analizar durante el primer muestreo, se utilizaron cuatro muestras de suero obtenidas previamente en un estudio anterior sobre incidencia en el área endémica de Lázaro Cárdenas, Michoacán, como controles positivos. Estos contaron con diagnóstico previo por ELISA y PCR para IgG e IgM de DENV y ZIKV y para los tres virus, respectivamente.

7.8 Realización y estandarización de ELISA indirecto.

Adaptando un protocolo previamente reportado (Kim *et al.* 2019), se emplearon pipetas multi-canal para sensibilizar placas de 96 pocillos (Maxisorp, NUNC) con 2µl/mL de antígeno para las placas de CHIKV y 3µl/mL de antígeno para las placas de DENV y ZIKV (proteínas recombinantes E2 de CHIKV, NS1 β-ladder de DENV y NS1 β-ladder de ZIKV, Oxford Jenner Institute), diluidos en PBS (Sigma D-8537), añadiendo 50 µl por pocillo (la concentración en la placa puede variar dependiendo del antígeno usado). Se incubaron dichas placas a temperatura ambiente por 16h. Después, se lavaron las placas 6 veces con PBS/0.05% Tween (PBS/T, Sigma P3563).

Se bloquearon placas con 300 µl Buffer de bloqueo Pierce (Thermo Scientific TM 37572, libre de proteína) por pocillo a temperatura ambiente por 2h. Se diluyó suero a 1:200 con PBS/T (995 µl + 5 µl de suero). Se incluyeron los controles negativos y positivos. Posteriormente, se descartó la solución de bloqueo y se realizaron 6 lavados con PBS/T. Se añadieron 50 µl de PBS/T con el suero de voluntarios 1:200 en los pocillos. Después se incubaron 1h a temperatura ambiente para luego lavar las placas x6 con PBS/T.

Se añadió un anticuerpo de detección comercial: anticuerpo anti-humano IgG conjugado con fosfatasa alcalina (A3187-5ML)/IgM (3275-5ML) producido en cabra, diluido 1/5000 en PBS/T (5mL por placa + 1, µl de anticuerpo). 50 µl por placa, incubándose por una hora. Durante este tiempo, se preparó el sustrato, pNPP (Sigma N-2765, tabletas de 20 mg): 10 mL por placa, una tableta de 20 mg pNPP en 20mL de buffer de dietanolamina (Pierce 34064). El buffer contaba con una concentración 5x, así que se diluyó a 1x con agua pura. Se dejó disolver a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavaron las placas x6 con PBS/T.

Se añadió sustrato pNPP, 10 µl por pocillo. Este sustrato se añadió al menos con un minuto de diferencia entre cada placa, de tal manera que todas las placas se revelaran en el mismo tiempo para ser leídas secuencialmente en el lector de ELISA. Se incubó en cámara oscura durante el periodo indicado hasta revelado a temperatura ambiente (tiempo dependiente de antígeno/usuario), para posteriormente realizar la lectura de las placas a 405 nm.

Lo anterior es descrito de acuerdo a lo realizado para el tamizaje del primer muestreo. Para segundo y tercer muestreo se contó con tres *pools* de suero positivos, uno por cada virus, provenientes de voluntarios residentes del estado de Veracruz, México. Estas muestras fueron donadas por el Dr. Héctor Vivanco Cid (Instituto de Investigaciones Médico Biológicas, Universidad Veracruzana), las cuales se clasificaron como positivas mediante otra variación del protocolo base de Kim y colaboradores (2019), como por PCR.

Los *pools* de cada virus se emplearon en placas correspondientes a cada proteína del virus estudiado y se determinó IgG para la construcción de una curva estándar, marcando como inicio una dilución 1:200, concentración calculada de 150µg de antígeno por pocillo, para proseguir con diluciones seriadas (1:200, 1: 400, 1:800, 1: 1 600, 1: 3 200, 1: 6 400, 1: 12 800, 1: 25 600, 1: 51 200). Los valores de la curva, de dos curvas por placa, se promediaron para los cálculos.

Tanto las muestras de voluntarios como las curvas, se leyeron a los 10, 15 y 30 minutos en las placas, con la subsecuente determinación de la R^2 para cada curva con el fin de determinar los tiempos adecuados y optimizar los resultados del ensayo para ser reportados conforme a densidad óptica (D.O.).

7.9 Determinación de puntos de corte para establecimiento de seropositividad y seroconversión en los individuos de la población estudiada.

Tras la lectura de las placas a 405 nm en lector MultiSkan™ FC (Thermo Scientific) se obtuvieron valores de densidad óptica (D.O.) para cada variedad de placa. Se utilizó para la determinación del punto de corte la estrategia convencional empleada en diversos ensayos serológicos calculando la media de la D.O. de los individuos sanos más tres desviaciones estándar (D.O. + 3 D.E.), que asume dos subpoblaciones, una de voluntarios seronegativos y otra de voluntarios seropositivos (Rogier *et al.*, 2015). Los resultados por encima de dicho punto de corte fueron considerados como seropositivos y su cálculo se repitió para cada virus, determinación y periodo de muestreo.

Se emplearon los mismos criterios para los sueros obtenidos en el segundo y tercer periodo muestreo. Con estos datos se determinó la tasa de seroconversión en la muestra poblacional estudiada.

7.10 Protocolo de PRNT (*Plaque Reduction Neutralization Test*).

Se realizaron ensayos de neutralización por reducción de placa (PRNT) para la correlación con nuestros resultados de D.O. de ELISA indirecto. Se emplearon sueros de 15 voluntarios seleccionados para el estudio con las siguientes características: 3 voluntarios sanos con resultado positivo por ELISA indirecto para DENV NS1, CHIKV E2, ZIKV NS1; 3 voluntarios sanos con resultado positivo exclusivamente para DENV NS1; 3 voluntarios sanos con resultado positivo exclusivamente para CHIKV E2; 3 voluntarios sanos con resultado positivo exclusivamente para ZIKV NS1; por último, 3 controles sanos seronegativos por ELISA para las tres proteínas recombinantes.

Se emplearon células Vero para la infección con virus de cepas de referencia DENV-1 (Hawaii), DENV-2 (16681), DENV-3 (H87), DENV-4 (H241), CHIKV (181/25), ZIKV (PRAVC59). Las células Vero se mantuvieron en incubación a 37°C con CO₂ al 5% y se emplearon en fase logarítmica a una confluencia del 90%. Los siguientes pasos se llevaron a cabo en una campana de bioseguridad (BSL-2). Después de posicionar el Flask en la campana, se bañaron con 15mL PBS 1x y se aspiró para añadir 3 mL de Tripsina al 0.25% (Gibco 15050). Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente por 1 minuto y después se añadieron 7 mL de medio para células Vero (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* + FBS 10%, inactivado a 56°C por 1h + Penicilina/Estreptomina 1%) (Gibco 11965-092; Atlanta Biologicals S11150; Gibco 15140-122). Se realizó el conteo de células con un hemocitómetro y se resuspendieron a una concentración final de 1.25×10^5 y se añadió 1mL a placas de 24 pocillos. Posteriormente, se recolocan en incubación hasta alcanzar una confluencia de 95-100% en aproximadamente 20 hrs.

Se preparó el *stock* de virus hasta una concentración de 800 pfu/mL para cada virus empleado en medio para el PRNT (DMEM + 2% de FBS inactivado a 56 °C por 1h). Se realizó una titulación de las placas conteniendo únicamente la dilución del virus en DMEM 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 en una placa de 96 pocillos (Costar 3958). Se tomó como punto de referencia la dilución 1:2 para

determinar la PRNT50, PRNT60 y PRNT80; donde la PRNT equivale a la máxima dilución en la que se reduce el número de placas en un 50, 60 y 80%, respectivamente, en las placas no-control. Simultáneamente, en las mismas placas de cada suero de voluntario, previamente inactivado a 56 °C por 1h, se realizaron diluciones seriadas 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 y 1:640 (virus + suero). Se extrajeron las placas de 24 pocillos con células Vero de la incubadora y se añadieron 100 µL de las diluciones mencionadas anteriormente a cada pocillo de células Vero. Las mismas se incubaron a 37°C por 72 hrs para las placas con CHIKV y ZIKV y 4 días para las placas con DENV 1-4 con una capa de 1mL de Metilcelulosa al 0.8% (Sigma-Aldrich MO512-100G).

Por último, se extrajeron las placas y se posicionaron en la campana para su lavado con PBSx1 para remover la capa de Metilcelulosa 0.8%. Se añadió una solución de Metanol:Acetona 1:1 para fijar y se incubaron a temperatura ambiente por 1h. Se descartó el Metanol:Acetona y se dejaron secar por hasta 2 horas. El revelado se realizó con violeta de cresilo para las placas con ZIKV y CHIKV y con rojo neutro para DENV 1-4. El conteo se realizó por observación directa a la luz. Se consideraron positivos todos aquellos sueros que tenían una PRNT80 en una dilución 1:20 o mayor. El título de neutralización se correlacionó con la D.O. obtenida mediante el ELISA indirecto realizado en este estudio, para establecer la concordancia entre ambos resultados y validar el empleo de nuestras proteínas recombinantes.

7.11 Análisis estadístico.

Se determinó la prevalencia general de individuos seropositivos mediante el cálculo de cada proporción por proteína viral e Ig estudiada, dichas proporciones también son reportadas en porcentajes. Esto se realizó también respecto a cada variable sociodemográfica y tasa de seroconversión en cada periodo de muestreo. Se determinó también la significancia estadística por test exacto de Fisher y Chi cuadrada de Pearson para cada variable sociodemográfica ($p < 0.05$).

En las curvas estándar se calculó la R^2 del promedio de las curvas en las distintas placas para su optimización y para las correlaciones entre los ensayos de neutralización por reducción de placa (PRNT) y nuestro ensayo de ELISA se utilizó una correlación de Pearson. Las bases de datos se construyeron en SPSS en su versión 23 y Excel, mientras que para el análisis de datos y la realización de gráficos se utilizaron SPSS versión 23 y Prisma GraphPad versión 8.

8. Resultados

8.1 Datos demográficos de la muestra en estudio

8.1.1 Datos totales.

En total, se analizaron 326 muestras de suero y plasma obtenidas entre octubre y diciembre del 2018 para el primer periodo de muestreo, procedentes de voluntarios de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, el Hospital General “Dr. Miguel Silva”, diversas instancias de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y de la población general. Para el segundo y tercer periodo de muestreo se recuperaron 253 y 176 muestras de suero, respectivamente. Dichas muestras se recuperaron entre los meses de abril y junio del 2019 para el segundo muestreo, mientras que para el tercer muestro se recuperaron entre Diciembre del 2019 y Marzo del 2020, limitándose la recaptación de voluntarios en este último debido a la pandemia mundial de SARS-CoV-2. A continuación, se exponen las cifras obtenidas de los grupos de variables socio-demográficas conforme a lo ya mencionado en la sección 7.6:

a. Procedencia.

De los 326 voluntarios, 122 proceden de algún municipio en área endémica con casos reportados de infecciones por uno o más de los arbovirus y 204 proceden de área no endémica. Destacan en el grupo de área endémica municipios como Apatzingán y Lázaro Cárdenas, mismos que son altamente representativos en los reportes epidemiológicos para el área de Tierra Caliente y de la costa en el estado de Michoacán, respectivamente.

Respecto a las zonas que no se consideran como área endémica, destaca Morelia como el municipio con más voluntarios, también se incluyen otros municipios que corresponden a la región oriente del estado de Michoacán. Dentro de éstos, varios destacan por tener un clima templado característico, tales como Maravatío, Ciudad Hidalgo y Zitácuaro.

b. Viaje reciente a área endémica.

El criterio aquí empleado corresponde a aquellos voluntarios que refirieron haber viajado a área endémica dentro de los últimos 6 meses (viaje a área endémica <6 meses), especificándose según el Anexo 1 como Tierra Caliente o costa. Se consideró en este criterio a aquellos individuos procedentes de estas zonas y que refirieron haber viajado a su lugar de origen en dicho periodo.

Por tanto, este grupo quedó comprendido por 177 personas procedentes de área endémica y 149 individuos no procedente de área endémica.

c. Antecedente de diagnóstico de enfermedad por arbovirus.

En este apartado se incluyen los individuos que refirieron haber recibido diagnóstico de una enfermedad por arbovirus; dengue, chikungunya o Zika, ya sea mediante datos clínicos o estudios de laboratorio (ELISA o PCR y no especificado) y por individuos que refirieron no haberlo recibido nunca. En el análisis de esta variable se obtuvieron 24 individuos que refirieron diagnóstico previo de enfermedad por chikungunya mediante cualquier método diagnóstico, contra 302 que refirieron nunca haber recibido dicho diagnóstico. Se obtuvieron también 30 con diagnóstico previo para dengue y 296 con este antecedente negado; mientras que para Zika se obtuvieron 5 y 321, respectivamente.

d. Sexo.

El sexo es una variable ampliamente estudiada en la literatura sobre seroprevalencia de arbovirosis. Se obtuvieron muestras de suero y plasma de 114 hombres y 212 mujeres, estas cifras estuvieron sujetas con base a la disponibilidad de los participantes, por lo que quedaron libres y a conveniencia.

e. Personal de salud.

Se obtuvieron 61 muestras de suero y plasma de personal del Hospital General “Dr. Miguel Silva”, la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” y otras dependencias de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, todos en contacto con pacientes o residuos biológicos probablemente infecciosos. El resto de las muestras (n = 265) son procedentes de estudiantes de diversas dependencias que no han estado en contacto constante con pacientes y de individuos de la población general.

f. Edad.

En el caso de los arbovirus, este rubro se encuentra bien descrito en infección por DENV. Este subgrupo consta de 4 intervalos de edad, menores de 24 años, de 24-35 años, de 36-45 años y

mayores de 45 años. De estas edades agrupadas la mayor fue la correspondiente a menores de 24 años debido a las características de las instancias donde se realizaron los muestreos.

8.2. Valores y puntos de corte para determinación de seropositividad mediante ELISA.

Se determinó la presencia de IgG e IgM en los sueros de los 326 voluntarios. En una primera instancia, respecto a los sueros utilizados como controles positivos como ya fue descrito (sección 7.7), utilizando nuestro criterio de punto de corte (media + 3 desviaciones estándar) se obtuvieron resultados para dichos controles similares a los ya reportados en los análisis previos realizados a estos por PCR y ELISA. Obtuvimos que para tres muestras control (C37, C44 y JRV), el diagnóstico coincide con el previamente reportado, mientras que para la restante (C-44) hay coincidencia en uno de los dos flavivirus previamente diagnosticados (Tabla 1).

Tabla 1. Controles con diagnóstico previo de arbovirosis por PCR y ELISA.

Controles								
Muestra	PCR	ELISA PREVIO *				PROTOCOLO ACTUAL**		
		IgM DENV NS1 Beta-ladder	IgM ZIKV NS1 Beta-ladder	IgG DENV NS1 Beta-ladder	IgG ZIKV NS1 Beta-ladder	IgG CHIKV E2	IgG DENV NS1 Beta-ladder	IgG ZIKV NS1 Beta-ladder
C-37	Dengue	<u>3.213</u>	<u>1.444</u>	<u>3.145</u>	<u>3.064</u>	0.184	<u>0.815</u>	<u>0.896</u>
C-38	Chikungunya /Zika	<u>2.498</u>	0.703	<u>1.953</u>	<u>0.922</u>	<u>1.288</u>	0.259	<u>0.555</u>
C-44	Dengue	0.529	0.312	<u>3.145</u>	<u>1.926</u>	<u>1.411</u>	0.216	<u>0.728</u>
JRV	Dengue/ Chikungunya	<u>1.051</u>	0.723	<u>3.158</u>	0.911	<u>1.433</u>	<u>0.671</u>	0.267

* Punto de corte para Zika de 0.953, punto de corte para DENV no especificado, valores obtenidos en análisis previo de incidencia, no publicados.

** Puntos de corte establecidos en el protocolo actual.

En cuanto al resto de los resultados obtenidos se elaboraron distribuciones representadas por diagramas de violín que reflejan la D.O. de todas las muestras de los voluntarios participantes en este estudio para el primer periodo de muestreo, tanto para IgG como para IgM (Figura 8). Se observan D.O. menores para el ensayo con IgM, así como una distribución de datos que difiere de una distribución normal. La mayoría de los valores se agrupan por debajo de la mediana y el percentil 75. El mismo procedimiento se realizó para IgG en los periodos segundo y tercero de muestreo, donde se aprecia una distribución similar, aunque acertada por el menor número de muestras recolectadas (Figura 9).

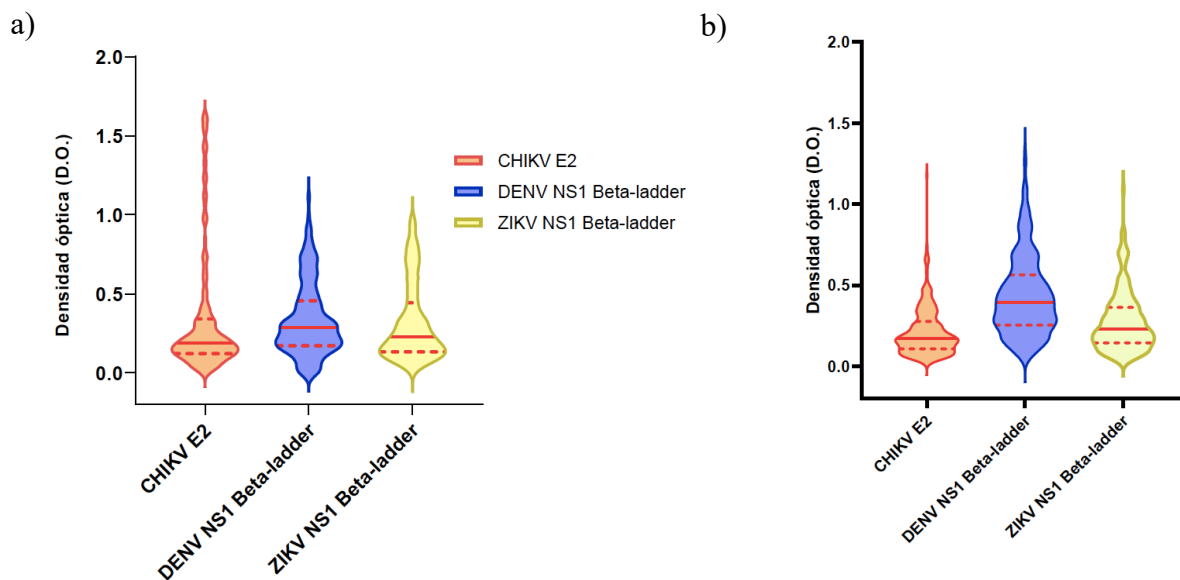


Figura 8. Distribución de los datos de D.O. en la determinación de IgG e IgM en los sueros de los voluntarios, durante el primer periodo de muestreo. La línea sólida y las líneas punteadas señalan la mediana y los percentiles 25 y 75, respectivamente. a) IgG. b) IgM. n = 326.

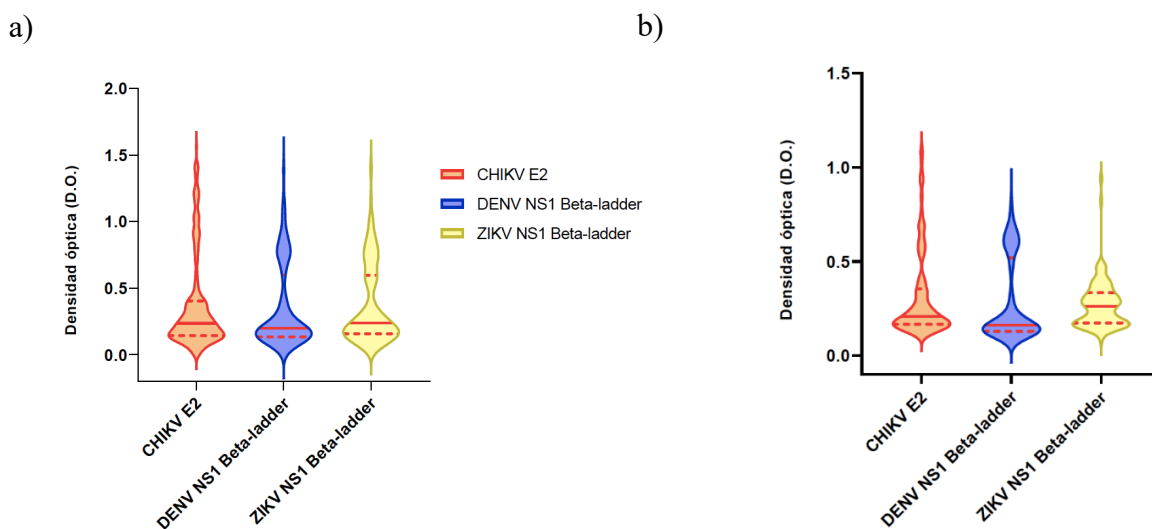


Figura 9. Distribución de los datos de D.O. en la determinación de IgG en los sueros de los voluntarios durante segundo y tercer periodo de muestreo. La línea sólida y las líneas punteadas señalan la mediana y los percentiles 25 y 75, respectivamente. a) IgG segundo muestreo, n = 253. B) IgG tercer muestreo, n = 176.

Del criterio para la determinación del punto de corte (media de sanos + 3 desviaciones estándar), se obtuvo dicho punto para cada proteína viral e Ig analizada. Las cifras de D.O. para cada muestra por encima del número obtenido son consideradas como positivas. Del mismo modo, se

establecieron puntos de corte y el número voluntarios seroconvertidos durante el segundo y tercer periodo de muestreo. Respecto al primer muestreo los puntos de corte fueron de 0.5048 para CHIKV e IgG, 0.4617 para DENV e IgG y de 0.5048 para ZIKV e IgG (Figura 10).

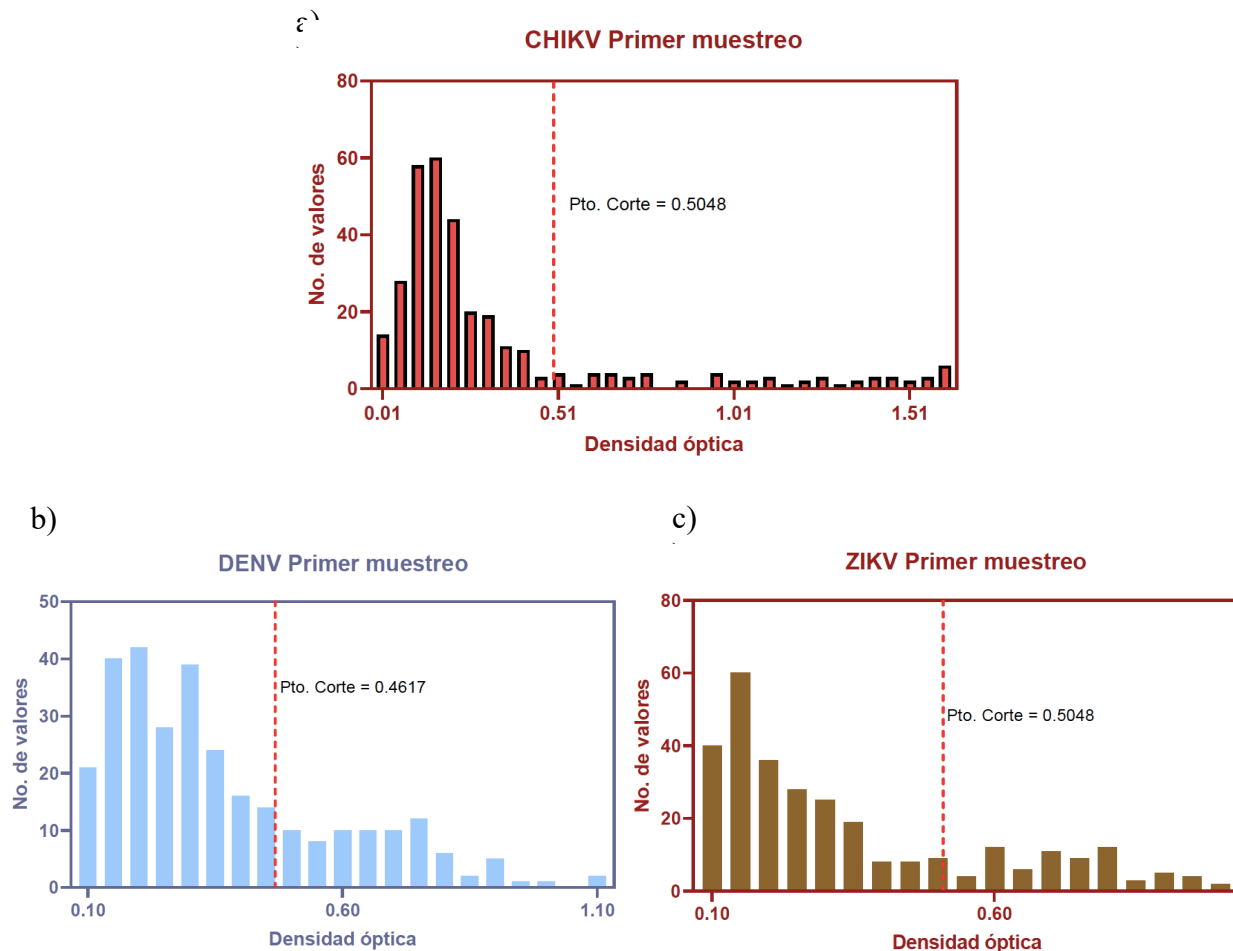


Figura 10. Punto de corte de IgG para cada arbovirus en primer periodo de muestreo (n = 326). Las líneas verticales en rojo indican el valor del punto de corte utilizado con base a la media de la D.O. + 3 desviaciones estándar. El eje x corresponde a la D.O. registrada y el eje y al número de valores o muestras con determinado intervalo de D.O.

Los puntos de corte para IgM, al igual que las distribuciones también fueron menores que para IgG, siendo de 0.3328, 0.7165 y 0.4544 para CHIKV, DENV y ZIKV respectivamente, mostrando un patrón similar para los casos de IgG, aunque con menores D.O. para los casos de CHIKV y ZIKV (figura 11).

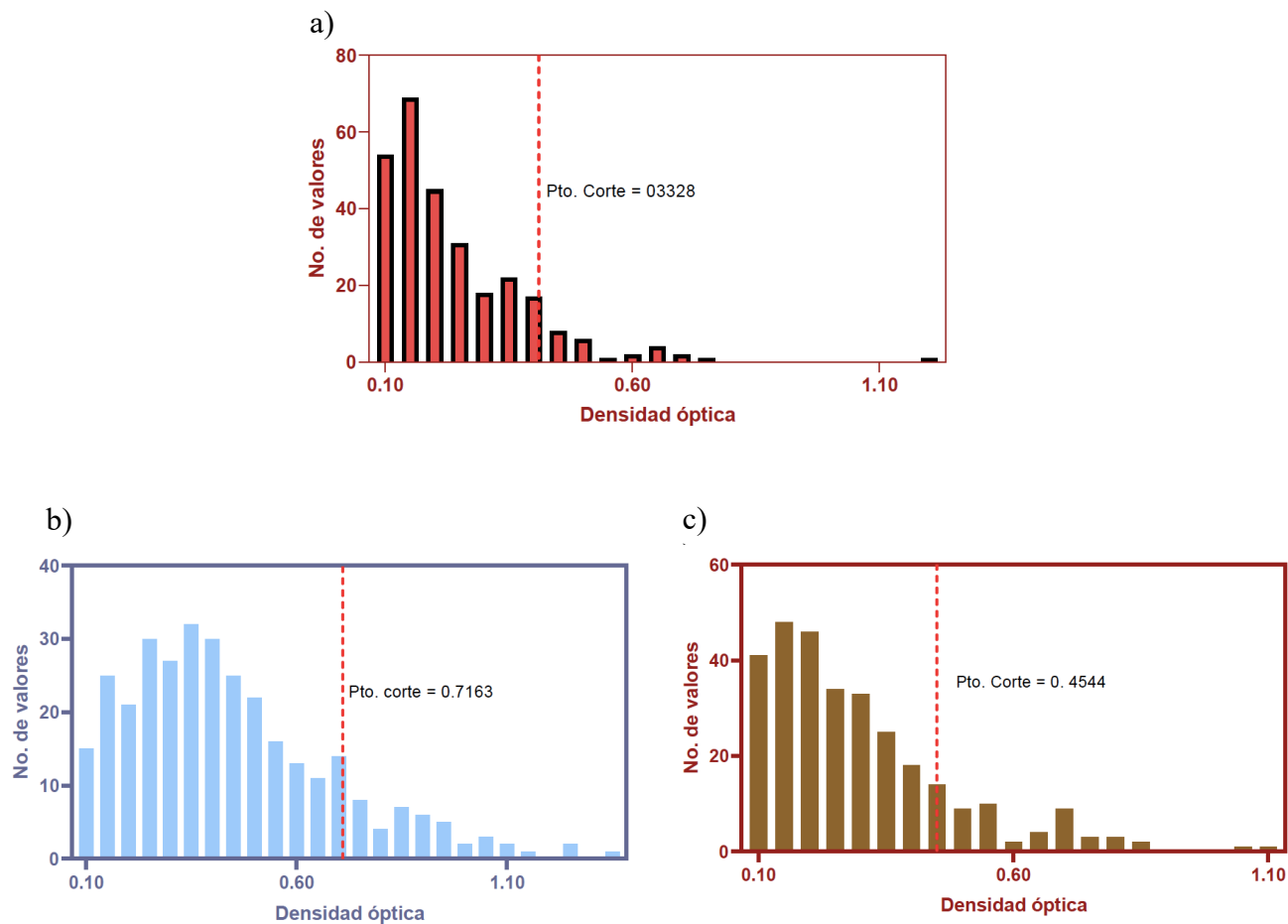


Figura 11. Punto de corte de IgG para cada arbovirus en primer periodo de muestreo (n = 326). Las líneas verticales en rojo indican el valor del punto de corte utilizado con base a la media de la D.O. + 3 desviaciones estándar. El eje x corresponde a la D.O. registrada y el eje y al número de valores o muestras con determinado intervalo de D.O.

Durante el segundo y tercer periodo de muestreo se obtuvieron curvas estándar mediante el preparado de diluciones seriadas del pool de sueros en PBS (1:200, 1:400, 1: 800, 1: 1600, 1: 3200, 1: 6400, 1: 12 800, 1: 25 600, 1: 51 200). Éstas diluciones fueron interpoladas con la concentración de μg en cada pocillo de la curva que interactuaron con el antígeno en la placa. El promedio de la D.O. de las diferentes curvas en las distintas placas fue usado. Del cálculo de la R^2 a los 10 minutos de lectura para DENV y 15 minutos de lectura para CHIKV y ZIKV, se obtuvo una R^2 de 0.9861 para CHIKV, 0.9691 para DENV y 0.9964 para ZIKV (Figura 12).

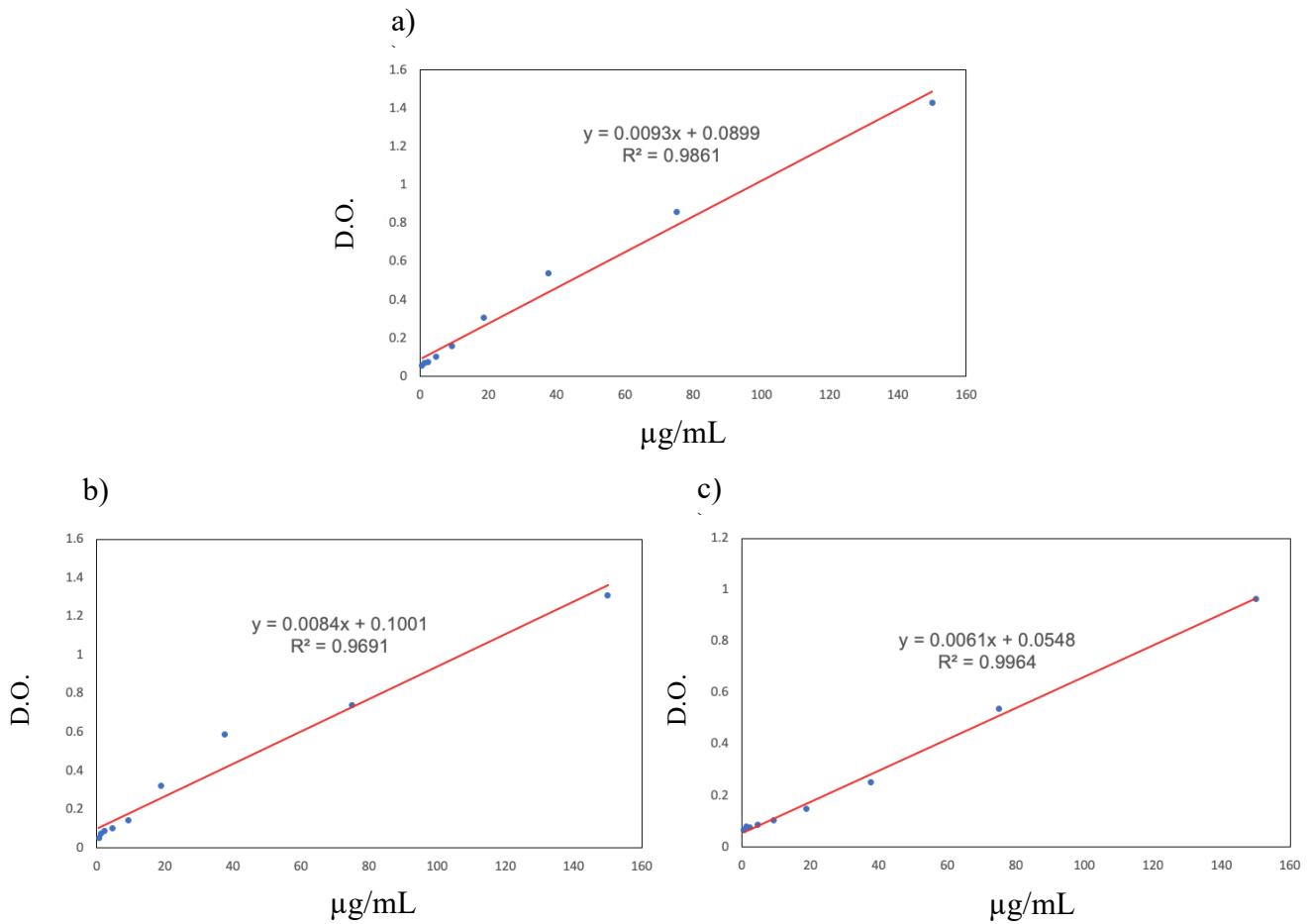
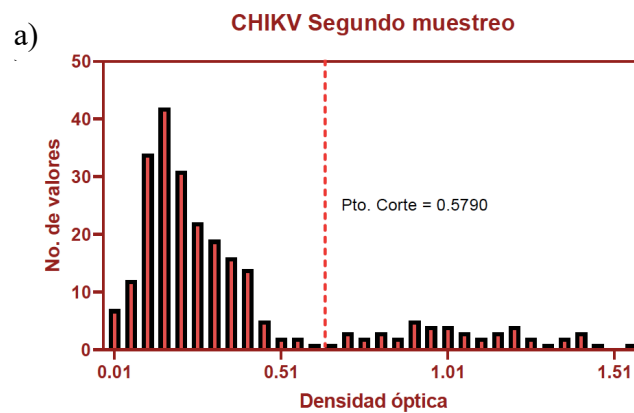


Figura 12. Curvas estándar para los valores de D.O. obtenidos durante el segundo muestreo. Las R^2 fueron óptimas para los tres casos. a) Curva estándar de CHIKV. b) Curva estándar de DENV. c) Curva estándar de ZIKV.

Los puntos de corte determinados para segundo muestreo fueron de 0.5790 para CHIKV, 0.4883 para DENV y 0.5593 para ZIKV. Nótese la variación con respecto a la cantidad de barras en el histograma dada la disminución en el número de muestras recuperadas (Figura 13).



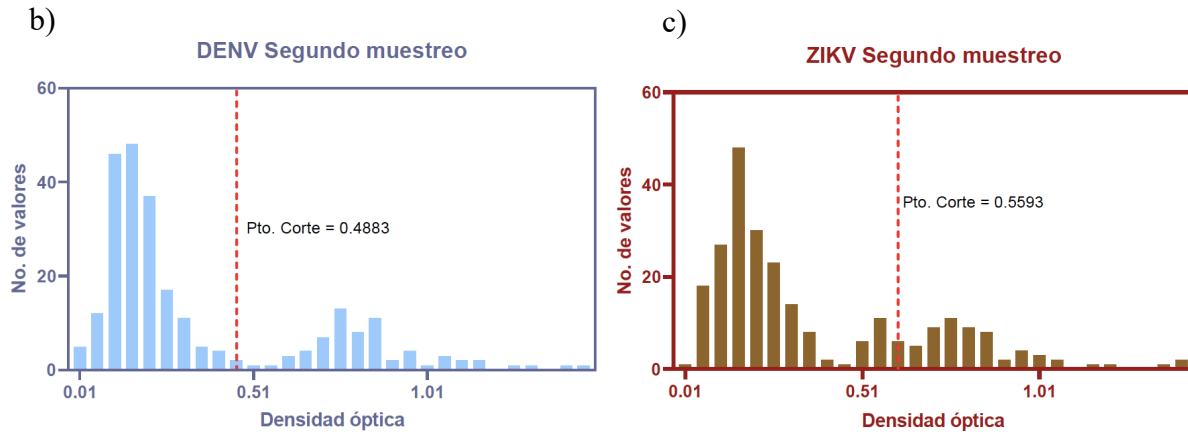
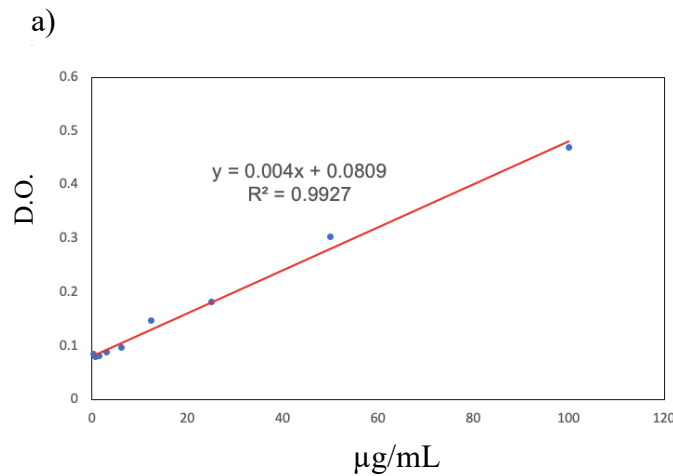


Figura 13. Distribución y punto de corte para cada arbovirus en segundo periodo de muestreo (n = 253). Las líneas verticales en rojo indican el valor del punto de corte utilizado con base a la media de la D.O. + 3 desviaciones estándar.

La R^2 calculadas de las curvas promediadas para el tercer muestreo fueron de 0.9927, 0.9012 y 0.9952, para CHIKV, DENV y ZIKV, respectivamente (Figura 14). Esto también a los 10 minutos para DENV y a los 15 minutos para CHIKV y ZIKV. Tiempos mayores para la lectura de la absorbancia ocasionaron una saturación mayor y lecturas de D.O. mayores a 4, además de la pérdida de la R^2 , particularmente en el caso de DENV. Nótese que la R^2 para DENV a los 10 minutos, si bien es óptima, roza el límite de los 0.9 para la consideración de la misma como adecuada.



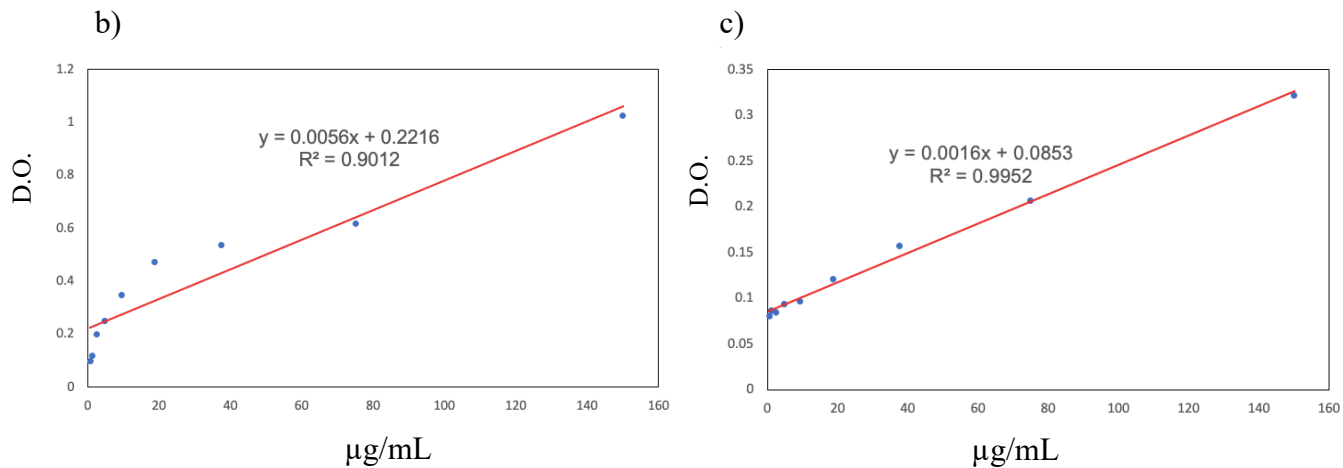
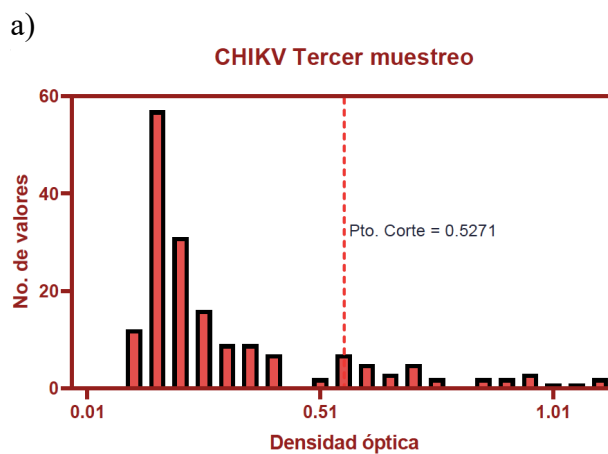


Figura 14. Curvas estándar para los valores de D.O. obtenidos durante el tercer muestreo. Las R^2 fueron óptimas para los tres casos. a) Curva estándar de CHIKV. b) Curva estándar de DENV. c) Curva estándar de ZIKV.

Para el tercer muestreo, se obtuvieron puntos de 0.5271, 0.5641 y 0.2906 para CHIKV, DENV y ZIKV, respectivamente. Se observa una variación más marcada en el punto de corte para ZIKV. Una vez más, disminuyó el número de muestras a analizar, lo cual a su vez disminuyó el número de intervalos generados, lo cual se puede observar en las barras de cada histograma (Figura 15).



b)

c)

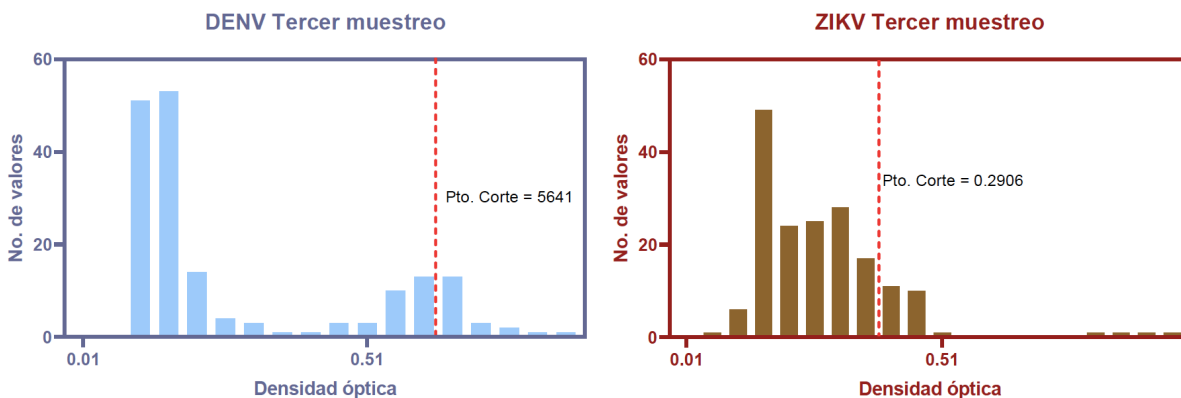


Figura 15. Distribución y punto de corte para cada arbovirus en tercer periodo de muestreo (n = 176). Las líneas verticales en rojo indican el valor del punto de corte utilizado con base a la media de la D.O. + 3 desviaciones estándar.

8.3.1 Prevalencia total.

Se obtuvo la prevalencia total de anticuerpos IgG e IgM con el cálculo de las proporciones para la muestra poblacional total inicial para cada proteína y/o virus (n = 326). La prevalencia de IgG fue de 14.11% para CHIKV, 24.53% para DENV y de 21.7% para ZIKV; mientras que la prevalencia para IgM fue de 18.4% para CHIKV, 12.8% para DENV y 15.33% para ZIKV. De estos valores obtenidos se analizaron los valores de IgG, al ser la inmunoglobulina que mejor refleja la inmunidad de la población estudiada respecto a datos sociodemográficos obtenidos en la encuesta realizada durante el primer muestreo (Tabla 2).

Tabla 2. Seroprevalencia total por virus y variable sociodemográfica.

	n (%) del total	Chikungunya		Dengue		Zika	
		n (%) positivos	I.C. 95%	n (%) positivos	I.C. 95%	n (%) positivos	I.C. 95%
Edad							
< 24 años	215 (65.95)	36 (78.26)	63.6-89.1	53 (66.25)	54.8-76.5	56 (78.87)	67.6-87.7
24-35 años	59 (18.09)	5 (10.86)	3.6-23.6	12 (26.08)	8-24.7	7 (9.85)	4.1-19.3
36-45 años	22 (6.74)	3 (6.52)	1.4-17.9	4 (5.00)	1.4-12.3	3 (4.22)	0.8-11.9
> 45 años	30 (9.2)	2 (4.34)	0.53-14.84	11 (13.75)	7.1-23.3	5 (7.04)	2.3-15.7
Sexo							
Masculino	114 (34.97)	18 (39.13)	25-54.6	27 (33.75)	23.6-45.2	28 (39.43)	28.03-51.8
Femenino	212 (65.03)	28 (60.86)	45.4-74.9	53 (66.25)	54.8-76.5	43 (60.56)	48.3-71.97
Ocupación							
Personal de salud	61 (18.71)	4 (8.69)	2.4-20.7	13 (16.25)	8.95-26.2	6 (8.45)*	3.2-17.5
Otro	265 (81.29)	42 (91.3)	79.2-97.6	67 (83.75)	73.8-91.1	65 (91.54)*	82.5-96.8
Procedencia							
Área endémica	122 (37.42)	28 (60.86)*	45.4-74.9	44 (55.00)*	43.5-66.15	44 (61.97)*	49.7-73.2
Área no endémica	204 (62.58)	18 (39.13)*	25-54.6	36 (45.00)*	33.9-56.5	27 (38.02)*	26.8-50.3
Viaje a un área endémica							
< 6 meses	177 (54.29)	29 (63.04)	47.6-76.8	52 (65.00)*	53.5-75.3	47 (66.19)*	54-77
> 6 meses	149 (45.71)	17 (36.95)	23.2-52.5	28 (35.00)*	24.7-46.5	24 (5.63)*	23-46.01
Total	326	46 (14.11)	10.5-18.37	80 (24.53)	19.97-29.6	71 (21.7)	17.4-26.6

*Datos sociodemográficos con significancia estadística entre análisis bivariados y multivariados por test exacto de Fisher y/o Chi cuadrada de Pearson.

8.3.2 Seroconversión por proteína viral analizada de acuerdo a cada variable sociodemográfica.

Se obtuvo la tasa de seroconversión de cada proteína viral por periodo de muestreo y variable sociodemográfica, destacando la seroconversión de los voluntarios durante el segundo periodo de muestreo, siendo menor y con diferencias menos significativas durante el tercer periodo de muestreo. En las tablas siguientes se muestran las principales características analizadas, tomando como base el número de personas que pasaron de estado seronegativo a seropositividad con base a los puntos de corte establecidos (Tablas 3, 4 y 5).

En el caso de chikungunya, la seroconversión fue de 5.3% de manera global durante el segundo periodo de muestreo, con mayor seroconversión en las variables sociodemográficas en las que si hubo pertenencia o viaje reciente (< 6 meses) a un área endémica (63.63% para ambos casos). Para el tercer muestreo la tasa de seroconversión global fue de 2.8%, sin destacar ninguna variable sociodemográfica en particular (Tabla 3).

Tabla 3. Tasa de seroconversión para chikungunya por variable sociodemográfica.

	Chikungunya					
	n (%) seroconversión					
	Segundo muestreo (n = 253)			Tercer muestreo (n = 176)		
	n (%) negativos	Nuevos posit.	I.C. 95%	n (%) negativos	Nuevos posit.	I.C. 95%
Edad						
< 24 años	131 (63.59)	7 (63.63)	30.1-89	88 (63.3)	3 (75.00)	19.4-99.4
24-35 años	44 (21.35)	3 (27.27)	6.02-60.9	26 (18.7)	1 (25.00)	0.6-80.6
36-45 años	11 (5.33)	1 (9.09)	0.2-41.2	8 (5.75)	0	0
> 45 años	20 (9.7)	0	0	17 (12.2)	0	0
Sexo						
Masculino	67 (32.52)	3 (27.27)	6.02-60.9	46 (33.09)	0	0
Femenino	139 (67.47)	8 (72.72)	39-93.9	93 (66.9)	4 (100.00)	39.7-100
Ocupación						
Personal de salud	45 (21.84)	3 (27.27)	6.02-60.9	31 (22.3)	0	0
Otro	161 (78.15)	8 (72.72)	39-93.9	108 (77.6)	4 (100.00)	39.7-100
Procedencia						
Área endémica	59 (28.64)	7 (63.63)	30.1-89	40 (28.77)	2 (50.00)	6.7-93.2
Área no endémica	147 (71.35)	4 (36.36)	10.9-69.2	99 (71.22)	2(50.00)	6.7-93.2
Viaje a un área endémica						
< 6 meses	105 (50.97)	7 (63.63)	30.1-89	68 (48.9)	2 (50.00)	6.7-93.2
> 6 meses	101 (49.07)	4 (36.36)	10.9-69.2	71 (51.07)	2 (50.00)	6.7-93.2
Total	206	11 (5.3)	2.7-9.4	139	4 (2.8)	0.8-7.2

En el caso de dengue, la tasa de seroconversión para el segundo periodo de muestreo fue de 3.2% y para el tercer muestreo de 3.1%, se vuelven a destacar los casos de procedencia y viaje reciente a área endémica como los de mayor contribución a la tasa de seroconversión en ambos periodos (Tabla 4).

Tabla 4. Tasa de seroconversión para dengue por variable sociodemográfica.

	Dengue					
	n (%) seroconversión					
	Segundo muestreo (n = 253)			Tercer muestreo (n = 176)		
	n (%) negativos	Nuevos posit.	I.C. 95%	n (%) negativos	Nuevos posit.	I.C. 95%
Edad						
< 24 años	126 (67.37)	4 (66.66)	22.3-95.7	84 (64.12)	2 (50.00)	6.7-93.2
24-35 años	38 (20.32)	1 (16.66)	0.4-64.1	26 (19.84)	1 (25.00)	0.6-80.1
36-45 años	10 (5.34)	1 (16.66)	0.4-64.1	7 (5.34)	0	0
> 45 años	13 (6.95)	0	0	14 (10.68)	1 (25.00)	0.6-80.1
Sexo						
Masculino	60 (32.08)	4 (66.66)	22.3-95.7	45 (34.35)	0	0
Femenino	127 (67.91)	2 (33.33)	4.3-77.7	86 (65.64)	4 (100.00)	39.7-100
Ocupación						
Personal de salud	36 (19.25)	1 (16.66)	0.4-64.1	29 (22.13)	1 (25.00)	0.6-80.1
Otro	151 (80.74)	5 (83.33)	35.9-99.6	102 (77.86)	3 (75.00)	19.4-99.4
Procedencia						
Área endémica	52 (27.8)	4 (66.66)	22.3-95.7	37 (28.24)	1 (25.00)	0.6-80.1
Área no endémica	135 (72.19)	2 (33.33)	4.3-77.7	94 (71.75)	3 (75.00)	19.4-99.4
Viaje a un área endémica						
< 6 meses	91 (48.66)	4 (66.66)	22.3-95.7	61 (46.56)	2 (50.00)	6.7-93.2
> 6 meses	96 (51.33)	2 (33.33)	4.3-77.7	70 (53.43)	2 (50.00)	6.7-93.2
Total	187	6 (3.2)	1.2-6.9	131	4 (3.1)	0.8-7.6

ZIKV registró una tasa de seroconversión de 10.7% para el segundo periodo de muestreo, la más alta de las tres arbovirosis, seguida de una tasa de seroconversión del 3.4% comparable con la tasa de serconversión para los otros dos virus (Tabla 5).

Tabla 5. Tasa de seroconversión para Zika por variable sociodemográfica.

	Zika					
	n (%) seroconversión					
	Segundo muestreo (n = 253)			Tercer muestreo (n = 176)		
	n (%) negativos	Nuevos posit.	I.C. 95%	n (%) negativos	Nuevos posit.	I.C. 95%
Edad						
< 24 años	109 (61.58)	13 (68.42)	43.5-87.4	70 (60.34)	2 (50.00)	6.7-93.2
24-35 años	41 (23.16)	2 (10.52)	1.3-33.1	25 (25.55)	1 (25.00)	0.6-80.1
36-45 años	10 (5.64)	2 (10.52)	1.3-33.1	7 (6.03)	0	0
> 45 años	17 (9.6)	2 (10.52)	1.3-33.1	14 (12.06)	1 (25.00)	0.6-80.1
Sexo						
Masculino	56 (31.63)	6 (31.57)	12.6-56.6	37 (31.89)	1 (25.00)	0.6-80.1
Femenino	121 (68.36)	13 (68.42)	43.5-87.4	79 (68.1)	3 (75.00)	19.4-99.4
Ocupación						
Personal de salud	40 (22.59)	4 (21.05)	6-45.6	29 (25.00)	2 (50.00)	6.7-93.2
Otro	137 (77.4)	15 (78.94)	54.4-94	87 (75.00)	2 (50.00)	6
Procedencia						
Área endémica	50 (28.24)	7 (36.84)	16.3-61.6	31 (26.72)	1 (25.00)	0.6-80.1
Área no endémica	122 (68.92)	12 (63.15)	38.4-83.7	85 (73.27)	3 (75.00)	19.4-99.4
Viaje a un área endémica						
< 6 meses	93 (52.54)	7 (36.84)	16.3-61.6	55 (47.41)	2 (50.00)	6.7-93.2
> 6 meses	84 (47.45)	12 (63.15)	38.4-83.7	61 (52.58)	2 (50.00)	6.7-93.2
Total	177	19 (10.7)	6.6-16.3	116	4 (3.4)	0.9-8.6

8.4 Títulación de anticuerpos neutralizantes por PRNT.

De los ensayos de neutralización llevados a cabo se obtuvieron datos para cada una de las cepas de virus en contacto con células Vero expuestas a los sueros seleccionados de los voluntarios. Los resultados se reportaron con base al PRNT80, con el cual se clasifican los sueros como positivos si logran una reducción del 80% en el número de placas de células que sufrieron lisis viral, respecto al punto de referencia de una titulación de virus diluido 1:2 sin suero. La PRNT80 de cada muestra corresponde a la dilución máxima de cada suero que logra dicha reducción (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de PRNT 80 para cada suero analizado con cada uno de los virus analizados. Se resaltan en verde los considerados positivos para el ensayo (positivos para PRNT 80 en verde).

Selección por ELISA	Muestra	ID	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	ZIKV	CHIKV
			PRNT80	PRNT80	PRNT80	PRNT80	PRNT80	PRNT80
Triples Positivos	1	CJRG-90	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20
	2	LACR-06	1:40	1:160	<1:20	1:80	1:80	1:160
	3	JMBC-94	1:320	1:320	1:80	1:640	1:80	1:640
CHIKV (+)	4	VRF-30	1:160	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20
	5	PMB-131	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20
	6	EOJ-79	1:20	1:160	1:80	1:160	<1:20	<1:20
DENV (+)	7	MDG-05	1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	1:160
	8	LSC-103	1:160	<1:20	<1:20	1:40	<1:20	1:640
	9	JJNZ-91	<1:20	1:20	<1:20	<1:20	<1:20	1:320
ZIKV (+)	10	JABR-152	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	1:80	<1:20
	11	JCV-173	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20
	12	MRG-04	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	1:320	<1:20
Negativos	13	JUCB-04	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20
	14	SACM-179	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20
	15	CGV-92	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20

8.4.1 Correlación entre títulos de PRNT para cada serotipo de DENV con D.O. obtenida por ELISA indirecto de IgG/NS1 β-ladder

Se obtiene de las 6 muestras positivas por ELISA y 3 controles negativos empleados, 4 resultados con títulos positivos para PRNT (igual o >1:20), arrojando una correlación baja, para la comparación con la cepa de DENV1 empleada y nuestro ELISA indirecto. $R^2 = 0.3125$ (Fig. 16).

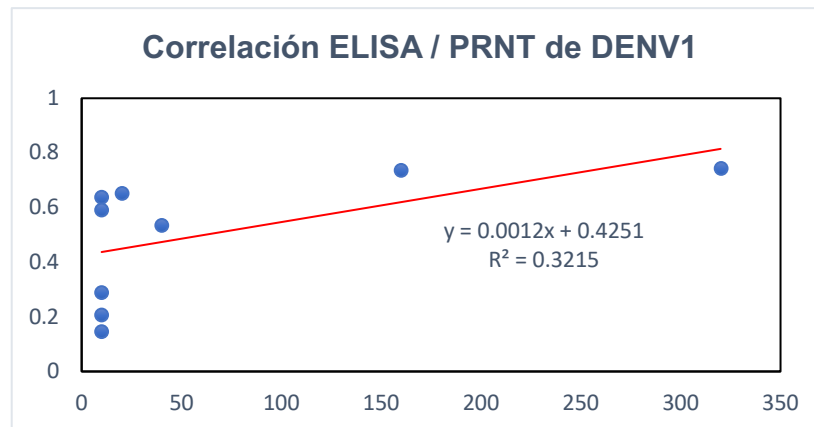


Figura 16. Correlación PRNT80 DENV-1 con D.O. ELISA IgG/NS1 β-ladder.

Para DENV-2 se obtiene un número de positivos de 3 en las 6 muestras seleccionadas, menor de PRNT80 respecto DENV-1, con solo 3 positivos en ambos ensayos (PRNT igual o >1:20). $R^2 = 0.2575$ (Fig. 17).

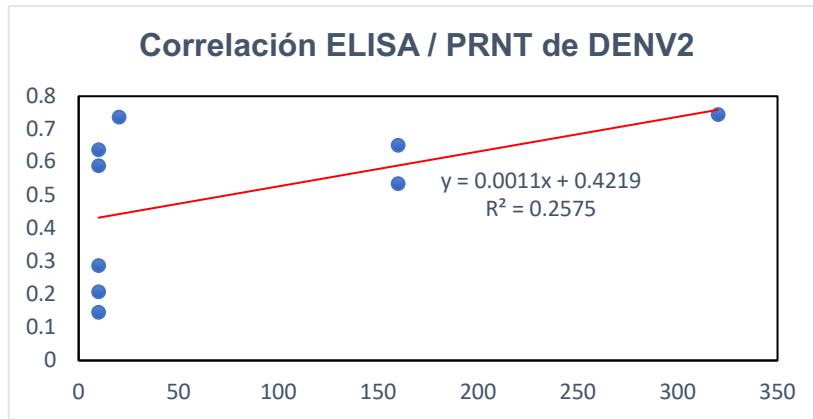


Figura 17. Correlación PRNT80 DENV-2 con D.O. ELISA IgG/NS1 β-ladder.

DENV 3 correspondió al menor número de resultados positivos para ambos ensayos con solo 2 obtenidos por ambos ensayos, reflejando también baja correlación, con una de $R^2 = 0.2287$ (Fig. 18).

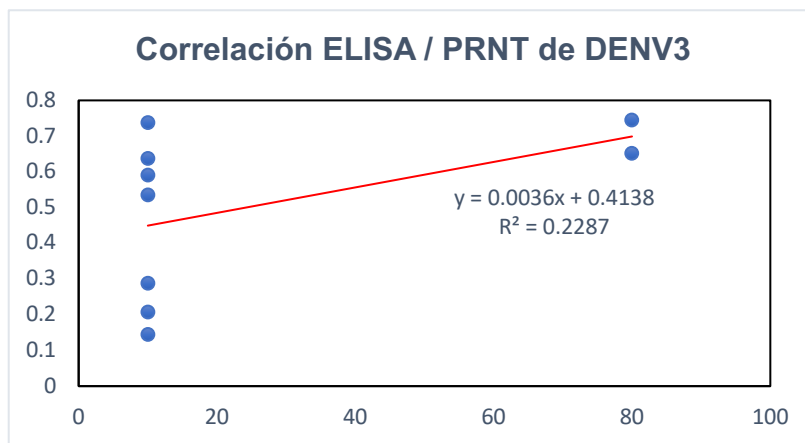


Figura 18. Correlación PRNT80 DENV-3 con D.O. ELISA IgG/DENV NS1 β-ladder.

Por último, para DENV 4, el número de positivos por ambos ensayos fue de 4 al igual que DENV 2, pero con una menor correlación entre ambos. $R^2 = 0.2802$ (Fig 19).

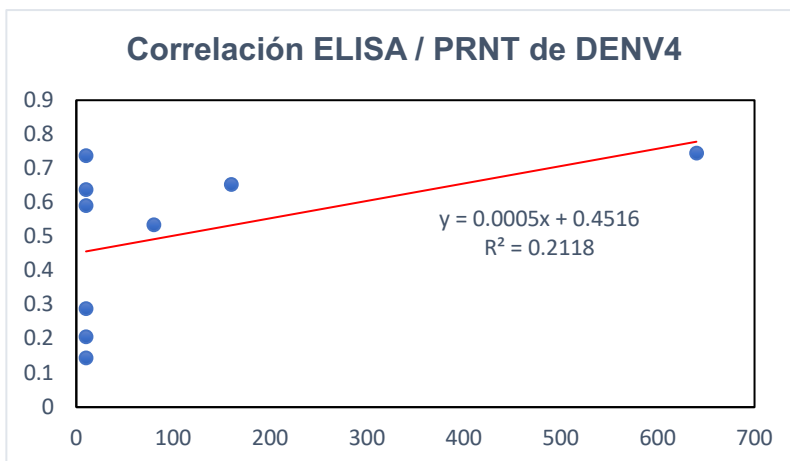


Figura 19. Correlación PRNT80 DENV-4 con D.O. ELISA IgG/ DENV NS1 β-ladder.

8.4.2 Correlación entre títulos de PRNT para cada serotipo de ZIKV con D.O. obtenida por ELISA indirecto de IgG/NS1 β-ladder

En cuanto a ZIKV, a pesar de ser un flavivirus como DENV, solo consta de un serotipo. De este, 4 resultados fueron positivos para ambos ensayos de PRNT y ELISA, sin embargo, es el virus con menor correlación entre los 3. Los controles al igual que en DENV, fueron negativos para ambas pruebas. $R^2 = 0.0085$ (Fig. 20).

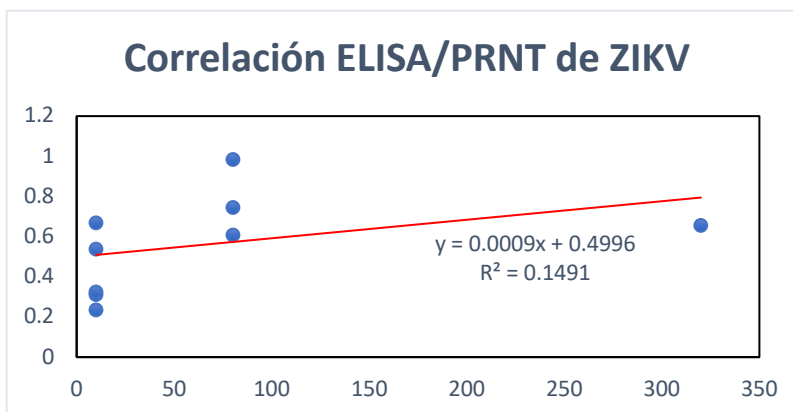


Figura 20. Correlación PRNT80 ZIKV con D.O. ELISA IgG/ZIKV NS1 β-ladder.

8.4.3 Correlación entre títulos de PRNT para cada serotipo de CHIKV con D.O. obtenida por ELISA indirecto de IgG/CHIKV E2

Los títulos de PRNT80 y ELISA IgG/CHIKV E2 son los que presentan mayor correlación entre los datos analizados y los únicos que reflejan una correlación positiva, habiendo concordancia de

diagnóstico positivo en 5 de las 6 muestras de suero analizadas (PRNT80 > 1:20, ELISA IgG/CHIKV E2 p75 > 3 DE). Los controles negativos también correlacionan directamente con su OD por ELISA. $R^2 = 0.9218$. (Fig. 21).

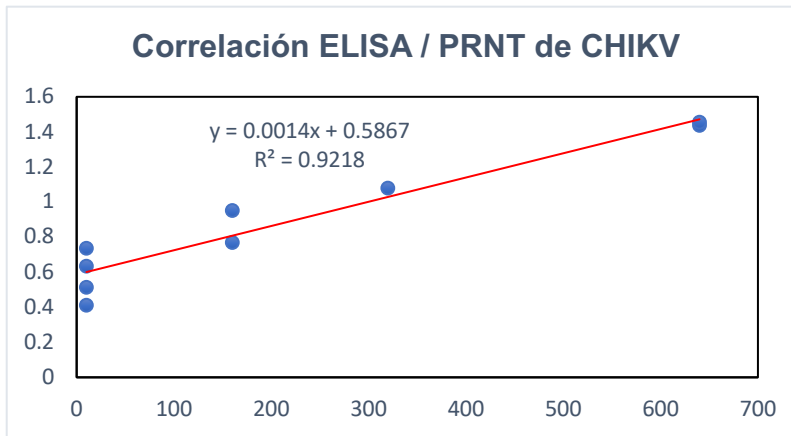


Figura 21. Correlación PRNT80 CHIKV con D.O. ELISA IgG/ CHIKV E2.

9. Discusión

En el presente trabajo se obtuvieron las prevalencias generales para cada tipo de anticuerpo, IgG e IgM, dirigidos contra las proteínas E2 de CHIKV y NS1 fracción β -ladder, tanto de DENV como de ZIKV, en una muestra poblacional estudiada de la ciudad de Morelia, capital de Michoacán, México. Con base a los puntos de corte establecidos mediante la media más tres desviaciones estándar se pudieron clasificar a dos subpoblaciones, una de voluntarios seropositivos y otra de seronegativos. Dicho cálculo es un abordaje convencional altamente adoptado para establecer puntos de corte en ensayos serológicos. De acuerdo a Parker y colaboradores (Parker *et al.*, 1990), dicho abordaje tiene una probabilidad del 0.14% de clasificar incorrectamente sueros negativos como positivos.

Lo anterior se vió reforzado por la correcta clasificación y diagnóstico de los controles positivos empleados durante el primer muestreo, al ser previamente diagnosticados con pruebas altamente específicas como la PCR. Asimismo, las curvas obtenidas para la estandarización de la técnica refuerzan la uniformidad de nuestra metodología al mostrar una $R^2 > 0.9$ para todos los casos en los tiempos establecidos. De manera interesante, en el caso de DENV dicha curva presentaba mayor saturación y una R^2 cada vez más baja conforme pasaba el tiempo de lectura con mayor rapidez que sus contrapartes. Con base a esto último, el tiempo de lectura de las placas definido para dicho protocolo se estipuló en 10 minutos tras la adición de sustrato, a diferencia de los 15 minutos para CHIKV y ZIKV. Cabe destacar que de estos 3, el ensayo para DENV NS1 β -ladder es el único que no ha sido publicado de manera individual, mientras que los protocolos base de CHIKV (Kim *et al.*, 2019) y de ZIKV (Kim *et al.*, 2018) ya fueron publicados anteriormente por separado. En un trabajo publicado por Chisenga y colaboradores, se realizó un estudio epidemiológico con el mismo protocolo base, para los tres virus aquí estudiados más el virus mayaro (MAYV) en Zambia. En dicho trabajo se contó con 214 voluntarios, obteniendo lecturas por encima de 3-4 D.O. a mayor tiempo de desarrollo de color, siendo estas realizadas a los 40 minutos tras la adición del sustrato (Chisenga *et al.*, 2020). Todo lo anterior da pie a trabajar más en la estandarización de la técnica, particularmente en el caso de NS1 β -ladder de DENV, considerando que factores como la temperatura ambiental, la preparación y el estado de los reactivos condicionan variaciones en la

misma. Esto último tomando en cuenta que dicha técnica se adaptó con ligeras variaciones en diferentes países y por diferentes centros de investigación.

La prevalencia obtenida para variables sociodemográficas como la procedencia de área endémica y viaje reciente a un área endémica fue estadísticamente significativa para la proporción de la muestra que contó con ambas características, en comparación con su contraparte por voluntarios no procedentes de área endémica y sin viaje reciente, siendo todos residentes actuales de la ciudad de Morelia. Esto se corroboró mediante las pruebas cualitativas de test exacto de Fisher y Chi cuadrada de Pearson para cada variable sociodemográfica ($p < 0.05$). Si bien lo anterior es de esperarse dado que gran parte de nuestra muestra corresponde a estudiantes jóvenes que cuentan con traslado reciente desde sus lugares de procedencia para residir en la capital del estado, lo anterior guarda también relación con el hecho de constituir una muestra heterógena en cuanto a grupos de edad siendo los grupos de < 24 años y de 25-35 años aquellos con los que contamos con más participantes. De manera interesante, aunque nuestro intervalo de edad de > 45 años ($n = 30$) constituyó el segundo intervalo de edad con menor número de participantes, más de la mitad de estos fueron seropositivos a alguno de los tres virus, dando cuenta de la larga duración de los anticuerpos que se ha reportado en la literatura. En un estudio por Pierro y colaboradores, se demostró que los anticuerpos contra CHIKV, especialmente IgG duraba un mayor tiempo y en ciertos casos hasta más de un año tras la exposición (Pierro *et al.*, 2007), mientras que un estudio por Nitatpattana y colaboradores demostró su presencia hasta por 19 años tras la misma (Nitatpattana *et al.*, 2014).

Es importante señalar que la seroprevalencia aquí descrita tiene limitantes en cuanto a dar un panorama de la situación general del país, pero sí del estado de Michoacán, ya que la seroprevalencia para los distintos arbovirus es altamente variable en la literatura. Esta variabilidad es también observada incluso entre regiones de un mismo país y entre los distintos tipos de diseño de los estudios. En una revisión de la literatura por Fritzell y colaboradores, donde se analizan 185 estudios de seroprevalencia del año 2000 al 2018 de los tres arbovirus, la seroprevalencia correspondiente a DENV va desde menos de 1% hasta 100%; éste fue un estudio llevado a cabo en mujeres embarazadas de las islas de St. Kitt Nevis y Jamaica (Fritzell *et al.*, 2018). Entre los estudios realizados correspondientes a ELISA de IgG los intervalos más altos de seroprevalencia

fueron observados en la región del Caribe y en las Américas, seguidos de intervalos en Asia (50-75%) y los más bajos en África (0-35%), siendo de manera general más alto en las Américas que en Asia (64.2% vs. 18.1%, $p < 0.001$). Se observó que en las Américas la seroprevalencia de DENV exhibió variaciones sustanciales, difiriendo hasta en un 50% entre países. Además, en un mismo país, la seroprevalencia varía considerablemente, por ejemplo, en Brasil la seroprevalencia fue de un 3% hasta un 90% en diferentes áreas (Fritzell *et al.*, 2018).

El sexo es una variable estudiada ampliamente en la literatura; sin embargo, los datos obtenidos de seroprevalencia al respecto no han sido concluyentes. En la revisión por Fritzell y colaboradores el sexo fue asociado con la seroprevalencia en el 13.5% de los estudios; 14 de 185 estudios reportaron que los hombres presentaron mayor seroprevalencia que las mujeres, mientras que 11/185 estudios reportaron mayor prevalencia significativa en mujeres (Fritzell *et al.*, 2018). Esto resulta poco concluyente y en el presente trabajo no se encuentran diferencias apreciables en cuanto a esta variable. Las proporciones de seroprevalencia fueron muy similares, considerando que 114 voluntarios fueron hombres y 212 mujeres, al ser prácticamente el doble la prevalencia de estas últimas para cada variable o periodo de muestreo, dicha relación fue prácticamente igual y sin significancia estadística apreciable por medio de los análisis ya comentados.

En cuanto al personal de salud aún no ha sido ampliamente estudiada dicha variable, pero se han encontrado relaciones entre la actividad laboral y la seroprevalencia, siendo esta mayor en aquellas personas que desempeñan actividades en exteriores (Chisenga *et al.*, 2020) y entre los hábitos o comportamientos preventivos como el uso de métodos de control del vector, así como el nivel socioeconómico (Braga *et al.*, 2010). En cuanto a la procedencia, la prevalencia fue mayor en aquellos individuos procedentes de área endémica en comparación con aquellos procedentes de áreas no endémicas (Tabla 2). Se obtuvo significancia estadística tanto para las IgG contra proteína CHIKV E2, como NS1 β -ladder de DENV y ZIKV ($p < 0.05$). A pesar de ser esperado este resultado dada la naturaleza en el vector, también se han reportado variaciones en la prevalencia de una misma región. Conforme a un estudio realizado por Walker y colaboradores, distintas variaciones microambientales, de entorno y de vivienda pueden modificar dicha prevalencia, así como la presencia y desarrollo del mosquito (Walker *et al.*, 2011), lo cual también se ha de considerar ya que la zona ocupada por la ciudad de Morelia, cuenta con diversas variaciones microambientales

en toda su extensión. También se encuentran en la literatura estudios que proponen una asociación entre vivir en un área urbana y ser seropositivo al ser *A. aegypti* un vector urbano (Vallée *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2017).

A pesar de que los títulos en PRNT obtenidos no correlacionan directamente con los valores de D.O obtenidos por ELISA, hubo concordancia en cuanto a ser clasificados como positivos o negativos por parte de los dos ensayos empleados. Una dificultad para correlacionar ambas metodologías radica en la naturaleza de las mismas, ya que la PRNT se basa en la lisis de células y la formación de placas para la cuantificación exclusivamente de anticuerpos neutralizantes. Otra dificultad es que las proteínas no estructurales no están presentes en la partícula viral que ingresa a la célula y pasan a ser elementos que se expresan intracelularmente o como proteínas en suero que no están en asociación con la partícula viral, mientras que las proteínas estructurales sí. Eso podría explicar las notorias diferencias entre las correlaciones con la D.O. de la proteína E2 de CHIKV respecto a las NS1 de DENV y ZIKV. Otra consideración importante con base a un estudio por Duyen y colaboradores, es que las cifras de sNS1 (forma soluble) para DENV son variables según el serotipo infectante y respecto a si se trata de una primoinfección o una exposición subsecuente (Duyen *et al.*, 2011). Esto último podría influir también de manera importante en la no correspondencia de los resultados de nuestro protocolo de ELISA y la PRNT en el caso de las proteínas no estructurales para DENV.

En el trabajo ya comentado por Kim y colaboradores (Kim *et al.*, 2018), se obtuvo una correlación entre la proteína estructural envelope de ZIKV ($R^2 = 0.53$) mayor a la aquí reportada para la fracción no estructural de NS1 Beta-ladder. Mientras tanto, la correlación aquí encontrada con la proteína estructural de CHIKV es aún mayor ($R^2 > 0.9$). Es importante señalar que las pruebas de neutralización permiten diferenciar serotipos como en el caso de DENV, siendo posible identificar los 4. Sin embargo, estas son más costosas, consumen más tiempo y requieren de mayor capacidad técnica y de bioseguridad. Por todo lo anterior, los ensayos de neutralización no pueden ser sustituidos por completo por ensayos de ELISA, el uso de estos últimos basados en proteínas estructurales podría ser una alternativa eficiente y más barata a los ensayos de neutralización, particularmente en el estudio seroepidemiológico y la evaluación de vacunas en la población.

CONCLUSION

Como conclusión para este trabajo, la movilidad y la urbanización desempeñan el papel más preponderante en la distribución de estas arbovirosis. Es importante señalar que la prevalencia aquí reportada es tan alta como en otras regiones del mundo consideradas endémicas. A pesar de que los sistemas de vigilancia y reporte epidemiológico no reportaron una alta incidencia en nuestro estado durante el periodo en que se recolectaron las muestras para el presente trabajo, estados vecinos como Jalisco y Guanajuato reportaron brotes en dicho periodo (SINAVE 2019). Es importante señalar, sin embargo, que la baja incidencia en Michoacán durante dicho periodo puede ser desencadenante de una disminución de anticuerpos contra arbovirus emergentes y re-emergentes en la población. Michoacán se ha colocado como uno de los estados con mayor incidencia en años anteriores, contrario a lo ocurrido en los últimos 2 años. Esto más que ser benéfico para la población, podría vaticinar un rebrote en años próximos, repitiendo el patrón cíclico ya ampliamente estudiado en DENV, pero ahora aunado a co-circulación y co-infección por CHIKV y ZIKV, problemática que ha de atacarse con un conocimiento amplio de la epidemiología en la región y el desarrollo de vacunas.

11. Referencias

Akey D.L. (2014). “Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system”. *Sci.* 343: 881-885.

Alcon-LePoder S., Sivard P., Drouet M.T., Talarmin A., Rice C., Flamand M. (2006). “Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis.” *Novartis Found Symp.* 277: 233-253.

Amaya-Larios I.Y., Martínez-Vega R.A., Mayer S.V., et al. (2014). “Seroprevalence of neutralizing antibodies against dengue virus in two localities in the State of Morelos, Mexico.” *Am J Trop Med Hyg.*; 91(5): 1057-1065. doi:10.4269/ajtmh.14-0145.

Amaya-Larios, I. Y., Rojas-Russell, M., López-Cervantes, M., Castro-Porras, L., Castro-Borbonio, M. V., Sarti, E., Puentes-Rosas, E., Tirado-Gómez, L. L., Olaíz-Fernandez, G., & Ramos-Castañeda, J. (2018). Seroprevalence of dengue in school children in Mexico ages 6-17 years, 2016. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 112(5), 223–229. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try046>

Anders K.L., Nguyet N.M., Chau N.V. (2011). “Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84: 127-134.

Assuncao-Miranda I., Cruz-Oliveria C., Da Poian A.T. (2013). “Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. *Biomed. Res. Int.* 2013: 973516.

Azami N.A.M., Salleh S.A., Shah S.A. Neoh H., Othman Z., Zakaria S.Z.S., Jamal R. (2013). “Emergence of chikungunya seropositivity in healthy Malaysian adults residing in outbreak-free locations: Chikungunya seroprevalence results from the Malaysian Cohort. *BMC Infect. Dis.* 13, 67.

Barrows N.J., Campos R.K., Powell S.T. (2016) “A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. *Cell Host Micr.* 20(2): 259-270.

Bartok B. & Firestein G.S. (2010) Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis.” *Immunol. Rev.* 233: 233-255. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00859.

Barzon L., Pacenti M., Franchin E., (2016). “Infection dynamics in a traveler with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January. *Euro Surveill.* 21(32): 1-4.

Beatty M.E., Beutels P., Meltzer M.I., Shepard D.S., Hombach J., Hutubessy R. (2011). “Health Economics of Dengue: A Systematic Literature Review and Expert Panel’s Assessment. *Am J Trop Med Hyg.* 84: 473-488. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0521>.

Beatty M.E., Letson G.W., Margolis H.S. (2009). “Estimating the global burden of dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 231.

Beatty P. (2015). “Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vacular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci. Transl. Med.* 7, 304ra141.

Besnard M., Lastère S., Teissier A., Cao-Lormeau V., Musso D. (2014). “Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2104. *Eurosurveill.*; 19: 20751.

Bhatt S., Gething P.W., Brady O.J., Messina J.P., Farlow A.W., Moyes C.L. (2013). “The global distribution and burden of dengue.” *Nat.*; 496: 504-507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>

Braack L., Gouveia de Almeida A.P., Cornel A.J., Swanepoel R., de Jager C. (2018). “Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors.” *Par & Vect*, 11:29. doi: 10.1186/s13071-017-2559-9.

Bryant J.E., Holmes E.C., Barret A.D. (2007). “Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas.” *PLoS Pathog.* 3:e75.

Braga C., Luna C.F., Martelli C.M., de Souza W.V., Cordeiro M.T., Alexander N. et al. (2010) “Seroprevalence and risk factors for dengue infection in socio-economically distinct areas of Recife, Brazil.” *Acta Trop.*; 113:234-240.

Campos G.S., Albuquerque Bandeira A.C., Diniz Rocha V.F., Dias J.P., Carvalho R.H. & Sardi S.I. (2017). “First detection of Chikungunya virus in breast milk. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 36: 1015-1017. doi: 10.1097/INF.0000000000001658.

Charrel R.N. (2016). “Diagnosis of arboviral infections – A quagmire of cross reactions and complexities.” *Travel Med and Infectious Dis* 14(1): 11-12.

Chaves B.A., Orfano A.S., Nogueira P.M., Rodrigues N.B., Campolina T.B. Nacif-Pimenta R. (2018). “Confection with Zika virus (ZIKV) and dengue virus results in preferential ZIKV transmission by vector bite to vertebrate host.” *J. Infect. Dis.*; 218: 563-571. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy196>.

Chisenga C.C., Bosomprah S., Musukuma K., Mubanga C., Chilybanyama O.N., Velu R.M., Kim Y.C., Reyes Sandoval A. “Sero-prevalence of arthropod-borne viral infections among Lukanga swamp residents in Zambia”. *PLoS ONE* 15(7): e0235322.

Choun-Carneiro T. (2016). Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10: e0004543.

Cortés-Escamilla A., López-Gatell H., Sánchez-Alemán M.A., Hegewisch-Taylor J., Hernández-Ávila M., Alpuche-Aranda C.M. (2018). “The hidden burden of Chikungunya in central Mexico: results of a small-scale serosurvey.” *Salud Publica Mex*; 60: 63-70. <https://doi.org/10.21149/9149>

Couderc T., Chretien F., Schilte C. (2008) “A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* 4: e29.

Couderc T., Khandoudi N., Grandadam M. (2009). “Prophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection.” *J. Infect. Dis.* 200: 516-523.

de Alwis R., Williams K.L., Schmid M.A., Lai C.Y., Patel B., Smith S.A. (2014). “Dengue viruses are enhanced by distinct populations of serotype cross-reactive antibodies in human immune sera. *PLoS Pathog.*; 10: e1004386. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004386>.

Diallo D., Sall A.A., Buenemann M., Chen R., Faye O., Diagne C.T. (2012). “Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southeastern Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1649. doi: 10.1371/journal.pntd.0001649.

Duangchinda T. (2010) “Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 16922-16927.

Duffy M.R., Chen T-H, Hancock W.T., Powers A.M., Kool J.L., Laciotti R.S. (2009). “Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.*; 360: 2536-2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>.

Durbin A, Wilder-Smith A. (2017). “An update on Zika vaccine developments.” *Expert Rev Vaccines*;16(8):781-787. doi:10.1080/14760584.2017.1345309

Fauci A.S., Morens D.M. (2016). “Zika Virus in the Americas – Yet Another Arbovirus Threat.” *N Engl J Med*; 374: 601-604. doi: 10.1056/NEJMp160029.

Fong R.H., Banik S.S., Mattia K., Barnes T., Tucker D., Liss N. (2014). “Exposure of epitope residues on the outer face of the chikungunya virus envelope trimer determines antibody neutralizing efficacy.” *J. Virol.* 88:14364-14379. doi: 10.1128/JVI.01943-14.

Fritzell C., Rousset D., Adde A., Kazanji M., Van Kerkhove M.D., Flamand C. (2018). “Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. *PLoS Negl Trop Dis* 12(7): e0006533. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006533>.

Gallian P., Cabie A., Richard P. (2017). “Zika virus in asymptomatic blood donors in Martinique. *Blood* 129: 263-266.

Gardner L.M., Bóta A., Gangavarapu K., Kraemer M.U.G., Grubaugh N.D. (2018). “Inferring risk factors behind the geographical spread and transmission of Zika in the Americas.” *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12: e0006194. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006194>.

Gerardin P. Samperiz S., Ramful D. (2014). “Neurocognitive outcome of children exposed to perinatal mother-to-child Chikungunya virus infection: the CHIMERE cohort study on Reunion Island. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2996.

Go Y., Balasuriya U.B. & Lee C.K. (2014) “Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses.” *Clin. Exp. Vaccine Res.* 3: 58-77. doi: 10.7774/cevr.2014.3.1.58.

Grifoni A. (2017). “Prior Dengue virus exposure shapes T cell immunity to Zika virus in humans. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/JVI.01469-17>

Gutsche I., Coulibay F., Voss J.E., Salmon J. d’Alayer J., Ermonval M. (2011). “Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108; 8003- 8008. Doi: 10.1073/pnas.

Guy B., Jackson N. (2016). “Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection.” *Nat Rev Microbiol.*; 14(1): 45-54. doi:10.1038/nrmicro.2015.2

Guzman M.G. (2000). “Epidemiologic studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am. J. Epidemiol.* 152: 793-799.

Guzman M.G., Gubler D.J., Izquierdo A., Martinez E., Halstead S.B. (2016). “Dengue Infection”. *Nat. Rev. Dis. Primer.* 18; 2: 16055. doi. 10.1038/nrdp.2016.55.

Haddow A.D., Schuh A.J., Yasuda C.Y. (2012). “Genetic characterization of zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1477.

Hadinegoro S.R. (2015). “Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. *N. Engl. J. Med.* 373: 1195-1206.

Halstead S.B. (1974). “Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 23: 974-982.

Halstead S.B. & O’Rourke E.J. (1977). Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nat.*; 265: 739-741.

Halstead S.B. & Russell P.K. (2016) “Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. *Vacc.* 34: 1643-1647.

Halstead S.B., Chow J.S., & Machette N.H. (1973). “Immunological enhancement of dengue virus replication. *Nat. New. Biol.* 243: 24-26.

Hamel R., Dejarnac O., Wichit S. (2015). “biology of Zika virus infection in human skin cells. *J. Virol.* 89: 8880-96.

Hernández-Ávila M, Santos-Preciado JI. (2016). “Análisis de la evidencia sobre eficacia y seguridad de la vacuna dengue CYD-TDV y su potencial registro e implementación en el Programa de Vacunación Universal de México.” *Salud Publica Mex*; 58(1):71-85.

Hernández-Ávila C.E., Sandoval E. (2019). “Seroprevalencia de anticuerpos IgM para zika y chikungunya en la vigilancia de dengue.” ALERTA Revista Científica del Instituto Nacional de Salud, 7 (2): 108-116. doi: 10.5377/alerta.v2i2.7743

Hochedez P., Jaureguiberry S., Debruyne M. (2006). “Chikungunya infection in travelers”. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1565-1567.

Jentes E.S., Robinson J., Johnson B.W., et al. (2010). “Acute arboviral infections in Guinea, West Africa, 2006.” *Am J Trop Med Hyg.*; 83(2): 388-394. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0688.

Johnson B.W., Russell B.J., Goodman C.H. (2016). “Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. *J. Infect. Dis.* 214: S471-474.

Jones K.E., Patel N.G., Levy M.A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J.L. (2008). “Global trends in emerging infectious diseases.” *Nat.*; 451: 990-993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>.

Kam Y.W., Lee W.W., Simarmata D., Harjanto S., Teng T.S., Tolou H. (2012). “Longitudinal analysis of the human antibody response to Chikungunya virus infection: implications for serodiagnosis and vaccine development.” *J. Virol.* 86: 13005-13015. doi: 10.1128/JVI.01780-12.

Kam Y.W., Simarmata D., Chow A., Her Z., Teng T.S., Ong E.K. (2012). “Early appearance of neutralizing immunoglobulin G3 antibodies is associated with chikungunya virus clearance and long-term clinical protection. *J. Infet. Dis.* 205: 1147-1154. doi: 10.1093/infdis/jis033.

Kanai R. (2006). “Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes.” *J. Virol.* 80: 11000-11008.

Khan A.H., Morita K., Parquet Md Mdel C., Hasebe F., Mathenge E.G., Igarashi A. (2002) “Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site.” *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 12): 3075-3084. Doi: 10.1099/0022-1317-83-12-3075.

Khor C.C., Chau T.N. Pang J. (2011). “Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. *Nat. Genet.* 43: 1139-1141.

Kikuti M., Tauro L.B., Moreira P.S.S. (2018). “Diagnostic performance of commercial IgM and IgG enzyme-linked immunoassays (ELISAs) for diagnosis of Zika virus infection. *Virol. J.*; 15(1): 108. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1015-6>.

Kim Y.C., López-Camacho C., Garcia-Larragoiti N., Cano-Mendez A., Hernández-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. *Vir.* (11): 407. doi:10.3390/v11050407.

Kim Y.C., Lopez-Camacho C., Nettleship J.E., Rahman N., Hill M.L., Silva-Reyes L., Ortiz-Martinez G., Figueroa-Aguilar G., Mar M.A., Vivanco-Cid H., Rollier C.S., Zitzmann N., Viveros-Sandoval M.E., Owens R.J., Reyes-Sandoval A. (2018). “Optimization of Zika virus envelope protein production for ELISA and correlation of antibody titers with virus neutralization in

Mexican patients from an arbovirus endemic region.” *Viol. J*; 15:193. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1104-6>.

Kirkpatrick B.D. (2016). “The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model. *Sci. Transl. Med.* 8, 330ra36.

Kliks S.C., Nimmanitya S., Nisalak A. & Burke D.S. (1988). “Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 411-419.

Kularatne S.A., Gihan M.C., Weerasinghe S.C., Gunasena S. (2009). “Concurrent outbreaks of Chikungunya and Dengue fever in Kandy, Sri Lanka, 2006-07: a comparative analysis of clinical and laboratory features.” *Posgrad Med J* 85: 342-346.

Kumar N.P., Suresh A., Vanamail P., Sabesan S., Krishnamoorthy K.G., Mathew J., Jose V.T., Jambulingam P. (2011). “Chikungunya virus outbreak in Kerala, India, 2007: A seroprevalence study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 106: 912-916.

L’Azou M., Jade Assoukpa J., Fanouillere K., Plennevaux E., Bonaparte M., Bouckenoghe A., Frago C., Noriega F., Zambrano B., Ochiai R.L., Guy B., Jackson N. (2018). “Dengue seroprevalence: data from the clinical development of a tetravalent dengue vaccine in 14 countries (2005–2014)”. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 112 (4): 158-168. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try037>

Leroy E.M., Nkoghe D., Ollomo B., Nze-Nkogue C., Becquart P., Grard G., Pourrut X., Charrel R., Moureau G., Ndjoyi-Mbiguino A., De-Lamballerie X. (2009). “Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007.” *Emerging infectious diseases*, 15(4), 591-593. <https://doi.org/10.3201/eid1504.080664>.

Li H., Saucedo-Cuevas L. Shresta S., Gleeson J.G. (2106) “The neurobiology of Zika virus. *Neu.* 92: 949-958.

Libraty D.H. (2002). “High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever.” *J. Infect. Dis.* 186, 1165-1168.

Lin S. (2012). “Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. *J. Infect.* 64: 325-344.

López-Camacho C., Abbink P., Larocca R.A., Dejnirattisai W., Boyd M., Badamchi-Zadeh A., Wallace Z.R., Doig J., Sanchez-Velazquez R., Lins-Nieto R.D., Coelho D.F., Kim Y.C., Donald C.L., Owsianka A., De Lorenzo G., Kohl A., Gilbert S.C., Dorrel L., Mongkolsapaya J., Patel A.H., Screaton G.R., Barouch D.H., Hill A.V.S., Reyes-Sandoval A. (2018). “Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors.” *Nat. Commun.* 9:2441. doi:10.1038/s41467-018-04859-5.

López-Camacho C., Chan Kim Y., Blight J., Lazaro Moreli M., Montoya-Diaz E., Huiskoen J.T.,

Mareike Kümmerer B., Reyes-Sandoval A. (2019). "Assesment of Immunogenicity and Neutralisation Efficacy of Viral-Vectored Vaccines Against Chikungunya Virus. *Vir.* 11, 332.

Mackenzie J.M, Jones M.K. & Young P.R. (1996). "Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Viol.* 220:232-240.

Mastrangelo E., Pezzullo M., De Burghgraeve T. (2012). "Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug." *J. Antimicrob. Chemoter.* 67: 1884-1894.

Miner J.J., Diamon M.S. (2017). "Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Micr.* 21: 134-142.

Mitrakul C. (1987). "Bleeding problem in dengue haemorrhagic fever: platelets and coagulation changes." *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 18: 407-412.

Mitrakul C., Poshychinda M., Futrakul P., Sangkawibha N. & Ahandrik S. (1977) "Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 975-984.

Modhiran, N. (2015). "Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity." *Sci. Transl. Med.* 7, 304ra142.

Mongkolsapaya J. (2003). "Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever." *Nat. Med.* 9: 921-927.

Montoya M. (2013). "Symptomatic versus inapparent outcome in repeat dengue virus infections is influenced by the time interval between infections and study year. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2357.

Muller D.A. & Young P.R. (2013). "The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 98: 192-208.

Nettleship J.E., Rhaman-Huq N., Owens R.J. (2009). "The production of glycoproteins by transient expression in Mammalian cells." *Methods Mol Biol;* 498: 245-63.

Nettleship J.E., Watson P.J., Rahman-Huq N., Fairall L., Posner M.G., Upadhyay A., Reddivari Y., Chamberlain J.M., Kolstoe S.E., Bagby S., Schwabe J.W., Owens R.J. (2015). "Transient expression in HEK 293 cells: an alternative to *E. coli* for the production of secreted and intracellular mammalian proteins." *Methods Mol Biol;* 1258: 209-22.

Nguyen T.H., Nguyen T.L., Ley H.Y. (2005). "Association between sex, nutritional status, severity of hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72:370-374.

Niedrig M., Zeller H., Schuffenecker I., Drosten C., Emmerich P., Rumer L., Donoso-Mantke O. (2009). "International diagnostic accuracy study for the serological detection of chikungunya virus infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 15: 880-884.

Nitatpattana N., Kanjanopas K., Yoksan S., Satimai W., Vongba N., Langdatsuwan S., et al. (2014). “Long-term persistence of Chikungunya virus neutralizing antibodies in human populations of North Eastern Thailand.” *Virol J*: 11:183.

Nowakowski T.J. Pollen A.A., Di Lullo E. (2016). Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell Sem Cell* 18: 591-596.

Nunes M.R., Faria N.R., de Vasconcelos J.M. (2015). “Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med*. 13: 102.

Nurtop E., Sba-Villaroel P.M., Pastorino B., Ninove L., Drexler J.F., Roca Y., Gake B., Dubot-Peres A., Grard G., Peyrefitte C., Priet S., de Lamballerie X., Gallian P. (2018) “Combination of ELISA screening and seroneutralisation tests to expedite Zika virus seroprevalence studies. *Vir Jour.*, 15:192. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1105-5>.

Oehler E., Watrin L., Larre P. (2014). “Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome – case report, French Polynesia, December 2013.” *Euro Surveill*. 19(9): 1-3.

Paixao E.S., Teixeira M.G., Rodrigues L.C. (2017). “Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases.” *BMJ Glob Health*, 3: *e000530*.

Paixao ES, Teixeira MG, Rodrigues LC (2017) Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ Glob Health*, 3: *e000530*.

Parra B., Lizarazo J., Jimenez-Arango J.A. (2016). “Guillain-Barre syndrome associated with Zika virus infection in Colombia. *N. Engl. J. Med*. 375: 1513-1523.

Parker R.A., Erdman D.D., Anderson L.J. (1990). “ Use of mixture models in determining laboratory criterion for identification of seropositive individuals: application to parvovirus B19 serology”. *J. Virol. Methods*. 27: 135-144.

Pavía-Ruz N., Rojas D.P., Salha Villanueva G.P., Balam-May A., Longini I.M., Halloran M.E., Manrique-Saide P., Gómez-Dantés H. (2018). “Seroprevalence of Dengue Antibodies in Three Urban Settings in Yucatan, Mexico.” *Am J Trop Med Hyg.*; 98(4): 1202-1208. doi: 10.4269/ajtmh.17-0382. Epub 2018 Feb 15. PMID: 29460714; PMCID: PMC5928812.

Petersen L.R., Jamieson D.J., Powers A.M., Honein M.A. (2016). “Zika Virus”. *N. Engl. J. Med*. 374: 1552-1563. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>.

Phulkia W., Kasisith J., Modhiran N., Rodpai E., Thannagith M., Thongsakulprasert T. (2013). “Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: a possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis. *Vir. Res*. 177: 179-188. doi: 10.1016/j.viruses.2013.08.011.

Pierro A., Rossini G., Gaibani P., Finarelli A.C., Moro M.L., Landini M.P., et al. (2007). “ Persistence of anti-chikungunya virus-specific antibodies in a cohort of patients followed from

acute phase of infection after the 2007 outbreak in Italy.” *New Microbes New Infect*; 7:23-5

Pierson T.C. (2007) “The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection.” *Cell Host Micr.*, 1: 135-145.

Powers A.M. (2018). Vaccine and therapeutic options to control chikungunya virus. *Clin. Microbiol. Rev.* 31: e00104-16. doi: 10.1128/CMR.00104-16.

Priya R., Khan M., Rao M.K., Parida M. (2014). “Cloning, expression and evaluation of diagnostic potential of recombinant capsid protein-based IgM ELISA for chikungunya virus.” *J. Virol. Methods*, 203:15-22.

Ramful D., Carbonnier M., Pasquet M., Bouhmani B., Ghazouani J., Noormahomed T. (2007). “Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26: 811-815. doi: 10.1097/INF.0b013e3180616d4f.

Ramsauer K., Shwameis M., Firbas C. (2015). “Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: a randomized, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. *Lancet Infect. Dis.* 15: 519-527.

Roehrig J. (2003). “Antigenic structure of flavivirus proteins.” *Adv. Virus Res.* 59: 141-175.

Rey F.A., Stiasny K., Vaney M.C., Dellarole M. & Heinz F.X. (2018). “The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO Rep.* 19: 206-224.

Reyes-Sandoval A. and Ludert J. E. (2018). “The Dual Role of the Antibody Response Against the Flavivirus Non-structural Protein 1 (NS1) in Protection and Immuno-Pathogenesis. *Front. Immunol.* 10:1651. doi: 10.3389/fimmu.2019.01651.

Rivino L. (2013) “Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue virus infection.” *J. Virol.* 87: 2693-2706.

Rocha E.S., de Oliveira J.G., Dos Santos J.R., Rodrigues G.O., Figueiredo L.B., Pessanha J.E., Proietti F.A., Fonseca F.G., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. (2013) “Recombinant envelope protein-based enzyme immunoassay for IgG antibodies is comparable to neutralization tests for epidemiological studies of dengue infection.” *J. Virol Methods*, 187:140-120.

Rodríguez-Morales A.J., Villamil-Gómez W.E., Franco-Paredes. (2016). “The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas.” *Travel Med Infect Dis.* 14: 177-179. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.05.004>.

Sabin A.B. (1952) “Research on dengue during World War II. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1: 30-50. SAGE Working Group on Dengue Vaccines and WHO Secretariat. Background paper on dengue vaccines: revision to the background paper from 17 March 2016. SAGE Meeting of April 2018 http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2018/april/2_DengueBackgrPaper_SAGEApr2018.pdf?ua=1

Sánchez-Burgos G.G., López-Alvarado M.A., Castañeda-Desales D., Ruiz-Gómez J., Ramos-Castañeda J. (2008). “Prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra los serotipos del virus dengue en universitarios de Tabasco, México.” *Salud Pública de México*, 50(5):362-366.

Schuffenecker I., Itean I., Michault A., Murri S., Frangé L., Vaney M.C. (2006). “Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak.” *PLoS Med.* 3:e263. doi. 10.1371/journal.pmed.0030263.

Shah P.S., Deoshatwar A., Karad S., Mhaske S., Singh A., Bachal R.V., et al. “Seroprevalence of dengue in a rural and an urbanized village: A pilot study from rural western India.” *J Vector Borne Dis.* 2017; 54: 172–176.

Simmons C.P., Farrar J.J., Nguyen V.V., Wills B. (2012). “Dengue.” *N Engl J Med.* 366(15):1423-1432. doi:10.1056/NEJMra1110265

Slon-Campos J.L., Mongkolsapaya J., Screaton G.R. (2018). “The immune response against flaviviruses”. *Nat. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0210-3>.

Smit J.M., Moesker B., Rodenhuis-Zybert I. & Wilschut J. (2011) “Flavivirus cell entry and membrane fusion.” *Vir.* 3: 160-171.

Smith S.A., Silva L.A., Fox J.M., Flyak A.I., Kose N., Sapparapu G. (2015). “Isolation and characterization of broad and ultrapotent human monoclonal antibodies with therapeutic activity against Chikungunya virus. *Cell Host Microbe* 18: 86-95. doi: 10.16/j.chom.2015.06.009.

Soghaier M.A., Mahmood S.F., Pasha O., Azam S.I., Karsani M.M., Elmangory M.M., et al. (2014). “Factors associated with dengue fever IgG sero-prevalence in South Kordofan State, Sudan, in 2012: Reporting prevalence ratios.” *J Infect Public Health*, 7: 54–61.

Stanaway J.D., Shepard D.S., Undurraga E.A., Halasa Y.A., Coffeng L.E., Brady O.J. (2016). “The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect. Dis*; 16: 712-713.

Staples J.E., Breiman R.F., Powers A.M. (2009). “Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease.” *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*; 49: 942-948. <https://doi.org/10.1086/605496>.

Tanabe I.S.B., Tanabe E.L.L., Santos E.C., Martins W.V., Araújo I.M.T.C., Cavalcante M.C.A., Lima A.R.V., Câmara N.O.S., Anderson L., Yunusov D., Bassi Ê.J. (2018). “Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection.” *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:345. doi: 10.3389/fcimb.2018.00345.

Tandale B.V., Sathe P.S., Arankalle V.A., Wadia R.S., Kulkarni R., Shah S.V., Shah S.K., Sheth J.K., Sudeep A.B., Tripathy A.S., Mishra A.C. (2009). “Systemic involvements and fatalities during chikungunya epidemic in India, 2006.” *J Clin Virol*, 46: 145-149. 10.1016/j.jcv.2009.06.027

Tharmarajah, K., Mahalingam, S., & Zaid, A. (2017). "Chikungunya: vaccines and therapeutics." *F1000Research*, 6, 2114. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12461>.

Torres J.R., Falleiros-Arlant L.H., Duenas L. (2016). Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. *Int. J. Infect. Dis.* 51: 85-88.

Undurraga E.A., Halasa Y.A., Shepard D.S. (2013). "Use of expansion factors to estimate the burden of dengue in Southeast Asia: a systematic analysis. *PLoS Negl Trop Dis*; 7: e2056. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002056>.

Vallée J., Dubot-Pères A., Ounaphom P., Sayavong C., Bryant J.E., Gonzalez J-P. "Spatial distribution and risk factors of dengue and Japanese encephalitis virus infection in urban settings: the case of Vientiane, Lao PDR: Spatial distribution of dengue and JEV." *Trop Med Int Health*. 2009; 14: 1134– 1142.

van den Berg B., Walgaard C., Drenthen J. (2014) "Guillain-Barre syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat. Rev. Neurol.* 10: 469-482.

Vazeille M., Mokusson L., Martin E., Failloux A-B. (2010). "Orally co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva." *PLoS Negl. Trop. Dis*; 4: e706. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000706>.

Verma A., Chandele A., Nayak K., et al. (2016). "High yield expression and purification of Chikungunya virus E2 recombinant protein and its evaluation for serodiagnosis." *J Virol Methods*.; 235: 73-79. doi:10.1016/j.jviromet.2016.05.003

Vogels C.B.F., Rückert C., Cavany S.M., Perkins T.A., Ebel G.D., Grubaugh N.D. (2019). "Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern?". *PLoS Biol* 17(1):e3000130. <https://doi.org/10.1371/journal.Pbio.3000130>.

Voss J.E., Vaney M.C., Duquerroy S., Vonnrhein C., Girard-Blanc C., Crublet E. (2010). "Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 468: 709-712. doi: 10.1038/nature09555.

Wahala W.M & Silva A.M. (2011) "The human antibody response to dengue virus infection. *Vir*.; 3: 2374-2395.

Wahid B., Ali A., Rafique S & Idrees M. (2017). "Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history." *Int. J. Infect. Dis.* 58: 69-76. doi: 10.1016/j.ijid.2017.03.006.

Walker, K. R., Joy, T. K., Ellers-Kirk, C., & Ramberg, F. B. (2011). "Human and Environmental Factors Affecting *Aedes aegypti* Distribution in an Arid Urban Environment." *J Am Mosquito Control Assoc*, 27(2), 135–141.

Wang A., Thurmond S., Islas L., Hui K., Hai R. (2017). “Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg. Microbes Infect*: 6 e13-e13.

Wayhono T.Y.M., Nealon J., Beucher S., Prayitno A., Moureau A., Nawawi S. (2017). “Indonesian dengue burden estimates: review of evidence by an expert panel. *Epidemiol. Infect*; 1-6. <https://doi.org/10.1017/S0950268817001030>.

Weaver S.C., Charlier C., Vasilakis N., Lecuit M. (2018). “Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases.” *Annu. Rev. Med.* 69: 395-408. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>.

Weaver S.C., Lecuit M. (2015). “Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N. Engl. J. Med.* 372: 1231-1239.

Weaver S.C., Reisen W.K. (2010). “Present and future arboviral threats.” *Antivir. Res.* 85: 328-345.

Weber C., Büchner S.M. & Schnierle B.S. (2015). “A small antigenic determinant of the Chikungunya virus E2 protein is sufficient to induce neutralizing antibodies which are partially protective in mice. *PLoS Negl Trop. Dis.* 9: e0003684. doi: 10.1371/journal.pntd.0003684.

Webster R.G. (1966) “Disquisitions of original antigenic sin. I. Evidence in man. *J. Exp. Med.* 124: 331-345.

Weiskopf D. (2013). “Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 2046-2053.

Wielanek A.C., Monredon J.D., Amrani M.E. (2007). Guillain-Barre syndrome complicating a Chikungunya virus infection. *Neurol.* 69: 2105-7.

Wolfe N.D., Dunavan C.P., Diamond J. (2007). “Origins of major human infectious diseases” *Nat.* 2007; 447: 279-283. <https://doi.org/10.1038/nature05775>.

World Health Organization & Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. WHO https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44188/1/9789241547871_eng.pdf (2009).

World Health Organization. Dengue Hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control 2nd ed. (WHO Press, 1997).

Wu K.M. & Riley S. (2014). “Simulation-guided design of serological surveys of the cumulative incidence of influenza infection. *BMC Infect Dis*; 14: 505. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-505>.

Yap G., Pok K-Y., Hapuarachchi H-C., Chow A., Leo Y-S., Tan L-K., Ng L-C. (2010). “Evaluation of Chikungunya Diagnostic Assays: Differences in Sensitivity of Serology Assays in Two Independent Outbreaks. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e753.

Yauche L.E. (2009). "A protective role for dengue virus-specific CD8+." *J. Immunol.* 182: 4865-4873.

Zhang Y. (2004). "Conformational changes of the flavivirus e glycoprotein. *Struct.* 12: 1607-1618.

Zompi S., Santich B.H., Beatty P.R. (2012). "Protection from secondary dengue virus infection in a mouse reveals the role of serotype cross-reactive B and T cells. *J. Immunol.* 188: 404-416.

Anexo 1. CUESTIONARIO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHAVEZ"
DIVISION ESTUDIOS DE POSGRADO
LABORATORIO DE HEMOSTASIA Y BIOLOGIA VASCULAR

FECHA: _____

NOMBRE: _____ SEXO: _____ EDAD: _____

ORIGEN: _____ RESIDENCIA: _____

OCUPACIÓN: _____ ESTADO CIVIL: _____

TEL: ____ (____) _____

1. Enfermedades concomitantes.

	Sí	No
• ¿Padece Diabetes Mellitus?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• ¿Padece Hipertensión arterial?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• ¿Padece de alguna enfermedad?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
○ ¿Cuál? _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• ¿Ha padecido Dengue, Chikungunya o Zika?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• ¿Ha padecido dolor articular incapacitante, aparente?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
○ ¿Cuándo? _____	sin	causa
• ¿Ha padecido fiebre, por más de 3 y menos de 7 días, aparente?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
○ ¿Cuándo? _____	sin	causa
• ¿Ha presentado exantema sin causa aparente?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
○ ¿Cuándo? _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• ¿Has viajado a Tierra Caliente o La costa, en los últimos 6 meses?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
○ ¿Cuándo? _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2. Medicamentos.

- ❖ Toma usted algún medicamento: Sí _____ No _____
 - En caso de respuesta afirmativa, dosis y frecuencia _____

3. Medidas antropométricas.

Peso		Talla		IMC	
-------------	--	--------------	--	------------	--

IMC (Kg/m²)	Clasificación
18.5-24.9	Normal
25-29.9	Sobrepeso
>30	obesidad



4. Signos vitales.

Presión arterial sistólica	
Presión arterial diastólica	
Temperatura	

5. Marcadores bioquímicos.

Variables de estudio	Cuantificación sérica de anticuerpos contra Dengue	
	Cualtificación sérica de anticuerpos contra Chikungunya	
	Cuantificación sérica de anticuerpos contra Zika	
Biometría Hemática	Cuenta de plaquetas	
	VPM	
Biomarcadores inflamatorios	TNF-alfa	
	IL-6	
	IL-1	

Anexo 2

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.
FECHA

NOMBRE, FIRMA DEL PACIENTE Y

FIRMA DE TESTIGO I Y FECHA

FIRMA DE TESTIGO II Y FECHA

Anexo 3. Aprobación del protocolo por el Comité de Investigación y el Comité de Ética en Investigación del Hospital General “Dr. Miguel Silva”.



Gobierno del Estado
de Michoacán de Ocampo

Dependencia SECRETARIA DE SALUD DE MICHOACÁN
Sub-dependencia HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"
Oficina DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA
No. de oficio 5009/388/18
Expediente
Asunto: SE INFORMA SOBRE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

2018, AÑO DEL CENTENARIO DE LA CONSTITUCION POLITICA DEL ESTADO LIBRE Y SOBERANO DE MICHOACAN DE OCAMPO

Morelia, Michoacán, 23 de abril del 2018.

C. DRA. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL
PRESENTE S.

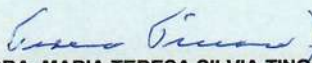
Por este conducto informo a ustedes, que el Comité de Ética en Investigación con número de registro Conbioética-16-CEI-004-20161212 de fecha de expedición 12 de diciembre del 2016 y el Comité de Investigación con número de Registro 17-CI-16053153 con fecha de expedición 11 de noviembre del 2017 de este Hospital General “Dr. Miguel Silva” **revisaron y aprobaron** el protocolo de investigación titulado;


“Estudio de seroprevalencia de enfermedades causadas por arbovirus Zika, Dengue y Chikungunya en individuos aparentemente sanos en la ciudad de la ciudad de Morelia.

No omito mencionar que deberán presentar a estos comités el informe final de su proyecto de investigación para lo cual deberá solicitar los criterios específicos a la Unidad de investigación.

Sin más por el momento, le envió un cordial saludo.

ATENTAMENTE


DRA. MARIA TERESA SILVIA TINOCO ZAMUDIO
PRESIDENTA DEL COMITE DE ETICA EN INVESTIGACION
DEL HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"


DR. JOSÉ FRANCISCO LÓPEZ BELTRÁN
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE
INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL
GENERAL "DR. MIGUEL SILVA".



Anexo 4. Aprobación del protocolo por el Comité de Investigación y Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez".



Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"

SECRETARÍA ACADÉMICA
A S U N T O: INFORMACIÓN

Morelia, Mich., 01 de Junio de 2018.

C. DRA. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL
PROFESOR INVESTIGADOR DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
P R E S E N T E

Le notifico que el protocolo de investigación que Usted presentó ante esta Secretaría Académica a mi cargo, y cuyo título es "**Estudio de seroprevalencia de enfermedades causadas por arbovirus zika, dengue y chikungunya en individuos aparentemente sanos en la ciudad de Morelia**" y que fue sometido a la evaluación del Comité de Investigación y Ética en Investigación de esta Dependencia Universitaria, quien (es) de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación vigentes, por lo que el protocolo fue **AUTORIZADO**, habiéndose asignado el número de registro de la dependencia siguiente:

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ETICA EN INVESTIGACIÓN	ÁREA	Nº DE REGISTRO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHÁVEZ"	POSGRADO	002/P/5/2018

Se le solicita informar del grado de avance del mismo acorde al cronograma de actividades así como el título de la revista, volumen, año y páginas una vez que el mismo sea publicado. En caso de que el mismo contemple la graduación de un alumno indicar fecha y grado académico obtenido.

Atentamente:


DR. MARIO MIGUEL ANGEL HERRERA CHAYRES
SECRETARIO ACADÉMICO



c.e.p. Coordinador de la Investigación Científica. UMSNH
c.e.p. Archivo y Correspondencia de la Facultad.
c.e.p. Archivo de la Secretaría Académica.
c.e.p. Jefatura de Investigación Fac Cs Med y Biol. "Dr. Ignacio Chávez"
DR.MMAHC/CAA