

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE
PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ARTRÓPODOS VECTORES, EN
PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL EN LA REGIÓN FRONTERIZA DEL SUR
DE MÉXICO

Por

Q.F.B José de Jesús Lugo Trampe

Como requisito para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con acentuación en Entomología Médica.

Agosto del 2019



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



FCB-SP-1185/2019

QFB JOSÉ DE JESÚS LUGO TRAMPE

Alumno de la Maestría en Ciencias con
Acentuación en Entomología Médica
Presente.-

Por medio de la presente me permito informar, que en sesión del Comité Académico de Maestría celebrada el día 27 de agosto del 2019, fue **APROBADA** la tesis titulada: "Diagnóstico molecular y caracterización genética de patógenos transmitidos por artrópodos vectores, en pacientes con síndrome febril en la región fronteriza del sur de México".

Asimismo le informo que puede seguir con los trámites Académicos correspondientes para su titulación.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Alere Flammam Veritatis"
Ciudad Universitaria, 27 de Agosto de 2019



DR. PABLO ZAPATA BENAVIDES
Secretario Técnico de Posgrado

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

c.c.p. Dr. Gustavo Ponce García. Director de Tesis.
c.c.p. archivo
mirthala

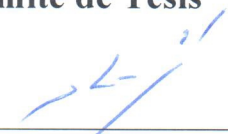


"Educación de clase mundial,
un compromiso social"


Ciudad Universitaria, C.P. 66455, A.P. 46 "F" San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
Tel. (81) 83294000 Ext 3651
katiushka.arevalonn@uanl.edu.mx

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN
GENÉTICA DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR
ARTRÓPODOS VECTORES, EN PACIENTES CON SÍNDROME
FEBRIL EN LA REGIÓN FRONTERIZA DEL SUR DE MÉXICO**

Comité de Tesis



Dr. Gustavo Ponce García
Director de Tesis



Dra. Adriana Elizabeth Flores Suarez
Secretario



Dra. Beatriz López Monroy
Vocal 1



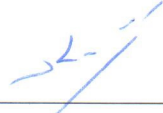
Dr. Raúl Torres Zapata
Vocal 2



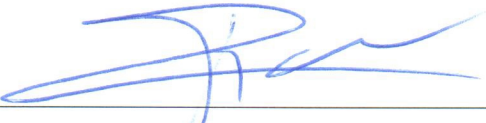
Dr. Ildelfonso Fernández Salas
Vocal 3

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN
GENÉTICA DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR
ARTRÓPODOS VECTORES, EN PACIENTES CON SÍNDROME
FEBRIL EN LA REGIÓN FRONTERIZA DEL SUR DE MÉXICO**

Comité de Tesis



Dr. Gustayo Ponce García
Director de Tesis



Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez
Director externo

INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
3.	ANTECEDENTES.....	4
3.1	PATOGENOS Y DIAGNÓSTICOS.....	7
3.2	MÉTODOS USADOS EN EL DIAGNÓSTICO VIRAL.....	8
3.2.1	<i>Métodos de tradicionales para el diagnóstico de infecciones virales</i>	9
3.2.1.1	Microscopio electrónico (EM).....	9
3.2.1.2	Cultivo celular.....	9
3.2.1.3	Fijación del complemento (CFT).....	10
3.2.1.4	Inhibición de la hemaglutinación.....	11
3.2.2	<i>Métodos recientes en el diagnóstico de infecciones virales</i>	11
3.2.2.1	Basadas en inmunoanálisis.....	11
3.2.2.1.1	Radioinmunoensayo (RIA).....	13
3.2.2.1.2	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	13
3.2.2.1.3	Ensayo de inmunofluorescencia (IFA).....	13
3.2.2.2	ENSAYOS BASADOS EN AMPLIFICACIÓN.....	14
3.2.2.2.1	PCR en tiempo real.....	15
3.2.2.2.2	Amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA)....	15
3.2.2.2.3	Amplificación mediada por transcripción (TMA).....	16
3.2.2.2.4	Secuenciación de próxima generación (NGS).....	16
3.2.2.3	Espectrometría de masas (EM).....	17
3.3	FAMILIAS DE ARBOVIRUS DE IMPORTANCIA MÉDICA Y VETERINARIA.....	17
3.3.1	<i>Bunyaviridae</i>	18
3.3.2	<i>Flaviviridae</i>	20
3.3.2.1	Genero flavivirus.....	20
3.3.2.1.1	Virus del dengue.....	21

3.3.2.1.2	Virus Zika.....	22
3.3.2.1.3	Virus de la fiebre amarilla.....	23
3.3.3	<i>Togaviridae</i>	24
3.3.3.1	Género Alphavirus.....	24
3.3.3.1.1	Virus Chikungunya.....	26
3.3.3.1.2	Virus de Mayaro (MAYV).....	26
3.4	OTROS PATÓGENOS TROPICALES VIRALES Y BACTERIANOS	27
3.4.1	<i>Leptospira spp.</i>	27
3.4.2	<i>Rickettsia spp.</i>	28
3.5	DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN ENFERMEDADES ARBOVIRALES, LEPTOSPIROSIS Y RICKETSIOSIS.....	28
3.5.1	<i>Pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico simultaneo para DENV y ZIKV</i> 28	
3.5.1.1	Pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico específico para DENV	29
3.5.1.2	Pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico específico para ZIKV	29
3.5.2	<i>Pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico específico para CHIKV</i>	31
3.5.3	<i>Pruebas comerciales para CHIKV, DENV y ZIKV</i>	32
3.5.4	<i>Diagnóstico molecular para leptospirosis</i>	32
3.5.5	<i>Diagnóstico molecular para Rickettsiosis</i>	33
3.5.6	<i>Búsqueda simultanea de patógenos por métodos moleculares</i>	34
3.6	RELEVANCIA PARA LA SALUD PÚBLICA	35
4	JUSTIFICACIÓN.....	38
5	HIPÓTESIS.....	39
6	OBJETIVOS.....	40
6.1	OBJETIVO GENERAL.....	40
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
7	MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
7.1	GRUPO DE ESTUDIO	41
7.2	DISEÑO DEL ESTUDIO	41
7.3	UNIVERSO DE TRABAJO	41

7.4	CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	41
7.4.1	<i>Criterios de inclusión</i>	41
7.4.2	<i>Criterio exclusión</i>	42
7.4.3	<i>Criterio Eliminación</i>	42
7.5	ÁREA DE TRABAJO	42
7.6	MATERIAL BIOLÓGICO.....	42
7.6.1	<i>Extracción de ARN con columna QIAGEN</i>	43
7.6.2	<i>Detección de ARN viral para DENV, CHIKV y ZIKV por PCR tiempo real</i> ...	44
7.6.3	<i>Conversión a ADNc</i>	45
7.6.4	<i>PCR-anidada para flavivirus</i>	46
7.6.5	<i>PCR-anidada para alfavirus</i>	50
7.6.6	<i>Extracción de ADN</i>	54
7.6.7	<i>PCR tiempo real con Sybr-green para leptospirosis y rickettsiosis</i>	54
7.6.8	<i>Purificación de bandas de gel de agarosa</i>	56
7.6.10	<i>Pruebas estadísticas</i>	58
8	RESULTADOS	60
8.1	MANIFESTACIONES CLÍNICAS EVALUADAS	60
8.2	DETECCIÓN DE ARN VIRAL PARA DENV, CHIKV Y ZIKV POR PCR TIEMPO REAL 61	
8.3	DETECCIÓN DE FLAVIVIRUS POR PCR ANIDADA	64
8.4	DETECCIÓN DE ALFAVIRUS POR PCR ANIDADA	66
8.5	SÍNTOMAS CLÍNICOS ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS	73
9	DISCUSIÓN.....	76
10	CONCLUSIONES.....	82
11	ANEXOS.....	83
12	BIBLIOGRAFÍA	95

Índice de figuras

FIGURA	TITULO	PÁGINA
1	distribución de arbovirus	4
2	Ciclo de transmisión de las arbovirosis.	6
3	Cuadro clínico general de la mayoría de los arbovirus	8
4	Mapa de calor de mayor proporción de vectores capaces de transmitir algún arbovirus.	27
5	Total de muestras recolectadas con signos y síntomas sugerentes a infección por arbovirus.	60
6	Manifestaciones clínicas de los casos	61
7	Muestras positivas para CHIKV, DENV y ZIKV detectadas por qPCR en los dos periodos de recolección	62
8	Grafica de amplificación donde se observan muestras positivas para DENV	63
9	Grafica de presencia/ausencia para las muestras analizadas para virus DENV	63
10	Gel de agarosa donde se muestra la positividad a flavivirus con por la técnica de PCR anidada.	64
11	Electroferograma de la muestra No. 72 positiva para la PCR de flavivirus	65
12	Ejemplo de análisis de búsqueda de coincidencia con BLAST para flavivirus	65
13	Gel de agarosa donde se observas las muestras positivas para la detección de alfavirus por la técnica de PCR anidada	66
14	Electroferograma de la muestra No. 11 positiva para la PCR de alfavirus	67
15	Ejemplo de análisis de búsqueda de coincidencia con BLAST para alfavirus	67
16	Grafica de muestras positivas a alfavirus y flavivirus detectadas por PCR anidada.	68

17	Ejemplo de las curvas de amplificación y fusión para la reacción de detección de <i>Leptospira</i>	68
18	Gel de agarosa donde se observan las muestras positivas para la detección de <i>Leptospira</i>	69
19	Electroferograma de la muestra No. 7 positiva por PCR para leptospira	69
20	Ejemplo de análisis de búsqueda de coincidencia con BLAST para leptospira	70
21	Resultados obtenidos para la búsqueda de Leptospirosis y Rickettsiosis	70
22	Reporte de datos epidemiológicos obtenido para arbovirosis y otros patógenos que presentan síntomas sugerentes a infección por arbovirosis	71
23	Grafica de detección de los diversos patógenos empleando diferentes métodos de detección molecular	72
24	Resultados obtenidos por patógeno en ambos periodos recolectados	73
25	Manifestaciones clínicas presentes en ZIKV + y CHIKV +.	75

índice de tablas

TABLA	TITULO	PÁGINA
1	Descripción general de los ensayos RT-RCR para la detección de la infección por DENV y ZIKV	30
2	Descripción general de los ensayos PCR para la detección de la infección por CHIKV	31
3	Descripción general de ensayos de PCR para la detección de Leptospirosis	33
4	Descripción general de ensayos de PCR para la detección de Rickettsiosis	34
5	Secuencia de Iniciadores y Sondas para ZIKV, CHIKV y DENV	44
6	Mezcla de Reacción para la Detección Molecular de ZIKV, CHIKV o DENV	45
7	Programa para la detección por qRT-PCR	45
8	Mezcla de reacción para la conversión a ADNc	46
9	Secuencia de iniciadores flavivirus	46
10	Mezcla de reacción para la PCR cFD2-MAMD	47
11	Programa de reacción para la PCR cFD2-MAMD	47
12	Mezcla de reacción para la PCR anidada cFD2-FS778	48
13	Programa de reacción para la PCR anidada cFD2-FS778	48
14	Programa de reacción para la conversión de cADN para flavivirus	49
14	Mezcla de reacción para el proceso de secuenciación para flavivirus	49
16	Programa de reacción para el procesos de secuenciación	49
17	Secuencia de iniciadores <i>alfavirus</i>	50
18	Mezcla de reacción de PCR para <i>alfavirus</i>	51
19	Programa de reacción de PCR para <i>alfavirus</i>	51
20	Mezcla de reacción de PCR-anidada para <i>alfavirus</i>	52
21	Programa de reacción de PCR-anidada para <i>alfavirus</i>	52
22	Programa de reacción para la conversión de cADN para alfavirus	53

23	Mezcla de reacción para el proceso de secuenciación para alfavirus	53
24	Programa de reacción para el proceso de secuenciación para alfavirus	53
25	Secuencia de iniciadores leptospirosis y rickettsiosis	55
26	Mezcla de reacción por qPCR para rickettsiosis	55
27	Mezcla de reacción por qPCR para leptospirosis	56
28	Programa de reacción por qPCR para rickettsiosis y leptospirosis	56
29	Mezcla de reacción para el proceso de secuenciación para leptospirosis	57
30	Programa de reacción para el proceso de secuenciación para leptospirosis	57
31	Características clínicas de pacientes con ZIKV + y CHIKV +	74

ABREVIATURAS y SÍMBOLOS

(-)ssRNA	ARN monocatenario de sentido negativo
(+)ssRNA	ARN monocatenario de sentido positivo
°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AMV	Virus de la mieloblastosis aviar
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASFV	Asfarviridae
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCFHV	Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo
CDC	Centro de control y prevención de enfermedades
CFT	Fijación del complemento
CHIKV	Virus chikungunya
CSF	Cerebroespinal
DENV	Virus del dengue
ECP	Efecto citopático
EEEV	Virus de la encefalitis equina del este
EIA	Inmunoensayos ligado a enzimas
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EM	Microscopio electrónico
EM	Espectrometría de masas
HA	Hemaglutinina
I.S.S.S.T.E	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
IF	Inmunofluorescencia
IFA	Ensayo de inmunofluorescencia
Ig	Inmunoglobulinas

IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
ISF	Flavivirus específicos de insectos
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
kb	Kilobases
kDa	KiloDaltons
LACV	Virus La Crosse
m/z	Masa a carga
MAYV	Virus de Mayaro
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MWAV	Virus Mwinilunga
NAATs	Pruebas de amplificación de ácido nucleico
NASBA	Amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico
NGS	Secuenciación de próxima generación
nm	Nanometros
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONNV	Virus o'nyong-nyong
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimeraza
poli-A	Cola poliadelinada
qPCR	PCR en tiempo real ó cuantitativa
RBC	Eritrocitos de oveja sensibilizados
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN vírico
RIA	Radioinmunoensayo
RNP	Ribonucleoproteína
rpm	Revoluciones por minuto
RRV	Virus del río Ross
RT	Transcriptasa iversa

RT-PCR	PCR de transcripción inversa
RVFV	Virus de la fiebre del Valle del Rift
SBV	Virus Schmallerberg
SFG	Grupo de fiebre moteada
SFTSV	Virus del síndrome de trombocitopenia
SFV	Virus Semliki Forest
SINV	Virus Sindbis
spp	Varias especies del mismo genero
TALV	Virus Taï Forest
TBEV	Virus de la encefalitis transmitidas por garrapatas
TMA	Amplificación mediada por transcripción
UTR	Región no traducida
VEEV	Virus de la encefalitis equina venezolana
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VNO	Virus del Nilo Occidental
WEEV	Virus de la encefalitis equina occidental
WNV	Virus del oeste del nilo
YFV	Virus de la fiebre amarilla
ZIKV	Virus Zika
μL	Microlitros
μM	Micromolar

1. RESUMEN

Las enfermedades producidas por arbovirus son un problema de salud a nivel mundial, el 17 % de enfermedades infecciosas en el mundo provienen de transmisión por vectores. En regiones endémicas, la fiebre es la razón principal para que las personas busquen atención médica, dada la presentación clínica no específica de diversas infecciones, pocos pacientes reciben un diagnóstico preciso y específico, y el resto sigue siendo desconocido. El objetivo de este trabajo fue explorar la epidemiología y la utilidad de herramientas diagnósticas en pacientes con cuadros febriles, en una región del sur oeste mexicano. Se recolectaron 253 sueros de pacientes con cuadro clínico sugerente de infección por arbovirus. Las manifestaciones clínicas presentadas en los pacientes destacaron fiebre, cefalea y escalofríos; en dos periodos comprendido de abril-junio del 2015 y febrero-marzo del 2016. Las muestras fueron evaluadas por qPCR sonda específico para ZIKV, CHIKV y DENV. Con respecto a las muestras negativas en el primer tamizaje (67 muestras) se les realizó una segunda prueba, PCR-anidada específica para los géneros flavivirus y alfavirus, Las muestras positivas (44 muestras) fueron confirmados por secuenciación. Las muestras negativas restantes (23 muestras) se les determino la presencia de leptospirosis y rickettsiosis por medio de qPCR con SYBR Green, el producto de PCR obtenido de los casos positivos (8 muestras) fueron confirmados por secuenciación. El ensayo por qPCR sonda específica logro detectar el 70.75% casos positivos para CHIKV, 2.37% para ZIKV y 0.39% en DENV. El poder de detección por PCR anidada se vio aumentada para ZIKV y CHIKV, 75.49% y 15.01%, respectivamente. Se encontraron 8 muestras positivas para *Leptospira kmetyi* en las muestras negativas por qPCR sonda específica y PCR anidada para alfavirus y flavivirus. Se logró diagnóstico en el 94% de los casos totales con la combinación de diferentes técnicas diagnósticas. La introducción de una técnica alternativa aumento el poder de detección en este estudio. Se reporta por primera vez en la región fronteriza de México la presencia de *L. kmetyi*.

2. INTRODUCCIÓN

Países de toda América Latina continúan siendo focos de enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes afectando a millones de personas (Pena-García et al., 2017). Los brotes de tales enfermedades tienen un impacto significativo en la salud y el desarrollo económico en la Región. Prácticamente los 40 países latinoamericanos han informado epidemias de enfermedades infecciosas emergentes en los últimos años con el potencial de propagación global (CDC, 2018b; T Wu et al., 2017). Estas amenazas epidémicas siguen siendo potencialmente devastadoras para el desarrollo social y económico de la Región, combinado con el riesgo de propagación internacional. La necesidad de prevenir, detectar y responder a cualquier enfermedad infecciosa que represente una amenaza para la seguridad sanitaria mundial sigue siendo una prioridad nacional, regional e internacional (Morens & Fauci, 2013).

Específicamente, enfermedades causadas por arbovirus se encuentran entre los problemas de salud pública más importantes relacionados con las enfermedades infecciosas (Gubler, 2001), aproximadamente el 17% de todas las enfermedades en el mundo provienen de enfermedades transmitidas por vectores, la CDC ha enumerado un catálogo de arbovirus de 537, de los cuales aproximadamente 134 se ha demostrado que causan enfermedades en humanos. El modo de transmisión a los humanos principalmente es a través de picaduras de mosquito, garrapatas, moscas (OMS, 2017).

En México, la amplia distribución de climas tropicales y subtropicales, el crecimiento poblacional (de 114 millones en el 2007 a 132 millones en el 2018) (countrymeters, 2018), comercio exterior, turismo, migración, la urbanización en los últimos 20 años los hace más susceptibles (Group, 2018), fomentando la propagación de enfermedades transmitidas por mosquitos. Por ejemplo, DENV ha causado brotes en diferentes regiones regularmente durante varias décadas (Torres-Galicia et al., 2014) y el virus CHIKV se introdujo en 2014 y posteriormente se extendió a todo el territorio (Nava-Frías et al., 2016). En consecuencia, se pronosticó que parte del territorio estaría en alto riesgo de

transmisión del ZIKV (Messina et al., 2016) con un riesgo concomitante de casos de enfermedad asociada al ZIKV grave (Rather et al., 2017).

La tasa de infección por arbovirus suelen ser altas dentro de la población en riesgo. Sin embargo, la mayoría de las personas infectadas tendrán una enfermedad leve, asintomática o inespecífica, y solo un puñado de las infectadas desarrollará uno de los síndromes clínicos reconocibles. En el caso de los flavivirus, la relación entre el caso y la infección suele ser baja, por ejemplo, JEV es de 1:300 (Nitattattana et al., 2008), mientras que los alfavirus 1:40 a 1:3 (Young et al., 2009), por consecuencia, la presentación clínica de las infecciones por arbovirus de origen tropical son muchos e incluyen un amplio espectro y similitud, sumando la respuesta inmune variable del huésped al patógeno, de acuerdo a su genotipo (Fang et al., 2012; Li et al., 2018; Sun & Kochel, 2013).

Es importante determinar la técnica de detección a emplear basándose en la información clínica, tiempo de presentación de la sintomatología y sospecha de patógeno, ya que de esto depende el éxito de las pruebas, esta nos puede proporcionar un indicador útil de la enfermedad, aunque algunas se utilizan como herramientas de investigación porque requieren mano de obra, son costosas y lentas (Mackay et al., 2002). Las técnicas más nuevas son mucho más rápidas y menos costosas usándose ampliamente, siendo más prácticas y oportunas para el diagnóstico de rutina (Gunson et al., 2006). Como objetivo de este estudio es Caracterizar molecular y genética de patógenos transmitidos por artrópodos vectores, en muestras de pacientes con síndrome febril en la región fronteriza del sur de México .

3. ANTECEDENTES

Los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) están ampliamente distribuidos y predominan en las zonas tropicales. Estos virus se mantienen en la naturaleza por ciclos epidemiológicos que involucran huéspedes-vertebrados y vectores-artrópodos hematófagos, principalmente mosquitos, garrapatas y moscas (Bichaud et al., 2014). El centro de control y prevención de enfermedades (CDC) ha reportado 537 arbovirus causantes de enfermedades en humanos (CDC, 2018a), todos estos, alrededor del mundo y la mayoría no suele co-existir en la misma región, por tal motivo, es de suma importancia tener un monitoreo estricto por cualquier brote en alguna región virgen (Figura 1).

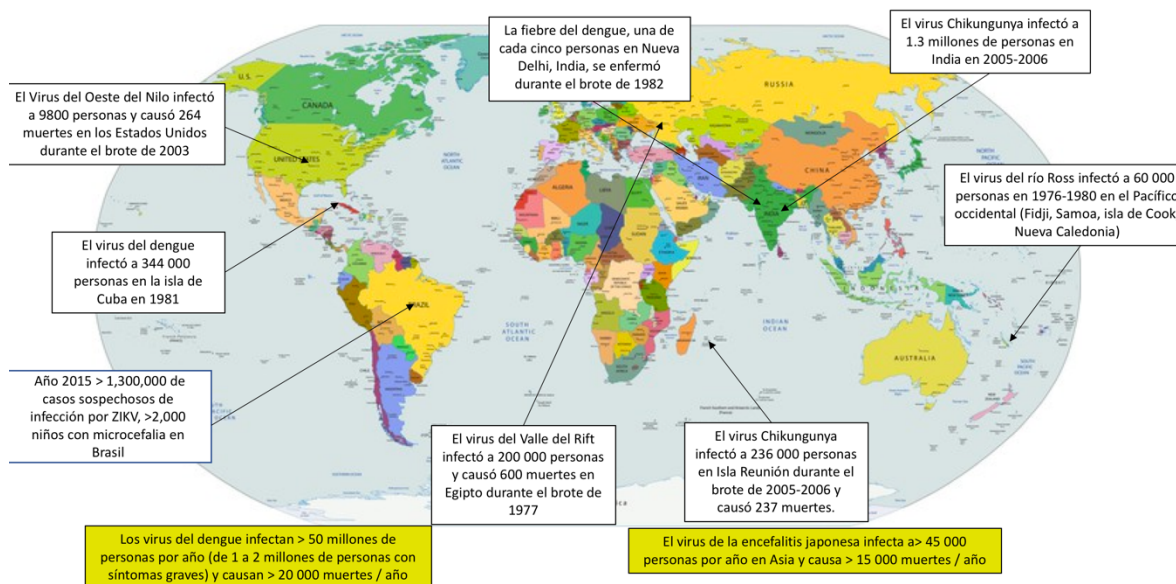


Figura 1. Países donde se han presentado brotes por arbovirus. Imagen tomada de (Devaux, 2012).

Los mosquitos hembras son infectados por arbovirus durante la hematofagia en huéspedes de amplificación, humanos, aves o primates. La competencia vectorial es un componente de la capacidad del vector y comprende una variedad de factores biológicos y genéticos que combinados determinan la capacidad del invertebrado para transmitir agentes infecciosos (Beerntsen et al., 2000). Después de un período extrínseco de incubación de 8 a 14 días, se establece una infección persistente de por vida en las glándulas salivales de

vectores competentes (Forrester et al., 2014). Aunque es menos frecuente, la transmisión transovárica y venérea también ocurre en los mosquitos (Coffey et al., 2013).

Taxonómicamente, los arbovirus se clasifican en morfología, propiedades antigénicas, mecanismos de replicación y estrategias genéticas. La mayoría pertenece a las familias de *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* y *Rhabdoviridae*. Solo se conoce un ejemplo de un arbovirus de ADN, el virus de la peste porcina africana (ASFV, *Asfarviridae*) que se transmite por garrapatas (Tulman et al., 2009). El ciclo de transmisión enzoótica natural (Figura 2), comienza cuando un vector toma una comida de sangre de un huésped vertebrado infectado. Los huéspedes animales a menudo son roedores, aves y primates. El patógeno se envía al intestino medio donde debe atravesar el epitelio, escapar del intestino medio y cruzar al hemocele. Seguido debe replicarse dentro de tejidos y diseminarse a las glándulas salivales, altas tasas virales se liberan en la saliva y pueden transmitirse a un nuevo anfitrión ingenuo adecuado cuando el artrópodo toma una comida posterior. La transmisión a los humanos puede tener lugar; aunque, en la mayoría de los casos, se consideran hospedadores sin salida ya que la viremia resultante suele ser demasiado baja para permitir que se produzca una transmisión posterior. Sin embargo, se ha observado una transmisión eficiente de los CHIKV, virus de la fiebre amarilla (YFV), DENV y ZIKV donde el ciclo enzoótico se ha perdido y estos virus son capaces de pasar entre mosquitos vectores y huéspedes humanos sin la necesidad de un intermediario animal (Durbin et al., 2013; Weaver, 2006; Weaver & Reisen, 2010). De esta manera, las epidemias extensas se pueden mantener de manera eficiente en las áreas urbanas. Además de la transmisión horizontal clásica, se documentan otras vías de transmisión, como la vertical (de un adulto infectado a su descendencia) y la transmisión venérea suelen ser menos comunes.

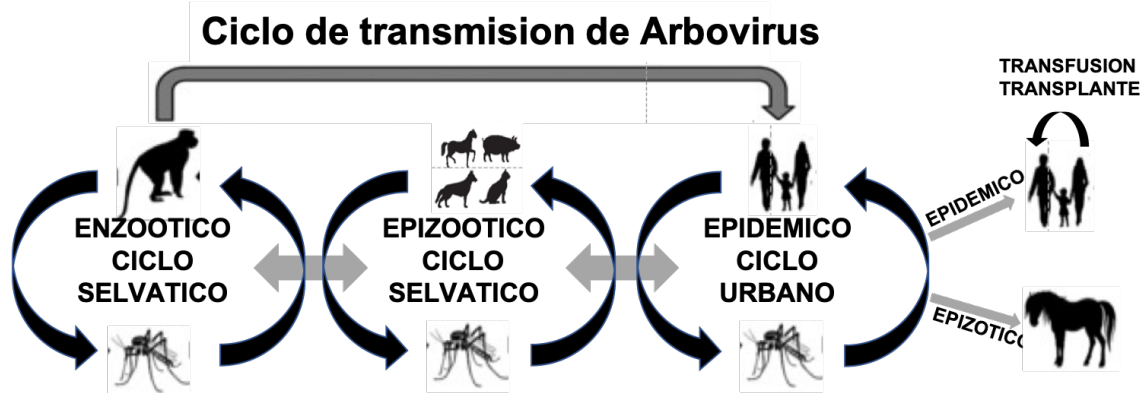


Figura 2. Los arbovirus cambian de ciclo entre vectores de artrópodos, como mosquitos, mosquitos y garrapatas, a huéspedes vertebrados susceptibles. Los anfitriones incluyen aves, mamíferos y primates subhumanos. Se producen infecciones humanas, pero la viremia es a menudo demasiado baja para permitir la transmisión posterior y, por lo tanto, se consideran hospederos terminales. Imagen tomada de (Anez et al., 2012).

Los viajes internacionales de hoy suelen ser intensos, haciendo más estrechas las comunicaciones y las interacciones entre personas de todo el mundo. Por otro lado, viajar también proporciona una vía para que las infecciones humanas que ayudan a que se propaguen rápidamente por todo el mundo (Gautret et al., 2012). Además, otros factores, como los cambios climáticos, el comercio internacional y el intercambio de mercancías (Tatem et al., 2006), son formas mediante las cuales las infecciones podrían ampliar su área geográfica de endemicidad. Particularmente cuando los vectores como los mosquitos juegan un papel en la propagación de la infección. El desafío actual para la prevención y el control de enfermedades transmisibles es encontrar una forma de minimizar estos riesgos y proteger a la población contra la propagación de enfermedades transmisibles. Es esencial considerar los efectos de las medidas de control, no solo en los viajeros, sino también en los que viven en países endémicos.

El panorama de las enfermedades infecciosas en los países tropicales es muy amplio. Dada la presentación clínica no específica de muchas infecciones que causan fiebre y los limitados servicios de clínicos disponibles en muchas áreas de bajos recursos, pocos pacientes reciben un diagnóstico preciso y específico y la importancia relativa de las diversas causas de la fiebre sigue siendo desconocida a nivel de la comunidad. A pesar de

esto, no siempre se realizan más investigaciones diagnósticas, lo que lleva a casos frecuentes de diagnósticos poco claros (Baba et al., 2013). Los investigadores suelen trabajar de manera independiente estudiando patógenos individuales o grupos de patógenos causantes de fiebre y muchos de ellos suelen ser negativos en pruebas serológicas o confirmatorias cuando se les evalúa al patógeno endémico.

3.1 PATOGENOS Y DIAGNÓSTICOS

Los desafíos de diagnóstico de las fiebres con origen tropical incluyen un amplio espectro y similitud de las presentaciones clínicas de enfermedades como DENV, CHIKV, ZIKV, leptospirosis e infecciones rickettsiales. También las infecciones gastrointestinales, las infecciones del tracto respiratorio y la septicemia pueden ser difíciles de distinguir de las enfermedades tropicales asociadas (Liu et al., 2016).

Los patógenos a considerar pueden variar, dependiendo de la información sobre los síntomas clínicos o el país de residencia tropical (Freedman et al., 2006). En vista de que la sintomatología rara vez es específica de la enfermedad, podría ser necesario un análisis más extenso. Además de qué enfermedad a sospechar y detectar, otro desafío es tener acceso a las herramientas adecuadas, lo que permite el diagnóstico correcto tanto en pacientes que residen en países endémicos como en viajeros que vuelven a casa con fiebre después de visitar dichas regiones. El momento y el tipo de muestras disponibles para el diagnóstico deben tenerse en cuenta al elegir los métodos de diagnóstico, tanto en relación con el tiempo de exposición, como durante cuánto tiempo el paciente ha estado sintomático (Hang et al., 2009). Además, el diagnóstico precoz podría ser importante para identificar las enfermedades que requieren tratamiento médico y para prevenir las complicaciones clínicas graves asociadas con una serie de infecciones.

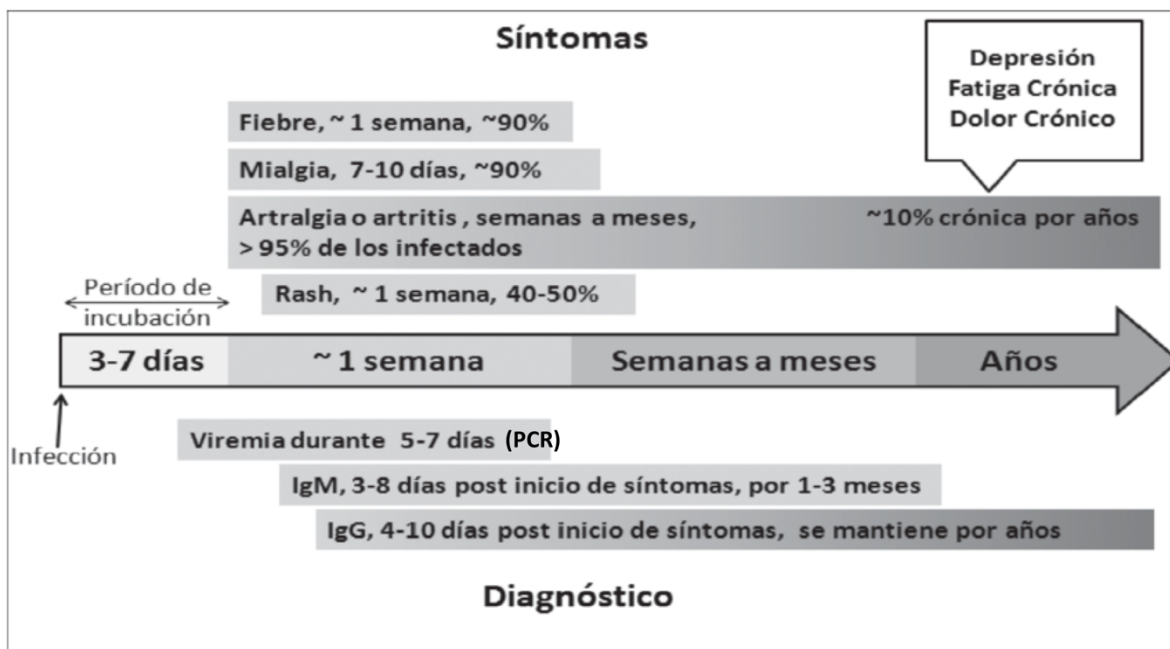


Figura 3. Cuadro clínico general de la mayoría de los arbovirus. Imagen tomada de (Corrales-Aguilar et al., 2014)

Las arbovirosis (Figura 3) muestran que en fase temprana de la infección, incluso poco antes de que los pacientes presenten algún síntoma, las partículas virales se vuelven presentes en el torrente sanguíneo. En la etapa inicial, el patógeno puede diagnosticarse con PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Unos días más tarde, cuando se produce la IgM (Inmunoglobulina M), la detección de anticuerpos IgM contra el patógeno se convierte en una posibilidad de diagnóstico. Cuando han transcurrido más de 5 días desde que el paciente presentó síntomas, es menos probable que obtenga un resultado positivo de PCR. Los diagnósticos después de la fase aguda tendrán que depender de la respuesta de anticuerpos. En la fase sintomática posterior y en la fase de convalecencia temprana, los anticuerpos IgG (Inmunoglobulina G) contra el patógeno aumentarán. El método de diagnóstico en esta etapa comparará el título de IgG de la fase sintomática temprana con el nivel de IgG en la fase de convalecencia.

3.2 MÉTODOS USADOS EN EL DIAGNÓSTICO VIRAL

El aislamiento viral y una serie de métodos para la detección de antígenos virales, ácidos nucleicos y anticuerpos (serología) son el repertorio central de las técnicas utilizadas para

el diagnóstico de laboratorio de infecciones virales. El aislamiento viral mediante cultivo celular casi siempre se realiza en laboratorios de virología designados. Los otros métodos también se pueden realizar en esos laboratorios, pero también se pueden realizar en diversas secciones de laboratorio, como microbiología general, serología, banco de sangre, química clínica, patología o virología molecular. Es probable que la tendencia a realizar pruebas de diagnóstico vírico fuera de los laboratorios de virología tradicionales se acelere, ya que las técnicas de diagnóstico rápido basadas en metodologías de ácido nucleico e inmunológico reemplazan cada vez más al cultivo viral.

3.2.1 Métodos de tradicionales para el diagnóstico de infecciones virales

3.2.1.1 Microscopio electrónico (EM)

En países desarrollados se ha considerado durante mucho tiempo una herramienta eficaz para la detección directa de virus mediante la visualización y el recuento de partículas virales en fluidos corporales, heces o muestras histopatológicas. La identificación se basa en las características morfológicas específicas de cada familia de virus y requiere una cierta cantidad de partículas virales (hasta 10⁶ partículas/ml). Sin embargo, la preparación de la muestra que se debe realizar de antemano puede reducir la concentración del virus, lo que dificulta el análisis (Goldsmith & Miller, 2009). Además, el microscopio electrónico requiere habilidades técnicas y experiencia sustanciales

La combinación de EM con métodos basados en cultivos ha demostrado una gran contribución en el diagnóstico de infecciones virales, junto con pruebas de serología para la detección de anticuerpos dirigidos contra el virus.

3.2.1.2 Cultivo celular

El cultivo celular es uno de los métodos más populares para aislar virus utilizando líneas celulares. Las condiciones de cultivo y la posibilidad de un cultivo positivo varían con el organismo específico y el material recolectado.

La evidencia del crecimiento del virus se ve a través del efecto citopático (ECP) que exhibe características y alteraciones específicas de las células (Robbins et al., 1950). La identificación definitiva del virus se realiza utilizando tinción de inmunofluorescencia (IF). Sin embargo, el aislamiento del virus mediante cultivo celular no es ideal en el caso de virus no susceptibles de crecimiento en líneas celulares (norovirus, virus de hepatitis) o que producen CPE (Papafraqkou et al., 2014).

Además, pequeños volúmenes de la muestra pueden no permitir la inoculación de muchos tipos de células y comprometer los resultados. Por ejemplo, la inoculación estándar de un medio de cultivo celular con muestra de fluido cerebroespinal (CSF) requiere un mínimo de 0,2 ml; sin embargo, se necesita mucho más para inocular una combinación de diferentes tipos de células, que podrían ser invasivas para el paciente (Hematian et al., 2016).

El tiempo requerido para aislar virus por cultivo celular es muy largo (semanas), lo que limita la utilidad de esta técnica cuando se necesita un diagnóstico rápido. El cultivo celular necesita personal altamente calificado y con experiencia para la interpretación precisa del ECP y las instalaciones adecuadas para el manejo de líneas celulares de mamíferos o virus altamente patógenos, es decir, una instalación BSL-3 o BSL4 (Roehr, 2016).

3.2.1.3 Fijación del complemento (CFT)

Es uno de los métodos más antiguos en la historia de la virología clínica (Casals & Palacios, 1941). El complemento reacciona solo con el complejo antígeno-anticuerpo de una manera no específica. Por lo tanto, en presencia del complejo, el complemento no es libre de interactuar con los eritrocitos de oveja sensibilizados (RBC) utilizados como indicador, y que permanecen sin lisar. La prueba se dice que es "positiva".

CFT es supuestamente fácil de realizar, conveniente y requiere material de bajo costo. Sin embargo, es laborioso y carece de sensibilidad. La estandarización interna a través de la valoración de los reactivos y la preparación de controles es crucial para obtener pruebas efectivas.

3.2.1.4 Inhibición de la hemaglutinación

Esta prueba generalmente se usa para detectar arbovirus, virus de la influenza y subtipos del virus parainfluenza y proporciona una cuantificación relativa de las partículas del virus. El principio se basa en la capacidad de la hemaglutinina (HA); una proteína viral presente en la envoltura, para unirse a los eritrocitos y para formar un patrón reticular denominado 'aglutinación'. En el ensayo, se agregan diluciones en serie del suero de muestra a una cantidad fija de HA viral y RBC aglutinables. Si los anticuerpos de Influenza están presentes en el suero, se previene el proceso de aglutinación. La tasa de dilución correspondiente a la que se observa y considera la hemoaglutinación completa.

Las variantes del ensayo de aglutinación se utilizan para el diagnóstico de una gama más amplia de enfermedades virales distintas de la gripe (Grandien et al., 1987; Ramalingam et al., 2002). Sin embargo, la prueba es lenta y exigente, especialmente en términos de control de calidad.

3.2.2 Métodos recientes en el diagnóstico de infecciones virales

3.2.2.1 Basadas en inmunoanálisis

Los anticuerpos producidos inmediatamente después de la invasión de una sustancia extraña pueden informar sobre infección primaria, reinfección o un estado de reactivación. Por lo tanto, medir el nivel de inmunoglobulinas (Ig) es un enfoque ampliamente considerado para el diagnóstico de infecciones virales.

Los métodos automáticos basados en inmunoensayos se encuentran entre los más utilizados para las pruebas, y son efectivos debido a la alta especificidad y afinidad de

unión entre el antígeno y el anticuerpo. Por lo tanto, el principio de la prueba se basa en la formación de un inmunocomplejo entre el anticuerpo presente en la muestra del paciente y el antígeno sintético presente en el reactivo o viceversa, para generar una señal mensurable.

Los inmunoensayos utilizan marcadores conjugados a anticuerpos o antígenos sintéticos que están unidos a una fase sólida, y se usan para capturar antígenos o anticuerpos correspondientes presentes en muestras de suero. Estas etiquetas podrían ser isótopos radiactivos, enzimas que provocan cambios de color o sustancias generadoras de luz. En consecuencia, este principio ha generado varias metodologías para la prueba.

Para la interpretación de los resultados, se necesita información clínica, ya que los títulos resultantes dependen de cuándo se tomaron las muestras en relación con el momento del inicio de la enfermedad. Los anticuerpos están dirigidos contra el patógeno. La especificidad de la respuesta dependerá del tipo de anticuerpo (IgM o IgG), el aumento en el título (IgG) y el patógeno (reactividad cruzada). En la fase aguda de la infección, después de una primera exposición al patógeno, el anticuerpo IgM es el anticuerpo más temprano que se encuentra. Se puede detectar poco después de que los síntomas han comenzado, el título sube durante un par de semanas y luego se desvanece. Si los anticuerpos IgM se encuentran dirigidos contra un patógeno específico, indica claramente la causa de la infección. Los títulos de IgG toman más tiempo antes de que sean detectables en una infección por primera vez con el agente patógeno específico. Una vez que los títulos de IgG han aumentado, por lo general permanecen en un nivel alto durante un período de tiempo más largo. El estudio de la respuesta de anticuerpos significa que también se puede hacer un diagnóstico cuando ha pasado la fase aguda de la replicación del patógeno, estudiando la respuesta inmune a la exposición. La reactividad cruzada puede ser un problema y, por ejemplo, es común entre los flavivirus (Stiasny et al., 2006). Por lo tanto, es importante ahora el estado de vacunación contra, por ejemplo, la YFV y la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV). Las reacciones inespecíficas pueden ocurrir en el serodiagnóstico, y es importante tenerlas en cuenta cuando se interpreta un resultado positivo.

3.2.2.1.1 Radioinmunoensayo (RIA)

Es probablemente el método de iniciación (1960); usa radioisótopos (como el Yodo 125) para marcar el antígeno o el anticuerpo. La cantidad de sustancia a analizar está determinada por la cantidad de radiactividad generada. RIA es un método muy sensible, pero el principal inconveniente es la manipulación y eliminación de sustancias radiactivas peligrosas.

Otras alternativas de marcaje enzimático que usa fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante como marcadores es la más utilizada y se consideró durante mucho tiempo un método de referencia (Engvall & Perlmann, 1972; Voller et al., 1976). Estas enzimas inducen la emisión de señales o cambian de color respectivamente, y permiten que se mida la cantidad de analito de interés. Este inmunoensayo ligado a enzimas (EIA) tiene numerosas variantes, incluyendo ELISA, y difieren en la enzima utilizada y el principio de detección de señal.

3.2.2.1.2 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

ELISA indirectos son utilizados para evaluar si hay una respuesta inmune (anticuerpos) en la muestra del paciente contra el patógeno. En este método, los pocillos en una placa de microtitulación están recubiertos con antígeno del patógeno. La muestra del paciente se agrega a la placa de microtitulación. Después del lavado, se agrega un segundo anticuerpo marcado contra el presunto complejo, así como un sustrato enzimático que permite que se desarrolle color si los anticuerpos de la muestra del paciente se han unido al patógeno. La reacción de color se evalúa luego y se lee en un lector de placa de fotómetro.

3.2.2.1.3 Ensayo de inmunofluorescencia (IFA)

Otra variante de EIA son los ensayos IFA los cuales las células cultivadas se infectan inicialmente con el patógeno. Las células se cultivan luego en portaobjetos de 12 pocillos

hasta una capa confluyente. El suero del paciente se diluye en serie y se agrega. Después de los pasos de lavado, posteriormente se agrega IgG de cabra antihumana marcada con fluoresceína. La reacción se evalúa y se estima la extensión de las células con fluorescencia citoplásmica usando un microscopio de fluorescencia (Vene et al., 1995).

3.2.2.2 ENSAYOS BASADOS EN AMPLIFICACIÓN

Desarrollado por Mullis y Faloona en 1987 (Mullis & Faloona, 1987), la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR ha revolucionado el campo del diagnóstico molecular. El ensayo de PCR básico se basa en la extracción y purificación del ácido nucleico, luego en la amplificación exponencial de la secuencia diana, usando una enzima polimerasa termoestable y cebadores específicos. Los amplicones resultantes se identifican utilizando un sistema de detección basado en fluorescencia, y el resultado se informa en unidades internacionales UI/ml.

Poco después de su invención, las modificaciones en la PCR fueron probadas y patentadas, con el objetivo de mejorar las capacidades de ensayo. El término pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAATs) se aplicó a este rango de nuevas variantes.

NAATs es muy popular en el diagnóstico y manejo de infecciones virales (VHB, VHC, VIH, virus de la influenza, etc) porque permiten la determinación de la carga viral. En otros términos, la cuantificación del ácido nucleico viral amplificando la secuencia objetivo millones de veces. En la mayoría de los casos, ahora se consideran un método de referencia o "estándar de oro" para las prácticas de diagnóstico por ejemplo en banco de sangre para los virus transmitidos por transfusión (Jackson, 1990).

Las variantes más ampliamente utilizadas de la amplificación convencional son la PCR en tiempo real (qPCR) y la PCR de transcripción inversa (RT-PCR). Ambos son ahora puntos de referencia en la evaluación de la carga viral, y mientras que el primer método cuantifica el ADN a lo largo de las reacciones en tiempo real (Ntziora et al., 2013); el segundo realiza la RT del ARNm (ARN mensajero) y amplifica el ADNc resultante (ADN

complementario). También cuantifica el ARN. La combinación de ambas técnicas aumenta la sensibilidad en la detección de virus.

3.2.2.2.1 PCR en tiempo real

La PCR amplifica el ADN o ADNc. Cuando se prepara ARN, por lo tanto, tendrá que transcribirse mediante transcriptasa inversa en ADNc. El método mide la amplificación de ADN después de cada ciclo, usando tintes fluorescentes. En la PCR en un solo paso en tiempo real, se incluye la transcripción inversa, y el producto de ADNc se amplifica luego. La PCR en tiempo real amplifica distintas partes de la cadena del genoma, definidas por las secuencias de los cebadores. Es importante que estos sean tan específicos y únicos como sea posible para el organismo que está tratando de encontrar. La qPCR es un método cualitativo. Si su objetivo es medir el producto, necesita un estándar que se incluya para ser cuantitativo. El método es específico, resultados positivos que dan un diagnóstico de alta precisión. El método tiene un límite bajo de detección, lo que significa que incluso se puede detectar una cantidad baja del patógeno. Sin embargo, las regiones objetivo para los cebadores y las sondas deben estar suficientemente preservadas. Se pueden desarrollar variaciones genéticas y nuevas cepas. Las especificidades de los cebadores para el ARN/ADN diana deben actualizarse y verificarse frecuentemente contra las secuencias del genoma para cepas nuevas y diferentes del patógeno de interés incluidas en una gran base de datos de secuencias genéticas y los ajustes necesarios de las secuencias de cebador deben realizarse.

3.2.2.2.2 Amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA)

Esta técnica amplifica específicamente el ARN, pero no el ADN (Heim et al., 1998). Una reacción de NASBA consiste en el virus de la mieloblastosis aviar (AMV), la transcriptasa inversa (RT), la ARN polimerasa T7 y la RNasa H con dos cebadores oligonucleotídicos para generar múltiples productos de ARN a 41°C. La amplificación es más de 10¹² veces en 90 a 120 minutos. Como NASBA es un proceso isotérmico, es posible. La reacción de

NASBA no obtiene falsos positivos causados por ADN genómico, como en el caso de la RT-PCR. El ADN bicatenario no se desnaturaliza y consecuentemente no se amplifica.

3.2.2.2.3 Amplificación mediada por transcripción (TMA)

La TMA es un proceso de amplificación molecular isotérmico que utiliza dos enzimas, RT y la ARN polimerasa. La amplificación rápida produce un aumento exponencial de mil millones del ARN diana, lo que maximiza la sensibilidad del ensayo. El uso de oligonucleótidos específicos de dianas (oligos) crea un segundo nivel de especificidad (D Wu et al., 2014).

3.2.2.2.4 Secuenciación de próxima generación (NGS)

La NGS es uno de los mayores logros de la era moderna. Más allá de la secuenciación del genoma de organismos conocidos, permitió descubrir nuevos virus responsables de enfermedades humanas desconocidas (Palacios et al., 2008) y rastrear brotes y pandemias como la influenza (Baillie et al., 2012) para comprender su aparición y transmisión perfiles (Isakov et al., 2015; Leung et al., 2014).

El método puede secuenciar, por ejemplo, el genoma del virus completo o realizar metagenómica viral si este es totalmente desconocido. El primer paso del NGS es una fragmentación aleatoria de ARN y/o ADN en la muestra. Luego se prepara la biblioteca de secuenciación, seguida de amplificación y secuenciación. Los datos recopilados se analizan en una computadora muchas veces como primer objetivo si se conoce el patógeno es realizar un alineamiento contra una secuencia de referencia y si no se conoce el patógeno sería realizar un análisis de blasteo hacia diversos grupos de virus para encontrar parentescos en secuencia (Pallen, 2014)

3.2.2.3 Espectrometría de masas (EM)

La EM es hoy en día un punto de referencia de investigación cualitativa y cuantitativa de laboratorio, particularmente en bacteriología (Sauer & Kliem, 2010).

El principio de EM se basa en convertir la muestra en partículas cargadas (iones) mediante un proceso de ionización. Estos iones se separan según su relación de masa a carga (m/z) y se analizan mediante un detector. El resultado obtenido se compara con una base de datos de referencia (biblioteca), que existe dentro del sistema y se entrega como un espectro interpretativo.

Los métodos basados en espectrometría de masas son versátiles, sensibles, rápidos y rentables, y no requieren software de interpretación para el análisis de datos. La maquinaria automatizada requiere una fácil preparación de muestras y menos operadores. La capacidad de análisis puede alcanzar hasta 960 muestras/día, lo que lo hace adecuado para el diagnóstico de rutina en laboratorios de gran volumen y estudios a gran escala.

3.3 Familias de Arbovirus de importancia médica y veterinaria

Las enfermedades transmitidas por vectores que pertenecen al grupo arbovirus, son un grupo de virus que tienen el potencial de aumentar su distribución geográfica y afectar poblaciones humanas o animales previamente vírgenes (Weaver, 2013; Weaver & Reisen, 2010). Los arbovirus que son patógenos para los humanos y animales son todos virus de ARN monocatenarios. Como ya se mencionó anteriormente, los arbovirus clínicamente más importantes pertenecen a una de las cuatro familias Bunyaviridae, Flaviviridae, Reoviridae y Togaviridae. El período de incubación es generalmente corto (3-10 días). El cuadro clínico va desde una enfermedad febril leve y autolimitada, tal vez con sarpullido, hasta dolor muscular y articular severo, enfermedad hemorrágica y encefalitis. A menudo es difícil distinguir las diferentes enfermedades arbovirales simplemente basadas en la sintomatología (Beckham & Tyler, 2015; Weaver et al., 2018).

Diferentes factores como el cambio ambiental, los viajes o el transporte de mercancías pueden facilitar la expansión de los vectores a nuevas regiones, proporcionando las condiciones necesarias para que estos virus se propaguen y aumenten el riesgo de convertirse en una amenaza para la salud pública. Los arbovirus a menudo están presentes en regiones endémicas que coinciden con el Dengue, causando brotes de diferentes tamaños e infecciones con síntomas similares, desafiando las habilidades y posibilidades de diagnóstico (Beckham & Tyler, 2015).

3.3.1 Bunyaviridae

La familia Bunyaviridae es el grupo más grande de virus de ARN y contiene > 350 especies virales, la mayoría de las cuales son transmitidas por artrópodos y algunas están clasificadas como nivel de contención 3 de patógenos. Dado el número de patógenos malignos humanos y animales prominentes que esta familia contiene, como el virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV), virus La Crosse (LACV), virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCFHV), el virus Schmallenberg (SBV) fiebre con el virus del síndrome de trombocitopenia (SFTSV), los bunyavirus son una amenaza importante para la salud humana y el bienestar de los animales en varios continentes.

Los bunyavirus se dividen en cinco géneros: Orthobunyavirus, Phlebovirus, Hantavirus, Nairovirus y Tospovirus (Elliott, 1990; Guardado-Calvo & Rey, 2017; Walter & Barr, 2011). Orthobunyaviruses, phleboviruses y nairoviruses se diseminan por mosquitos, moscas, garrapatas y flebótomos (Labuda, 1991; Tesh, 1988), Los Hantavirus son la excepción ya que no se clasifican como arbovirus debido a la ausencia de un vector conocido y se diseminan por aerosol, saliva u orina de roedores (de Oliveira et al., 2014). Todos los virus miembros comparten ciertas características. Están envueltos y contienen un genoma de ARN monocatenario de sentido negativo ((-)ssRNA) que se divide en tres segmentos, denominados de acuerdo con su tamaño (Elliott, 1990), . El segmento L (Grande) codifica la proteína L que actúa como ARN polimerasa dependiente de ARN vírico (RdRp) (Amroun et al., 2017). El segmento M (Medio) codifica el precursor de las glicoproteínas virales que se producen después del procesamiento postraduccional

(Amroun et al., 2017). El segmento S (Pequeño) codifica la proteína multifuncional nucleocápside (N) (SA Eifan & Elliott, 2009). Algunos phlebovirus tienen un segmento S ambisensible que permite la codificación bidireccional durante la replicación (Shope, 1996). Al igual que con otros virus genómicos multisegmentados, se sabe que los bunyavirus experimentan recombinación genómica durante infecciones mixtas (Chinikar et al., 2004; Deyde et al., 2006; Reese et al., 2008).

Los viriones esféricos tienen aproximadamente 100 nm de diámetro y están compuestos por cuatro proteínas estructurales; las dos glicoproteínas externas (Gn y Gc), la proteína N y la proteína L. Se entiende que la proteína N se une y recubre el ARN viral e interactúa con la proteína L para formar complejos de ribonucleoproteína (RNP) con una estructura específica, uniéndolos a las proteínas de la envoltura (Amroun et al., 2017). También se ha demostrado que ciertos virus codifican proteína(s) no estructural(es) en sus segmentos M (NSm) y / o S (NS) que tienen la hipótesis de que interactúan con el sistema inmune y participan en la patogénesis viral; aunque, sus funciones aún son en gran parte desconocidas (Amroun et al., 2017; S Eifan et al., 2013).

algunos bunyavirus se clasifican como agentes emergentes o reemergentes debido a la expansión de su host y rangos geográficos. En particular, ha habido un gran aumento en la distribución geográfica del RVFV durante los últimos años y se han informado brotes en África Oriental, Sudán, África del Sur, Arabia Saudita y Yemen (Anyamba et al., 2010; Aradaib et al., 2013; Hassan et al., 2011; Nguku et al., 2010) . SFTSV es un miembro recientemente identificado del género phlebovirus y hasta ahora ha sido reconocido como un patógeno humano en China, Japón y Corea del Sur (Feldmann, 2011; X Zhang et al., 2013). Surgió en 2007 de la cordillera Huaiyangshan en China y se cree que es transportado por un vector de garrapatas, específicamente *Haemaphysalis longicornis* (YZ Zhang et al., 2011) Como su nombre indica, los síntomas incluyen fiebre, leucopenia, trombocitopenia y tiene una alta tasa de letalidad de entre el 12 y el 30%. Más recientemente, la aparición de SBV en 2011 tuvo un impacto agrícola y económico devastador tras su diseminación en Alemania, los Países Bajos, Bélgica, Francia, Dinamarca, Italia, Luxemburgo, España y el Reino Unido (Balenghien et al., 2014; Beer

et al., 2013; Doceul et al., 2013; Haider et al., 2018). El virus, clasificado como ortobunyavirus, se transmite por un mosquito y causa fiebre, diarrea, caída de leche, pérdida de apetito y aborto en rebaños de ovejas, ganado y cabras. Los descendientes de individuos infectados todavía pueden nacer y con frecuencia se encontró que los nacidos vivos tenían malformaciones congénitas y anomalías físicas.

3.3.2 Flaviviridae

Hay > 100 miembros de la familia Flaviviridae que pertenecen a uno de los cinco géneros, Flavivirus, Hepacivirus, Pegivirus, Pestivirus y Flaviviridae no clasificados. El género Flavivirus es el más grande y el único que contiene arbovirus transmitidos por cualquiera de los mosquitos; como YFV, DENV, virus del Nilo Occidental (VNO) y virus de la encefalitis japonesa (JEV) o garrapatas; como el TBEV (Fields et al., 2013; Rust, 2012; VIPR, 2018). Además de los virus transmitidos por artrópodos, los flavivirus también contienen un grupo sin vector conocido (Cook & Holmes, 2006; VIPR, 2018), así como flavivirus específicos de insectos (ISF) que se ha demostrado que son incapaces de infectar vertebrados (Cammisa-Parks et al., 1992; ICTV, 2017).

3.3.2.1 Genero flavivirus

Los flavivirus están envueltos y contienen un genoma monocatenario de sentido positivo no segmentado (+) ssARN) de que tiene aproximadamente 10,7 kb de longitud (Fields et al., 2013; Harris et al., 2006; Lindenbach & Rice, 2003; Rice et al., 1985). El ARN genómico tiene una capucha 5' pero, a diferencia de los ARNm celulares, carecen de una cola poliadenilada (poli-A) en el extremo 3'. Se traduce como una única poliproteína flanqueada por regiones 5' y 3' no traducidas (UTR). Estas regiones forman estructuras secundarias complejas y desempeñan papeles importantes en la regulación de la traducción, la síntesis de ARN y la replicación del virus (Charlier et al., 2002; Markoff, 2003). La poliproteína se escinde co- y pos traduccionalmente mediada por una combinación de proteasas virales y de huésped en tres proteínas estructurales (la proteína

de la cápside [C], el precursor de glicoproteína de membrana [prM] y la glicoproteína de la envoltura [E]) y siete proteínas no estructurales (NS) proteínas (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). NS5 es la proteína más altamente conservada dentro de los flavivirus y codifica la RdRP (Mandl et al., 1989). Las proteínas NS, incluyendo NS5, y factores adicionales del huésped forman el complejo de replicación para facilitar la síntesis de nuevo ARN viral (Fields et al., 2013). La proteína C es importante para la formación de la nucleocápside icosaédrica que encapsula el genoma (Mukhopadhyay et al., 2005). La nucleocápside está rodeada por una bicapa lipídica derivada del huésped en la que se encuentra la proteína E, la principal proteína estructural documentada como objetivo principal para neutralizar anticuerpos (Sanchez et al., 2005; VanBlargan et al., 2013). En viriones inmaduros, la proteína prM protege la proteína E de la degradación. Durante la salida del virus de la célula, la proteína prM se escinde en la proteína M madura y el segmento "pr" por lo que solo los viriones maduros presentan la proteína M incrustada en la bicapa. Los viriones maduros resultantes son esféricos y tienen aproximadamente 50 nm de diámetro (Fields et al., 2013).

Los flavivirus transmitidos por mosquitos representan algunos de los patógenos globales emergentes y reemergentes más graves (Mackenzie et al., 2004). Se pueden dividir en aquellos transmitidos principalmente por *Culex* spp. vectores (WNV, JEV) y los de *Aedes* spp. vectores (DENV, YFV). Curiosamente, esto también se divide en aquellos que resultan en la enfermedad encefalítica que se asocia con la transmisión de *Culex* y aquellos virus que resultan en enfermedades hemorrágicas que se asocian con *Aedes* spp (Gaunt et al., 2001).

3.3.2.1.1 Virus del dengue

El DENV es responsable de la mayor incidencia de enfermedades y mortalidad dentro del género y cuenta con cuatro serotipos relacionados, pero antigénicamente distintos. La infección con uno de los serotipos 1-4 solo confiere inmunidad solo para ese serotipo específico. La infección puede presentarse con un grado variable de síntomas (Guzman & Kouri, 2004), y se han observado diferencias en la sintomatología clínica entre los

serotipos (Nunes et al., 2016). Muchas personas con infecciones por DENV tienen una enfermedad febril leve e inespecífica, o incluso pueden ser asintomáticas, y la enfermedad se resuelve sin complicaciones. Sin embargo, en algunos casos se desarrolla una enfermedad grave, con hemorragia, insuficiencia orgánica y shock, lo que requiere un diagnóstico y tratamiento correctos y urgentes. El resultado grave de la enfermedad se ha relacionado con una segunda infección de DENV con otro serotipo heterólogo (Halstead, 2015; Zompi et al., 2012).

Para la mayoría de los DENV que causan infección en humanos, los humanos son el único huésped vertebrado (Weaver & Reisen, 2010). DENV es el arbovirus más extendido que afecta a los humanos y los cuatro serotipos se encuentran ahora en Asia, África y las Américas (Guzman et al., 2010). En la década de 1970, solo nueve países fueron considerados endémicos para DENV. Ahora está ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, actualmente hay más de 100 países en el sudeste de Asia, América Latina y la región del Pacífico Occidental afectados por DENV. Según recientes estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 96 millones de personas se presentan con síntomas de infección DENV de los probablemente 390 millones de personas que se infectan con DENV por año. Diez veces más, 3.900 millones de personas, que viven en 128 países diferentes, están de acuerdo con la OMS en riesgo de infección por DENV (WHO, 2016a). Varios de los países endémicos son destinos turísticos y visitados por muchos viajeros.

3.3.2.1.2 Virus Zika

El ZIKV es, similar a DENV y CHIKV, transmitido principalmente por los mosquitos *Aedes* que pican durante el día. Es un flavivirus que fue aislado por primera vez de un mono rhesus en el bosque Zika de Uganda en 1947 (Hayes, 2009). El virus no se encontró fuera de África y Asia hasta 2007. Luego se detectó en un brote en una isla de Micronesia (Hayes, 2009), los síntomas se describieron como leves y auto limitados.

El brote de ZIKV en América Latina es un ejemplo reciente del impacto en la salud pública causado por un arbovirus emergente. Al llegar a una población grande no expuesta en América del Sur, ha tenido un gran impacto en la salud pública, especialmente para las mujeres en edad fértil, tiene un tropismo inusual para las células neurales progenitoras en el feto humano en desarrollo, lo que resulta en grupos de defectos de nacimiento del neurodesarrollo que se complican aún más por grupos de enfermedad neurológica severa en adultos. Muchas preguntas sobre los factores de riesgo aún no se han respondido (Alvarado & Schwartz, 2017). El brote fue un desafío para las organizaciones de salud, particularmente en los lugares donde el brote fue nuevo. Los modelos recientes sugieren que la inmunidad colectiva al ZIKV podría provocar el cese de grandes epidemias en 3 años, pero los brotes podrían volver a ocurrir una vez que desaparezca la inmunidad colectiva de la infección natural (Ferguson et al., 2016). Con el intenso foco de atención sobre la infección por ZIKV, el riesgo de que otras enfermedades se pasen por alto o se diagnostiquen erróneamente fue aparente, lo que provocó una amenaza adicional para la salud.

3.3.2.1.3 Virus de la fiebre amarilla

El YFV se mantiene en ciclos enzoóticos con monos y mosquitos en 34 países de África y 13 en América del Sur (Wasserman et al., 2016). La mayoría de las infecciones por YFV son asintomáticas; la mayoría de los pacientes sintomáticos tienen fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, dolor muscular y náuseas, generalmente limitados a menos de 1 semana. Alrededor del 10-25% de los pacientes desarrollan manifestaciones hemorrágicas y daño renal y hepático, con una tasa de letalidad del 20-50% en los casos sintomáticos (Wasserman et al., 2016). Desde diciembre de 2015, se ha iniciado una epidemia de fiebre amarilla en Angola (WHO, 2016b). Los viajes internacionales provocaron la propagación de la enfermedad a Kenia, la República Democrática del Congo y China (Z Chen et al., 2016). En abril de 2016, la OMS declaró que la actual epidemia de fiebre amarilla era una amenaza mundial.

3.3.3 Togaviridae

Los virus que pertenecen a la familia Togaviridae se dividen en dos géneros: Alphavirus y Rubivirus (Fields et al., 2013). El género Rubivirus contiene un solo virus, el virus de la rubéola, que es una enfermedad común en los niños pero que no tiene artrópodos. Esto es diferente del género Alphavirus que contiene una cantidad de arbovirus. Hay aproximadamente 30 alfavirus transmitidos por artrópodos reconocidos que consisten en patógenos humanos y animales (R Chen et al., 2018). Se subdividen en aquellos que infectan los huéspedes terrestres, generalmente mamíferos o aves, y aquellos que infectan a los peces. Los peces salmónidos, como la trucha y el salmón, son huéspedes de alfavirus acuáticos, como el virus de la enfermedad pancreática del salmón y el virus de la enfermedad del sueño. Aunque se sabe que los piojos de mar están infectados, no se han verificado de manera concluyente como un vector para estos virus (Fields et al., 2013; Forrester et al., 2012; McLoughlin & Graham, 2007). Además, hace algunos años se describió un nuevo alfavirus específico para mosquitos denominado virus Eilat, que se especula que no puede replicarse en células de vertebrados (Nasar et al., 2012). Recientemente, se han incluido otros dos virus a la familia de los alfavirus; virus Tai Forest (TALV) y virus Mwinilunga (MWAV), actualmente se encuentran en estudio para ver la capacidad de infectar células de vertebrado (Torii et al., 2018). El ciclo de transmisión del alfavirus generalmente involucra mosquitos vectores; aunque las garrapatas y los piojos son capaces de transmitir algunos alfavirus. Se sabe que la mayoría de las infecciones causan una variedad de síntomas que incluyen: fiebre, erupciones cutáneas, artritis, artralgias y, más prominentemente, encefalitis (Zacks & Paessler, 2010). Aunque el virus de la rubéola comparte varias propiedades con los alfavirus, como la organización genómica y la estructura del virión, ya que no está clasificado como un arbovirus, solo se describirá en detalle el género del alfavirus.

3.3.3.1 Género Alphavirus

Los alfavirus consisten en un genoma de (+)ssARN rodeado por una envoltura. El genoma vírico tiene aproximadamente 11,5 kb, que está rematado en el extremo 5' y poliadenilado

en el extremo 3'. Esto le permite funcionar como un ARNm celular y ser traducido directamente por la maquinaria de traducción de la célula huésped a la vez que lo protege de la degradación (EG Strauss et al., 1983). Se separa en dos marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican las nueve proteínas virales (JH Strauss & Strauss, 1994). El ORF más grande en el extremo 5 'abarca aproximadamente dos tercios del genoma y produce las cuatro proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4) de la poliproteína nsP1234. El tercio restante codifica una poliproteína separada de la cual las cinco proteínas estructurales (la proteína de la cápside [C], la proteína de 6 kDa [6K] y las tres glicoproteínas de la envoltura [E1, E2 y E3]) se generan bajo el control subgenómico interno (26S) promotor (Kaariainen et al., 1987). E2 y E3 se producen a partir de un precursor denominado p62. Se sabe que las nsP son multifuncionales (Kaariainen & Ahola, 2002; JH Strauss & Strauss, 1994).

Las partículas de alfavirus están en la región de 70 nm de diámetro y tienen una apariencia esférica. La envoltura circundante está compuesta por una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula huésped. En la superficie, tres heterodímeros E1-E2 forman cada uno de los ochenta picos incrustados en la envoltura que rodea la nucleocápside (R Chen et al., 2018; Vaux et al., 1988; Ziemiecki & Garoff, 1978). La nucleocápside está dispuesta en una disposición icosaédrica T = 4 de 240 copias de las proteínas C (R Chen et al., 2018).

Como la mayoría de los alfavirus se transmiten por vectores artrópodos, es probable que afecte su dispersión geográfica; sin embargo, se ha demostrado que tienen una distribución mundial. Se pueden definir como virus del Viejo Mundo o del Nuevo Mundo según el origen geográfico del aislamiento. Los alfavirus del Viejo Mundo, incluidos CHIKV, virus Semliki Forest (SFV), virus Sindbis (SINV) y virus o'nyong-nyong (ONNV) originarios de África y Asia, además del virus del río Ross (RRV) identificado en Australia, son responsables para causar erupciones, mialgia y artralgia. Los alfavirus del Nuevo Mundo consisten en los identificados en las Américas que generalmente causan encefalitis (Zacks & Paessler, 2010). Estos incluyen el virus de la encefalitis equina del este (EEEV), el virus

de la encefalitis equina occidental (WEEV) y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV).

3.3.3.1.1 Virus Chikungunya

El CHIKV es un alfavirus que históricamente se clasificó como un virus de África pero se ha extendido ampliamente por todo el Viejo y el Nuevo Mundo. Solo 5 a 25% de las infecciones son asintomáticas y se sabe que los pacientes presentan síntomas como dolores de cabeza, vómitos, erupciones cutáneas, fiebres, mialgias y artralgias graves son síntomas clínicos característicos de la infección por CHIKV (WHO, 2017). Es una enfermedad transmitida por vectores, transmitida por mosquitos *Aedes* que pican en el día, particularmente en áreas tropicales de África, Asia y el subcontinente indio. Se aisló por primera vez en África oriental (Tanzania) en 1952 durante un brote (Weaver & Reisen, 2010). Se han producido brotes episódicos en África, India y el sudeste asiático, que se extendieron a Indonesia en los años ochenta. En los últimos años se ha extendido a muchos países subtropicales, habiéndose identificado en 60 países (WHO, 2017). Durante los últimos 10 años se ha extendido rápidamente desde lo que comenzó como un brote en Kenia hasta las islas del Océano Índico y luego también en América. Tras la aparición del gran brote de fiebre de CHIKV en las islas del Océano Índico en 2006 (Chhabra et al., 2008). El virus CHIKV ahora circula en las mismas áreas endémicas como el DENV y la malaria, y la sintomatología de estas enfermedades puede ser indistinguible (Weaver & Reisen, 2010).

3.3.3.1.2 Virus de Mayaro (MAYV)

El MAYV es un alfavirus estrechamente relacionado con CHIKV (Lwande et al., 2015), y fue aislado por primera vez en Trinidad 1954. MAYV es endémico en Sudamérica (Lwande et al., 2015) y causa una enfermedad similar al DENV (Weaver & Reisen, 2010). En cuanto a CHIKV, la presencia de artritis podría ser un síntoma distintivo de los alfavirus de otros diagnósticos diferenciales (Lwande et al., 2015).[Esto requiere una mayor conciencia y atención sobre posibles infecciones MAYV, lo que lleva a un

diagnóstico correcto y medidas preventivas oportunas con el objetivo de limitar la propagación del vector y la infección.

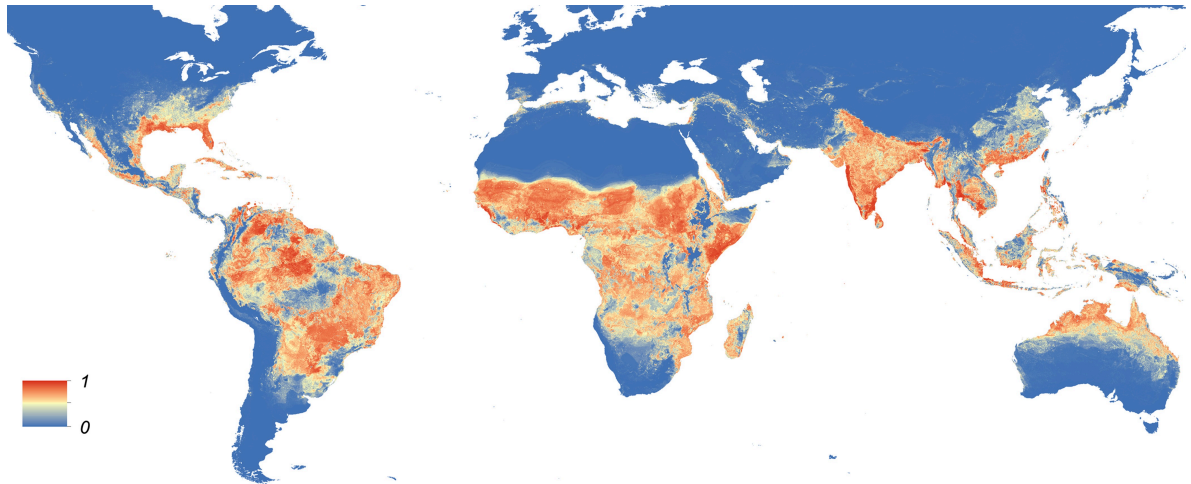


Figura 4. Mapa de calor de mayor proporción de vectores capaces de transmitir algún arbovirus. Imagen tomada de (Kraemer et al., 2015).

3.4 OTROS PATÓGENOS TROPICALES VIRALES Y BACTERIANOS

Diversos patógenos virales y bacterianos pueden, por supuesto, causar infecciones de origen tropical, muchas de las cuales también son comunes en otras partes del mundo a continuación se describen unos ejemplos.

3.4.1 *Leptospira* spp.

La leptospirosis es una zoonosis asociada a la exposición al suelo y al agua contaminada por la orina de portadores de animales, principalmente roedores, de la bacteria. Tanto los animales domésticos como los salvajes pueden verse afectados (de Vries et al., 2014). Las personas infectadas pueden presentar síntomas leves que simulan otras enfermedades, pero el espectro de la enfermedad es amplio y la mortalidad es alta en los casos graves cuando puede desarrollar ictericia. Se han informado brotes después de inundaciones y tormentas, la mayoría de las alertas provienen de las Américas, seguidas por el Pacífico

occidental y el sudeste asiático. Teniendo en cuenta los datos disponibles sobre infecciones humanas, la enfermedad puede considerarse una enfermedad tropical desatendida (de Vries et al., 2014). La leptospirosis puede ocurrir entre viajeros, y se ha asociado particularmente con viajes de aventura (Antony, 1996).

3.4.2 Rickettsia spp.

Rickettsiae son bacterias intracelulares estrictas. Lo que generalmente se llama rickettsiosis generalmente se refiere a dos entidades, *Orientia tsutsugamushi* (tifus de matorral) y el género *Rickettsia*. La *Rickettsia* se puede dividir además en las rickettsias del grupo de fiebre moteada (SFG) (por ejemplo, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia africae*) y las rickettsias del grupo del tifus (*Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*) (Parola et al., 2013; Rolain et al., 2004). Los vectores de los raquitismos SFG son garrapatas, y varias especies que anteriormente se consideraban no patogénicas ahora se han reclasificado y se han asociado a la infección en humanos (Parola et al., 2013). Otros vectores de artrópodos para infecciones por rickettsias incluyen piojos y pulgas. Los síntomas clínicos asociados con la rickettsiosis son fiebre, erupción y generalmente escaras (Portillo et al., 2017). La PCR puede realizarse en tejido de escara o sangre, aunque muy pocas bacterias pueden estar presentes en la sangre durante la fase aguda, como se ha observado en informes sobre diagnósticos, por ejemplo, la Fiebre Moteada de las Montañas Rocosas (Kato et al., 2013). Esto podría ser un factor limitante en el diagnóstico por PCR de la enfermedad aguda. Al igual que en el caso de la *Leptospira*, otro factor limitante cuando se usa la PCR es si el tratamiento con antibióticos ya se ha iniciado antes de tomar las muestras.

3.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN ENFERMEDADES ARBOVIRALES, LEPTOSPIROSIS Y RICKETSIOSIS

3.5.1 Pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico simultáneo para DENV y ZIKV

La detección de ZIKV y DENV por medio de RT-qPCR dependen del tiempo de inicio de los primeros síntomas ya sea por suero, orina, líquido cefalorraquídeo, etc (Gourinat et al.,

2015; Lalle et al., 2018; Lanciotti et al., 2008; Musso et al., 2015; Oliveira Melo et al., 2016).

Las primeras pruebas para la detección de flavivirus se establecieron en 1993, se diseñaron cebadores consenso basándose en motivos conservados dentro de la región NS3, utilizando RT-PCR anidada dependiendo de técnicas de secuenciación para identificar el serotipo viral presente en la muestra (Chow et al., 1993). Para el siguiente año, Pierre et al (Pierre et al., 1994) propuso un conjunto único universal de cebadores consenso para flavivirus. Las características métodos de detección de anteriormente mencionados se resumen en la tabla 1.

3.5.1.1 Pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico específico para DENV

El DENV es uno de los flavivirus más estudiados desde hace varias décadas, ya que es uno de los principales causantes de reemergencias epidemiológicas en la tabla 1 se presenta las principales características de algunos ensayos utilizados diversos trabajos basados en la técnica de RT-PCR y RT-qPCR que están disponibles en la literatura.

3.5.1.2 Pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico específico para ZIKV

En la actualidad, la RT-qPCR, es el método diagnóstico de elección para la detección de infección aguda por ZIKV. Los ensayos comerciales de RT-PCR para el virus de Zika están disponibles. Sin embargo, hasta ahora las pruebas son solo para fines de investigación. Varios de estos ensayos son de diseño propio y están disponibles solo para uso de investigación, se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Descripción general de los ensayos RT-PCR para la detección de la infección por DENV y ZIKV.

Referencia o fuente	Año	Tipo de PCR	Blanco	#Pacientes humanos	Tipo de muestra	Virus
Lanciotti et al.	1991	RT-PCR anidada; primer específico	C/prM	93 Pacientes	Línea celular	DENV
Chow et al	1993	RT-PCR anidada; secuenciación	NS3	0	plasmidos	DENV y ZIKV
Chang et al	1994	RT-PCR anidada; primer específico	NS5	115 Pacientes	suero y línea celular	DENV
Pierre et al	1994	RT-PCR anidada; Secuenciación	NS5/3' UTR	0	mosquitos y plasmidos	DENV y ZIKV
Meiyu et al	1997	RT-PCR anidada; primer específico	NS1	78 Pacientes	Suero	DENV
Kuno et al	1997	RT-PCR anidada; Secuenciación	NS5	0	Línea celular	DENV y ZIKV
Scaramozzi et al	2001	PCR anidada; Secuenciación	NS5	0	Línea celular	DENV y ZIKV
Shu et al	2003	Tiempo real un solo paso; SYBR Green	C	193 Pacientes	Suero	DENV
Johnson et al	2005	RT-PCR anidada; sonda específica	M/E/NS5	40 Pacientes	Suero	DENV
Ayers et al	2006	RT-PCR un solo paso; Secuenciación	NS5	0	mosquitos y plasmidos	DENV y ZIKV
Chien et al	2006	RT-PCR anidada; tiempo real SYBR Green; taqman multiplex	C/prM	77 Pacientes	Suero y línea celular	DENV
Moureau et al	2007	PCR convencional; Secuenciación	NS5	0	Línea celular	DENV y ZIKV
Lanciotti et al	2008	Tiempo real un solo paso; sonda	pRM/E	>200 pacientes	Suero, Orina, Fluido amniótico	ZIKV
Faye et al	2008	Tiempo real un solo paso; sonda	E	>15 Pacientes	Suero	ZIKV
Gurukumar et al	2009	Tiempo real un solo paso; Taqman	3'UTR	308	Suero y línea celular	DENV
Balm et al	2012	PCR convencional	E	88 (ningun positivo para ZIKV)	Plasma	ZIKV
Faye et al	2013	Tiempo real un solo paso; sonda	NS5	0 (validado en monos)	Suero	ZIKV
Tappe et al	2014	Tiempo real un solo paso; sonda	NS3	5 Pacientes	Suero	ZIKV
Pyke et al	2014	Tiempo real un solo paso; sonda	E/NS1	1 Paciente	Suero	ZIKV
PAHO	2015	Tiempo real un solo paso; sonda	NS2	-	-	ZIKV
Corman et al	2016	Tiempo real un solo paso; sonda	E/NS1	24 Pacientes	Suero y Orina	ZIKV
Salles et al	2017	Tiempo real un solo paso; SYBR Green	C/prM	0	Línea celular	DENV

*PrM, membrana precursora; M, Membrana; E, Estructural; C, Capside; NS5, proteína no estructural 5; NS3, proteína no estructural 3; NS1, proteína no estructural 1. NS2. Proteína no estructural 2; 3' UTR, 3' Región no traducida.

3.5.2 Pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico específico para CHIKV

Pfeffer M et al en 1997 desarrollaron un ensayo de reacción RT-PCR semi-anidada que amplifica un fragmento del gen NS1 para la identificación de CHIKV. En el año 2002 este mismo autor utiliza la misma metodología (RT-PCR semi-anidada) para la identificación de CHIKV específico (Pfeffer et al., 2002).

Al mismo tiempo en el año 2002, otro grupo de trabajo desarrollo sus propios cebadores para los genes NS1 y E utilizando RT-PCR y secuenciación, demostrando tener otra alternativa para la identificación de CHIKV de una manera más eficiente (Hasebe et al., 2002). La primera RT-PCR basado en ensayos con sondas Taqman se desarrolló en el año 2005, demostrando ser mucho más sensible y específico para el diagnóstico de CHKV, aunque no se pudo probar de manera clínica (Pastorino et al., 2005). (ver tabla 2)

Tabla 2. Descripción general de los ensayos PCR para la detección de la infección por CHIKV.

Referencia o fuente	Año	Tipo de PCR	Blanco	#Pacientes humanos	Tipo de muestra
Pfeffer et al	1997	RT-PCR anidada; Secuenciación	NS1	0	Línea celular
Pfeffer et al	2002	RT-PCR anidada; primer específico	NS1/E1	0	Línea celular
Hasebe et al	2005	PCR convencional; Secuenciación	NS1/E1	0	Línea celular
Pastorino et al	2005	Tiempo real un solo paso; sonda	E1	0	Línea celular
Edwards et al	2007	Tiempo real un solo paso; sonda	E1	55 Pacientes	Suero
Lanciotti et al	2007	Tiempo real un solo paso; sonda	NS1	106 Pacientes	Suero
Lakshmi et al	2008	RT-LAMP	E1	296 Pacientes	Suero
Telles et al	2009	NASBA	E1	250 Pacientes	Plasma
Johnson et al	2016	Tiempo real un solo paso; sonda	NS1/NS2	0	Suero

*E1, Estructural 1; NS1, proteína no estructural 1; NS2, proteína no estructural 2.

3.5.3 Pruebas comerciales para CHIKV, DENV y ZIKV.

Recientemente, los ensayos de RT-PCR comerciales para la identificación de ZIKV, DENV y CHIKV están disponibles. Estos incluyen a marcas como Altona Diagnostics, Clonit, Fast Track Diagnostics, Primerdesign™ Ltd, Liferiver, Roche, Thermofisher, Sacace Biotechnologies, Bio-rad. Etc. En el cual todos tienen la marca CE-IVD. Aparte de un estudio sobre el rendimiento de la prueba RealStar® Zika Virus (L'Huillier et al., 2017), no se encontraron revisiones publicadas de los otros ensayos en la literatura. Sin embargo, estos kits comerciales son caros y no proporcionan una sensibilidad del 100%. Por tal motivo, los cebadores y las secuencias de las sondas en kits comerciales no suelen estar disponibles públicamente, lo que impide la evaluación sencilla de su ajuste con los virus en emergencia o re-emergencia actual.

3.5.4 Diagnóstico molecular para leptospirosis

La detección de *Leptospira* por medio de PCR se ha realizado por más de 20 años y se han utilizado sangre, orina, LCR, suero, etc (Haake & Levett, 2015; Levett, 2001; Limmathurotsakul et al., 2012). La duración de la espiroqueta en sangre puede ser detectada tan tarde como cuanto dure la enfermedad (Agampodi et al., 2012; Waggoner et al., 2015). Se han desarrollado muchos diagnósticos moleculares para la leptospirosis, incluidos la PCR convencional, qPCR, RT-PCR y los métodos de amplificación isotérmica (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción general de ensayos de PCR para la detección de Leptospirosis.

Referencia o fuente	Año	Tipo de PCR	Blanco	#Pacientes humanos	Tipo de muestra
Mérien et al	1992	PCR; RFLPI	<i>16S rRNA</i>	28	Sangre, suero y orina
Graveka et al	1993	PCR punto final	<i>16S rRNA</i>	40	Suero
Stoddard et al	2009	PCR; Sonda	<i>lipL32</i>		Sangre, Orina y Cultivo
Ahmed et al	2009	PCR; SYBR Green	<i>secY</i>	133	Sangre, suero
Waggoner et al	2014	PCR; Secuenciación	<i>16S rRNA</i>	63	Sangre, suero y plasma
Waggoner et al	2014	PCR; Sonda	<i>16S rRNA</i>	65	Sangre, suero y plasma
Galloway et al	2015	PCR; Sonda	<i>lipL32</i>	3	Sangre, Suero, Orina y Cultivo
Waggoner et al	2015	PCR; Sonda	<i>16S rRNA</i>	479	Sueros
Backstedt et al	2015	PCR; Sonda	<i>16S rRNA</i>	25	Sangre, suero
Hua-Wei et al	2015	PCR isotermica	<i>lipL32</i>	25	Sangre y cultivo
Nurul et al	2016	PCR isotermica	<i>LipL32</i>	0	Cultivo
García-Ruiz et al	2016	PCR; SYBR Green	<i>16S rRNA</i>	100	Sueros

LipL32: Proteína principal de la membrana externa 16S rRNA: 16S RNA ribosomal secY: Proteína de canal de translocación SecYEG

3.5.5 Diagnóstico molecular para Rickettsiosis

Se han desarrollado varios ensayos de PCR para la detección de agentes rickettsiales, incluidos los ensayos específicos para el género *Rickettsia* (*panrickettsia*) y los ensayos específicos para *R. rickettsii*, (Eremeeva et al., 2003; Garcia-Ruiz et al., 2016; Giulieri et al., 2012; Marquez et al., 1998; Oliveira et al., 2002; Regnery et al., 1991; Renvoise et al., 2012; Santibanez et al., 2013; Stenos et al., 2005; Weisburg et al., 1991), los cuales se reusumen en la tabla 4. Los ensayos de *Panrickettsia* han utilizado sitios conservados en los genes de 17 kDa, proteína de membrana externa (*ompB*), rRNA 16S y citrato sintasa (*gltA*), mientras que los ensayos de discriminación de especies se han dirigido a los genes

16S rRNA, sca4, ompB, gltA, ompA y 23S rRNA (Denison et al., 2014; Hecht et al., 2016).

Tabla 4. Descripción general de ensayos de PCR para la detección de Rickettsiosis.

Referencia o fuente	Año	Tipo de PCR	Blanco	#Pacientes humanos	Tipo de muestra
Weisburg et al	1991	PCR; secuenciación	16S rDNA	0	Plasmidos
Regnery et al	1991	PCR; Anidada; RFLP	<i>gltA/ompA</i>	0	Cultivo
Márquez et al	1998	PCR; RFLP; secuenciación	16S rDNA	0	Garrapata
Oliveira et al	2002	PCR; secuenciación	<i>htrA</i>	0	Garrapata
Choi et al	2005	PCR; Anidada; RFLP; secuenciación	<i>gltA/ompB</i>	200	Suero
Kato et al	2012	PCR; taqman	23S rRNA	223	Biopsias
Denison et al	2014	PCR; taqman	<i>gltA/ompB</i>	31	Biopsias
Hecht et al	2016	PCR; taqman	<i>gltA</i>	11	Plasmidos
García-Ruíz et al	2016	PCR; SYBR Green	<i>gltA</i>	100	Suero

ompB: proteína de membrana externa B, ompA: proteína de membrana externa A, 16S rDNA: 16 S ribosomal DNA, 23S rRNA: 23S ribosomal RNA, *gltA*: Citrato sintasa y *htrA*: proteína de 17-kDa.

3.5.6 Búsqueda simultanea de patógenos por métodos moleculares

La búsqueda de otros patógenos que presentan una sintomatología sugerente a infección por enfermedad febril es de suma importancia establecer el diagnóstico preciso y la respuesta del laboratorio a veces suele ser crítica, ya que facilitará el tratamiento en caso de presentaciones atípicas y complicaciones. La distinción temprana entre el dengue y otras enfermedades febriles podría ayudar a identificar a los pacientes con signos de fiebre de dengue hemorrágico que podrían convertirse en un síndrome de choque por dengue potencialmente mortal, de igual manera, para mujeres embarazadas con infección de ZIKV ó Leptospirosis con complicaciones de síndrome de disfunción multiorgánica. Además, la coinfección de virus u otros patógenos han sido informados (Carrillo-Hernandez et al., 2018; Dupont-Rouzeyrol et al., 2015), donde en algunos casos suele ser fatal (Cardona-Ospina et al., 2018; Neaterour et al., 2017), por consiguiente, la

información sobre las infecciones por virus u otros patógenos puede contribuir a la base de datos de vigilancia y ayudar con la investigación de epidemiología molecular, así como a monitorear y ayudar a controlar la diseminación del virus (Pongsiri et al., 2012).

Existen muy pocos trabajos en donde busquen de manera simultánea múltiples patógenos (Giry et al., 2017; Liu et al., 2016; Pabbaraju et al., 2016; Waggoner et al., 2016; Wu et al., 2018). Varios de ellos se enfocan en patógenos circulantes en determinando momento y algunos otros cubren una amplia variedad. Sin embargo, todos concuerdan en la reducción de casos negativos. Por lo tanto, las enfermedades arbovirales, leptospirosis y rickettsiosis comparten muchas características no específicas, como fiebre, artralgia y también trombocitopenia en la fase aguda. El amplio espectro de presentaciones clínicas, desde formas asintomáticas hasta formas muy graves, exige la necesidad de tener pruebas de diagnóstico diferencial con alta sensibilidad y especificidad (Giry et al., 2017).

3.6 RELEVANCIA PARA LA SALUD PÚBLICA

La vigilancia y el conocimiento sobre los patrones de enfermedad constituyen una base para las acciones de salud pública destinadas a prevenir enfermedades a nivel de la población (Schmidt et al., 2013). La propagación de enfermedades contagiosas a menudo es multifactorial. Además del riesgo de viajar, otros factores determinantes de la salud pueden facilitar la propagación de infecciones y, por lo tanto, afectar la salud pública. Tales determinantes de la salud son, por ejemplo, el transporte internacional y el comercio entre diferentes partes del mundo, el movimiento global de poblaciones y el cambio climático y ambiental (Tatem et al., 2006). Recientemente se han resaltado los efectos del cambio climático en la salud humana, indicando que existe un riesgo directo de brotes resultantes de eventos climáticos extremos, pero también un riesgo indirecto incluso de cambios climáticos más leves que dan como resultado una distribución geográfica alterada de vectores.

El resurgimiento más notable en este siglo son los virus ZIKV, DENV, YFV, CHIKV son transmitidos en áreas urbanas o periurbanas por los mosquitos *Aedes* spp. Todos se transmiten en ciclos zoonóticos en los que intervienen primates no humanos y mosquitos arbóreos, y han entrado en ciclos de humano a humano que incluyen el *aegypti* urbano y, en algunos casos, la transmisión de *Aedes albopictus* (Weaver & Reisen, 2010). Las distribuciones de *Aedes* spp son ahora las más anchas jamás registradas; extensa en todos los continentes, incluyendo América del Norte y Europa, con más de 3.000 millones de personas que viven en regiones infestadas de *Aedes*. Un *aegypti*, el vector principal, se encuentra principalmente en los trópicos y subtropicos. Es eficiente porque es muy susceptible a estos virus, se alimenta preferentemente de seres humanos, se activa durante el día, prospera en entornos peridomésticos cercanos a las personas y muchas veces pica a varias personas en un corto período de tiempo. El hacinamiento facilita la transmisión a través de mosquitos aéreos urbanos, agravada por hábitats larvarios artificiales, lo que sugiere que la urbanización sin precedentes en los países tropicales de bajos ingresos en los últimos 50 años es el principal impulsor de las enfermedades transmitidas por *A. Aegypti* (Struchiner et al., 2015). Además, aumentar los viajes internacionales y la globalización aceleran la introducción del arbovirus en nuevas áreas y su expansión geográfica (Wilder-Smith & Gubler, 2008).

La OMS y la Iniciativa de Vinculación de Salud y Medio Ambiente (HELI) alientan a los países a abordar los vínculos entre salud y medio ambiente, haciendo hincapié en la prevención y el control. Tradicionalmente, los arbovirus tenían baja prioridad a la investigación. Sin embargo, en los últimos 50 años, la aparición sin precedentes de enfermedades arbovirales epidémicas ha cambiado la percepción sobre su contribución mundial a la mortalidad y discapacidad (DALYs et al., 2015; Gubler & Clark, 1995). El ejemplo más reciente es la infección por el ZIKV, que pasó rápidamente de la oscuridad a una Emergencia de salud pública de Preocupación internacional. En 2016, el YFV fue exportado a Asia por primera vez a través de viajeros internacionales, poniendo en riesgo a 1.8 billones de personas debido a que el mosquito vector urbano (*Aedes aegypti*) está presente en grandes poblaciones no vacunadas (Monath et al., 2016). El virus CHIKV causó estragos en 2013-2014 cuando se introdujo una cepa reemergente en el Caribe y

América Latina y se extendió a una velocidad y una escala sin precedentes (Khan et al., 2014). El VNO se introdujo en los EE. UU. en 1999 y se extendió rápidamente por América del Norte y del Sur en pocos años (Artsob et al., 2009). El JEV se ha propagado hacia el oeste, el norte y el sur en Asia (Mackenzie et al., 2004). Se ha producido un aumento sin precedentes de las infecciones por el DENV en las últimas cinco décadas, tanto que ahora se considera la infección vírica viral transmitida por vectores más común alrededor del mundo (Bhatt et al., 2013).

Los requisitos de los arbovirus hacia los vectores como *A. aegypti* o *A. albopictos* son mínimos y la transmisión endémica está latente, otros tres virus que podrían convertirse en importantes patógenos humanos en grandes poblaciones: el VEEV, que ya es causa de enfermedades neurológicas humanas y equinas en las regiones tropicales de América, el MAYV y el RRV que son parientes cercanos del virus CHIKV y producen una enfermedad artralgiaca debilitante comparable en Sudamérica y Australia, respectivamente (Weaver & Reisen, 2010). Por tal motivo, la OMS ha señalado las enfermedades transmitidas por vectores como uno de los riesgos prioritarios a nivel mundial (WHO, 2005).

4 JUSTIFICACIÓN

El 17 % de todos los casos de enfermedades infecciosas en el mundo son transmitidas por vectores, parte de estos vectores son insectos chupadores de sangre, que ingieren microorganismos durante una comida de sangre de un huésped infectado (humano o animal) y luego los inyectan en un nuevo huésped durante su posterior comida de sangre. Los mosquitos (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*) son los vectores de enfermedades más conocidos. Otros vectores incluyen garrapatas, mosca tsetse, triatominos, etc. (OMS, 2017). Un amplio espectro de enfermedades febriles con signos y síntomas inespecíficos y superpuestos hace que el consejo médico sea sumamente difícil para los médicos involucrados.

Una de las posibles vías de exportación de enfermedades entre países suelen ser las fronteras, en este caso, en el sur de México, cerca de la frontera con Guatemala, se presentaron casos con conjuntivitis, fiebre y sarpullido en la Ciudad de Tapachula y las localidades rurales aledañas en a finales del 2015. Síntomas similares a los producidos por CHIKV. Sin embargo, la mayoría de los casos no se presentaron con artralgias en manos y pies, lo que es típico de CHIKV, y el dolor retroocular visto en la mayoría de los casos, que no es típico de CHIKV, fue sugestivo de DENV (Guerbois et al., 2016).

Dado que los patrones de enfermedad y la propagación de infecciones cambian con el tiempo, es de particular importancia tanto para aumentar el acceso a información epidemiológica relevante como para proporcionar métodos de diagnóstico alternativos, es de gran interés ampliar la base de evidencia necesaria para las decisiones sobre medidas preventivas y diagnósticas, buscando mejorar las herramientas para la investigación clínica.

5 HIPÓTESIS

Existe la presencia múltiple de patógenos transmitidos por artrópodos vectores, en pacientes con espectro febril en la región fronteriza del sur de México.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Caracterización molecular y genética de patógenos transmitidos por artrópodos vectores, en muestras de pacientes con síndrome febril en la región fronteriza del sur de México.

6.2 Objetivos Específicos

- Identificar por qPCR específico la presencia de los agentes causales de CHIKV, DENV y ZIKV en muestras de pacientes con síndrome febril.
- Ampliar la cobertura de identificación de casos positivos para la familia de flavovirus y alfavirus.
- Búsqueda de leptospirosis y Rickettsiosis a muestras negativas de los dos objetivos anteriores.
- Realizar un análisis epidemiológico de los resultados de genotipificación.

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Grupo de estudio

Sueros de pacientes con fiebre y/o exantema característico de arbovirosis comprendido en los periodos abril-junio del 2015 y febrero-marzo del 2016.

7.2 Diseño del estudio

El estudio será de tipo retrospectivo, transversal, descriptivo y observacional.

7.3 Universo de trabajo

Estará conformado por sueros de pacientes con fiebre y/o exantema característico de arbovirosis que se colectaron en el Hospital General Dr. Roberto Nettel Flores I.S.S.T.E en Tapachula, Chiapas, durante los periodos abril-junio del 2015 y febrero-marzo del 2016.

7.4 Criterios de selección

7.4.1 Criterios de inclusión

Sujetos adultos con fiebre y/o exantema serán incluidos si cumplen uno de los siguientes criterios (1 ó 2):

1. Cumplir con la definición de caso de la OMS/OPS, definida como (a y b y c):

a. Uno de los siguientes signos principales:

- Exantema
- Temperatura corporal elevada (> 37.2 °C)

b. Uno o más de los siguientes síntomas (no explicados por otras condiciones médicas):

- Artralgia

- Mialgia
 - Conjuntivitis no-purulenta o hiperemia conjuntival
 - Cefalea
 - Malestar general
- c. Inicio de la enfermedad en los últimos 7 días

7.4.2 Criterio exclusión

Suero de Pacientes que no cumplan con los criterios expuestos anteriormente.

7.4.3 Criterio Eliminación

- Muestras que no se obtenga ARN.
- Muestras con material insuficiente para la extracción.

7.5 Área de trabajo

El trabajo experimental se realizará en el laboratorio de Biología Molecular del departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los sueros se obtendrán de banco de muestras con las características anteriormente expuestas de pacientes que asistieron al Hospital General Dr. Roberto Nettel Flores I.S.S.S.T.E en la ciudad de Tapachula, Chiapas.

7.6 Material biológico

Se contaron con muestras (sueros) de pacientes con fiebre y/o exantema del Hospital General Dr. Roberto Nettel Flores I.S.S.S.T.E de la ciudad de Tapachula, Chiapas, que cumplieron con criterios de inclusión de infección por algún tipo de arbovirus de acuerdo

con la evaluación inicial de sus síntomas. Se obtuvieron muestras de dos periodos abril-junio del 2015 y febrero-marzo del 2016.

Todo paciente que acudió a consulta médica del Hospital General I.S.S.S.T.E en Tapachula, Chiapas fue evaluado por el personal médico. Posteriormente los pacientes que fueran casos sospechosos de fiebre por CHIKV o ZIKV, fueron evaluados siguiendo los criterios clínicos establecidos por la OMS. Se recabó la historia clínica y se hizo exploración física intencionada.

Posteriormente, para confirmar el probable diagnóstico de fiebre se le tomó una muestra de sangre venosa periférica de aproximadamente 5 mL a los pacientes, las muestras fueron tomadas en tubos de sangre sin anticoagulante. A continuación, los tubos fueron centrifugados a 3,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Consecutivamente el suero fue separado del paquete globular y se realizaron alícuotas, los sueros fueron almacenados a -80 °C hasta su uso.

7.6.1 Extracción de ARN con columna QIAGEN

Se extrajo ARN a partir de 140 µL de suero con el kit QIAamp Viral RNA Mini de QIAGEN (# cat. 52906). La extracción fue realizada de acuerdo a las indicaciones del fabricante con ligeras modificaciones. A continuación, se mencionará el procedimiento realizado. Se partió de un tubo de 1.5 mL con 560 µL de amortiguador AVL con acarreador de ARN. Se agregaron 140 µL de suero, se mezcló por vortex, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos en un thermomixer a 1000 rpm. Terminada la incubación, se agregaron 560 µL de etanol 100% y se mezcló por inversión aproximadamente 1 min. Se vertieron 630 µL de la mezcla a la columna QIAamp Mini y se centrifugó a 6000 x g por 1 min. Al terminar la centrifugación, se desecharon los residuos. Se vertió el volumen de mezcla restante en la columna y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Posteriormente se agregaron 500µL de amortiguador de lavado AW1 y se centrifugaron las columnas a 6000 x g por 1 minuto. Se descartó de nuevo los desechos, después se añadió 500 µL de amortiguador AW2 a la columna. Esta vez la

centrifugación fue a 20,000 x g por 1 minutos. Se descartó el tubo colector y se volvió a centrifugar a 20,000 x g por 3 minutos, posteriormente, la columna se colocó en un tubo de 1.5 mL donde el ARN se eluyó con 60 µL de amortiguador AVE se incubo por 1 minuto y se realizó un vortex de 15 segundos, posterior a una centrifugación a 6000 x g por 1 minuto. El ARN extraído se almacenó a -80°C.

7.6.2 Detección de ARN viral para DENV, CHIKV y ZIKV por PCR tiempo real

Para la identificación por qRT-PCR en Tiempo Real de los Viru ZIKV, CHIKV y DENV en muestras clínicas se empleó el estuche comercial QuantiTect probe RT-PCR kit (#204443). Cada vez que se realiza la prueba también se analiza un Blanco (NTC), Control Positivo (CP) y Negativo (CN).

Tabla 5. Secuencia de Iniciadores y Sondas para ZIKV, CHIKV y DENV.

Iniciador y Sonda	Secuencia (5'-3')
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG
ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
ZIKV 1107-FAM	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-TAMRA
CHIK856	ACCATCGGTGTTCCATCTAAAG
CHIK962c	GCCTGGGCTCATCGTTATT
CHIK908-FAM	FAM-ACAGTGGTTTCGTGTGAGGGCTAC-TAMRA
DENV 10635	GARAGACCAGAGATCCTGCTGTCT
DENV 10682	ACCATTCCATTTTCTGGCGTT
DENV123-10663-FAM	FAM-AGCATCATTCCAGGCAC-MGB
DENV4-10663-FAM	FAM-AACATCAATCCAGGCAC-MGB

Para la preparación de cada mezcla de iniciadores y sonda, los iniciadores se dejan a una concentración de 100 µM y las sondas Taqman se dejan a una concentración de 25 µM, se procede a realizar la mezcla el cual consiste en 18 µl de cada iniciador a 100 µM y 5 µl de la sonda a 25 µM más 59 µl de H₂O libre de nucleasas obteniendo un stock a 20X.

Tabla 6. Mezcla de Reacción para la Detección Molecular de ZIKV, CHIKV o DENV

Reactivos	Volumen (μL)	Con. Final
2x QuantiTect Probe PCR Master Mix	10	-
Mezcla de iniciadores y sonda 20X	1	1X
QuantiTect RT Mix	0.2	-
H ₂ O grado biología molecular	3.8	-
RNA	5	30 ng-500 ng
Total	20	

Las reacciones fueron llevadas a cabo en placas de 96 pozos, se utilizó un termociclador StepOnePlus de Applied Biosystems. Las condiciones del termociclador utilizados se describen a continuación.

Tabla 7. Programa para la detección por qRT-PCR.

Proceso	Temperatura	Tiempo
Reacción de Retrotranscripción (RT)	50°C	30 minutos
Activación enzimática	95°C	15 minutos
paso 2		
Desnaturalización	94°C	15 segundos
Alineamiento/Extensión	60°C	60 segundos
Numero de ciclos	45	

7.6.3 Conversión a ADNc

La síntesis de ADNc se realizó solo para muestras que salieron negativas a la prueba anterior de qPCR-Tiempo real para DENV, CHIKV y ZIKV, se utilizó el kit High Capacity RNA-to-cDNA (#4368814) mezclando los reactivos en un bloque frío. Los componentes de la reacción se listan a continuación:

Tabla 8. Mezcla de reacción para la conversión a ADNc

Reactivos	Volumen (μL)
10X RT Buffer	2
25X dNTP Mix (100 μM)	0.8
10X RT Random Primers	2

MultiScribe RT	1
Rnase Inhibitor	1
H ₂ O grado biología molecular	3.2
Total	10

Posteriormente agregar 10 µl de cada muestra de RNA a cada tubo, se incubo en un termociclador 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas y 85°C por 5 minutos y se almaceno a -20°C hasta su uso.

7.6.4 PCR-anidada para flavivirus

Se amplió la búsqueda de posibles infecciones de virus del género flavivirus utilizando los iniciadores ya establecidos por Natale Scaramozzino (Scaramozzino et al., 2001). El cual se utilizará como primera PCR los iniciadores cFD2-MAMD y como segunda PCR los iniciadores cFD2-FS778.

Tabla 9. Secuencia de iniciadores flavivirus.

Iniciador y Sonda	Secuencia (5'- 3')
cFD2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC
MAMD	AACATGATGGGRAARAGRGARAA
FS 778	AARGGHAGYMC DGCHATHHTGGT

Para la primera PCR se utilizó el kit comercial Quantitect Probe PCR (#204343) con las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 10. Mezcla de reacción para la PCR cFD2-MAMD

Reactivos	Volumen (µL)	Con. Final
2X Quantitect Probe PCR Master Mix	10	1X
Iniciador cFD2 (40 µM)	1	2 µM
Iniciador MAMD (40 µM)	1	2 µM
H ₂ O grado biología molecular	6	-
cDNA	2	-
Total	20	

Se utilizó el siguiente programa de ciclado:

Tabla 11. Programa de reacción para la PCR cFD2-MAMD

Proceso	Temperatura	Tiempo
Activación enzimática	95°C	15 minutos
paso 2		
Desnaturalización	94°C	5 segundos
Alineamiento	54°C	30 segundos
Extensión	72°C	30 segundos
Numero de ciclos	25	

El producto obtenido se guardó a -20° C hasta su posterior uso. Para la segunda reacción de PCR se utilizaron los iniciadores cFD2-FS778. Se utilizó el reactivo GoTaq G2 Hot Start Polymerase (#M7405), a continuación, se describen las condiciones de reacción:

Tabla 12. Mezcla de reacción para la PCR anidada cFD2-FS778

Reactivos	Volumen (µl)	Con. Final
5X Colorless GoTaq Flexi Buffer	3	1X
MgCl ₂ Solution, 25mM	1.1	1.83 mM
PCR Nucleotide Mix, 10mM each	0.3	0.2 mM
Iniciador cFD2, 25 µM	1	1.6 µM
Iniciador FS778, 25 µM	1	1.6 µM
GoTaq G2 Hot Start Polymerase	0.2	1 U
Producto de PCR	3	-
H ₂ O grado biología molecular	5.4	-
Total	15	-

Se utilizó el siguiente programa de ciclado:

Tabla 13. Programa de reacción para la PCR anidada cFD2-FS778

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	2 minutos
Paso 2		
Desnaturalización	95°C	10 segundos
Alineamiento	54°C	15 segundos
Extensión	72°C	40 segundos
Numero de ciclos	30	
Paso 3		
Extensión	72°C	2 minutos
Termino	25°C	1 min

Al término del programa de ciclado los productos amplificados se almacenaron a 4°C o se corrieron inmediatamente en un gel de agarosa a 1.5% a 80 volts, esperando observar un fragmento de tamaño de 220 pb.

A las muestras que se les observo un fragmento de aproximadamente 220 pb, se les realizó una purificación con la enzima ExoSAP-IT (#78200.200.UL), el cual consto de 5 µL de producto y 2 µL de la enzima ExoSAP-IT, se metió a un termociclador Veriti con las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 14. Programa de reacción para la conversión de cADN para flavivirus.

Proceso	Temperatura	Tiempo
Digestion enzimatica	37°C	30 minutos
Desnaturalización	80°C	15 minutos

El producto de la reacción enzimática se separó en dos tubos; 3.5 µL a cada tubo, los cuales se trabajaron de manera independiente para el proceso de marcaje fluorescente con el reactivo de BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (#4337455), las condiciones de reacción se describen a continuación:

Tabla 15. Mezcla de reacción para el proceso de secuenciación para flavivirus.

Reactivos	Volumen (µl)	Con. Final
BigDye Terminator 3.1 Reaction Mix	1	-
BigDye Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	2	1X
Iniciador cFD2 ó FS778, 3.2 µM	1	0.32 µM
Producto enzimático	3.5	-
H ₂ O grado biología molecular	2.5	-
Total	10	

El programa de ciclado para el marcaje se describe a continuación:

Tabla 16. Programa de reacción para el proceso de secuenciación

Proceso	Temperatura	Tiempo
Activación enzimática	95°C	2 minutos
paso 2		
Desnaturalización	95°C	5 segundos
Alineamiento	50°C	10 segundos
Alineamiento	55°C	10 segundos
Extensión	60°C	50 segundos
Numero de ciclos	25	

Se mantuvieron los productos finales a 4 °C hasta el siguiente proceso. Después del proceso de marcaje se centrifugó la placa de reacción por 1 min a 14 000 rpm. A cada tubo se agregó el volumen de 35 µL de solución Mix Xterminator (SAM 28.5 µL y 6.5 µL de XTerminator). Se mezcló en un vórtex a 1800 rpm por 50 min. Se le dio un spin a los tubos a 1000 x g por 2 min. Posteriormente se pasaron a la placa de reacción, y finalmente al analizador genético ABI Prism 3130.

Los resultados fueron visualizados en el software 4Peaks y las secuencias se exportaron en formato FASTA, las lecturas fueron introducidas a la aplicación web nucleotide

BLAST del NCBI y ViPR de manera simultánea, esto para la identificación del patógeno presente en las muestras positivas.

7.6.5 PCR-anidada para alfavirus

De igual manera se realizó la búsqueda de posibles infecciones de virus del género alfavirus utilizando los iniciadores ya establecidos por Klaus Grywna (Grywna et al., 2010). El cual se utilizó como primera PCR los iniciadores ALPHA-1-Fod/ALPHA-1-Rev y como segunda PCR los iniciadores ALPHA-2-Fod/ALPHA-2-Rev.

Tabla 17. Secuencia de iniciadores alfavirus.

Iniciador	Secuencia (5'- 3')
ALPHA-1-Fod	TTTAAGTTTGGTGCATGATGAAGTC
ALPHA-1-Rev	GCATCTATGATATTGACTTCCATGTT
ALPHA-2-Fod	GGTGCATGATGAAGTCTGGGATGT
ALPHA-2-Rev	CTATGATATTGACTTCCATGTTCAKCCA

Para la primera PCR se utilizó GoTaq G2 Hot Start Polymerase (#M7405), a continuación, se describen las condiciones de reacción:

Tabla 18. Mezcla de reacción de PCR para alfavirus

Reactivos	Volumen (µl)	Con. Final
5X Colorless GoTaq Flexi Buffer	3	1X
MgCl ₂ Solution, 25mM	1.8	3 mM
PCR Nucleotide Mix, 10mM each	0.3	0.2 mM
Iniciador ALPHA-1-Fod, 25 µM	2	3.3 µM
Iniciador ALPHA-1-Rev, 25 µM	2	3.3 µM
GoTaq G2 Hot Start Polymerase	0.2	1 U
cDNA	3	-
H ₂ O grado biología molecular	2.7	-
Total	15	-

Se utilizó el siguiente programa de ciclado:

Tabla 19. Programa de reacción de PCR para Alfavirus

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	5 minutos
Paso 2		
Desnaturalización	95°C	10 segundos
Alineamiento	55°C	30 segundos
Extensión	72°C	30 segundos
Numero de ciclos	40	
Paso 3		
Extensión	72°C	2 minutos
Termino	25°C	1 min

Para la segunda reacción de PCR se utilizaron los iniciadores ALPHA-2-Fod - ALPHA-2-Rev. Se utilizó el reactivo GoTaq G2 Hot Start Polymerase (#M7405), a continuación, se describen las condiciones de reacción:

Tabla 20. Mezcla de reacción de PCR-anidada para alfavirus

Reactivos	Volumen (µL)	Con. Final
5X Colorless GoTaq Flexi Buffer	3	1X
MgCl ₂ Solution, 25mM	1.2	2 mM
PCR Nucleotide Mix, 10mM each	0.3	0.2 mM
Iniciador ALPHA-2-Fod, 25 µM	2	3.3 µM
Iniciador ALPHA-2-Rev, 25 µM	2	3.3 µM
GoTaq G2 Hot Start Polymerase	0.2	1 U
Producto de PCR	3	-
H ₂ O grado biología molecular	3.3	-
Total	15	-

Se utilizó el siguiente programa de ciclado:

Tabla 21. Programa de reacción de PCR-anidada para alfavirus

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	5 minutos
Paso 2		
Desnaturalización	95°C	10 segundos
Alineamiento	60°C	30 segundos
Extensión	72°C	30 segundos
Numero de ciclos	35	
Paso 3		
Extensión	72°C	2 minutos
Termino	25°C	1 min

Al término del programa de ciclado se almacenaron a 4°C o se corrieron inmediatamente en un gel de agarosa a 1.5% a 80 volts, esperando observar un fragmento de tamaño de 220 pb.

A las muestras que se les observo un fragmento de aproximadamente 220 pb, se procedió a realizar una purificación con la enzima ExoSAP-IT (#78200.200.UL), el cual consto de 5 µL de producto y 2 µL de la enzima ExoSAP-IT, se metió a un termociclador Veriti con las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 22. Programa de reacción para la conversión de cADN para alfavirus

Proceso	Temperatura	Tiempo
Digestion enzimatica	37°C	30 minutos
Desnaturalización	80°C	15 minutos

El producto de la reacción enzimática se separó en dos tubos; se agregó 3.5 µL a cada tubo, los cuales se trabajaron de manera independiente para el proceso de marcaje fluorescente con el reactivo BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (#4337455), las condiciones de reacción se describen a continuación:

Tabla 23. Mezcla de reacción para el proceso de secuenciación para alfavirus

Reactivos	Volumen (µL)	Con. Final
BigDye Terminator 3.1 Reaction Mix	1	-
BigDye Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	2	1X
Iniciador ALPHA-2-Fod ó ALPHA-Rev, 3.2 µM	1	0.32 µM
Producto enzimático	3.5	-
H2O	2.5	-
Total	10	

El programa de ciclado para el marcaje se describe a continuación:

Tabla 24. Programa de reacción para el proceso de secuenciación para alfaviru.

Proceso	Temperatura	Tiempo
Activación enzimática	95°C	2 minutos
paso 2		
Desnaturalización	95°C	5 segundos
Alineamiento	50°C	10 segundos
Alineamiento	55°C	10 segundos
Extensión	60°C	50 segundos
Numero de ciclos	25	

Se mantuvieron los productos finales a 4 °C hasta el siguiente proceso. Después del proceso de marcaje se centrifugó la placa de reacción por 1 min a 14 000 rpm. A cada tubo se agregó el volumen de 35 µL de solución Mix Xterminator (SAM 28.5 µL y 6.5 µL de XTerminator). Se mezcló en un vórtex a 1800 rpm por 50 min. Se le dio un spin a los tubos a 1000 x g por 2 min. Posteriormente se pasaron a la placa de reacción, y finalmente al analizador genético ABI Prism 3130.

Los resultados fueron visualizados en el software 4Peaks y las secuencias se exportaron en formato FASTA, las lecturas fueron introducidas a la aplicación web nucleotide

BLAST del NCBI y ViPR de manera simultánea, esto para la identificación del patógeno presente en las muestras positivas.

7.6.6. Extracción de ADN

Para las muestras negativas por qPCR (DENV, CHIKV y ZIKV) y PCR-anidada (flavivirus y alfavirus), se extrajo ADN del suero utilizando el kit Gentra® Puregene de Quiagen (#158445). Brevemente se describe el procedimiento: a partir de 30 µL de suero se mezcló con 300 µL de Solución de lisis celular y se dio vortex a 1200 rpm a una temperatura de 65°C por 20 minutos, posteriormente, se agregaron 100 µL de solución de precipitación de proteínas y se dio vortex por 20 segundos, y se centrifugo a 14 000 rpm por 1 minuto, el sobrenadante se exporto a otro tubo limpio y se le agrego 500 µL de Isopropanol, se mantuvo en inversión constante en una balanza por aproximadamente 3 minutos, se centrifugo por 1 minuto a 14 000 rpm y se descartó todo el sobrenadante, a continuación, se le hizo un lavado 500 µL de etanol al 70% y se volvió a centrifugar por 1 minuto a 14 000 rpm, se descartó todo el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Por último, se resuspendió en 30 µL de solución de hibridación de ADN a 65°C por 5 minutos. Después se evaluo la concentración de ADN con el equipo nanodrop-8000. Y las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

7.6.7 PCR tiempo real con Sybr-green para leptospirosis y rickettsiosis

A partir de las muestras negativas de los ensayos anteriores y posterior extracción de ADN, se utilizaron iniciadores ya establecidos por García-Ruiz (Garcia-Ruiz et al., 2016), se empleó el reactivo Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (#K0221) para la realización de los ensayos. A continuación, se describen los iniciadores utilizados en el proceso.

Tabla 25. Secuencia de iniciadores leptospirosis y rickettsiosis.

Iniciador	Secuencia (5'- 3')
RICK-ADN-For	TATGCTTGCGGCTGTCGGTTCTC
RICK-ADN-Rev	TTGCGGTAAGTTCGTAGTCTGCTTCTT
LEP-ADN-For	AGCAGCCGCGGTAATACGTATGG
LEP-ADN-Rev	TTTAGGGCGTGGATTACTGGGG

Para la reacción de qPCR para Rickettsiosis se utilizaron las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 26. Mezcla de reacción por qPCR para rickettsiosis

Reactivos	Volumen (µL)	Con. Final
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	12.5	1 X
RICK-ADN-For 3.2 µM	2	0.256 µM
RICK-ADN-Rev 3.2 µM	2	0.256 µM
ADN (30-100 ng)	5	-
H ₂ O grado biología molecular	3.5	-
Total	25	

Para la reacción de qPCR para Leptospirosis se utilizaron las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 27. Mezcla de reacción por qPCR para leptospirosis

Reactivos	Volumen (µL)	Con. Final
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	12.5	1 X
LEP-ADN-For 3.2 µM	2	0.256 µM
LEP-ADN-Rev 3.2 µM	2	0.256 µM
ADN (30-100 ng)	5	-
H ₂ O grado biología molecular	3.5	-
Total	25	

La reacción de ciclado se corrió para las dos reacciones bajo las mismas condiciones en un equipo StepOnePlus de Applied Biosystem con los siguientes tiempos de reacción:

Tabla 28. Programa de reacción por qPCR para rickettsiosis y leptospirosis

Proceso	Temperatura	Tiempo
Activación UNG	50°C	2 minutos
Activación enzimática	95°C	10 minutos
segundo paso		
Desnaturalización	95°C	15 segundos
Alineamiento/Polimerización	60°C	30 segundos
Numero de ciclos	50	

7.6.8 Purificación de bandas de gel de agarosa

Para los productos obtenidos en PCR tiempo real con Sybr-green para leptospirosis y rickettsiosis que mostraban amplificación, se corrió un gel de agarosa y el producto esperado fue purificado utilizando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (#740609.50) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente. Se cortó la banda del gel de agarosa y se introdujo en un tubo de 1.5 ml, se agregó 300 µL de buffer NTI y se incubó en un thermomixer a 50°C con 1200 rpm por 10 minutos, se pasó todo el homogenato a una columna de Nucleospin gel and PCR Cleand-up y se centrifugó a 11 000 rpm por 30 segundos y se descartó el líquido filtrado, posteriormente, se lavó con buffer NT3 y se centrifugó por 11 000 rpm por 30 segundos y se descartó el líquido filtrado, se centrifugó la columna en un tubo de desecho por 3 minutos a 14 000 rpm para secar la columna y descartar cualquier sobrante del buffer NT3, posteriormente, se eluyó en 30 µL de Buffer NE previamente calentado a 70°C, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente, se le realizó un ligero vortex y fue centrifugado a 14 000 rpm por 1 min, el líquido centrifugado fue almacenado a -20°C hasta su posterior uso.

Se repartió 5 µL a cada tubo del producto purificado, los cuales se trabajaron de manera independiente para el proceso de marcaje fluorescente con el reactivo BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, las condiciones de reacción se describen a continuación:

Tabla 29. Mezcla de reacción para el proceso de secuenciación para leptospirosis

Reactivos	Volumen (µL)	Con. Final
BigDye Terminator 3.1 Reaction Mix	1	-
BigDye Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer	2	1X
Iniciador LEP-ADN-Fod ó LEP-ADN-Rev 3.2 µM	1	0.32 µM
Producto purificado	6	-
Total	10	-

El programa de ciclado para el marcaje se describe a continuación:

Tabla 30. Programa de reacción para el proceso de secuenciación para leptospirosis

Proceso	Temperatura	Tiempo
Activación enzimática	95°C	2 minutos
paso 2		
Desnaturalización	95°C	5 segundos
Alineamiento	50°C	10 segundos
Alineamiento	55°C	10 segundos
Extensión	60°C	50 segundos
Numero de ciclos	30	

Se mantuvieron los productos finales a 4 °C hasta el siguiente proceso. Después del proceso de marcaje se centrifugó la placa de reacción por 1 min a 14 000 rpm. A cada tubo se agregó el volumen de 35 µL de solución Mix Xterminator (SAM 28.5 µL y 6.5 µL de Xterminator). Se mezcló en un vórtex a 1800 rpm por 50 min. Se le dio un spin a los tubos a 1000 x g por 2 min. Posteriormente se pasaron a la placa de reacción, seguido al analizador genético ABI Prism 3130.

Los resultados fueron visualizados en el software 4Peaks y las secuencias se exportaron en formato FASTA, las lecturas fueron introducidas a la aplicación web nucleotide BLAST del NCBI, se usó como plantilla un organismo ya conocido *Leptospira* (taxid:171) y para optimizar los datos se seleccionó el apartado Secuencias similares.

7.6.9 Análisis de secuencia genómica para cebadores de zika.

Se recuperaron cuarenta secuencias genómicas de ZIKV de la base de datos de nucleótidos del NCBI. Las entradas fueron nombradas de acuerdo a sus orígenes geográficos y periodos de recolección de la siguiente manera: BrazilAmniotic2015 (KU497555), BrazilBrain2015 (KU527068), Brazil2015_1 (KU365777), Brazil2015_2 (KU365778), Brazil2015_3 (KU365779), Brazil2015_4 (KU365780), Brazil2015_5 (KU707826), Cambodia2010 (JN860885), CAR1968 (KF383115), CAR1976 (KF268950), CAR1979 (KF268948), CAR1980 (KF268949), FrenchPolynesia2013 (KJ776791), Guatemala2015_1 (KU501216), Guatemala2015_2 (KU501217), Haiti2014 (KU509998), Malaysia1966 (HQ234499), Martinique2015 (KU647676), Nigeria1968 (HQ234500), Philippines2012 (KU681082), PuertoRico2015 (KU501215), SaoPaulo2015 (KU321639), Senegal1968 (KF383116), Senegal1984 (HQ234501), Senegal1997 (KF383117), Senegal2001 (KF383119), Suriname2015 (KU312312), Thailand2013 (KF993678), Thailand2014 (KU681081), Uganda1947_1 (AY632535), Uganda1947_2 (HQ234498), Uganda1947_3 (LC002520), Yap2007 (EU545988), Mexico2016_1 (KY606272), Mexico2015_1 (KY631494), Mexico2016_2 (KY120348), Mexico2016_3 (MF801397), Mexico2016_4 (MF801401), Mexico2016_5 (KY606274), Mexico2015_2 (KY631493). La alineación de las secuencias genómicas se realizó con ayuda de la herramienta en línea Align Sequences (MSA) de ViPR y se visualizó con ClustalX versión 2.0 (ver resultados en anexos).

7.6.10 Pruebas estadísticas

El análisis estadístico se realizó en el programa IBM SPSS Statistics versión 23. Se realizó análisis de medias y mediana de la edad de los pacientes. Se realizaron tablas de

contingencia y pruebas de chi-cuadrado para todos los datos demográficos, de igual manera se realizó estadística descriptiva para los resultados de laboratorio. Las gráficas se realizaron con el software graph path versión 6.0.

8 RESULTADOS

Se recolectaron 253 pacientes con cuadro clínico sugerente de infección por arbovirus. La recolección de las muestras se realizó durante los periodos de abril-junio del 2015 y febrero-marzo del 2016. (Figura 5).

La edad media de presentación fue de 39 años, la mediana de 41 años y el rango de edad fueron de 7 a 74 años. El 33% (84) de los pacientes fue de género masculino, mientras que el 67% (169) fue femenino.

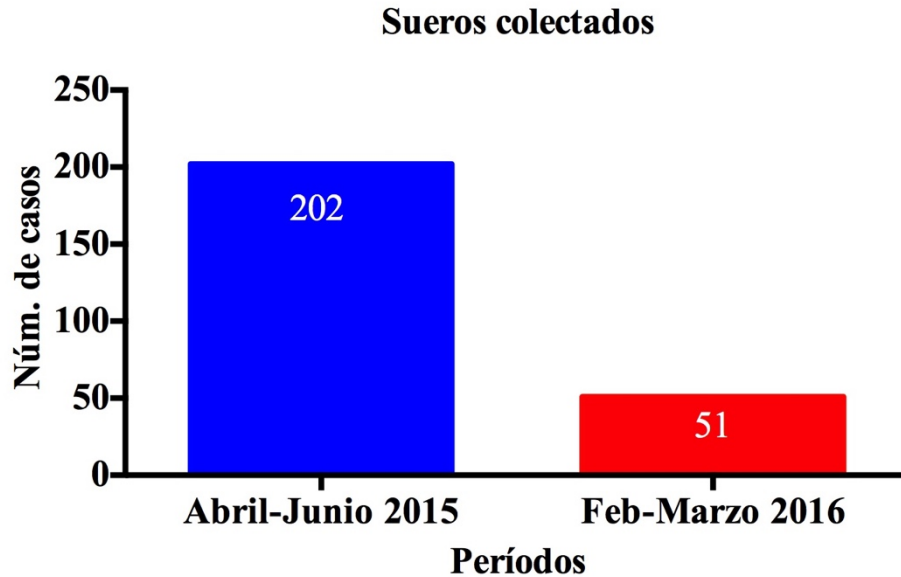


Figura 5. Total de muestras recolectadas con signos y síntomas sugerentes a infección por arbovirus, Tapachula Chiapas, México. 2015-2016.

8.1 Manifestaciones clínicas evaluadas

Las manifestaciones clínicas que se presentaron en los pacientes se describen a continuación:

La manifestación clínica que se presentó con mayor frecuencia en los pacientes fue fiebre el 99.6% de los cuales la fiebre fue mayor a 38 °C en el 86% de los pacientes,

seguido de cefalea en el 92%. Escalofríos en el 90.9%, Exantema, alteración del gusto, prurito, náuseas estuvieron arriba del 50% de los casos (Figura 6).

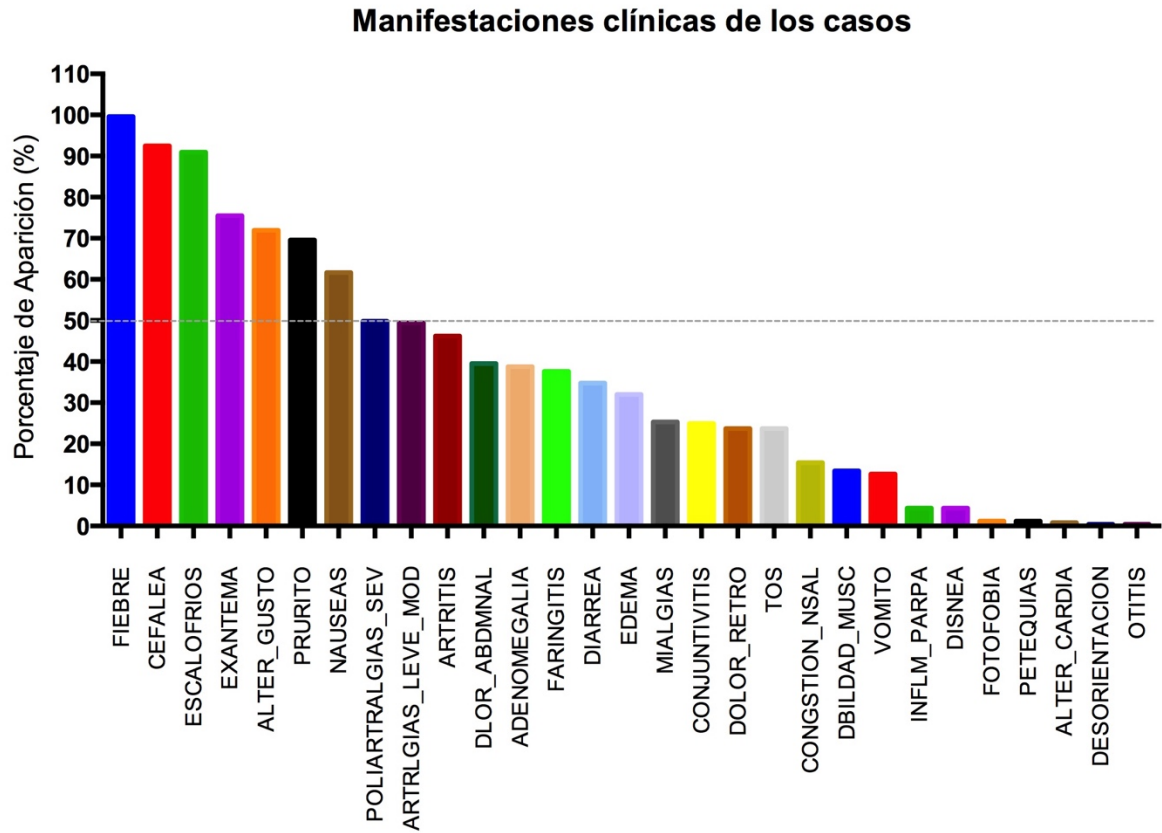


Figura 6. Manifestaciones clínicas de los casos. Tapachula Chiapas, México. 2015-2016.

8.2 Detección de ARN viral para DENV, CHIKV y ZIKV por PCR tiempo real

En el ensayo por PCR en tiempo real se logró detectar el 70.75% (179/253) casos positivos para CHIKV, 0.39% (1/253) de casos positivos para DENV y 2.37% (6/253) de casos positivos para ZIKV (Figura 7). Se logró identificar 2 caso de co-infección con virus ZIKA y CHIKV, estos datos son lo encontrado para ambos periodos.

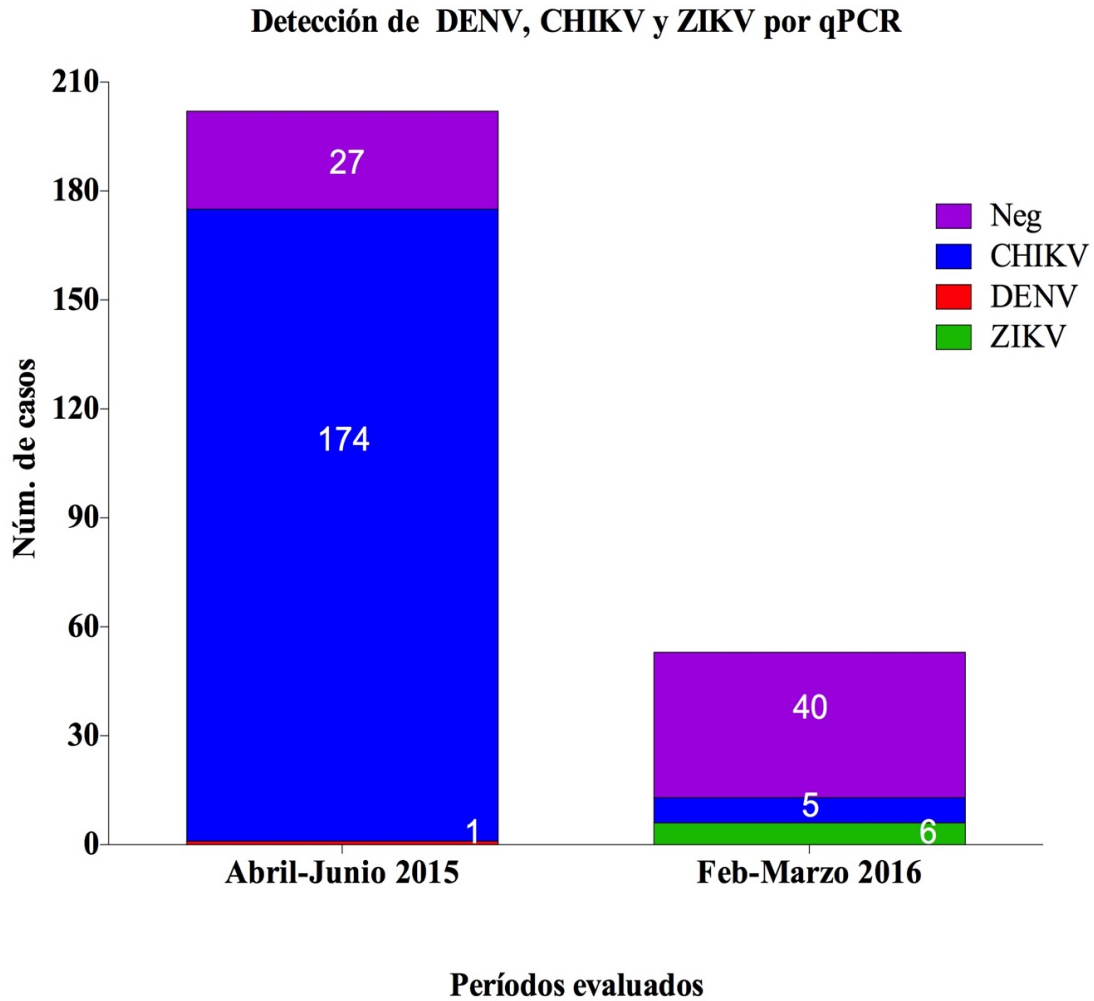


Figura 7. Muestras positivas para CHIKV, DENV y ZIKV detectadas por qPCR en los dos periodos de recolección. , Tapachula Chiapas, México. 2015-2016.

La figura 8 y 9 son ejemplos de amplificación de la qPCR para los casos de los virus de interés (CHIKV, DENV y ZIKV) y resultados de presencia/ausencia obtenidos por el StepOnePlus Software v2.3

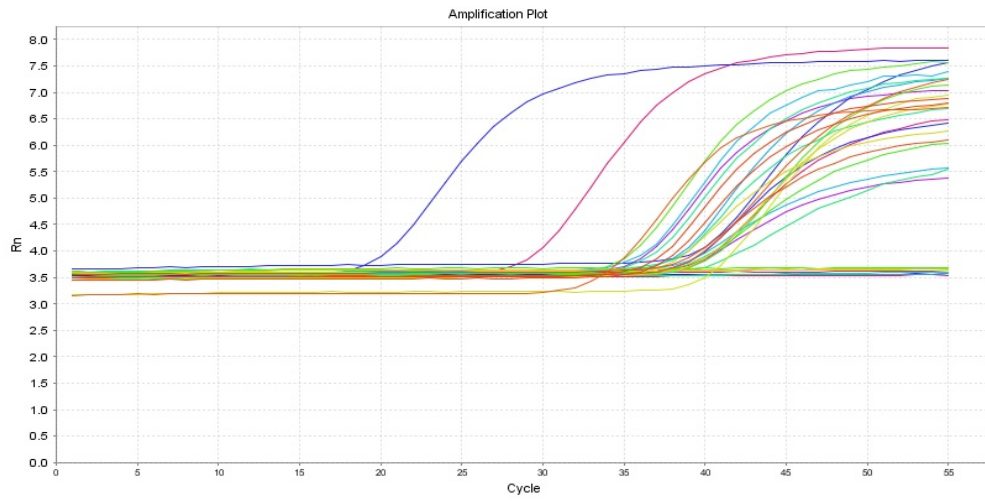


Figura 8. Grafica de amplificación donde se observan muestras positivas para DENV

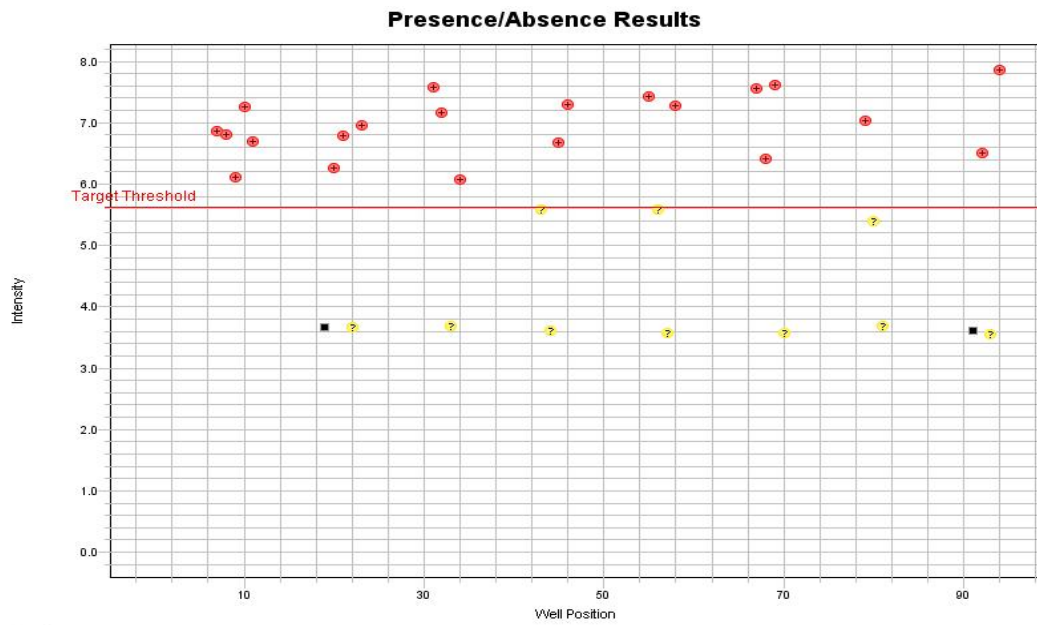


Figura 9. Grafica de presencia/ausencia para las muestras analizadas para virus DENV

8.3 Detección de flavivirus por PCR anidada

En el ensayo para determinar si algún otro arbovirus, estaba circulando durante los periodos de recolección de muestras; se realizó una ensayo de PCR anidada (Figura 10) utilizando iniciadores reportados por Natale Scaramozzino . Estos iniciadores flanquean una región de aproximadamente de 220 pb, esta es una región conservada mediante la cual se puede detectar más de 53 especies de flavivirus.

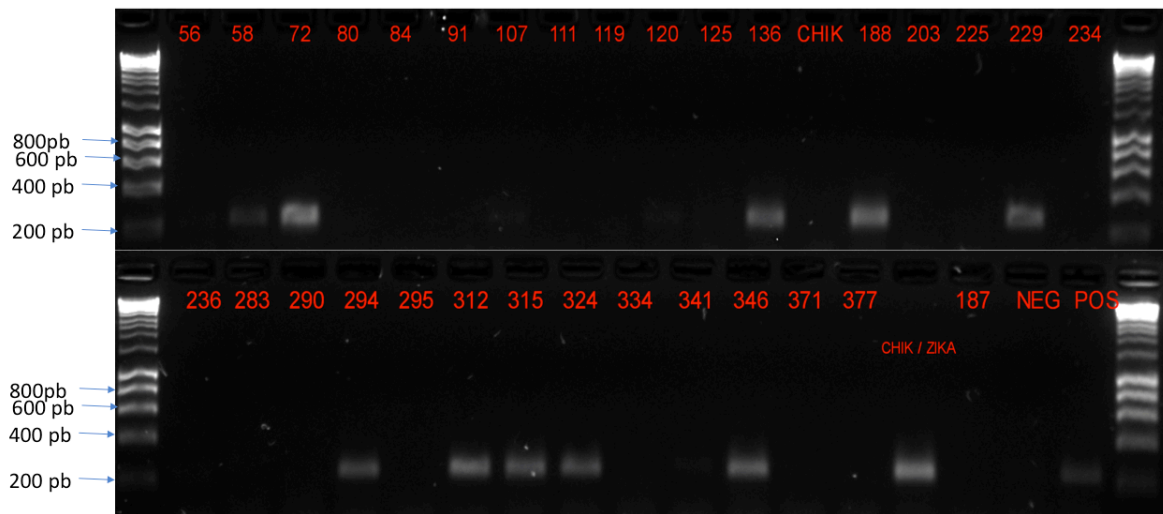


Figura 10. Gel de agarosa donde se muestra la positividad a flavivirus con por la técnica de PCR anidada.

Todos los fragmentos amplificados fueron purificados del gel y marcados con el kit de Big Dye v3.1 para su posterior secuenciación (Figura 11). A cada una de las secuencias obtenidas se les realizo una búsqueda de coincidencia con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para determinar la secuencia a la que se parece, se encontró que todas las muestras fueron positivas para ZIKV (Figura 12).

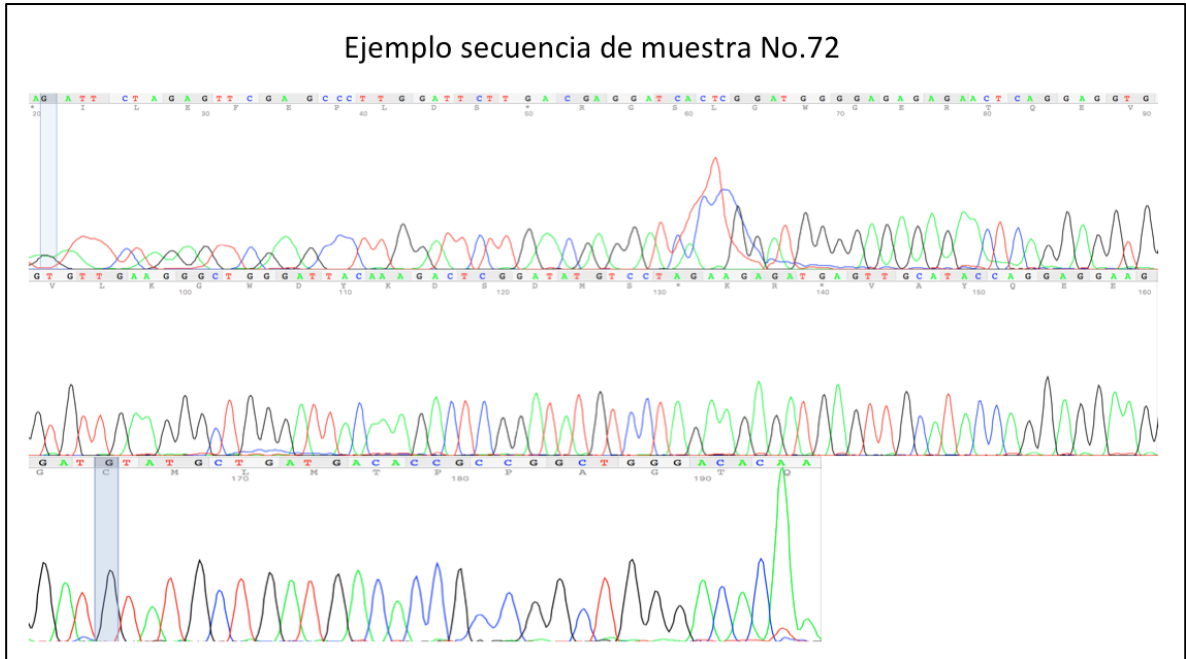


Figura 11. Electroferograma de la muestra No. 72 positiva para la PCR de Flavivirus.

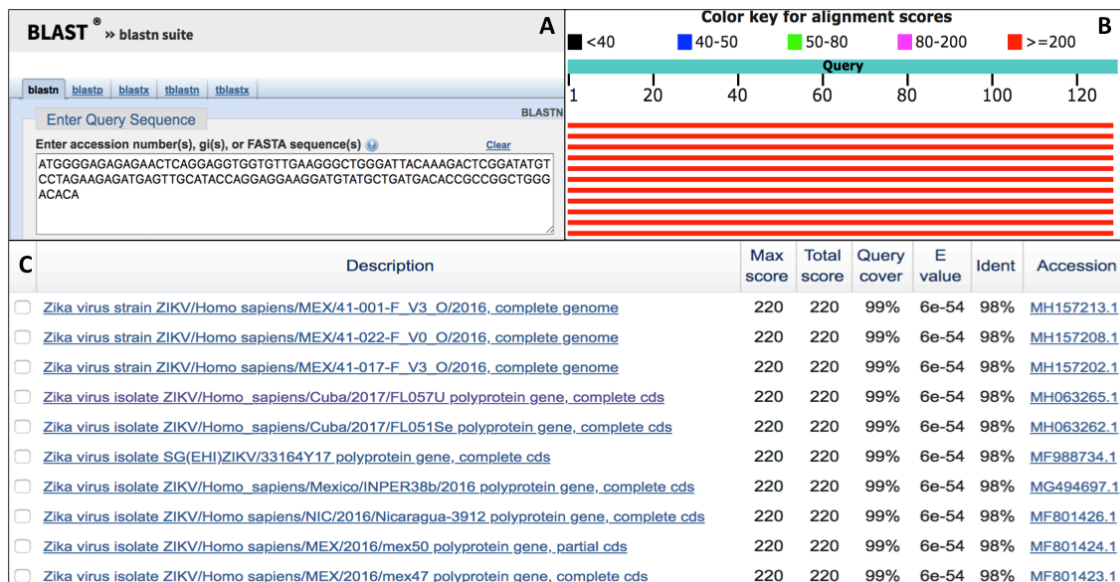


Figura 12. Ejemplo de análisis de búsqueda de coincidencia con BLAST para flavivirus. A) Secuencia ejemplo obtenida de las muestras positivas. B) Alineamiento con la herramienta BLAST. C) Descripción del resultado de coincidencia de la búsqueda en BLAST.

8.4 Detección de alfavirus por PCR anidada

Se realizó la determinación de alfavirus empleando la técnica de PCR anidada, se utilizaron iniciadores reportados por Klaus Grywna para la detección 32 especies de Alfavirus.

Las muestras positivas (Figura 13) se purificaron del gel de agarosa, se marcaron con el kit de Big Dye y posteriormente se secuenciaron en un analizador genético ABI 3130 ver Figura 14.

Posteriormente se realizó una búsqueda de coincidencia con el programa BLAST para determinar la secuencia a la que se parece. Se encontró que todas las muestras fueron positivas para CHIKV los resultados se muestran en la Figura 15.

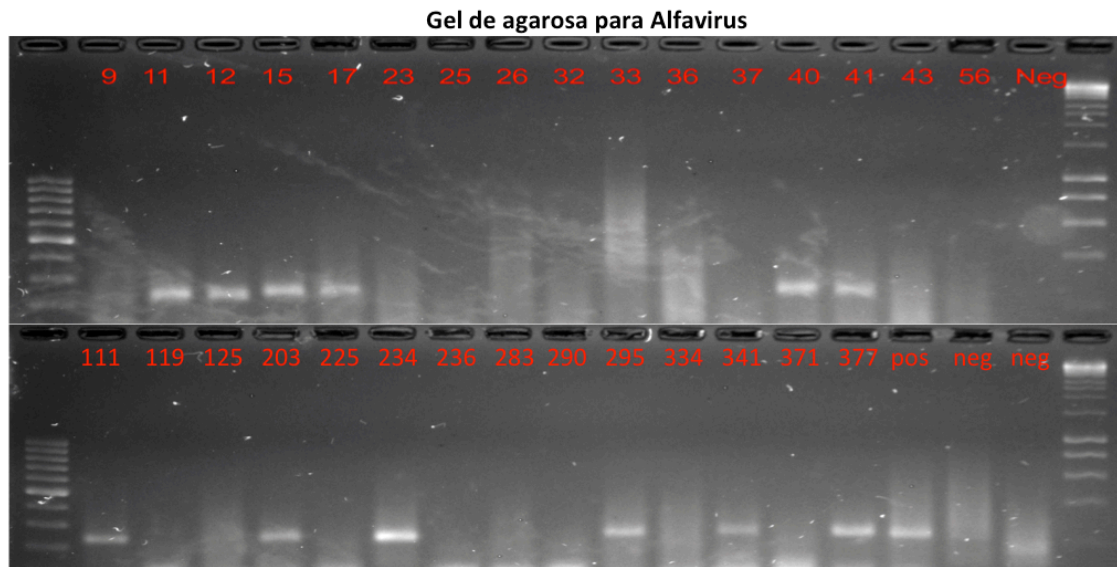


Figura 13. Gel de agarosa donde se observan las muestras positivas para la detección de alfavirus por la técnica de PCR anidada.

Ejemplo secuencia de muestra No.11

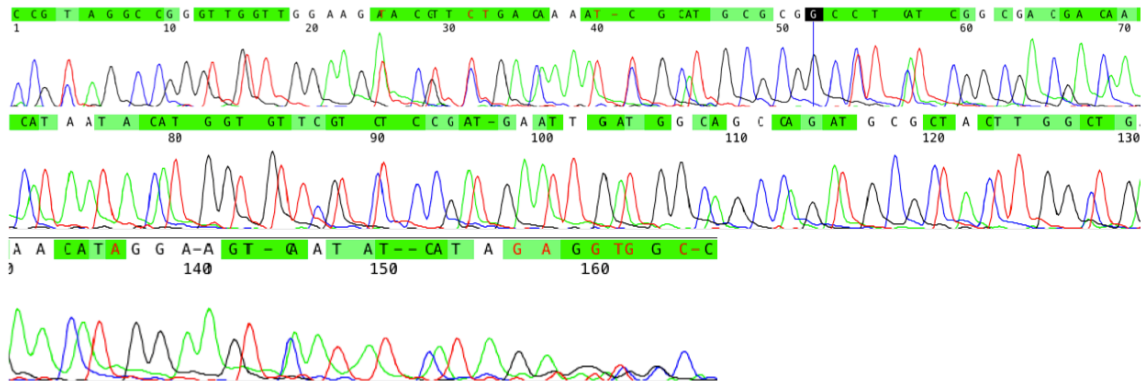


Figura 14. Electroferograma de la muestra No. 11 positiva para la PCR de Alfavirus.

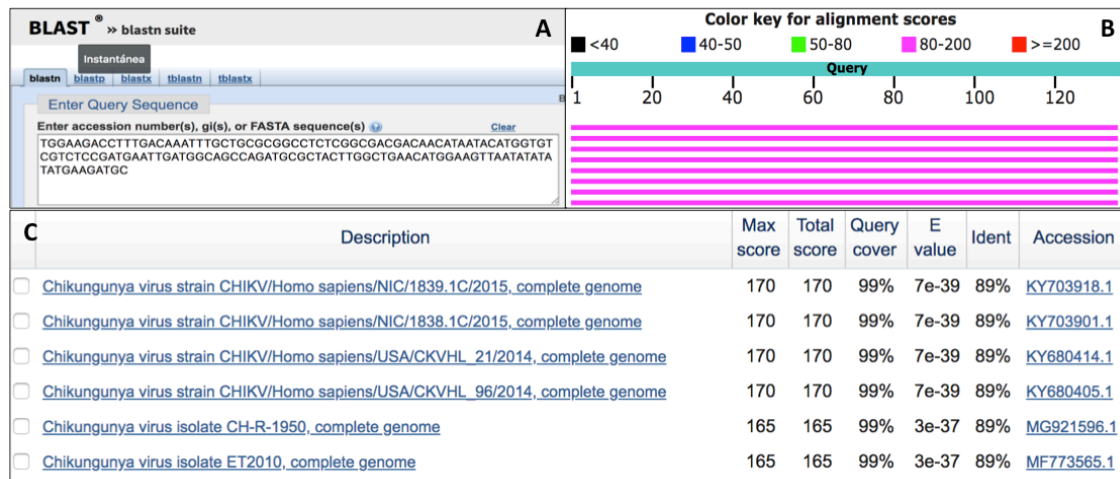


Figura 15. Ejemplo de análisis de búsqueda de coincidencia con BLAST para alfavirus. A) Secuencia ejemplo obtenida de las muestras positivas. B) Alineamiento con la herramienta BLAST. C) Descripción del resultado de coincidencia de la búsqueda en BLAST

A partir de 67 muestras negativas para flavivirus y alfavirus (Figura 16) se realizó extracción de ADN para la detección de Leptospirosis y Rickettsiosis.

Posterior a la amplificación utilizando los iniciadores reportados García-Ruiz, se empleó el reactivo Maxima SYBR Green/ROX, se verificó que no hubiera presencia de dímeros de primers evaluando la curva de fusión (melting curve) y curva de amplificación (Figura 17).

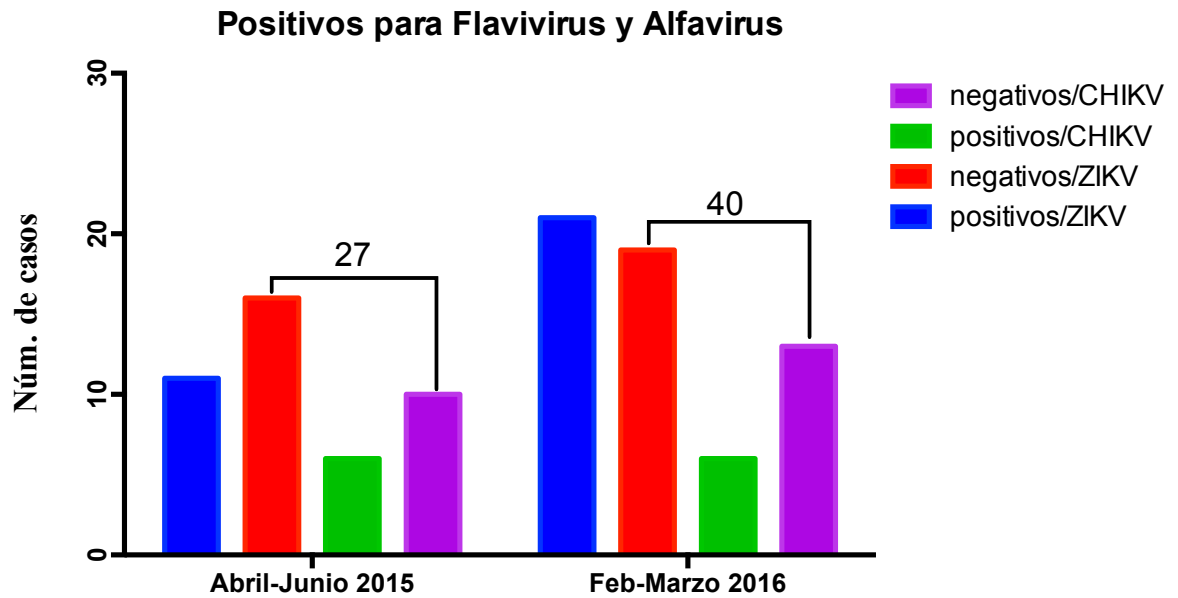


Figura 16. Grafica de muestras positivas a alfavirus y flavivirus detectadas por PCR anidada.

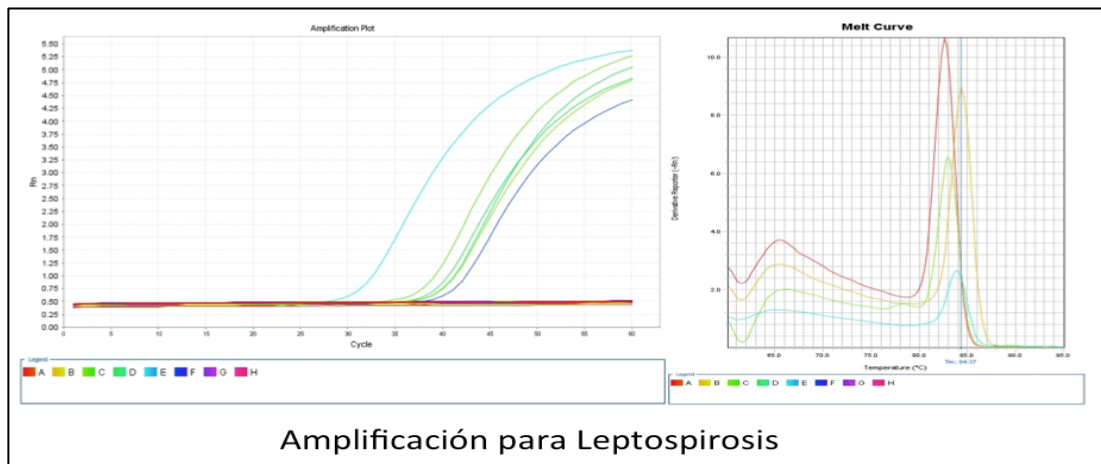


Figura 17. Ejemplo de las curvas de amplificación y fusión para la reacción de detección de Leptospira.

Se corrió una electroforesis en gel de agarosa para confirmar los productos amplificados (Figura 18), posteriormente se purificaron las bandas del gel y se marcaron para poder ser secuenciadas por el método de secuenciación capilar (Figura 19).

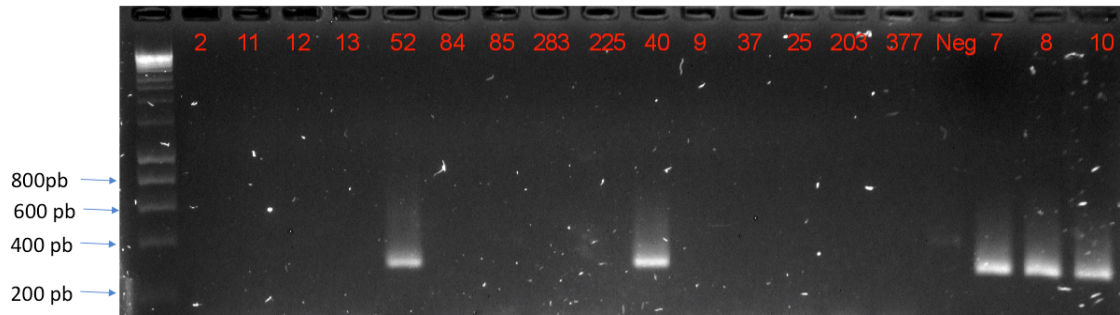


Figura 18. Gel de agarosa donde se observan las muestras positivas para la detección de *Leptospira*.

Ejemplo de muestra No. 7

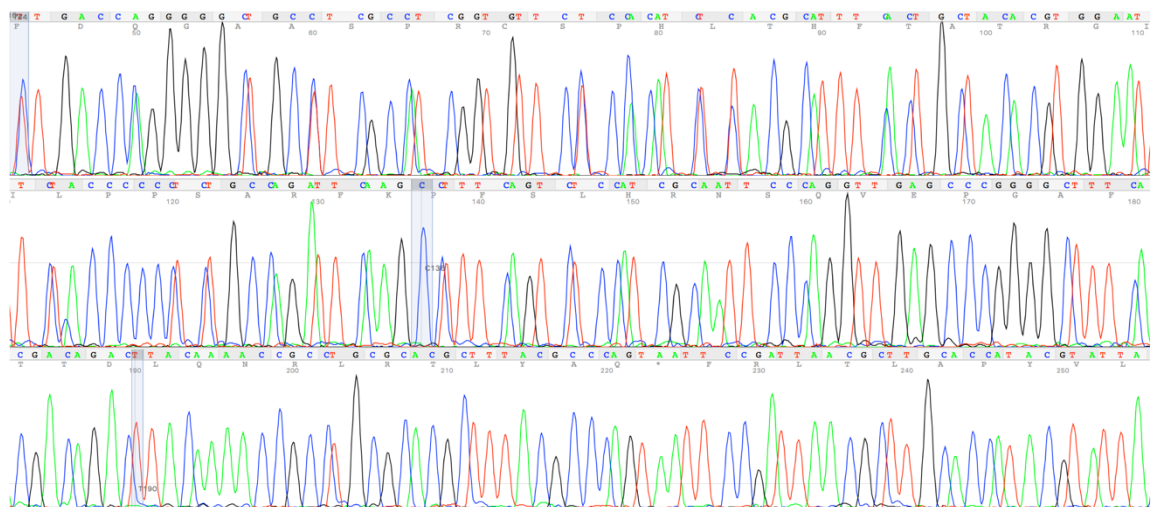


Figura 19. Electroferograma de la muestra No. 7 positiva por PCR para leptospira.

A todas las muestras se les realizo una búsqueda de coincidencia con el programa BLAST para determinar la secuencia a la que se parece. Se encontró que todas las muestras fueron positivas para *L. Kmetyi* (Figura 20), no se encontró ninguna muestra positiva para *Rickettsia*, los resultados se muestran en la Figura 21.

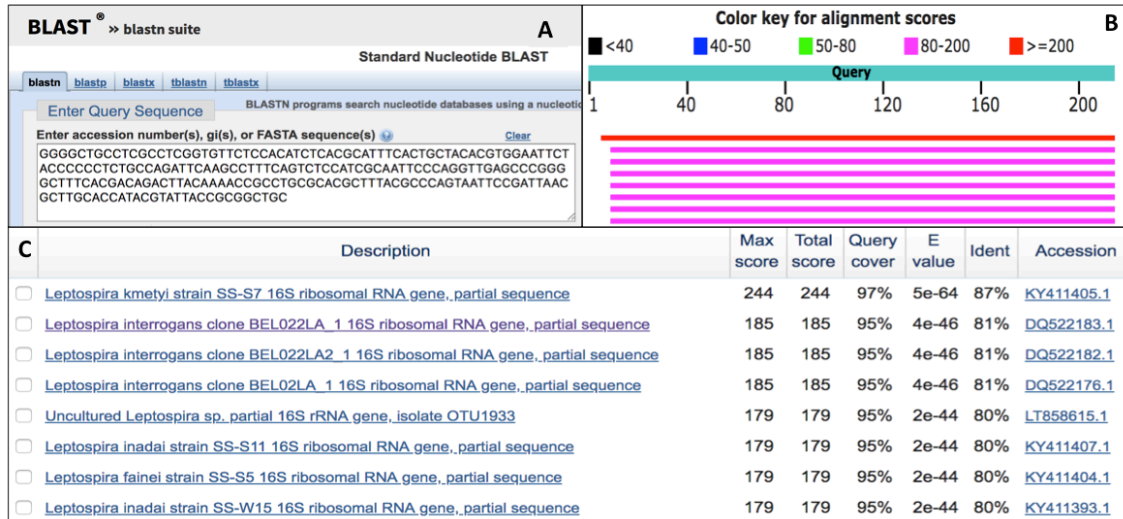


Figura 20. Ejemplo de análisis de búsqueda de coincidencia con BLAST para leptospira. A) Secuencia ejemplo obtenida de las muestras positivas. B) Alineamiento con la herramienta BLAST. C) Descripción del resultado de coincidencia de la búsqueda en BLAST

Casos positivos para L. Kmetyi

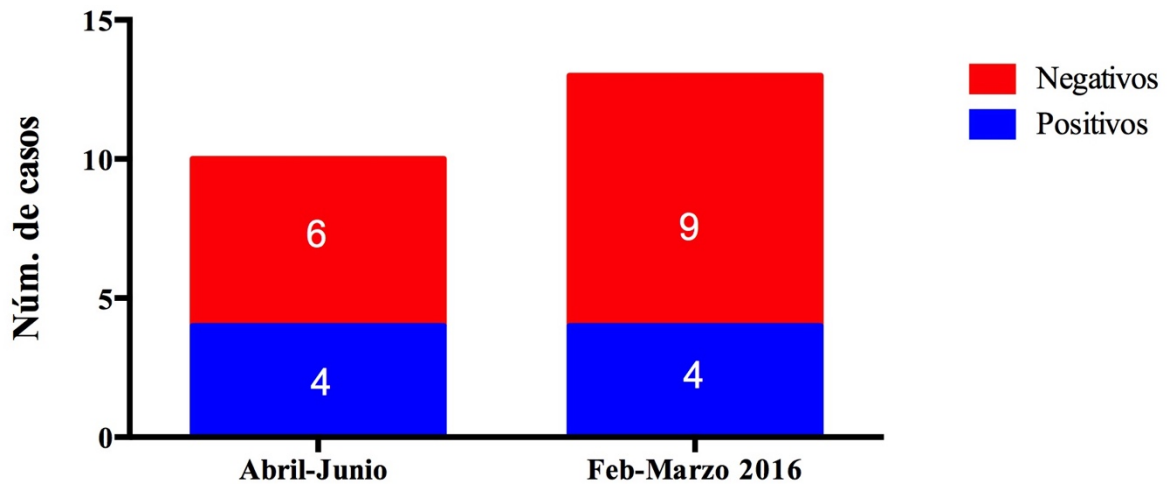


Figura 21. Resultados obtenidos para la búsqueda de Leptospirosis y Rickettsiosis, Tapachula Chiapas, México. 2015-2016.

En la figura 22 se puede observar gráficamente la distribución de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se destaca el alto porcentaje de detección de los diferentes

patógenos analizados (94.08%) y el bajo número de casos no diagnosticados 15 casos (5.92%).

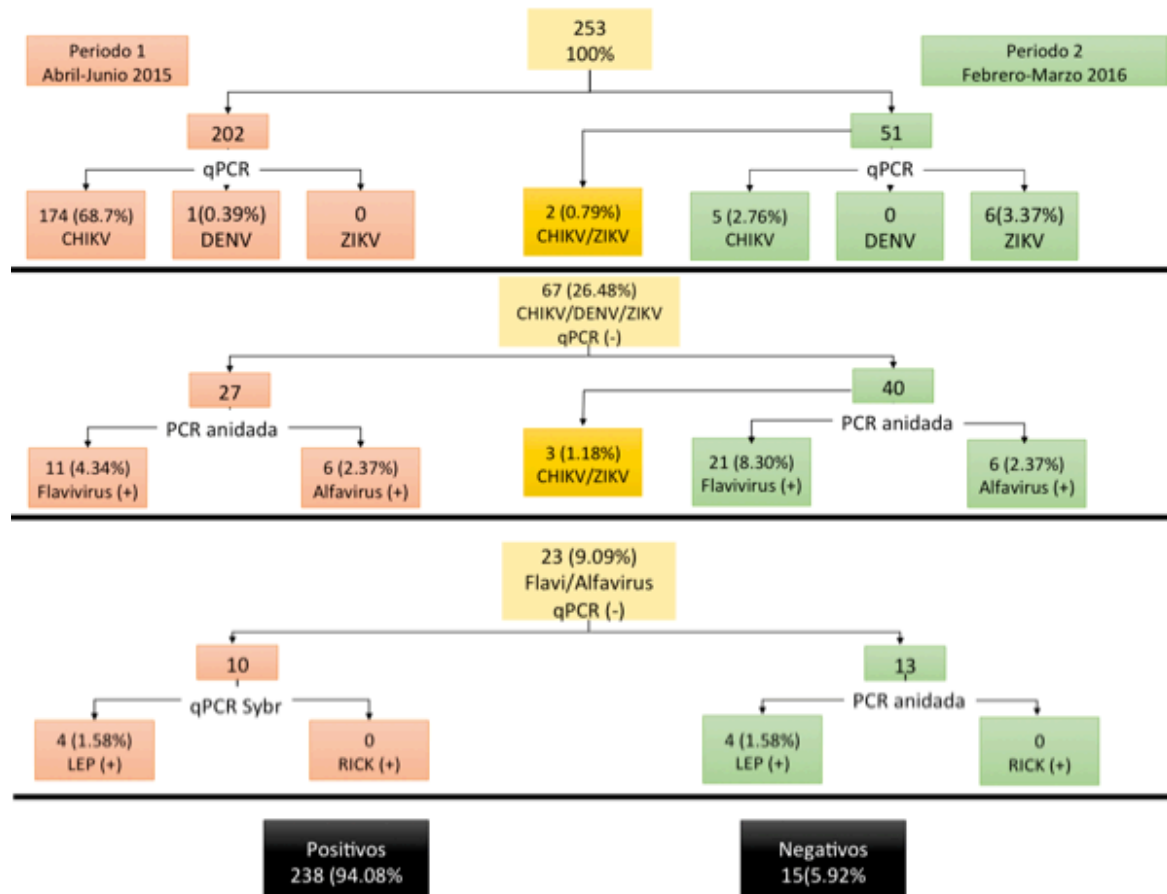


Figura 22. Reporte de datos epidemiológicos obtenido para arbovirose y otros patógenos que presentan síntomas sugerentes a infección por arbovirose.

En la figura 23 se puede observar los porcentajes de detección de cada patógeno por método empleado (qPCR, PCR anidada, qPCR Sybr Green), donde se puede observar que la detección mayor fue realizada empleando la técnica de qPCR específica para CHIKV y la que presentó un menor rendimiento fue de igual manera qPCR para DENV.

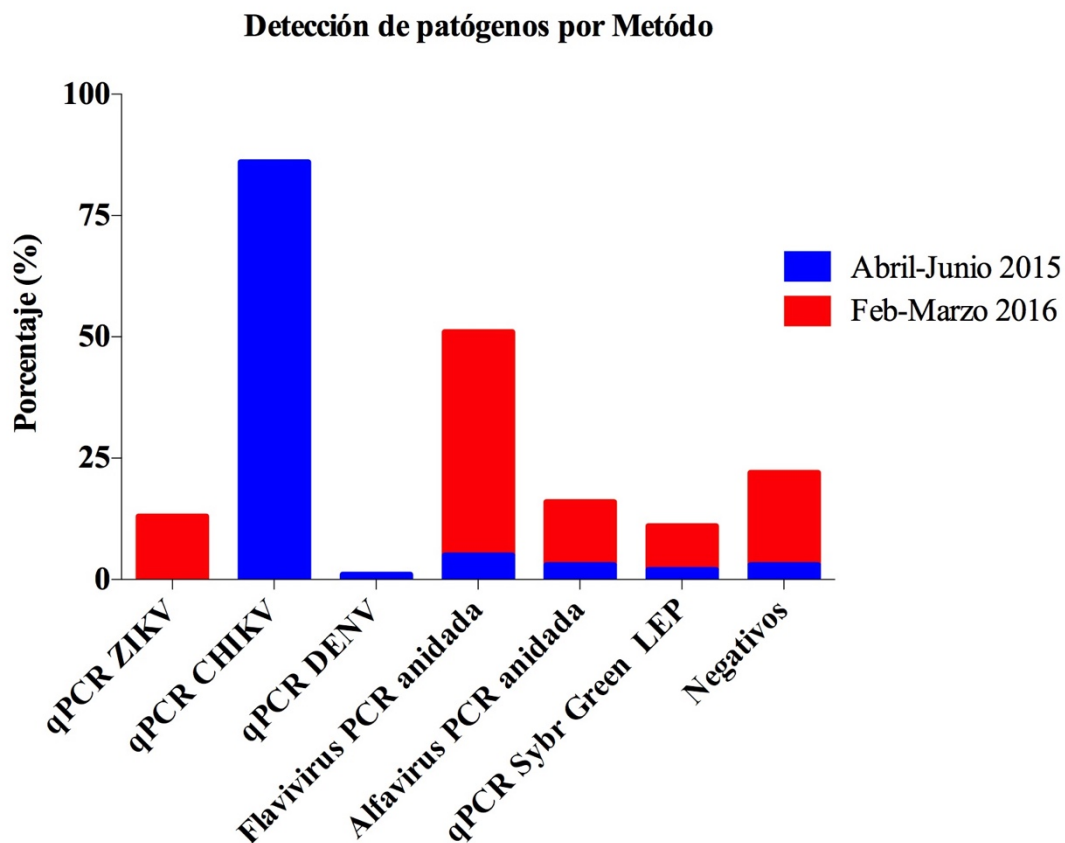


Figura 23. Grafica de detección de los diversos patógenos empleando diferentes métodos de detección molecular.

En la figura 24 se observan los resultados de detección obtenidos para cada patógeno en ambos periodos, CHIKV con 193 casos detectados seguidos de ZIKV con 38 casos, 4 casos de Leptospira y 0 casos de Rickettsia.

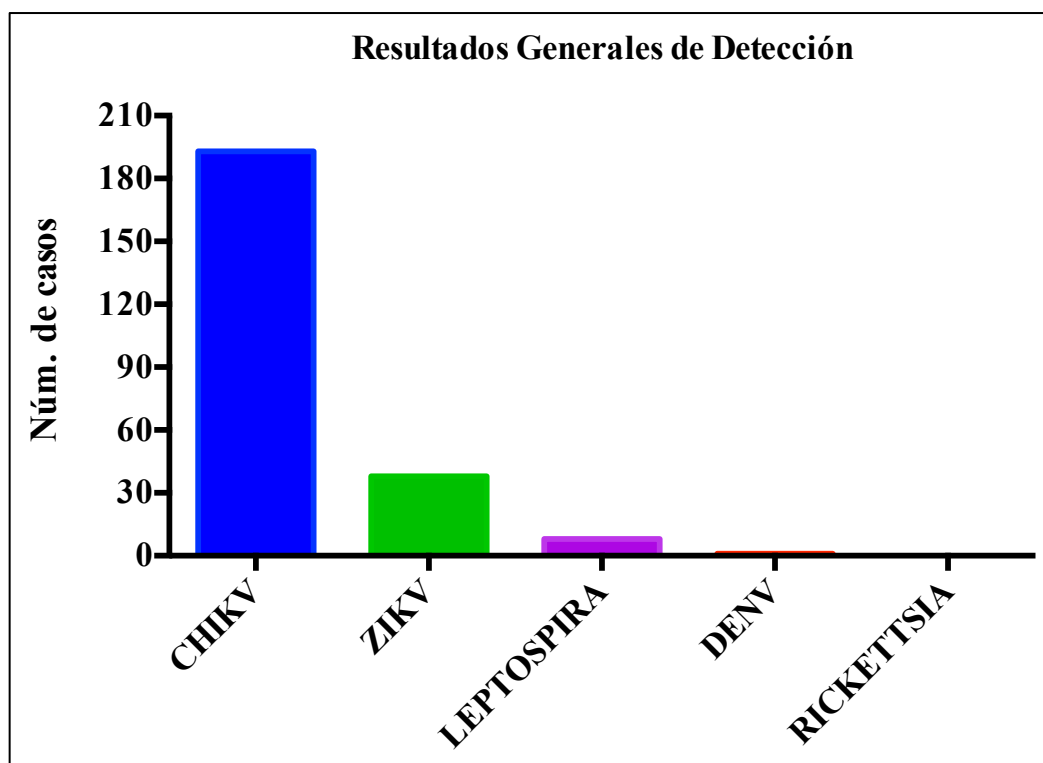


Figura 24. Resultados obtenidos por patógeno en ambos periodos recolectados.

8.5 Síntomas clínicos entre los diferentes grupos

La fiebre fue el síntoma informado con mayor frecuencia en los casos de ZIKV infectados con el 100%. Sin embargo, la presencia de fiebre también se informó en el 99.5% de los casos con CHIKV infectados y no se asoció significativamente hacia un grupo. El segundo síntoma fue la cefalea los cuales tuvieron 94.3% y 91%, respectivamente, de igual manera tampoco mostraron diferencia significativa hacia un grupo.

Los síntomas listados a continuación mostraron significancia estadística en los pacientes con ZIKV + y CHIKV + estos fueron: Mialgias (65.7% vs 11.6, $p < 0.01$), artralgia leve-moderado (71.4% vs 40.2%, $p < 0.01$), artritis (17.1% vs 54.5%, $p < 0.01$), Dolor retro (51.4% vs 15.9%, $p < 0.01$), exantema (60% vs 79.9%, $p < 0.05$), Conjuntivitis (71.4% vs 10.6%, $p < 0.01$), Tos (42.9% vs 18%, $p < 0.01$), Alteración del gusto (42.9% vs 79.4%, $p < 0.01$), Adenomegalia (25.7% vs 45%, $p < 0.05$), Edema (14.3% vs 37%, $p < 0.05$) Ttabla 27 y Figura 25).

Tabla 31. Características clínicas de pacientes con ZIKV + y CHIKV +. Tapachula, Chiapas, México.
2015-2016

SINTOMA	ZIKV/35 (%)	CHIK/189 (%)	<i>p</i>
CEFALEA	33 (94.3)	173 (91.5)	0.746
MIALGIAS	23 (65.7)	22 (11.6)	<0.01
ARTROALGIAS LEVE MODERADO	25 (71.4)	76 (40.2)	<0.01
POLIARTROALGIAS SEVERA	10 (28.6)	112 (59.3)	<0.01
ARTRITIS	6 (17.1)	103 (54.5)	<0.01
DOLOR_RETRO	18 (51.4)	30 (15.9)	<0.01
EXANTEMA	21 (60.0)	151 (79.9)	<0.05
PRURITO	22 (62.9)	138 (73.0)	0.227
VOMITO	3 (8.6)	27 (14.3)	0.588
NAUSEAS	23 (65.7)	116 (61.4)	0.707
ESCALOFRIOS	32 (91.4)	175 (92.6)	0.734
FOTOFOBIA	1 (2.9)	2 (1.1)	0.401
DOLOR_ABDOMINAL	11 (31.4)	81 (42.9)	0.262
DIARREA	9 (25.7)	73 (38.6)	0.182
CONJUNTIVITIS	25 (71.4)	20 (10.6)	<0.01
CONGESTION NASAL	8 (22.9)	24 (12.7)	0.12
TOS	15 (42.9)	34 (18.0)	<0.01
FARINGITIS	11 (31.4)	70 (37.0)	0.571
ALTER_GUSTO	15 (42.9)	150 (79.4)	<0.01
ADENOMEGALIA	9 (25.7)	85 (45.0)	<0.05
INFLAM_PARPA	3 (8.6)	8 (4.2)	0.384
DISNEA	3 (8.6)	6 (3.2)	0.151
ALTER_CARDIA	0 (0)	2 (1.1)	1
DESORIENTACION	0 (0)	1 (0.5)	1
DEBILIDAD MUSCULAR	4 (11.4)	30 (15.9)	0.615
OTITIS	0 (0)	1 (0.5)	1
PETEQUIAS	1 (2.9)	2 (1.1)	0.401
EDEMA	5 (14.3)	70 (37.0)	<0.05

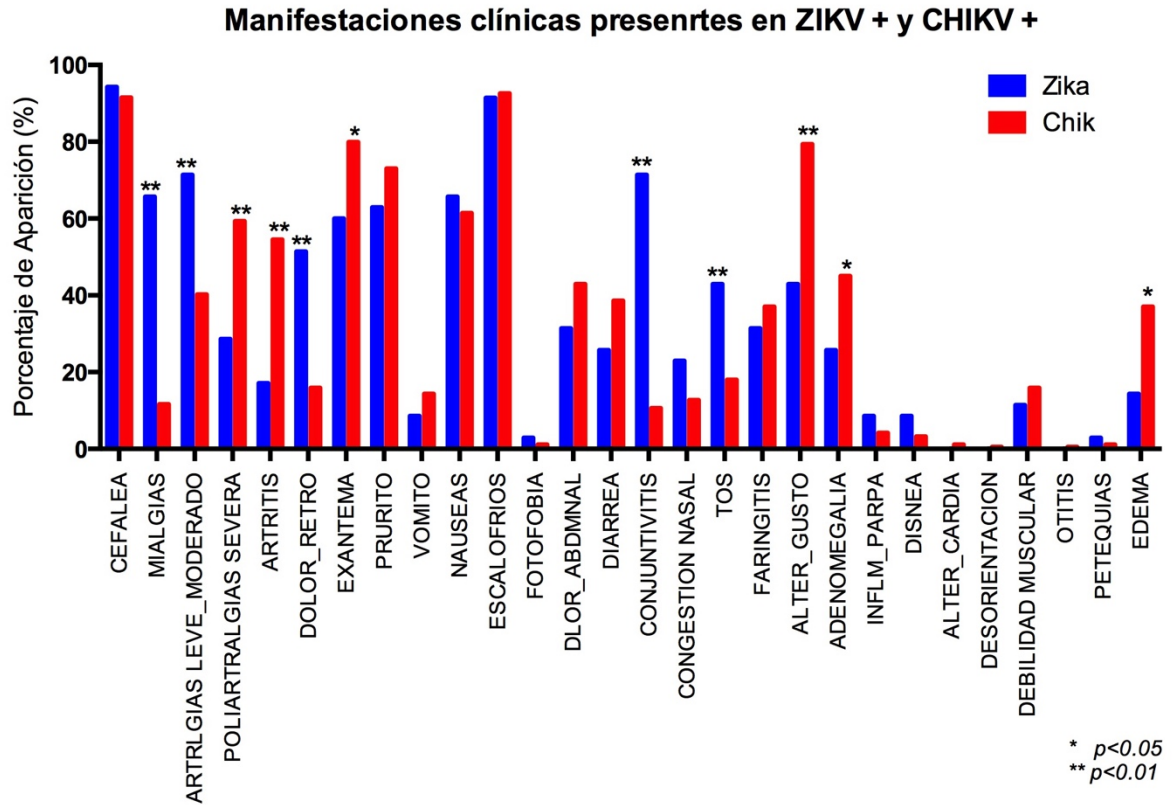


Figura 25. Manifestaciones clínicas presentes en ZIKV + y CHIKV +.

Los síntomas como vómitos, fotofobia, petequias y otros síntomas fueron poco frecuentes. Encontramos que solo el 28% de los pacientes con ZIKV positivas tenían síntomas que cumplían con la definición de caso estándar para un caso clínico de enfermedad por Zika. Mientras que para los pacientes con CHIKV encontramos el 16.9% tenían síntomas que cumplían con los criterios para la enfermedad de Chikungunya.

Para el Grupo II de 51 pacientes se encontraron 5 casos con co-infección de CHIKV+/ZIKV+, a la cual no se le pudo realizar alguna comparación estadística por el número limitado de pacientes, sin embargo, 3 de ellos cumplían con los criterios clínicos para la enfermedad de zika y Chikungunya.

Por otro lado, los pacientes detectados con leptospirosis, cumplían con la mayoría de criterios para las dos enfermedades zika y Chikungunya.

9 DISCUSIÓN

Como resultados de nuestro trabajo, en el primer análisis por qPCR mostro 71.46% (179) de casos positivos para CHIKV, 3.37% (6) para ZIKV y solo un 0.39% (1) para dengue, de acuerdo a CHIKV correspondía a porcentajes de detección del mismo periodo 65.2% (Danis-Lozano et al., 2017), mientras que para ZIKV se observó en bajo porcentaje en el mismo periodo con el 11.7% mientras que para el trabajo de Guerbois et al. (Guerbois et al., 2016) mostro un porcentaje de 21%. Para el virus DENV solo encontramos un caso, esto igual se compara con los resultados en esta misma región (Danis-Lozano et al., 2017; Guerbois et al., 2016) en los cuales no se detectó la presencia del virus por qPCR, sin embargo, por títulos virales de IgM para DENV, se encontraron en algunos casos.

Utilizando otra estrategia alternativa para detección de alfavirus y flavivirus por PCR-anidada subimos el poder de detección de 71.46% a 76.27% (193/253 muestras) de casos positivos para CHIKV, el cual mostró un porcentaje de detección ligeramente superior al de otros estudios en el mismo periodo en Chiapas 65.2% (Danis-Lozano et al., 2017), 20, 21% (Guerbois et al., 2016). Para los casos positivos para ZIKV aumento de 3.37% a 15.01% (38 muestras) con un aumento significativo de casos positivos para los meses de febrero-marzo del 2016, en donde mostramos 53% de positivos (27/51 muestras), estos resultados son superiores a los reportado por Guerbois con un 21% (Guerbois et al., 2016), estos resultados ayudan a plantearnos la hipótesis de que se debe tener una segunda técnica de detección en caso de emergencia para poner dar un diagnóstico certero y evitar lo menos posible los resultados falsos negativos

La estrategia de utilizar dos métodos alternativos para la identificación de arbovirus demuestra el poder de detección (qPCR + PCR-anidada), para aumentar los casos positivos a algún tipo de virus. Es importante considerar que en este estudio se utilizaron iniciadores universales capaces de detectar más del 95% de las especies de flavivirus y 90% de alfavirus. Estos resultados proporcionan un dato importante en la epidemiología de los arbovirus ya que podría existir flavivirus ó alfavirus aparte de ZIKV, CHIKV y DENV en la región fronteriza de Chiapas que hasta el momento no se han estudiado.

Cabe destacar que, Aunque la RT-PCR por sondas es muy sensible y específica y es de suma importancia para su utilidad clínica, suelen tener algunas limitantes, ya que estudios previos han demostrado que el procesamiento de muestras y el método de extracción de ARN contribuyen significativamente a los resultados en el número de positivos o negativos "falsos" (Burchill et al., 1999; Keilholz et al., 1998). De igual manera, algunos estudios demuestran que la variación de secuencia en los virus puede afectar la detección por RT-qPCR (Kamau et al., 2017). De acuerdo a datos observados en este estudio, en época de emergencia o Re-emergencia de algún patógeno se recomienda utilizar otra técnica para una mejor detección y poder eliminar los falsos negativos.

Por otro lado, si bien es cierto que las pruebas de diagnóstico para CHIKV y ZIKV se basan en serología y RT-PCR. Los anticuerpos de la inmunoglobulina IgM generalmente aparecen durante la primera semana después del inicio de los síntomas, y su aparición es seguida rápidamente por la aparición de anticuerpos IgG (Lanciotti et al., 2008). Aunque las pruebas de IgM pueden ser capaces de identificar infecciones recientes por ZIKV, una serología de IgM positiva aún requiere confirmación con una prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT) debido a la reactividad cruzada con otros flavivirus, como DENV (Rabe et al., 2016) mas no para los alfavirus, aunque de igual manera hay que confirmarse por PRNT (Kam et al., 2015). Particularmente, las pruebas serológicas en poblaciones con alta exposición a DENV podrían ser extremadamente difíciles debido a problemas de reactividad cruzada. Por lo tanto, RT-PCR tiene una ventaja sobre la serología debido a su especificidad. Además, la detección del ARN de ZIKV y CHIKV por RT-PCR es una indicación de infección aguda por cualquiera de las dos infecciones, aunque se ha observado persistencia en la orina, la saliva, las lágrimas y el semen (Bandeira et al., 2016; Judice et al., 2018).

En México se informaron los primeros tres casos de ZIKV el 25 noviembre de 2015 (Kindhauser et al., 2016), aproximadamente 7 meses después del primer reporte de presencia de ZIKV en mosquitos en los estados de San Luis y Tabasco (Diaz-Quinonez et al., 2016). En nuestro estudio, se identificó presencia del virus ZIKV desde el 14 de abril

2015 en una persona infecta, lo cual nos hace pensar de la presencia del vector infectado desde principio del año 2015, los primeros reportes en América suelen ser de Brasil a partir de mayo del 2015 (casos confirmados) y con una migración hacia el norte del continente americano en meses posteriores (Musso, 2016). Nosotros sugerimos, que las rutas migratorias de Asia y África hacia el continente americano suelen ser diversos, La presencia del virus ZIKV desde abril del 2015, hace pensar que la distribución de la epidemia a todo el continente Americano surgió desde diferentes puntos. Aunque un estudio filogénico infiere que la trasmisión de ZIKV fue desde Brasil ya que fue donde se estableció desde principios de 2014 (Theze et al., 2018). De igual manera, creemos que hacen falta estudios retrospectivos, para establecer resultados mucho más concluyentes.

La ampliación de búsqueda de otros patógenos que presentan una sintomatología similar/sugereente a infección por enfermedad febril es de suma importancia para establecer el agente etiológico y así realizar un buen manejo del paciente infectado. En nuestro estudio hicimos un descubrimiento inesperado de secuencias de ácido nucleico sugestivas de *L. Kmetyi*, se detectaron 8 casos en las 23 muestras negativas para flavivirus y alfavirus.

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica considerada una de las más ampliamente diseminadas y prevalentes en la naturaleza, que puede transmitirse por contacto directo o indirecto con la orina de animales infectados (Sanchez-Montes et al., 2015). La mayoría de la carga de morbilidad se produce en las regiones tropicales donde pueden producirse grandes epidemias después de fuertes lluvias e inundaciones(Guernier et al., 2018), *L. Kmetyi* ha sido reportadas por diversos estudios (Mohd Ali et al., 2017; Saito et al., 2014) en aguas y suelos contaminados por heces de animales infectados y en regiones tropicales en temporadas de lluvia suele presentarse cerca de los ríos ya que estos al desbordarse contaminan el suelo de algunas comunidades, En el caso de nuestro estudio los casos detectados son pacientes que viven en zonas rurales cerca de ríos en la región de Tapachula, Chiapas, por lo cual se infiere que pudieron tener contacto con el patógeno.

La mayoría de los casos por leptospirosis es debido a *L. interrogans*, *L. kirschneri* y *L.*

noguchii (Esteves et al., 2018), sin embargo, en nuestro estudio encontramos presente a *L. kmetyi*, en cual artículos de revisión sugieren que al carecer de la mayoría de proteínas específicas de patógenos y no ser muy virulentas, no está asociada a enfermedades humanas (Picardeau, 2017). Mientras que, otros estudios lo catalogan como causante de enfermedad en humanos, ya que se aisló de pacientes sintomáticos (Bourhy et al., 2013; Meny et al., 2017; Mohd Ali et al., 2017).

Este estudio demuestra por primera vez la presencia de *L. kmetyi* en pacientes de la región fronteriza de México. Proporcionando datos importantes para una mayor investigación, de igual modo, se requieren más estudios para determinar las características serológicas y moleculares de esta cepa y su distribución en México, también, para explorar la relación entre la *L. kmetyi* y sus posibles funciones en las infecciones humanas.

Con respecto a las características clínicas estándar reportadas para CHIKV (Staples et al., 2009), los resultados del presente trabajo fueron muy similares a lo ya reportado. Los síntomas más comunes informados por estudios previos, incluidos los nuestros, fueron fiebre (98-100%), artralgias (98-100%), Escalofríos (82-92%), Cefalea (82-91.5%), exantema (79.9-82.3%), prurito (66-73%), Nauseas (61-71%), artritis (54.5-65%), dolor abdominal (39-46%), diarrea (29-50%%), faringitis (37%) y edema (37-43%). La alteración del gusto, faringitis y otros síntomas rara vez se describieron en los reportes revisados (Danis-Lozano et al., 2017; Galan-Huerta et al., 2018).

Con lo que respecta a las características clínicas reportadas para ZIKV (Musso & Gubler, 2016), nuestros resultados se asemejaron a lo ya reportado por otros grupos de trabajo. Los síntomas más comunes, incluidos los nuestros fueron fiebre (65-100%), cefalea (45-94.3%), escalofríos (62-91.4%), artralgias (65-88%), conjuntivitis (38-71.4%), nauseas (33-65.7%), mialgias (48-71%), prurito (62.9-78%), exantema (60-80%), dolor retroocular (38-51.4%), dolor abdominal (25-31.4%) (Duffy et al., 2009; Garza-Gonzalez et al., 2017; Guerbois et al., 2016). En contraste con lo anterior, refiriéndonos a los pacientes positivos a ZIKV en nuestro estudio del primer periodo, los síntomas como

conjuntivitis (2/12; 16%) y mialgias (0/12; 0%) se mostraron disminuidos o ausentes en porcentaje a lo ya reportado.

Como se ha manejado en la literatura para las infecciones por arbovirosis, los síntomas son inespecíficos y el diagnóstico diferencial representa un desafío. Sin embargo, A pesar de las similitudes de estas enfermedades en cuanto a los síntomas, existen diferencias entre ellos que pueden guiar al médico hacia un diagnóstico clínico más preciso (Beltrán-Silva et al., 2018).

Cabe resaltar, que en este estudio se identificó co-infección de ZIKV y CHIKV, en solo 5 pacientes, correspondientes a segundo periodo, en los pacientes no se observó un efecto sinérgico en la co-infección respecto a la clínica. Similar a lo que se ha reportado en otros trabajos (Dupont-Rouzeyrol et al., 2015; Villamil-Gomez et al., 2016).

Finalmente, A pesar del uso de las diferentes técnicas de diagnóstico anteriormente descritas, hubo 15 casos negativos para alfavirus, flavivirus, leptospirosis y rickettsiosis. Aunque la técnica de RT-qPCR suele ser lo suficientemente específica y sensible para la identificación de virus, es preferible la evaluar y optimizar la sonda a utilizar para disminuir los falsos negativos (Corman et al., 2016). De igual manera, podría ampliarse la búsqueda a otros patógenos para determinar la causa de infección en los casos negativos o incorporarse a algunos paneles, ya que la incidencia y etiología de la fiebre suelen ser muy complejas y son muy poco claras (Liu et al., 2016).

En resumen, nuestros datos enfatizan la necesidad de ensayos altamente sensibles y específicos para el diagnóstico preciso de los pacientes con alguna infección febril ya que este es fundamental para la vigilancia epidemiológica en curso, el tratamiento y evaluación de las posibles terapias. Además de una elección adecuada del método, la sensibilidad clínica puede aumentarse probando varias muestras por paciente, utilizando más de un objetivo de RT-PCR en tiempo real, optimizando la purificación de ARN a partir de muestras clínicas y combinando pruebas moleculares y serológicas (Lanciotti et al., 2008), ya que tomando en cuenta varios de estos parámetros podrían ser fundamental para comprender y garantizar una respuesta de laboratorio adecuada, oportuna y precisa.

10 CONCLUSIONES

De los 253 sueros colectados se pudo detectar la presencia de CHIKV, DENV y ZIKV por medio de RT-qPCR sonda específica. En 71.5%, 0.39% y 2.37%, respectivamente.

La ampliación de cobertura para la identificación de virus del género flavivirus y alfavirus por medio de PCR anidada, logro aumentar el poder de detección de CHIKV y ZIKV en un 76.24% y 15.01%, respectivamente.

La búsqueda intencionada de otros patógenos causantes de síntomas a infección por enfermedad febril similares a arbovirosis, identificó 3.16% de casos positivos para L. Kmetyi.

Se logra identificar diferencias mínimas en los síntomas clínicos de los pacientes con ZIKV y DENV, lo cual puede guiar al médico hacia un diagnóstico clínico más preciso

Se pudo llegar al diagnóstico en el 94% de los casos totales, mientras que el 6% restante, sigue sin esclarecerse la causa de su cuadro febril.

Existe la presencia múltiple de patógenos CHIKV (76.24%), DENV (0.39%), ZIKV (15.01%) y L. Kmetyi (3.16%).

11 ANEXOS

Todos los cebadores/sondas están en la dirección de 5 'a 3'. Los desajustes se resaltan con cuadros azules. La secuencia del cebador anti-sentido se complementa inversamente.

Faye et al (2013)	Primer Forward	Sonda	Primer Reverse
	A A R T A C A C A T A C C A R A A C A A A A G T G G T	C T Y A G A C C A G C T G A A R	C A A G A C C A R A G R G G G A G Y G G A
BrazilAmniotic2015	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
BrazilBrain2015	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Brazil2015_1	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Brazil2015_2	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Brazil2015_3	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Brazil2015_4	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Brazil2015_5	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Cambodia2010	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
CAR1968	A A A T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A G	C A A G A C C A G A G A G G G A G T G G A
CAR1976	A A G T A C A C A A A A A A C A A A G T G G T	C T C A G A C C A G C T G A A G	C A G A C C A G A G A G G G A G T G G A
CAR1979	A A G T A C A C A A A A A A C A A A G T G G T	C T C A G A C C A G C T G A A G	C A G A C C A G A G A G G G A G T G G A
CAR1980	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T C A G A C C A G C T G A A G	C A A G A C C A G A G A G G G A G T G G A
FrenchPolynesia2013	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Guatemala2015_1	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Guatemala2015_2	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Haiti2014	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Malaysia1966	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G A G G G A G C G G A
Martinique2015	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Nigeria1968	A A A T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T C A G A C C A G C T G A A G	C A A G A C C A G A G A G G G A G C G G A
Philippines2012	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
PuertoRico2015	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
SaoPaulo2015	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Senegal1968	A A A T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T C A G A C C A G C T G A A G	C A A G A C C A G A G A G G G A G C G G A
Senegal1984	A A A T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T C A G A C C A G C T G A A G	C A A G A C C A G A G A G G G A G T G G A
Senegal1997	A A A T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T C A G A C C A G C T G A A G	C A A G A C C A G A G A G G G A G T G G A
Senegal2001	A A A T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T C A G A C C A G C T G A A G	C A A G A C C A G A G A G G G A G T G G A
Suriname2015	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Thailand2013	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Thailand2014	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Uganda1947_1	A A A T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T C A G A C C A G C T G A A G	C A A G A C C A G A G A G G G A G T G G A
Uganda1947_2	A A A T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T C A G A C C A G C T G A A G	C A A G A C C A G A G A G G G A G T G G A
Yap2007	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T C A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Mexico2016_1	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Mexico2016_2	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Mexico2016_3	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Mexico2016_4	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Mexico2016_5	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A
Mexico2015_2	A A G T A C A C A T A C C A A A A C A A A G T G G T	C T T A G A C C A G C T G A A A	C A A G A C C A A A G G G G G A G C G G A

Alineación del cebador 1: Este conjunto de cebador/sonda se dirige al gen NS5. Este conjunto de cebador/sonda coincide perfectamente con todos los aislamientos de África, Asia y Sudamérica y México, con la excepción de aislamientos de la República Centroafricana de 1976 y 1979.

Faye et al (2018)	Primer sentido (ZIKVENVF)										Primer anti-sentido (ZIKVENVR)																															
	G	C	T	G	G	D	G	C	R	G	A	C	A	C	H	G	G	R	A	C	T	C	A	G	Y	C	C	A	R	A	T	G	G	C	R	G	T	R	G	A	Y	
BrazilAmniotic2015	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
BrazilBrain2015	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Brazil2015_1	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Brazil2015_2	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Brazil2015_3	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Brazil2015_4	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Brazil2015_5	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Cambodia2010	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
CAR1968	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	C	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
CAR1976	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	T	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	C	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
CAR1979	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	T	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	C	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
CAR1980	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
FrenchPolynesia2013	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Guatemala2015_1	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Guatemala2015_2	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Haiti2014	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Malaysia1966	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Martinique2015	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	C	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Nigeria1968	T	C	T	G	G	T	G	C	A	G	A	C	A	C	T	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	C	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C	
Philippines2012	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	T	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
PuertoRico2015	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
SaoPaulo2015	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Senegal1968	G	C	T	G	G	T	G	C	A	G	A	C	A	C	T	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	C	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	A	G	A	C
Senegal1984	G	C	T	G	G	T	G	C	A	G	A	C	A	C	T	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	C	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Senegal1997	G	C	T	G	G	T	G	C	A	G	A	C	A	C	T	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	C	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Senegal2001	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	C	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Suriname2015	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Thailand2013	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Thailand2014	A	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Uganda1947_1	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	T	C	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Uganda1947_2	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	T	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	T	C	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Yap2007	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Mexico2016_1	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Mexico2016_2	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Mexico2016_3	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Mexico2016_4	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Mexico2016_5	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C
Mexico2015_2	G	C	T	G	G	G	G	C	A	G	A	C	A	C	C	G	G	A	A	A	C	T	C	A	G	C	T	C	A	G	A	T	G	G	C	G	G	T	G	G	A	C

Alineación de cebadores 2: Este conjunto de cebadores se dirige al gen de la envoltura. Es capaz de detectar todos los aislamientos de África, Asia y Sudamérica con un mismatch por 20 nucleótidos del cebador anti-sentido en aislados de Asia, América del Sur y México y de 1-3 mismatch por 21 nucleótidos del cebador sentido en Senegal, Nigeria y Tailandia

Lanciotti et al (2008)	Primer sentido (ZIKV 1086)					Sonda (ZIKV 1107)					Primer anti-sentido (ZIKV 1162c)									
	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	T	G	T	C
BrazilAmniotic2015	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	T	G	T	C
BrazilBrain2015	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Brazil2015_1	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Brazil2015_2	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Brazil2015_3	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Brazil2015_4	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Brazil2015_5	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Cambodia2010	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
CAR1968	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
CAR1976	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
CAR1979	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
CAR1980	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
FrenchPolynesia2013	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Guatemala2015_1	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Guatemala2015_2	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Haiti2014	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Malaysia1966	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Martinique2015	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Nigeria1968	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Philippines2012	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
PuertoRico2015	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
SaoPaulo2015	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Senegal1968	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Senegal1984	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Senegal1997	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Senegal2001	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Suriname2015	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Thailand2013	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Thailand2014	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Uganda1947_1	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Uganda1947_2	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Yao2007	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Mexico2016_1	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Mexico2016_2	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Mexico2016_3	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Mexico2016_4	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Mexico2016_5	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T
Mexico2015_2	C	C	G	T	G	A	G	C	T	A	T	C	A	G	A	A	A	T	G	T

Alineación de cebadores 3: Este conjunto de cebadores/sondas se dirige al gen de la envoltura es capaz de detectar todos los aislamientos de Asia, América del Sur y México con un mismatch por cada 31 nucleótidos de la sonda. Es posible que no se detecte el aislamiento de Filipinas debido a la falta de coincidencia en el extremo 5' de la sonda. Para los aislados africanos, hay 2 mismatch por 17 nucleótidos del cebador sentido, 1-2 mismatch por 31 nucleótidos de la sonda y 1-4 mismatch por 24 nucleótidos del cebador anti-sentido.

Lanciotti et al (2008)	Primer sentido (ZIKV 835)					Sonda (ZIKV 860)					Primer anti-sentido (ZIKV 911c)				
	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
BrazilAmniotic2015	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
BrazilBrain2015	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Brazil2015_1	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Brazil2015_2	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Brazil2015_3	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Brazil2015_4	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Brazil2015_5	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Cambodia2010	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
CAR1968	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
CAR1976	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
CAR1979	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
CAR1980	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
FrenchPolynesia2013	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Guatemala2015_1	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Guatemala2015_2	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Haiti2014	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Malaysia1966	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Martinique2015	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Nigeria1968	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Philippines2012	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
PuertoRico2015	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
SaoPaulo2015	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Senegal1968	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Senegal1984	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Senegal1997	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Senegal2001	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Suriname2015	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Thailand2013	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Thailand2014	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Uganda1947_1	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Uganda1947_2	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Yap2007	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Mexico2016_1	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Mexico2016_2	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Mexico2016_3	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Mexico2016_4	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Mexico2016_5	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G
Mexico2015_2	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	G	G	G	G	G

Primer alineamiento 4: Este conjunto de cebador/sonda se dirige a la unión del gen M-E es capaz de detectar todos los aislamientos de Asia, Sudamérica y México. Es posible que no detecte el aislamiento tailandés de 2014, que tiene un mismatch cerca del extremo 3' del cebador anti-sentido. Para los aislados africanos, hay 1-2 mismatch por 27 nucleótidos de sonda y 2-5 mismatch por 22 nucleótidos de cebador anti-sentido. En aislamientos de Senegal y Nigeria, se encontraron 2 mismatch por 23 nucleótidos del cebador sentido.

Tappe et al (2014)	Primer sentido (ZIKAF)										Sonda (ZIKAp)										Primer anti-sentido (ZIKAr)																																					
	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	A	T	G	T	A	T	G	C	T	G	A	T	G	A	A	G	G	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	C	A	T	C	T	A	C	C
BrazilAmniotic2015	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C		
BrazilBrain2015	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Brazil2015_1	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Brazil2015_2	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Brazil2015_3	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Brazil2015_4	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Brazil2015_5	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Cambodia2010	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
CAR1968	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
CAR1976	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
CAR1979	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
CAR1980	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
FrenchPolynesia2013	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Guatemala2015_1	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Guatemala2015_2	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Haiti2014	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Malaysia1966	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	T	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
Martinique2015	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Nigeria1968	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	T	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
Philippines2012	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
PuertoRico2015	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
SaoPaulo2015	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Senegal1968	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
Senegal1984	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
Senegal1997	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
Senegal2001	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
Suriname2015	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Thailand2013	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	T	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Thailand2014	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Uganda1947_1	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
Uganda1947_2	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	A	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C
Yap2007	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Mexico2016_1	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Mexico2016_2	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Mexico2016_3	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Mexico2016_4	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Mexico2016_5	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	
Mexico2015_2	T	G	G	A	G	A	T	G	A	G	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	C	T	G	A	T	G	A	A	G	A	C	C	A	T	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	T	G	A	C	A	A	T	A	T	T	A	C	C	

Alineación de cebadores 6: Este conjunto de cebadores/sondas se dirige al gen NS3 es capaz de detectar aislamientos de África con un mismatch por 22 nucleótidos de sonda y un mismatch por 19 nucleótidos de cebador inverso. Podría tener problemas con aislamientos asiáticos, sudamericanos y mexicanos debido a la falta de coincidencia en el extremo cercano a 3' del cebador inverso. También tiene 2 mismatch adyacentes en el cebador sentido con aislamientos asiáticos, sudamericanos y mexicanos.

Balm et al (2012)	Primer sentido (ZIKVF9027)										Primer anti-sentido (ZIKVR9197c)																																	
	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
BrazilAmniotic2015	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
BrazilBrain2015	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Brazil2015_1	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Brazil2015_2	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Brazil2015_3	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Brazil2015_4	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Brazil2015_5	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Cambodia2010	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
CAR1968	A	C	T	T	G	G	G	T	T	C	T	T	G	A	A	T	G	A	A	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
CAR1976	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	T	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
CAR1979	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	T	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
CAR1980	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	T	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
FrenchPolynesia2013	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Guatemala2015_1	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Guatemala2015_2	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Haiti2014	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Malaysia1966	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Martinique2015	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Nigeria1968	T	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	T	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Philippines2012	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	T	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
PuertoRico2015	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
SaoPaulo2015	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Senegal1968	T	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	A	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Senegal1984	T	C	T	T	G	G	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	A	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	C	T	C	T	
Senegal1997	T	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	A	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	C	T	C	T
Senegal2001	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	T	C	T
Suriname2015	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Thailand2013	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Thailand2014	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	A	A	A	T	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	T	C	T
Uganda1947_1	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Uganda1947_2	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Yap2007	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Mexico2016_1	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Mexico2016_2	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Mexico2016_3	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Mexico2016_4	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Mexico2016_5	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	
Mexico2015_2	C	C	T	T	G	G	A	T	T	C	T	T	G	A	A	C	G	A	G	G	A	T	T	G	A	T	C	T	G	G	A	G	A	A	T	G	A	A	G	C	T	C	T	

Alineación de cebadores 7: Este conjunto de cebadores se dirige al gen NS5 es capaz de detectar aislamientos de Asia, Sudamérica, Mexico y África. Es posible que no detecte el aislamiento de Brasil que se encontró en el cerebro del feto con microcefalia y el aislado de África de la República Centroafricana en 1968. El aislado de cerebro brasileño tiene un mismatch cerca del extremo 3' del cebador anti-sentido. El aislado CAR1968 tiene 5 mismatch en el cebador sentido.

Pike et al (2014)	Primer Sentido (Zika R For)	Sonda (Zika E probe)	Primer anti-sentido (Zika E Rev)
	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
BrazilAmniotic2015	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
BrazilBrain2015	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Brazil2015_1	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Brazil2015_2	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Brazil2015_3	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Brazil2015_4	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Brazil2015_5	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Cambodia2010	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
CAR1968	A A G T T C A C G T G T T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C G G A	A T C T G G A G T A T C G A T A A T G C T A
CAR1976	A A G T T C A C G T G T T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C G G A	A T C T G G A G T A T C G A T A A T G C T A
CAR1979	A A G T T C A C G T G T T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C G G A	A T C T G G A G T A T C G A T A A T G C T A
CAR1980	A A G T T C A C G T G T T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C G G A	A T C T G G A G T A T C G A T A A T G C T A
FrenchPolynesia2013	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Guatemala2015_1	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Guatemala2015_2	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Haiti2014	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Malaysia1966	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Martinique2015	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Nigeria1968	A A G T T T A C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C G G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T A
Philippines2012	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
PuertoRico2015	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
SaoPaulo2015	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Senegal1968	A A G T T T C C G T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G C A A G A G C A T C C A G C C G G A	A T T G G A G T A C C G G A T A A T G C T A
Senegal1984	A A G T T T C C G T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G C A A G A G C A T C C A G C C G G A	A T T G G A G T A C C G G A T A A T G C T A
Senegal1997	A A G T T T C C G T G T T C C A A G A A A A T	A C C G G A A G A G C A T T C A G C C G G A	A T T G G A G T A C C G G A T A A T G C T A
Senegal2001	A A G T T T C C G T G T T C C A A G A A A A T	A C C G G A A G A G C A T T C A G C C G G A	A T T G G A G T A C C G G A T A A T G C T A
Suriname2015	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Thailand2013	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Thailand2014	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Uganda1947_1	A A G T T T C C G T G T T C A A G A A A A T	A C C G G A A G A G C A T T C A C C G G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T A
Uganda1947_2	A A G T T T C C G T G T T C A A G A A A A T	A C C G G A A G A G C A T T C A C C G G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T A
Yap2007	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Mexico2016_1	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Mexico2016_2	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Mexico2016_3	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Mexico2016_4	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Mexico2016_5	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G
Mexico2015_2	A A G T T T G C A T G C T C C A A G A A A A T	A C C G G G A A G A G C A T C C A G C C A G A	A T C T G G A G T A C C G G A T A A T G C T G

Alineación de cebadores 8: Este conjunto de cebadores/sondas se dirige al gen de la envoltura, es capaz de detectar todos los aislamientos de Asia, Sudamérica y México. Es posible que no detecte el aislamiento de Malasia a partir de 1966 debido a la falta de coincidencia en el extremo 3' del cebador anti-sentido. Para los aislados africanos, hay 1-6 mismatch por 23 nucleótidos del cebador sentido, incluido un mismatch cerca del extremo 3'. Tiene 1-3 mismatch por 23 nucleótidos de la sonda y 1-3 mismatch por 23 nucleótidos del cebador inverso con los aislados africanos. También tiene 2 mismatch adyacentes en el extremo 3' del cebador inverso en los aislamientos de Senegal y Nigeria.

Pyke et al (2014)	Primer sentido (Zika NS1 For)	Sonda (Zika NS1 Probe)	Primer Anti-sentido (Zika NS1 Rev)
	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
BrazilAmnriot2015	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
BrazilBrain2015	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Brazil2015_1	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Brazil2015_2	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Brazil2015_3	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Brazil2015_4	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Brazil2015_5	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Cambodia2010	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
CAR1968	G C A C A A T G C C C C C A C T A T	T T T C G A G C A A A G A G G G C T G C T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
CAR1976	G C A C A A T G C C C C C A C T A T	T T T C G A G C A A A G A G G G C T G C T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
CAR1979	G C A C A A T G C C C C C A C T A T	T T T C G A G C A A A G A G G G C T G C T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
CAR1980	G C A C A A T G C C C C C A C T A T	T T T C G A G C A A A G A T G G C T G C T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
FrenchPolynesia2013	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Guatemala2015_1	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Guatemala2015_2	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Haiti2014	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Malaysia1966	G C A C A A T G C C C C C A T T G T	T T C C G G G C A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Martinique2015	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T T C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Nigeria1968	G C A C A A T G C C C C A C T A T	T T C C G G G C A A A G A T G G C T G G T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Philippines2012	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G A G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
PuertoRico2015	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
SaoPaulo2015	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Senegal1968	G C A C A A T G C T C C A C T A T	T T C C G G G C A A A G A T G G C T G C T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Senegal1984	G C A C A A T G C T C C A C T A T	T T C C G G G C A A A G A T G G C T G C T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Senegal1997	G C A C A A T G C C C C C A C T A T	T T T C G A G C A A A G A G G G C T G C T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Senegal2001	G C A C A A T G C C C C C A C T A T	T T T C G A G C A A A G A G G G C T G C T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Suriname2015	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Thailand2013	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Thailand2014	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Uganda1947_1	G C A C A A T G C C C C C A C T A T	T T T C G A G C A A A G A G G G C T G C T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Uganda1947_2	G C A C A A T G C C C C C A C T A T	T T T C G A G C A A A G A G G G C T G C T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Yap2007	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Mexico2016_1	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Mexico2016_2	G C A C G A T G C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Mexico2016_3	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G A G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Mexico2016_4	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Mexico2016_5	G C A C A A T G C C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A
Mexico2015_2	G C A C A A T G C C C C A C T G T	T T C C G G G C T A A A G A T G G C T G T T G G T	T G G A A T G G A G A T A A G G C C C A

Alineación de cebadores 9: Este conjunto de cebadores/sondas se dirige al gen NS1. Este conjunto de cebadores es capaz de detectar todos los aislamientos de Asia, Sudamérica. Tiene 1 mismatch en el primer sentido para un aislado en México, y 1 mismatch para la sonda en un aislado en México. Es posible que no detecte aislamientos africanos debido a la falta de coincidencia cerca del extremo 3' del cebador sentido. También tiene 3-5 mismatch por cada 25 nucleótidos de la sonda para aislamientos africanos.

Alineación de cebadores 11: Este conjunto de cebadores/sondas se dirige al gen NS, es capaz de detectar todos los aislamientos de Asia, Sudamérica y México. A excepción de dos aislado mexicanos que presenta un mismatch por cada 26 nucleótidos de sonda.

Moureaux Et al (2007)	Primer sentido (PF1S)													Primer anti-sentido (PF2R)																										
	T	G	Y	R	T	B	T	A	Y	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	Y	A	C	H	G	C	H	G	H	T	G	G	G	A	C	A	C	
BrazilAmniotic2015	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
BrazilBrain2015	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Brazil2015_1	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Brazil2015_2	T	G	T	G	T	G	T	A	T	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Brazil2015_3	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Brazil2015_4	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Brazil2015_5	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Cambodia2010	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	T	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
CAR1968	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	C	G	C	T	G	G	T	T	G	G	A	T	A	C	
CAR1976	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	T	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	C	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
CAR1979	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	C	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
CAR1980	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	T	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	C	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	T	A	C
FrenchPolynesia2013	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Guatemala2015_1	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Guatemala2015_2	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Haiti2014	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Malaysia1966	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	T	A	C	C	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Martinique2015	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Nigeria1968	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	C	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	T	A	C
Philippines2012	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	T	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
PuertoRico2015	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
SaoPaulo2015	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Senegal1968	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	T	A	C	A	C	C	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Senegal1984	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	C	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Senegal1997	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	T	A	C	A	C	C	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Senegal2001	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Suriname2015	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Thailand2013	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Thailand2014	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Uganda1947_1	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Uganda1947_2	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Yap2007	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	A	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Mexico2016_1	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Mexico2016_2	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Mexico2016_3	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Mexico2016_4	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Mexico2016_5	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C
Mexico2015_2	T	G	T	G	T	G	T	A	C	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	G	A	A	C	A	C	T	G	C	T	G	G	C	T	G	G	G	A	C	A	C

Alineación de cebadores 11: Este conjunto de cebadores se dirige al gen NS5, es capaz de detectar todos los aislamientos de Asia, Sudamérica y México. Tiene 1 mismatch por 21 nucleótidos de cebador sentido para aislados africanos y del caribe, para el cebador sentido tambien tiene 1 mismatch por 19 del cebador anti-sentido.

12 BIBLIOGRAFÍA

Agampodi SB, Matthias, MA, Moreno, AC, & Vinetz, JM. 2012. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. *Clin Infect Dis*, 54(9): 1249-1255. doi:10.1093/cid/cis035

Ahmed A, Engelberts, MF, Boer, KR, Ahmed, N, & Hartskeerl, RA. 2009. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS One*, 4(9): e7093. doi:10.1371/journal.pone.0007093

Alvarado MG, & Schwartz, DA. 2017. Zika Virus Infection in Pregnancy, Microcephaly, and Maternal and Fetal Health: What We Think, What We Know, and What We Think We Know. *Arch Pathol Lab Med*, 141(1): 26-32. doi:10.5858/arpa.2016-0382-RA

Amroun A, Priet, S, de Lamballerie, X, & Querat, G. 2017. Bunyaviridae RdRps: structure, motifs, and RNA synthesis machinery. *Crit Rev Microbiol*, 43(6): 753-778. doi:10.1080/1040841X.2017.1307805

Anez G, Chancey, C, Grinev, A, & Rios, M. 2012. Dengue virus and other arboviruses: a global view of risks. *ISBT Science Series*(7): 274-282. doi:https://doi.org/10.1111/j.1751-2824.2012.01602.x

Antony SJ. 1996. Leptospirosis - An Emerging Pathogen in Travel Medicine: A Review of its Clinical Manifestations and Management. *J Travel Med*, 3(2): 113-118.

Anyamba A, Linthicum, KJ, Small, J, Britch, SC, Pak, E, de La Rocque, S, Swanepoel, R. 2010. Prediction, assessment of the Rift Valley fever activity in East and Southern Africa 2006-2008 and possible vector control strategies. *Am J Trop Med Hyg*, 83(2 Suppl): 43-51. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0289

Aradaib IE, Erickson, BR, Elageb, RM, Khristova, ML, Carroll, SA, Elkhidir, IM, Nichol, ST. 2013. Rift Valley fever, Sudan, 2007 and 2010. *Emerg Infect Dis*, 19(2): 246-253. doi:10.3201/eid1902.120834

Artsob H, Gubler, DJ, Enria, DA, Morales, MA, Pupo, M, Bunning, ML, & Dudley, JP. 2009. West Nile Virus in the New World: trends in the spread and proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Zoonoses Public Health*, 56(6-7): 357-369. doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01207.x

Ayers M, Adachi, D, Johnson, G, Andonova, M, Drebot, M, & Tellier, R. 2006. A single tube RT-PCR assay for the detection of mosquito-borne flaviviruses. *J Virol Methods*, 135(2): 235-239. doi:10.1016/j.jviromet.2006.03.009

Baba M, Logue, CH, Oderinde, B, Abdulmaleek, H, Williams, J, Lewis, J, P, DA. 2013. Evidence of arbovirus co-infection in suspected febrile malaria and typhoid patients in Nigeria. *J Infect Dev Ctries*, 7(1): 51-59. doi:10.3855/jidc.2411

Baillie GJ, Galiano, M, Agapow, PM, Myers, R, Chiam, R, Gall, A, Zambon, M. 2012. Evolutionary dynamics of local pandemic H1N1/2009 influenza virus lineages revealed by whole-genome analysis. *J Virol*, 86(1): 11-18. doi:10.1128/JVI.05347-11

Balenghien T, Pages, N, Goffredo, M, Carpenter, S, Augot, D, Jacquier, E, Garros, C. 2014. The emergence of Schmallenberg virus across Culicoides communities and ecosystems in Europe. *Prev Vet Med*, 116(4): 360-369. doi:10.1016/j.prevetmed.2014.03.007

Balm MN, Lee, CK, Lee, HK, Chiu, L, Koay, ES, & Tang, JW. 2012. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *J Med Virol*, 84(9): 1501-1505. doi:10.1002/jmv.23241

Bandeira AC, Campos, GS, Rocha, VF, Souza, BS, Soares, MB, Oliveira, AA, Sardi, SI. 2016. Prolonged shedding of Chikungunya virus in semen and urine: A new perspective for diagnosis and implications for transmission. *IDCases*, 6: 100-103. doi:10.1016/j.idcr.2016.10.007

Beckham JD, & Tyler, KL. 2015. Arbovirus Infections. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 21(6 Neuroinfectious Disease): 1599-1611. doi:10.1212/CON.0000000000000240

Beer M, Conraths, FJ, & van der Poel, WH. 2013. 'Schmallenberg virus'--a novel orthobunyavirus emerging in Europe. *Epidemiol Infect*, 141(1): 1-8. doi:10.1017/S0950268812002245

Beerntsen BT, James, AA, & Christensen, BM. 2000. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(1): 115-137.

Beltrán-Silva SL, Chacón-Hernández, SS, Moreno-Palacios, E, & Pereyra-Molina, JÁ. 2018. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Revista Médica del Hospital General de México*, 81(3): 146-153. doi:https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.011

Bhatt S, Gething, PW, Brady, OJ, Messina, JP, Farlow, AW, Moyes, CL, Hay, SI. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446): 504-507. doi:10.1038/nature12060

Bichaud L, de Lamballerie, X, Alkan, C, Izri, A, Gould, EA, & Charrel, RN. 2014. Arthropods as a source of new RNA viruses. *Microb Pathog*, 77: 136-141. doi:10.1016/j.micpath.2014.09.002

Bloom-Feshbach K, Alonso, WJ, Charu, V, Tamerius, J, Simonsen, L, Miller, MA, & Viboud, C. 2013. Latitudinal variations in seasonal activity of influenza and respiratory

syncytial virus (RSV): a global comparative review. *PLoS One*, 8(2): e54445. doi:10.1371/journal.pone.0054445

Bourhy P, Herrmann Storck, C, Theodose, R, Olive, C, Nicolas, M, Hochedez, P, Picardeau, M. 2013. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(3): e2114. doi:10.1371/journal.pntd.0002114

Burchill SA, Lewis, IJ, & Selby, P. 1999. Improved methods using the reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect tumour cells. *Br J Cancer*, 79(5-6): 971-977. doi:10.1038/sj.bjc.6690155

Cammisa-Parks H, Cisar, LA, Kane, A, & Stollar, V. 1992. The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology*, 189(2): 511-524.

Campos GS, Bandeira, AC, & Sardi, SI. 2015. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 21(10): 1885-1886. doi:10.3201/eid2110.150847

Cao-Lormeau VM, Roche, C, Teissier, A, Robin, E, Berry, AL, Mallet, HP, Musso, D. 2014. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*, 20(6): 1085-1086. doi:10.3201/eid2006.140138

Cardona-Ospina JA, Jimenez-Canizales, CE, Vasquez-Serna, H, Garzon-Ramirez, JA, Alarcon-Robayo, JF, Ceron-Pineda, JA, & Rodriguez-Morales, AJ. 2018. Fatal Dengue, Chikungunya and Leptospirosis: The Importance of Assessing Co-infections in Febrile Patients in Tropical Areas. *Trop Med Infect Dis*, 3(4). doi:10.3390/tropicalmed3040123

Carrillo-Hernandez MY, Ruiz-Saenz, J, Villamizar, LJ, Gomez-Rangel, SY, & Martinez-Gutierrez, M. 2018. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue,

chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. *BMC Infect Dis*, 18(1): 61. doi:10.1186/s12879-018-2976-1

Casals J, & Palacios, R. 1941. The Complement Fixation Test in the Diagnosis of Virus Infections of the Central Nervous System. *J Exp Med*, 74(5): 409-426.

CDC. (2018a). Arbovirus Catalog. Retrieved from <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/VirusBrowser.aspx>

CDC. (2018b). Travelers' Health: Destinations. Retrieved from <https://wwwnc.cdc.gov/travel/destinations/list>

Chang GJ, Trent, DW, Vorndam, AV, Vergne, E, Kinney, RM, & Mitchell, CJ. 1994. An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, to detect and characterize flaviviruses. *J Clin Microbiol*, 32(2): 477-483.

Charlier N, Leysen, P, Pleij, CW, Lemey, P, Billoir, F, Van Laethem, K, Neyts, J. 2002. Complete genome sequence of Montana Myotis leukoencephalitis virus, phylogenetic analysis and comparative study of the 3' untranslated region of flaviviruses with no known vector. *J Gen Virol*, 83(Pt 8): 1875-1885. doi:10.1099/0022-1317-83-8-1875

Chen R, Mukhopadhyay, S, Merits, A, Bolling, B, Nasar, F, Coffey, LL, Ictv Report, C. 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. *J Gen Virol*, 99(6): 761-762. doi:10.1099/jgv.0.001072

Chen Z, Liu, L, Lv, Y, Zhang, W, Li, J, Zhang, Y, Li, D. 2016. A fatal yellow fever virus infection in China: description and lessons. *Emerg Microbes Infect*, 5(7): e69. doi:10.1038/emi.2016.89

Chhabra M, Mittal, V, Bhattacharya, D, Rana, U, & Lal, S. 2008. Chikungunya fever: a re-emerging viral infection. *Indian J Med Microbiol*, 26(1): 5-12.

Chien LJ, Liao, TL, Shu, PY, Huang, JH, Gubler, DJ, & Chang, GJ. 2006. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol*, 44(4): 1295-1304. doi:10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006

Chinikar S, Persson, SM, Johansson, M, Bladh, L, Goya, M, Houshmand, B, Nilsson, M. 2004. Genetic analysis of Crimean-congo hemorrhagic fever virus in Iran. *J Med Virol*, 73(3): 404-411. doi:10.1002/jmv.20106

Chow VT, Seah, CL, & Chan, YC. 1993. Use of NS3 consensus primers for the polymerase chain reaction amplification and sequencing of dengue viruses and other flaviviruses. *Arch Virol*, 133(1-2): 157-170.

Coffey LL, Forrester, N, Tsetsarkin, K, Vasilakis, N, & Weaver, SC. 2013. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiol*, 8(2): 155-176. doi:10.2217/fmb.12.139

Cook S, & Holmes, EC. 2006. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Arch Virol*, 151(2): 309-325. doi:10.1007/s00705-005-0626-6

Corman VM, Rasche, A, Baronti, C, Aldabbagh, S, Cadar, D, Reusken, CB, Drexler, JF. 2016. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. *Bull World Health Organ*, 94(12): 880-892. doi:10.2471/BLT.16.175950

Corrales-Aguilar E, Troyo, A, & Calderón-Arguedas, Ó. 2014. Chikungunya: a threatening virus. *Acta Médica Costarricense*, 57(1): 7-15.

countrymeters. (2018). countrymeters. Retrieved from <http://countrymeters.info/es/Mexico>

DALYs GBD, Collaborators, H, Murray, CJ, Barber, RM, Foreman, KJ, Abbasoglu Ozgoren, A, Vos, T. 2015. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition. *Lancet*, 386(10009): 2145-2191. doi:10.1016/S0140-6736(15)61340-X

Danis-Lozano R, Diaz-Gonzalez, EE, Trujillo-Murillo, KDC, Caballero-Sosa, S, Sepulveda-Delgado, J, Malo-Garcia, IR, Fernandez-Salas, I. 2017. Clinical characterization of acute and convalescent illness of confirmed chikungunya cases from Chiapas, S. Mexico: A cross sectional study. *PLoS One*, 12(10): e0186923. doi:10.1371/journal.pone.0186923

de Oliveira RC, Guterres, A, Fernandes, J, D'Andrea, PS, Bonvicino, CR, & de Lemos, ER. 2014. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. *Viruses*, 6(5): 1929-1973. doi:10.3390/v6051929

de Vries SG, Visser, BJ, Nagel, IM, Goris, MG, Hartskeerl, RA, & Grobusch, MP. 2014. Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: a systematic review. *Int J Infect Dis*, 28: 47-64. doi:10.1016/j.ijid.2014.06.013

Denison AM, Amin, BD, Nicholson, WL, & Paddock, CD. 2014. Detection of *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, and *Rickettsia akari* in skin biopsy specimens using a multiplex real-time polymerase chain reaction assay. *Clin Infect Dis*, 59(5): 635-642. doi:10.1093/cid/ciu358

Devaux CA. 2012. Emerging and re-emerging viruses: A global challenge illustrated by Chikungunya virus outbreaks. *World J Virol*, 1(1): 11-22. doi:10.5501/wjv.v1.i1.11

Deyde VM, Khristova, ML, Rollin, PE, Ksiazek, TG, & Nichol, ST. 2006. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol*, 80(17): 8834-8842. doi:10.1128/JVI.00752-06

Diagne CT, Diallo, D, Faye, O, Ba, Y, Faye, O, Gaye, A, Diallo, M. 2015. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect Dis*, 15: 492. doi:10.1186/s12879-015-1231-2

Diaz-Quinonez JA, Lopez-Martinez, I, Torres-Longoria, B, Vazquez-Pichardo, M, Cruz-Ramirez, E, Ramirez-Gonzalez, JE, Kuri-Morales, P. 2016. Evidence of the presence of the Zika virus in Mexico since early 2015. *Virus Genes*, 52(6): 855-857. doi:10.1007/s11262-016-1384-0

Doceul V, Lara, E, Sailleau, C, Belbis, G, Richardson, J, Breard, E, Zientara, S. 2013. Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallenberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe. *Vet Res*, 44: 31. doi:10.1186/1297-9716-44-31

Domingo C, Niedrig, M, Teichmann, A, Kaiser, M, Rumer, L, Jarman, RG, & Donoso-Mantke, O. 2010. 2nd International external quality control assessment for the molecular diagnosis of dengue infections. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(10). doi:10.1371/journal.pntd.0000833

Dubot-Peres A, Vongphrachanh, P, Denny, J, Phetsouvanh, R, Linthavong, S, Sengkeopraseuth, B, Newton, PN. 2013. An epidemic of dengue-1 in a remote village in rural Laos. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(8): e2360. doi:10.1371/journal.pntd.0002360

Duffy MR, Chen, TH, Hancock, WT, Powers, AM, Kool, JL, Lanciotti, RS, Hayes, EB. 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*, 360(24): 2536-2543. doi:10.1056/NEJMoa0805715

Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor, O, Calvez, E, Daures, M, John, M, Grangeon, JP, & Gourinat, AC. 2015. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis*, 21(2): 381-382. doi:10.3201/eid2102.141553

Durbin AP, Mayer, SV, Rossi, SL, Amaya-Larios, IY, Ramos-Castaneda, J, Eong Ooi, E, . Vasilakis, N. 2013. Emergence potential of sylvatic dengue virus type 4 in the urban transmission cycle is restrained by vaccination and homotypic immunity. *Virology*, 439(1): 34-41. doi:10.1016/j.virol.2013.01.018

Edwards CJ, Welch, SR, Chamberlain, J, Hewson, R, Tolley, H, Cane, PA, & Lloyd, G. 2007. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. *J Clin Virol*, 39(4): 271-275. doi:10.1016/j.jcv.2007.05.008

Eifan S, Schnettler, E, Dietrich, I, Kohl, A, & Blomstrom, AL. 2013. Non-structural proteins of arthropod-borne bunyaviruses: roles and functions. *Viruses*, 5(10): 2447-2468. doi:10.3390/v5102447

Eifan SA, & Elliott, RM. 2009. Mutational analysis of the Bunyamwera orthobunyavirus nucleocapsid protein gene. *J Virol*, 83(21): 11307-11317. doi:10.1128/JVI.01460-09

Elliott RM. 1990. Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol*, 71 (Pt 3): 501-522. doi:10.1099/0022-1317-71-3-501

Engvall E, & Perlmann, P. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol*, 109(1): 129-135.

Eremeeva ME, Dasch, GA, & Silverman, DJ. 2003. Evaluation of a PCR assay for quantitation of *Rickettsia rickettsii* and closely related spotted fever group rickettsiae. *J Clin Microbiol*, 41(12): 5466-5472.

Esteves LM, Bulhoes, SM, Branco, CC, Carreira, T, Vieira, ML, Gomes-Solecki, M, & Mota-Vieira, L. 2018. Diagnosis of Human Leptospirosis in a Clinical Setting: Real-Time PCR High Resolution Melting Analysis for Detection of *Leptospira* at the Onset of Disease. *Sci Rep*, 8(1): 9213. doi:10.1038/s41598-018-27555-2

Fang X, Hu, Z, Shang, W, Zhu, J, Xu, C, & Rao, X. 2012. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 66(2): 134-146. doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00995.x

Faye O, Faye, O, Diallo, D, Diallo, M, Weidmann, M, & Sall, AA. 2013. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology*, 10: 311. doi:10.1186/1743-422X-10-311

Faye O, Faye, O, Dupressoir, A, Weidmann, M, Ndiaye, M, & Alpha Sall, A. 2008. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *J Clin Virol*, 43(1): 96-101. doi:10.1016/j.jcv.2008.05.005

Feldmann H. 2011. Truly emerging--a new disease caused by a novel virus. *N Engl J Med*, 364(16): 1561-1563. doi:10.1056/NEJMe1102671

Ferguson NM, Cucunuba, ZM, Dorigatti, I, Nedjati-Gilani, GL, Donnelly, CA, Basanez, MG, Lessler, J. 2016. EPIDEMIOLOGY. Countering the Zika epidemic in Latin America. *Science*, 353(6297): 353-354. doi:10.1126/science.aag0219

Fields BN, Knipe, DM, & Howley, PM. (2013). *Fields virology* (6th ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Forrester NL, Coffey, LL, & Weaver, SC. 2014. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses*, 6(10): 3991-4004. doi:10.3390/v6103991

Forrester NL, Palacios, G, Tesh, RB, Savji, N, Guzman, H, Sherman, M, Lipkin, WI. 2012. Genome-scale phylogeny of the alphavirus genus suggests a marine origin. *J Virol*, 86(5): 2729-2738. doi:10.1128/JVI.05591-11

Freedman DO, Weld, LH, Kozarsky, PE, Fisk, T, Robins, R, von Sonnenburg, F, GeoSentinel Surveillance, N. 2006. Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travelers. *N Engl J Med*, 354(2): 119-130. doi:10.1056/NEJMoa051331

Furuya-Kanamori L, Liang, S, Milinovich, G, Soares Magalhaes, RJ, Clements, AC, Hu, W, Yakob, L. 2016. Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses. *BMC Infect Dis*, 16: 84. doi:10.1186/s12879-016-1417-2

Galan-Huerta KA, Martinez-Landeros, E, Delgado-Gallegos, JL, Caballero-Sosa, S, Malo-Garcia, IR, Fernandez-Salas, I, Rivas-Estilla, AM. 2018. Molecular and Clinical Characterization of Chikungunya Virus Infections in Southeast Mexico. *Viruses*, 10(5). doi:10.3390/v10050248

Galloway RL, & Hoffmaster, AR. 2015. Optimization of LipL32 PCR assay for increased sensitivity in diagnosing leptospirosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 82(3): 199-200. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.024

Garcia-Ruiz D, Martinez-Guzman, MA, Cardenas-Vargas, A, Marino-Marmolejo, E, Gutierrez-Ortega, A, Gonzalez-Diaz, E, Elizondo-Quiroga, D. 2016. Detection of dengue, west Nile virus, rickettsiosis and leptospirosis by a new real-time PCR strategy. *Springerplus*, 5(1): 671. doi:10.1186/s40064-016-2318-y

Garza-Gonzalez E, Mendoza-Olazarán, S, Roman-Campos, R, Tellez-Marroquin, R, Saldivar-Rodriguez, D, Soria-Lopez, JA, Camacho-Ortiz, A. 2017. Rapid spread of an ongoing outbreak of Zika virus disease in pregnant women in a Mexican hospital. *Braz J Infect Dis*, 21(5): 554-556. doi:10.1016/j.bjid.2017.04.008

Gaunt MW, Sall, AA, de Lamballerie, X, Falconar, AK, Dzhivanian, TI, & Gould, EA. 2001. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J Gen Virol*, 82(Pt 8): 1867-1876. doi:10.1099/0022-1317-82-8-1867

Gautret P, Botelho-Nevers, E, Brouqui, P, & Parola, P. 2012. The spread of vaccine-preventable diseases by international travellers: a public-health concern. *Clin Microbiol Infect*, 18 Suppl 5: 77-84. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03940.x

Giry C, Roquebert, B, Li-Pat-Yuen, G, Gasque, P, & Jaffar-Bandjee, MC. 2017. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan(R) assay. *BMC Microbiol*, 17(1): 105. doi:10.1186/s12866-017-1019-1

Giulieri S, Jatou, K, Cometta, A, Trelu, LT, & Greub, G. 2012. Development of a duplex real-time PCR for the detection of *Rickettsia* spp. and typhus group rickettsia in clinical samples. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 64(1): 92-97. doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00910.x

Goldsmith CS, & Miller, SE. 2009. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin Microbiol Rev*, 22(4): 552-563. doi:10.1128/CMR.00027-09

Gomez-Palacio A, Suaza-Vasco, J, Castano, S, Triana, O, & Uribe, S. 2017. *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) infected with the American-Asian genotype of dengue type 2 virus in Medellin suggests its possible role as vector of dengue fever in Colombia. *Biomedica*, 37(0): 135-142. doi:10.7705/biomedica.v37i0.3474

Gourinat AC, O'Connor, O, Calvez, E, Goarant, C, & Dupont-Rouzeyrol, M. 2015. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis*, 21(1): 84-86. doi:10.3201/eid2101.140894

Grandien M, Pettersson, CA, Svensson, L, & Uhnoo, I. 1987. Latex agglutination test for adenovirus diagnosis in diarrheal disease. *J Med Virol*, 23(4): 311-316.

Gravekamp C, Van de Kemp, H, Franzen, M, Carrington, D, Schoone, GJ, Van Eys, GJ, Terpstra, WJ. 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol*, 139(8): 1691-1700. doi:10.1099/00221287-139-8-1691

Group TWB. (2018). Urban population. Retrieved from <https://data.worldbank.org/indicator/SP.URB.TOTL.IN.ZS>

Grywna K, Kupfer, B, Panning, M, Drexler, JF, Emmerich, P, Drosten, C, & Kummerer, BM. 2010. Detection of all species of the genus Alphavirus by reverse transcription-PCR with diagnostic sensitivity. *J Clin Microbiol*, 48(9): 3386-3387. doi:10.1128/JCM.00317-10

Guardado-Calvo P, & Rey, FA. 2017. The Envelope Proteins of the Bunyavirales. *Adv Virus Res*, 98: 83-118. doi:10.1016/bs.aivir.2017.02.002

Gubler DJ, & Clark, GG. 1995. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis*, 1(2): 55-57. doi:10.3201/eid0102.952004

Gubler DJ. 2001. Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci*, 951: 13-24.

Guerbois M, Fernandez-Salas, I, Azar, SR, Danis-Lozano, R, Alpuche-Aranda, CM, Leal, G, Weaver, SC. 2016. Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. *J Infect Dis*, 214(9): 1349-1356. doi:10.1093/infdis/jiw302

Guerbois M, Fernandez-Salas, I, Azar, SR, Danis-Lozano, R, Alpuche-Aranda, CM, Leal, G, Weaver, SC. 2016. Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015,

and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. *J Infect Dis*, 214(9): 1349-1356. doi:10.1093/infdis/jiw302

Guernier V, Goarant, C, Benschop, J, & Lau, CL. 2018. A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(5): e0006503. doi:10.1371/journal.pntd.0006503

Guerra-Gomes IC. (2016). *Molecular characterization of two dengue serotypes and correlation with pluviometric indices and two cases of dengue in Paraíba, in the period 2007-2015*. (Doctorado), Universidad Federal de Paraíba.

Gunson RN, Collins, TC, & Carman, WF. 2006. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol*, 35(4): 355-367. doi:10.1016/j.jcv.2005.12.006

Gurukumar KR, Priyadarshini, D, Patil, JA, Bhagat, A, Singh, A, Shah, PS, & Cecilia, D. 2009. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol J*, 6: 10. doi:10.1186/1743-422X-6-10

Guzman MG, & Kouri, G. 2004. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis*, 8(2): 69-80.

Guzman MG, Halstead, SB, Artsob, H, Buchy, P, Farrar, J, Gubler, DJ, Peeling, RW. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*, 8(12 Suppl): S7-16. doi:10.1038/nrmicro2460

Haake DA, & Levett, PN. 2015. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387: 65-97. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_5

Haider N, Cuellar, AC, Kjaer, LJ, Sorensen, JH, & Bodker, R. 2018. Microclimatic temperatures at Danish cattle farms, 2000-2016: quantifying the temporal and spatial

variation in the transmission potential of Schmallenberg virus. *Parasit Vectors*, 11(1): 128. doi:10.1186/s13071-018-2709-8

Halstead SB. 2015. Pathogenesis of Dengue: Dawn of a New Era. *PLoS Res*, 4. doi:10.12688/f1000research.7024.1

Hang VT, Nguyet, NM, Trung, DT, Tricou, V, Yoksan, S, Dung, NM, Simmons, CP. 2009. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(1): e360. doi:10.1371/journal.pntd.0000360

Harris E, Holden, KL, Edgil, D, Polacek, C, & Clyde, K. 2006. Molecular biology of flaviviruses. *Novartis Found Symp*, 277: 23-39; discussion 40, 71-23, 251-253.

Hasebe F, Parquet, MC, Pandey, BD, Mathenge, EG, Morita, K, Balasubramaniam, V, Igarashi, A. 2002. Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 67(3): 370-374. doi:10.1002/jmv.10085

Hassan OA, Ahlm, C, Sang, R, & Evander, M. 2011. The 2007 Rift Valley fever outbreak in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(9): e1229. doi:10.1371/journal.pntd.0001229

Hayes EB. 2009. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*, 15(9): 1347-1350. doi:10.3201/eid1509.090442

Hecht JA, Allerdice, ME, Krawczak, FS, Labruna, MB, Paddock, CD, & Karpathy, SE. 2016. Development of a Rickettsia bellii-Specific TaqMan Assay Targeting the Citrate Synthase Gene. *J Med Entomol*, 53(6): 1492-1495. doi:10.1093/jme/tjw111

Heim A, Grumbach, IM, Zeuke, S, & Top, B. 1998. Highly sensitive detection of gene expression of an intronless gene: amplification of mRNA, but not genomic DNA by

nucleic acid sequence based amplification (NASBA). *Nucleic Acids Res*, 26(9): 2250-2251.

Hematian A, Sadeghifard, N, Mohebi, R, Taherikalani, M, Nasrolahi, A, Amraei, M, & Ghafourian, S. 2016. Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. *Osong Public Health Res Perspect*, 7(2): 77-82. doi:10.1016/j.phrp.2015.11.011

Hertz JT, Munishi, OM, Ooi, EE, Howe, S, Lim, WY, Chow, A, Crump, JA. 2012. Chikungunya and dengue fever among hospitalized febrile patients in northern Tanzania. *Am J Trop Med Hyg*, 86(1): 171-177. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0393

ICTV. (2017). FLAVIVIRIDAE - FLAVIVIRIDAE - POSITIVE SENSE RNA VIRUSES - INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Retrieved from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus

Isakov O, Borderia, AV, Golan, D, Hamenahem, A, Celniker, G, Yoffe, L, Shomron, N. 2015. Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. *Bioinformatics*, 31(13): 2141-2150. doi:10.1093/bioinformatics/btv101

Jackson JB. 1990. The polymerase chain reaction in transfusion medicine. *Transfusion*, 30(1): 51-57.

Johnson BW, Russell, BJ, & Goodman, CH. 2016. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. *J Infect Dis*, 214(suppl 5): S471-S474. doi:10.1093/infdis/jiw274

Johnson BW, Russell, BJ, & Lanciotti, RS. 2005. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*, 43(10): 4977-4983. doi:10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005

Judice CC, Tan, JIL, Parise, PL, Kam, YW, Milanez, GP, Leite, JA, Zika-Unicamp, N. 2018. Efficient detection of Zika virus RNA in patients' blood from the 2016 outbreak in Campinas, Brazil. *Sci Rep*, 8(1): 4012. doi:10.1038/s41598-018-22159-2

Kaariainen L, & Ahola, T. 2002. Functions of alphavirus nonstructural proteins in RNA replication. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 71: 187-222.

Kaariainen L, Takkinen, K, Keranen, S, & Soderlund, H. 1987. Replication of the genome of alphaviruses. *J Cell Sci Suppl*, 7: 231-250.

Kam YW, Pok, KY, Eng, KE, Tan, LK, Kaur, S, Lee, WW, Ng, LF. 2015. Sero-prevalence and cross-reactivity of chikungunya virus specific anti-E2EP3 antibodies in arbovirus-infected patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(1): e3445. doi:10.1371/journal.pntd.0003445

Kamau E, Agoti, CN, Lewa, CS, Oketch, J, Owor, BE, Otieno, GP, Nokes, DJ. 2017. Recent sequence variation in probe binding site affected detection of respiratory syncytial virus group B by real-time RT-PCR. *J Clin Virol*, 88: 21-25. doi:10.1016/j.jcv.2016.12.011

Kato CY, Chung, IH, Robinson, LK, Austin, AL, Dasch, GA, & Massung, RF. 2013. Assessment of real-time PCR assay for detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in banked clinical samples. *J Clin Microbiol*, 51(1): 314-317. doi:10.1128/JCM.01723-12

Keilholz U, Willhauck, M, Rimoldi, D, Brasseur, F, Dummer, W, Rass, K, Burchill, S. 1998. Reliability of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)-based assays for the detection of circulating tumour cells: a quality-assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group. *Eur J Cancer*, 34(5): 750-753.

Khan K, Bogoch, I, Brownstein, JS, Miniota, J, Nicolucci, A, Hu, W, Wilder-Smith, A. 2014. Assessing the origin of and potential for international spread of chikungunya virus from the Caribbean. *PLoS Curr*, 6. doi:10.1371/currents.outbreaks.2134a0a7bf37fd8d388181539fea2da5

Kindhauser MK, Allen, T, Frank, V, Santhana, RS, & Dye, C. 2016. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ*, 94(9): 675-686C. doi:10.2471/BLT.16.171082

Konongoi L, Ofula, V, Nyunja, A, Owaka, S, Koka, H, Makio, A, Sang, R. 2016. Detection of dengue virus serotypes 1, 2 and 3 in selected regions of Kenya: 2011-2014. *Virology*, 13(1): 182. doi:10.1186/s12985-016-0641-0

Kraemer MU, Sinka, ME, Duda, KA, Mylne, AQ, Shearer, FM, Barker, CM, Hay, SI. 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*, 4: e08347. doi:10.7554/eLife.08347

Kukreti H, Chaudhary, A, Rautela, RS, Anand, R, Mittal, V, Chhabra, M, Rai, A. 2008. Emergence of an independent lineage of dengue virus type 1 (DENV-1) and its co-circulation with predominant DENV-3 during the 2006 dengue fever outbreak in Delhi. *Int J Infect Dis*, 12(5): 542-549. doi:10.1016/j.ijid.2008.02.009

Kuno G. 1998. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J Virol Methods*, 72(1): 27-41.

L'Huillier AG, Lombos, E, Tang, E, Perusini, S, Eshaghi, A, Nagra, S, Gubbay, JB. 2017. Evaluation of Altona Diagnostics RealStar Zika Virus Reverse Transcription-PCR Test Kit for Zika Virus PCR Testing. *J Clin Microbiol*, 55(5): 1576-1584. doi:10.1128/JCM.02153-16

Labuda M. 1991. Arthropod vectors in the evolution of bunyaviruses. *Acta Virol*, 35(1): 98-105.

Lakshmi V, Neeraja, M, Subbalaxmi, MV, Parida, MM, Dash, PK, Santhosh, SR, & Rao, PV. 2008. Clinical features and molecular diagnosis of Chikungunya fever from South India. *Clin Infect Dis*, 46(9): 1436-1442. doi:10.1086/529444

Lalle E, Colavita, F, Iannetta, M, Gebremeskel Tekle, S, Carletti, F, Scorzolini, L, Nicastrì, E. 2018. Prolonged detection of dengue virus RNA in the semen of a man returning from Thailand to Italy, January 2018. *Euro Surveill*, 23(18). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.18.18-00197

Lanciotti RS, Calisher, CH, Gubler, DJ, Chang, GJ, & Vorndam, AV. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30(3): 545-551.

Lanciotti RS, Kosoy, OL, Laven, JJ, Panella, AJ, Velez, JO, Lambert, AJ, & Campbell, GL. 2007. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis*, 13(5): 764-767. doi:10.3201/eid1305.070015

Lanciotti RS, Kosoy, OL, Laven, JJ, Velez, JO, Lambert, AJ, Johnson, AJ, Duffy, MR. 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*, 14(8): 1232-1239. doi:10.3201/eid1408.080287

Leung P, Bull, R, Lloyd, A, & Luciani, F. 2014. A bioinformatics pipeline for the analyses of viral escape dynamics and host immune responses during an infection. *Biomed Res Int*, 2014: 264519. doi:10.1155/2014/264519

Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 14(2): 296-326. doi:10.1128/CMR.14.2.296-326.2001

Li M, Zhao, L, Zhang, C, Wang, X, Hong, W, Sun, J, Jin, X. 2018. Dengue immune sera enhance Zika virus infection in human peripheral blood monocytes through Fc gamma receptors. *PLoS One*, 13(7): e0200478. doi:10.1371/journal.pone.0200478

Limmathurotsakul D, Turner, EL, Wuthiekanun, V, Thaipadungpanit, J, Suputtamongkol, Y, Chierakul, W, Peacock, SJ. 2012. Fool's gold: Why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a reevaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. *Clin Infect Dis*, 55(3): 322-331. doi:10.1093/cid/cis403

Lindenbach BD, & Rice, CM. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*, 59: 23-61.

Litzba N, Schuffenecker, I, Zeller, H, Drosten, C, Emmerich, P, Charrel, R, Niedrig, M. 2008. Evaluation of the first commercial chikungunya virus indirect immunofluorescence test. *J Virol Methods*, 149(1): 175-179. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.004

Liu J, Ochieng, C, Wiersma, S, Stroher, U, Towner, JS, Whitmer, S, Fields, B. 2016. Development of a TaqMan Array Card for Acute-Febrile-Illness Outbreak Investigation and Surveillance of Emerging Pathogens, Including Ebola Virus. *J Clin Microbiol*, 54(1): 49-58. doi:10.1128/JCM.02257-15

Lorono-Pino MA, Farfan-Ale, JA, Zapata-Peraza, AL, Rosado-Paredes, EP, Flores-Flores, LF, Garcia-Rejon, JE, Beaty, BJ. 2004. Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 71(4): 485-492.

Lwande OW, Obanda, V, Bucht, G, Mosomtai, G, Otieno, V, Ahlm, C, & Evander, M. 2015. Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. *Infect Ecol Epidemiol*, 5: 29853. doi:10.3402/iee.v5.29853

Mackay IM, Arden, KE, & Nitsche, A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, 30(6): 1292-1305.

Mackenzie JS, Gubler, DJ, & Petersen, LR. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*, 10(12 Suppl): S98-109. doi:10.1038/nm1144

Mandl CW, Heinz, FX, Stockl, E, & Kunz, C. 1989. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology*, 173(1): 291-301.

Markoff L. 2003. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res*, 59: 177-228.

Marquez FJ, Muniain, MA, Soriguer, RC, Izquierdo, G, Rodriguez-Bano, J, & Borobio, MV. 1998. Genotypic identification of an undescribed spotted fever group rickettsia in *Ixodes ricinus* from southwestern Spain. *Am J Trop Med Hyg*, 58(5): 570-577.

McLoughlin MF, & Graham, DA. 2007. Alphavirus infections in salmonids--a review. *J Fish Dis*, 30(9): 511-531. doi:10.1111/j.1365-2761.2007.00848.x

Meiyu F, Huosheng, C, Cuihua, C, Xiaodong, T, Lianhua, J, Yifei, P, Huiyu, G. 1997. Detection of flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with the universal primer set. *Microbiol Immunol*, 41(3): 209-213.

Meny P, Menendez, C, Quintero, J, Hernandez, E, Rios, C, Balassiano, IT, Varela, G. 2017. Characterization of *Leptospira* isolates from humans and the environment in Uruguay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 59: e79. doi:10.1590/S1678-9946201759079

Merien F, Amouriaux, P, Perolat, P, Baranton, G, & Saint Girons, I. 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol*, 30(9): 2219-2224.

- Merien F, Portnoi, D, Bourhy, P, Charavay, F, Berlioz-Arthaud, A, & Baranton, G. 2005. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett*, 249(1): 139-147. doi:10.1016/j.femsle.2005.06.011
- Messina JP, Kraemer, MU, Brady, OJ, Pigott, DM, Shearer, FM, Weiss, DJ, Hay, SI. 2016. Mapping global environmental suitability for Zika virus. *Elife*, 5. doi:10.7554/eLife.15272
- Mohd Ali MR, Mohamad Safiee, AW, Yusof, NY, Fauzi, MH, Yean Yean, C, & Ismail, N. 2017. Isolation of *Leptospira kmetyi* from residential areas of patients with leptospirosis in Kelantan, Malaysia. *J Infect Public Health*. doi:10.1016/j.jiph.2017.12.008
- Monath TP, Woodall, JP, Gubler, DJ, Yuill, TM, Mackenzie, JS, Martins, RM, Heymann, DL. 2016. Yellow fever vaccine supply: a possible solution. *Lancet*, 387(10028): 1599-1600. doi:10.1016/S0140-6736(16)30195-7
- Morens DM, & Fauci, AS. 2013. Emerging infectious diseases: threats to human health and global stability. *PLoS Pathog*, 9(7): e1003467. doi:10.1371/journal.ppat.1003467
- Moureau G, Temmam, S, Gonzalez, JP, Charrel, RN, Grard, G, & de Lamballerie, X. 2007. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 7(4): 467-477. doi:10.1089/vbz.2007.0206
- Mukhopadhyay S, Kuhn, RJ, & Rossmann, MG. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*, 3(1): 13-22. doi:10.1038/nrmicro1067
- Mullis KB, & Faloona, FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335-350.
- Musso D, & Gubler, DJ. 2016. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*, 29(3): 487-524. doi:10.1128/CMR.00072-15

- Musso D, Roche, C, Nhan, TX, Robin, E, Teissier, A, & Cao-Lormeau, VM. 2015. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol*, 68: 53-55. doi:10.1016/j.jcv.2015.04.021
- Nasar F, Palacios, G, Gorchakov, RV, Guzman, H, Da Rosa, AP, Savji, N, Weaver, SC. 2012. Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(36): 14622-14627. doi:10.1073/pnas.1204787109
- Nava-Frias M, Searcy-Pavia, RE, Juarez-Contreras, CA, & Valencia-Bautista, A. 2016. Chikungunya fever: current status in Mexico. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 73(2): 67-74. doi:10.1016/j.bmhmx.2016.03.001
- Neaterour P, Rivera, A, Galloway, RL, Negron, MG, Rivera-Garcia, B, & Sharp, TM. 2017. Fatal *Leptospira* spp./Zika Virus Coinfection-Puerto Rico, 2016. *Am J Trop Med Hyg*, 97(4): 1085-1087. doi:10.4269/ajtmh.17-0250
- Netto EM, Moreira-Soto, A, Pedroso, C, Hoser, C, Funk, S, Kucharski, AJ, Drexler, JF. 2017. High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks. *MBio*, 8(6). doi:10.1128/mBio.01390-17
- Nguku PM, Sharif, SK, Mutonga, D, Amwayi, S, Omolo, J, Mohammed, O, Breiman, RF. 2010. An investigation of a major outbreak of Rift Valley fever in Kenya: 2006-2007. *Am J Trop Med Hyg*, 83(2 Suppl): 5-13. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0288
- Ninove L, Parola, P, Baronti, C, De Lamballerie, X, Gautret, P, Doudier, B, & Charrel, RN. 2009. Dengue virus type 3 infection in traveler returning from west Africa. *Emerg Infect Dis*, 15(11): 1871-1872. doi:10.3201/eid1511.081736
- Nitatpattana N, Dubot-Peres, A, Gouilh, MA, Souris, M, Barbazan, P, Yoksan, S, Gonzalez, JP. 2008. Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 14(11): 1762-1765. doi:10.3201/eid1411.080542

Ntziora F, Paraskevis, D, Haida, C, Manesis, E, Papatheodoridis, G, Manolakopoulos, S, Hatzakis, A. 2013. Ultrasensitive amplification refractory mutation system real-time PCR (ARMS RT-PCR) assay for detection of minority hepatitis B virus-resistant strains in the era of personalized medicine. *J Clin Microbiol*, 51(9): 2893-2900. doi:10.1128/JCM.00936-13

Nunes PC, Sampaio, SA, da Costa, NR, de Mendonca, MC, Lima Mda, R, Araujo, SE, de Filippis, AM. 2016. Dengue severity associated with age and a new lineage of dengue virus-type 2 during an outbreak in Rio De Janeiro, Brazil. *J Med Virol*, 88(7): 1130-1136. doi:10.1002/jmv.24464

Oliveira Melo AS, Malinger, G, Ximenes, R, Szejnfeld, PO, Alves Sampaio, S, & Bispo de Filippis, AM. 2016. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol*, 47(1): 6-7. doi:10.1002/uog.15831

Oliveira RP, Galvao, MA, Mafra, CL, Chamone, CB, Calic, SB, Silva, SU, & Walker, DH. 2002. Rickettsia felis in Ctenocephalides spp. fleas, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 8(3): 317-319. doi:10.3201/eid0803.010301

OMS. (2017). Vector-borne diseases. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/>

Pabbaraju K, Wong, S, Gill, K, Fonseca, K, Tipples, GA, & Tellier, R. 2016. Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol*, 83: 66-71. doi:10.1016/j.jcv.2016.09.001

Paixao ES, Teixeira, MG, & Rodrigues, LC. 2018. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ Glob Health*, 3(Suppl 1): e000530. doi:10.1136/bmjgh-2017-000530

Palacios G, Druce, J, Du, L, Tran, T, Birch, C, Briese, T, Lipkin, WI. 2008. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N Engl J Med*, 358(10): 991-998. doi:10.1056/NEJMoa073785

Pallen MJ. 2014. Diagnostic metagenomics: potential applications to bacterial, viral and parasitic infections. *Parasitology*, 141(14): 1856-1862. doi:10.1017/S0031182014000134

Papafragkou E, Hewitt, J, Park, GW, Greening, G, & Vinje, J. 2014. Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models. *PLoS One*, 8(6): e63485. doi:10.1371/journal.pone.0063485

Parola P, Paddock, CD, Socolovschi, C, Labruna, MB, Mediannikov, O, Kernif, T, Raoult, D. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev*, 26(4): 657-702. doi:10.1128/CMR.00032-13

Pastorino B, Bessaud, M, Grandadam, M, Murri, S, Tolou, HJ, & Peyrefitte, CN. 2005. Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *J Virol Methods*, 124(1-2): 65-71. doi:10.1016/j.jviromet.2004.11.002

Pena-Garcia VH, McCracken, MK, & Christofferson, RC. 2017. Examining the potential for South American arboviruses to spread beyond the New World. *Curr Clin Microbiol Rep*, 4(4): 208-217. doi:10.1007/s40588-017-0076-4

Pfeffer M, Linssen, B, Parke, MD, & Kinney, RM. 2002. Specific detection of chikungunya virus using a RT-PCR/nested PCR combination. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 49(1): 49-54.

Pfeffer M, Proebster, B, Kinney, RM, & Kaaden, OR. 1997. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 57(6): 709-718.

Picardeau M. 2017. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol*, 15(5): 297-307. doi:10.1038/nrmicro.2017.5

Pierre V, Drouet, MT, & Deubel, V. 1994. Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. *Res Virol*, 145(2): 93-104.

Pongsiri P, Praianantathavorn, K, Theamboonlers, A, Payungporn, S, & Poovorawan, Y. 2012. Multiplex real-time RT-PCR for detecting chikungunya virus and dengue virus. *Asian Pac J Trop Med*, 5(5): 342-346. doi:10.1016/S1995-7645(12)60055-8

Portillo A, de Sousa, R, Santibanez, S, Duarte, A, Edouard, S, Fonseca, IP, Oteo, JA. 2017. Guidelines for the Detection of Rickettsia spp. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 17(1): 23-32. doi:10.1089/vbz.2016.1966

Pyke AT, Daly, MT, Cameron, JN, Moore, PR, Taylor, CT, Hewitson, GR, Gair, R. 2014. Imported zika virus infection from the cook islands into australia, 2014. *PLoS Curr*, 6. doi:10.1371/currents.outbreaks.4635a54dbffba2156fb2fd76dc49f65e

Rabe IB, Staples, JE, Villanueva, J, Hummel, KB, Johnson, JA, Rose, L, Powers, AM. 2016. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 65(21): 543-546. doi:10.15585/mmwr.mm6521e1

Ramalingam S, Kannangai, R, Raj, AA, Jesudason, MV, & Sridharan, G. 2002. Rapid particle agglutination test for human immunodeficiency virus: hospital-based evaluation. *J Clin Microbiol*, 40(4): 1553-1554.

Ranjan P, Natarajan, V, Bajpai, M, & Gupta, E. 2016. High Seroprevalence of Dengue Virus Infection in Blood Donors From Delhi: A Single Centre Study. *J Clin Diagn Res*, 10(10): DC08-DC10. doi:10.7860/JCDR/2016/21262.8711

Rather IA, Lone, JB, Bajpai, VK, & Park, YH. 2017. Zika Virus Infection during Pregnancy and Congenital Abnormalities. *Front Microbiol*, 8: 581. doi:10.3389/fmicb.2017.00581

Reese SM, Blitvich, BJ, Blair, CD, Geske, D, Beaty, BJ, & Black, WC. 2008. Potential for La Crosse virus segment reassortment in nature. *Virology*, 5: 164. doi:10.1186/1743-422X-5-164

Regnery RL, Spruill, CL, & Plikaytis, BD. 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol*, 173(5): 1576-1589.

Renou A, Rolain, JM, Socolovschi, C, & Raoult, D. 2012. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 64(1): 126-129. doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00899.x

Rice CM, Lenches, EM, Eddy, SR, Shin, SJ, Sheets, RL, & Strauss, JH. 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, 229(4715): 726-733.

Robbins FC, Enders, JF, & Weller, TH. 1950. Cytopathogenic effect of poliomyelitis viruses in vitro on human embryonic tissues. *Proc Soc Exp Biol Med*, 75(2): 370-374.

Rodriguez-Morales AJ, Villamil-Gomez, WE, & Franco-Paredes, C. 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(3): 177-179. doi:10.1016/j.tmaid.2016.05.004

Roehr B. (2016). Facing Down the World's Deadliest Pathogens in a BSL4 Lab. Retrieved from <https://www.scientificamerican.com/article/facing-down-the-world-s-deadliest-pathogens-in-a-bsl4-lab/>

Rolain JM, Jensenius, M, & Raoult, D. 2004. Rickettsial infections--a threat to travellers? *Curr Opin Infect Dis*, 17(5): 433-437.

Rust RS. 2012. Human arboviral encephalitis. *Semin Pediatr Neurol*, 19(3): 130-151. doi:10.1016/j.spen.2012.03.002

Saito M, Miyahara, S, Villanueva, SY, Aramaki, N, Ikejiri, M, Kobayashi, Y, Yoshida, S. 2014. PCR and culture identification of pathogenic *Leptospira* spp. from coastal soil in Leyte, Philippines, after a storm surge during Super Typhoon Haiyan (Yolanda). *Appl Environ Microbiol*, 80(22): 6926-6932. doi:10.1128/AEM.02568-14

Sanchez MD, Pierson, TC, McAllister, D, Hanna, SL, Puffer, BA, Valentine, LE, Doms, RW. 2005. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology*, 336(1): 70-82. doi:10.1016/j.virol.2005.02.020

Sanchez-Montes S, Espinosa-Martinez, DV, Rios-Munoz, CA, Berzunza-Cruz, M, & Becker, I. 2015. Leptospirosis in Mexico: Epidemiology and Potential Distribution of Human Cases. *PLoS One*, 10(7): e0133720. doi:10.1371/journal.pone.0133720

Santibanez S, Portillo, A, Santibanez, P, Palomar, AM, & Oteo, JA. 2013. Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31(5): 283-288. doi:10.1016/j.eimc.2012.08.001

Sarkar A, Taraphdar, D, & Chatterjee, S. 2012. Molecular typing of dengue virus circulating in kolkata, India in 2010. *J Trop Med*, 2012: 960329. doi:10.1155/2012/960329

Sauer S, & Kliem, M. 2010. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 8(1): 74-82. doi:10.1038/nrmicro2243

Scaramozzino N, Crance, JM, Jouan, A, DeBriel, DA, Stoll, F, & Garin, D. 2001. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol*, 39(5): 1922-1927. doi:10.1128/JCM.39.5.1922-1927.2001

Schmidt K, Dressel, KM, Niedrig, M, Mertens, M, Schule, SA, & Groschup, MH. 2013. Public health and vector-borne diseases - a new concept for risk governance. *Zoonoses Public Health*, 60(8): 528-538. doi:10.1111/zph.12045

Shope RE. (1996). Bunyaviruses. In th & S Baron (Eds.), *Medical Microbiology*. Galveston (TX).

Shu PY, Chang, SF, Kuo, YC, Yueh, YY, Chien, LJ, Sue, CL, Huang, JH. 2003. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol*, 41(6): 2408-2416.

Singh K, Lale, A, Eong Ooi, E, Chiu, LL, Chow, VT, Tambyah, P, & Koay, ES. 2006. A prospective clinical study on the use of reverse transcription-polymerase chain reaction for the early diagnosis of Dengue fever. *J Mol Diagn*, 8(5): 613-616; quiz 617-620. doi:10.2353/jmoldx.2006.060019

Staples JE, Breiman, RF, & Powers, AM. 2009. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin Infect Dis*, 49(6): 942-948. doi:10.1086/605496

Stenos J, Graves, SR, & Unsworth, NB. 2005. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and typhus group Rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg*, 73(6): 1083-1085.

Stiasny K, Kiermayr, S, Holzmann, H, & Heinz, FX. 2006. Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. *J Virol*, 80(19): 9557-9568. doi:10.1128/JVI.00080-06

Stoddard RA, Gee, JE, Wilkins, PP, McCaustland, K, & Hoffmaster, AR. 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 64(3): 247-255. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014

Strauss EG, Rice, CM, & Strauss, JH. 1983. Sequence coding for the alphavirus nonstructural proteins is interrupted by an opal termination codon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(17): 5271-5275.

Strauss JH, & Strauss, EG. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev*, 58(3): 491-562.

Struchiner CJ, Rocklov, J, Wilder-Smith, A, & Massad, E. 2015. Increasing Dengue Incidence in Singapore over the Past 40 Years: Population Growth, Climate and Mobility. *PLoS One*, 10(8): e0136286. doi:10.1371/journal.pone.0136286

Sun P, & Kochel, TJ. 2013. The battle between infection and host immune responses of dengue virus and its implication in dengue disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal*, 2013: 843469. doi:10.1155/2013/843469

Tappe D, Nachtigall, S, Kapaun, A, Schnitzler, P, Gunther, S, & Schmidt-Chanasit, J. 2015. Acute Zika virus infection after travel to Malaysian Borneo, September 2014. *Emerg Infect Dis*, 21(5): 911-913. doi:10.3201/eid2105.141960

Tappe D, Rissland, J, Gabriel, M, Emmerich, P, Gunther, S, Held, G, Schmidt-Chanasit, J. 2014. First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Euro Surveill*, 19(4).

Tatem AJ, Rogers, DJ, & Hay, SI. 2006. Global transport networks and infectious disease spread. *Adv Parasitol*, 62: 293-343. doi:10.1016/S0065-308X(05)62009-X

Telles JN, Le Roux, K, Grivard, P, Vernet, G, & Michault, A. 2009. Evaluation of real-time nucleic acid sequence-based amplification for detection of Chikungunya virus in clinical samples. *J Med Microbiol*, 58(Pt 9): 1168-1172. doi:10.1099/jmm.0.010736-0

Tesh RB. 1988. The genus Phlebovirus and its vectors. *Annu Rev Entomol*, 33: 169-181. doi:10.1146/annurev.en.33.010188.001125

Thaipadungpanit J, Chierakul, W, Wuthiekanun, V, Limmathurotsakul, D, Amornchai, P, Boonslip, S, Peacock, SJ. 2011. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. *PLoS One*, 6(1): e16236. doi:10.1371/journal.pone.0016236

Theze J, Li, T, du Plessis, L, Bouquet, J, Kraemer, MUG, Somasekar, S, Pybus, OG. 2018. Genomic Epidemiology Reconstructs the Introduction and Spread of Zika Virus in Central America and Mexico. *Cell Host Microbe*, 23(6): 855-864 e857. doi:10.1016/j.chom.2018.04.017

Torii S, Orba, Y, Hang'ombe, BM, Mweene, AS, Wada, Y, Anindita, PD, Sawa, H. 2018. Discovery of Mwinilunga alphavirus: A novel alphavirus in Culex mosquitoes in Zambia. *Virus Res*, 250: 31-36. doi:10.1016/j.virusres.2018.04.005

Torres-Galicia I, Cortes-Poza, D, & Becker, I. 2014. [Dengue in Mexico: an analysis of two decades]. *Gac Med Mex*, 150(2): 122-127.

Tulman ER, Delhon, GA, Ku, BK, & Rock, DL. 2009. African swine fever virus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 328: 43-87.

VanBlargan LA, Mukherjee, S, Dowd, KA, Durbin, AP, Whitehead, SS, & Pierson, TC. 2013. The type-specific neutralizing antibody response elicited by a dengue vaccine candidate is focused on two amino acids of the envelope protein. *PLoS Pathog*, 9(12): e1003761. doi:10.1371/journal.ppat.1003761

Vaux DJ, Helenius, A, & Mellman, I. 1988. Spike--nucleocapsid interaction in Semliki Forest virus reconstructed using network antibodies. *Nature*, 336(6194): 36-42. doi:10.1038/336036a0

Vene S, Mangiafico, J, & Niklasson, B. 1995. Indirect immunofluorescence for serological diagnosis of dengue virus infections in Swedish patients. *Clin Diagn Virol*, 4(1): 43-50.

Villamil-Gomez WE, Gonzalez-Camargo, O, Rodriguez-Ayubi, J, Zapata-Serpa, D, & Rodriguez-Morales, AJ. 2016. Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *J Infect Public Health*, 9(5): 684-686. doi:10.1016/j.jiph.2015.12.002

VIPR. (2018). virus pathogen resource. Retrieved from <https://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=vipr>

Voller A, Bidwell, DE, & Bartlett, A. 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ*, 53(1): 55-65.

Waehre T, Maagard, A, Tappe, D, Cadar, D, & Schmidt-Chanasit, J. 2014. Zika virus infection after travel to Tahiti, December 2013. *Emerg Infect Dis*, 20(8): 1412-1414. doi:10.3201/eid2008.140302

Waggoner JJ, & Pinsky, BA. 2016. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. *J Clin Microbiol*, 54(4): 860-867. doi:10.1128/JCM.00279-16

Waggoner JJ, Abeynayake, J, Balassiano, I, Lefterova, M, Sahoo, MK, Liu, Y, Pinsky, BA. 2014. Multiplex nucleic acid amplification test for diagnosis of dengue fever, malaria, and leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 52(6): 2011-2018. doi:10.1128/JCM.00341-14

Waggoner JJ, Balassiano, I, Abeynayake, J, Sahoo, MK, Mohamed-Hadley, A, Liu, Y, Pinsky, BA. 2014. Sensitive real-time PCR detection of pathogenic *Leptospira* spp. and a comparison of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of leptospirosis. *PLoS One*, 9(11): e112356. doi:10.1371/journal.pone.0112356

Waggoner JJ, Balassiano, I, Mohamed-Hadley, A, Vital-Brazil, JM, Sahoo, MK, & Pinsky, BA. 2015. Reverse-Transcriptase PCR Detection of *Leptospira*: Absence of Agreement with Single-Specimen Microscopic Agglutination Testing. *PLoS One*, 10(7): e0132988. doi:10.1371/journal.pone.0132988

Waggoner JJ, Gresh, L, Mohamed-Hadley, A, Ballesteros, G, Davila, MJ, Tellez, Y, Pinsky, BA. 2016. Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Emerg Infect Dis*, 22(7): 1295-1297. doi:10.3201/eid2207.160326

Walter CT, & Barr, JN. 2011. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J Gen Virol*, 92(Pt 11): 2467-2484. doi:10.1099/vir.0.035105-0

Wasserman S, Tambyah, PA, & Lim, PL. 2016. Yellow fever cases in Asia: primed for an epidemic. *Int J Infect Dis*, 48: 98-103. doi:10.1016/j.ijid.2016.04.025

Weaver SC, & Reisen, WK. 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*, 85(2): 328-345. doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.008

Weaver SC, Charlier, C, Vasilakis, N, & Lecuit, M. 2018. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu Rev Med*, 69: 395-408. doi:10.1146/annurev-med-050715-105122

Weaver SC. 2006. Evolutionary influences in arboviral disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 299: 285-314.

Weaver SC. 2013. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol*, 21(8): 360-363. doi:10.1016/j.tim.2013.03.003

Weisburg WG, Barns, SM, Pelletier, DA, & Lane, DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173(2): 697-703.

Whelan J, Rimmelzwaan, GF, van den Hoek, A, Belderok, SM, & Sonder, GJB. 2016. Influenza in long-term Dutch travelers in the tropics: symptoms and infections. *BMC Infect Dis*, 16: 158. doi:10.1186/s12879-016-1502-6

WHO. (2005). Priority environment and health risks. Retrieved from <http://www.who.int/heli/risks/en/>

WHO. (2016a). Dengue and severe dengue Fact sheet. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.

WHO. (2016b). Situation report: yellow fever outbreak in Angola. Retrieved from <http://www.afro.who.int/en/yellow-fever/sitreps/item/9085-situation-report-yellow-fever-outbreak-in-angola-29-september-2016.html>

WHO. (2017). Chikungunya Fact sheet Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>

Wilder-Smith A, & Gubler, DJ. 2008. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin North Am*, 92(6): 1377-1390, x. doi:10.1016/j.mcna.2008.07.002

Wu D, Liu, F, Liu, H, Dai, L, & Tan, D. 2014. [Detection of serum HCV RNA in patients with chronic hepatitis C by transcription mediated amplification and real-time reverse transcription polymerase chain reaction]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 39(7): 664-672. doi:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.07.003

Wu T, Perrings, C, Kinzig, A, Collins, JP, Minter, BA, & Daszak, P. 2017. Economic growth, urbanization, globalization, and the risks of emerging infectious diseases in China: A review. *Ambio*, 46(1): 18-29. doi:10.1007/s13280-016-0809-2

Wu W, Wang, J, Yu, N, Yan, J, Zhuo, Z, Chen, M, Xia, N. 2018. Development of multiplex real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Zika, dengue, yellow fever, and chikungunya viruses in a single tube. *J Med Virol*, 90(11): 1681-1686. doi:10.1002/jmv.25253

Young PR, NG, LFP, Hall, RA, Smith, DW, & Johansen, CA. (2009). Arbovirus Infections. In ELSEVIER (Ed.), *Manson's Tropical Diseases* (Twenty - Third Edition ed.).

Zacks MA, & Paessler, S. 2010. Encephalitic alphaviruses. *Vet Microbiol*, 140(3-4): 281-286. doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.023

Zanluca C, Melo, VC, Mosimann, AL, Santos, GI, Santos, CN, & Luz, K. 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(4): 569-572. doi:10.1590/0074-02760150192

Zhang X, Liu, Y, Zhao, L, Li, B, Yu, H, Wen, H, & Yu, XJ. 2013. An emerging hemorrhagic fever in China caused by a novel bunyavirus SFTSV. *Sci China Life Sci*, 56(8): 697-700. doi:10.1007/s11427-013-4518-9

Zhang YZ, Zhou, DJ, Xiong, Y, Chen, XP, He, YW, Sun, Q, Xu, J. 2011. Hemorrhagic fever caused by a novel tick-borne Bunyavirus in Huaiyangshan, China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 32(3): 209-220.

Ziemiacki A, & Garoff, H. 1978. Subunit composition of the membrane glycoprotein complex of Semliki Forest virus. *J Mol Biol*, 122(3): 259-269.

Zompi S, Montoya, M, Pohl, MO, Balmaseda, A, & Harris, E. 2012. Dominant cross-reactive B cell response during secondary acute dengue virus infection in humans. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(3): e1568. doi:10.1371/journal.pntd.0001568