

# Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**“DETECCIÓN DE ARBOVIRUS (DENGUE, ZIKA, CHIKUNGUNYA  
Y OROPOUCHE) EN PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL  
MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA  
(PCR). PIURA, ABRIL - AGOSTO DEL 2016.”**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Martins Luna, Johanna Elizabeth**

Para optar el Título Profesional de

**Ingeniera Biotecnóloga**

**Asesora:**

Ing. Córdova Barrios, Cinthia

**Co - asesor:**

Mg. Aguilar Luis, Miguel Angel

**Arequipa - Perú**

**2019**

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000013635  
N° Trámite en Fac. 331-2017  
Fecha Recep. Fac. 21-03-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **MARTINS LUNA, Johanna Elizabeth**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**"PREVALENCIA DE LOS ARBOVIRUS: DENGUE, ZIKA, CHIKUNGUNYA Y OROPUCHE EN PACIENTES CON SINDROME FEBRIL DEL DEPARTAMENTO DE PIURA DURANTE EL FENOMENO DEL NIÑO"**

DICTAMINADORES: 1) *Dra. Yenny López Valencia* 2) *Dr. Julio Cesar Bernabé Ortiz*

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"FRECUENCIA DE LOS ARBOVIRUS: DENGUE, ZIKA, CHIKUNGUNYA Y OROPUCHE EN PACIENTES CON SINDROMES FEBRILES DE LA DIRECCION REGIONAL DE SALUD PIURA DURANTE EL PERIODO ABRIL-AGOSTO 2016"** después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS: *[Signatures]* (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA *08/06/17*

ASESOR: *Ing. Cinthia Córdova Barrios*

**DICTAMEN ASESORÍA** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por las recurrentes, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"FRECUENCIA DE ARBOVIRUS: DENGUE, ZIKA, CHIKUNGUNYA Y OROPUCHE EN PACIENTES CON SINDROMES FEBRILES DE LA DIRECCION REGIONAL DE SALUD PIURA DURANTE EL PERIODO ABRIL-AGOSTO DEL 2016"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente

FIRMA *[Signature]* FECHA *23-04-19*

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Dra. Yenny Lopez Valencia*
- 2) *Dr. César Bernabé Ortiz*
- 3) *Mgter. Natalia López Álvarez*

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: **"DETECCIÓN DE ARBOVIRUS (DENGUE, ZIKA, CHIKUNGUNYA Y OROPUCHE) EN PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). PIURA, ABRIL-AGOSTO DEL 2016"** y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA *[Signatures]* (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

JURADOS: PRESIDENTE *DRA. YENNY LOPEZ VALENCIA*  
VOCAL *DR. CESAR BERNABE ORTIZ*  
SECRETARIO *MAG. NATALIA LOPEZ ALVAREZ*

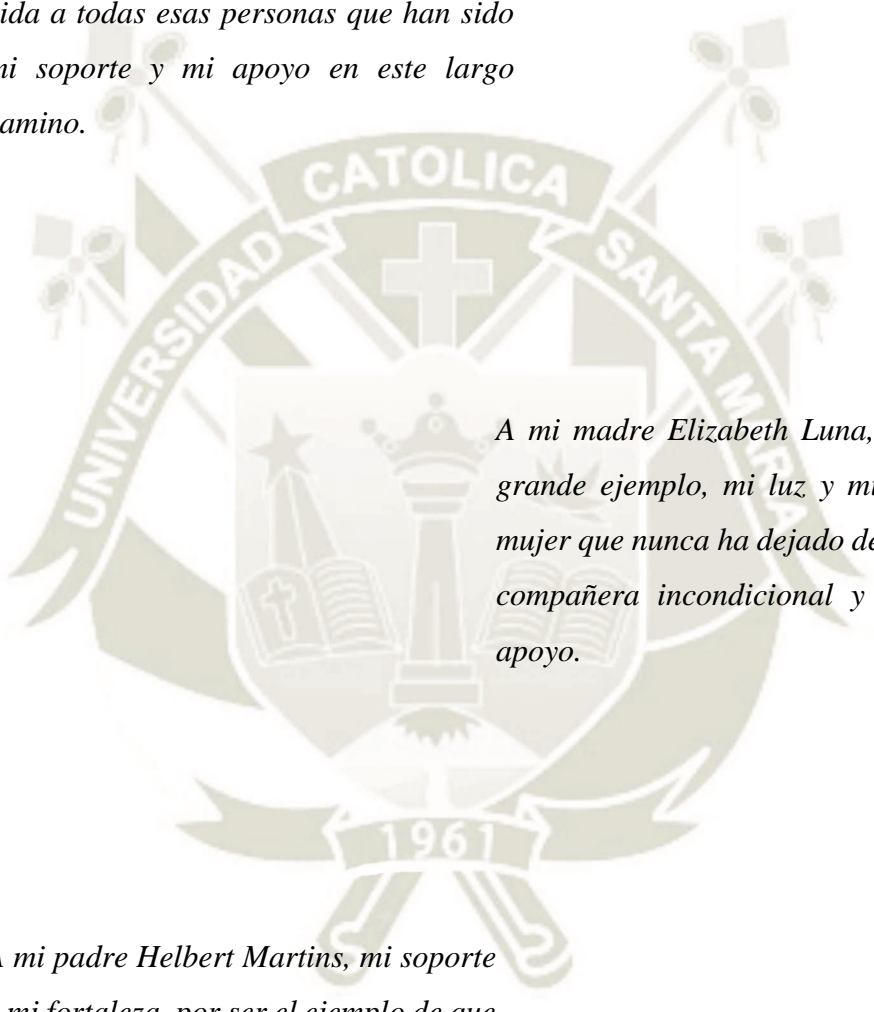
FECHA *12/8/19* HORA *19.00* LOCAL *C-401*

FIRMA DEL DECANO

FECHA

## **DEDICATORIA**

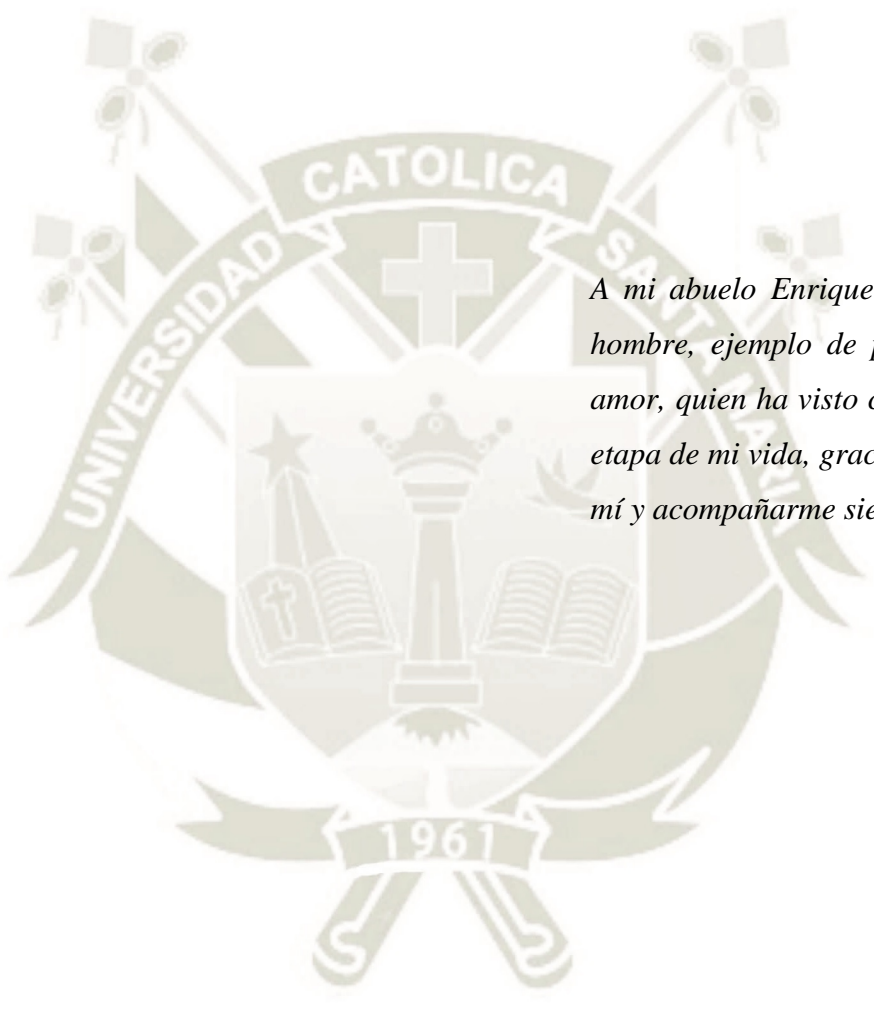
*A Dios, por darme la oportunidad día a día de seguir con mis sueños, permitirme llegar hasta este momento y poner en mi vida a todas esas personas que han sido mi soporte y mi apoyo en este largo camino.*



*A mi madre Elizabeth Luna, que es mi más grande ejemplo, mi luz y mi motivación, la mujer que nunca ha dejado de creer en mí, mi compañera incondicional y el más grande apoyo.*

*A mi padre Helbert Martins, mi soporte y mi fortaleza, por ser el ejemplo de que una familia unida puede lograr lo que se proponga, el hombre que me motiva día a día a empezar de nuevo y a ser valiente.*

*A mis abuelos Enrique Martins y Elsa Aleman (Q.E.P.D.) que creyeron en mí, mis segundos padres, a quienes recuerdo y amo con todo mi corazón, gracias por darme la mejor etapa de mi vida junto a ustedes.*



*A mi abuelo Enrique Luna, un gran hombre, ejemplo de perseverancia y amor, quien ha visto con ilusión cada etapa de mi vida, gracias por creer en mí y acompañarme siempre.*

## AGRADECIMIENTOS

*Primero deseo agradecer a Dios por haberme dado fuerza y perseverancia para cumplir una de las metas más importantes en mi vida.*

*Agradecer a la Dra. Juana del Valle Mendoza, investigadora titular del Instituto de Investigación Nutricional, quien me abrió las puertas a esta gran oportunidad y me apoyo en todo momento, incentivándome a ser mejor cada día.*

*A mi madre Elizabeth, que no se dio nunca por vencida y decidió luchar contra cualquier adversidad para darme su apoyo incondicional.*

*A mi padre Helbert, que decidió respaldarme en todas mis decisiones y apoyarme en los momentos más difíciles.*

*A las maravillosas personas que conocí en el Instituto de Investigación Nutricional, quienes ahora se han convertido en mis compañeros de trabajo y mis grandes amigos, gracias por brindarme su apoyo y conocimiento en el desarrollo de esta tesis.*

*A mi abuelo Enrique Luna, un gran hombre, que me acogió en su hogar todo el tiempo que estuve fuera de casa, gracias por tu amor y tus grandes palabras, gracias por preocuparte por mí y cuidarme.*

*A mi tío Francisco Gonzales, quien no ha dejado de luchar por su familia, gracias por siempre estar a mi lado y apoyarme en todos mis sueños.*

*A mi familia que me dio aliento en esta travesía, con el único objetivo de que yo pueda cumplir con mis metas.*

*A mis amigos Lucía, Briggite, Dayana, Christian y Gabriela quienes a pesar de la distancia decidieron seguir a mi lado con sus palabras de aliento y su motivación.*

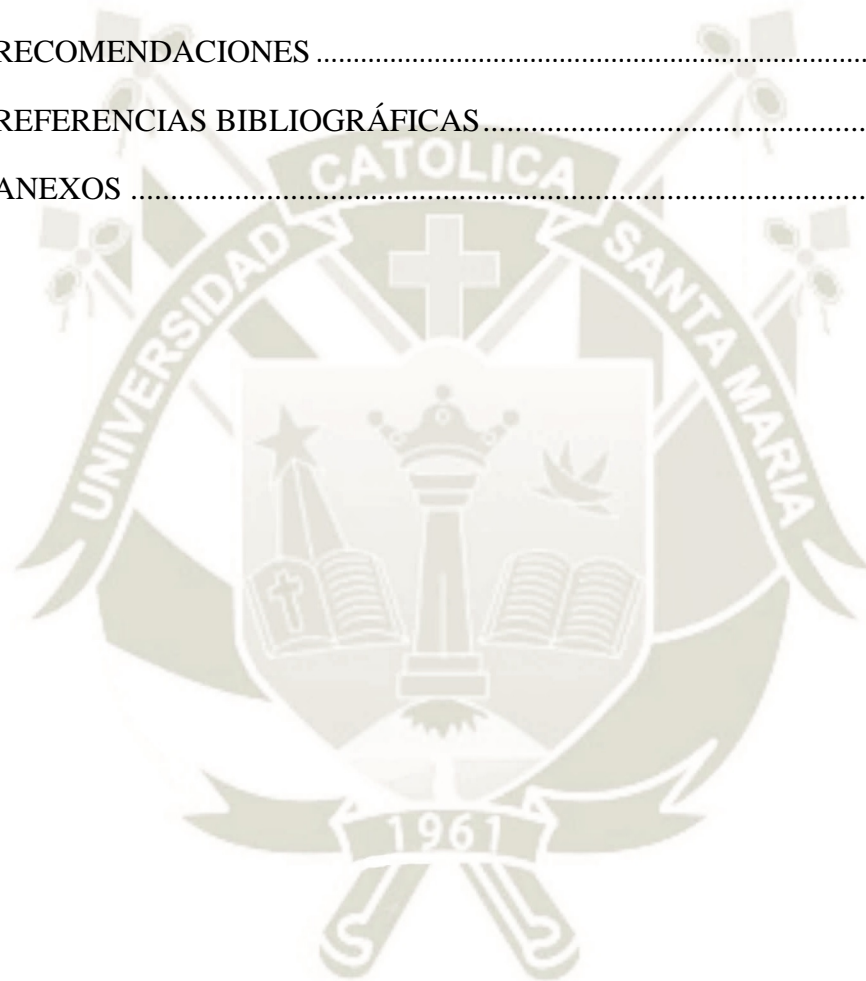
*El presente trabajo fue financiado por Cienciactiva del CONCYTEC a través del proyecto denominado: “PLATAFORMA NANO-BIOTECNOLÓGICA MULTIDISCIPLINAR PARA CONTENER EL IMPACTO DE SÍNDROMES FEBRILES EN ZONAS DE ALTO RIESGO EN EL PERÚ” (Contrato N° 164-2016-FONDECYT).*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
INTRODUCCIÓN .....	III
OBJETIVOS .....	V
HIPÓTESIS.....	VI
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Aspectos Generales de lo Arbovirus.....	1
1.2. Síndrome febril.....	3
1.3. Clasificación.....	3
1.3.1. Familia <i>Togaviridae</i> .....	4
1.3.1.1. <i>Alphavirus</i> .....	4
1.3.1.1.1. Virus Chikungunya.....	4
1.3.2. Familia <i>Flaviviridae</i> .....	7
1.3.2.1. <i>Flavivirus</i> .....	7
1.3.2.1.1. Dengue: “Veneno del agua”.....	8
1.3.2.1.2. Virus Zika.....	11
1.3.3. Familia <i>Rhabdoviridae</i> .....	14
1.3.4. Familia <i>Bunyaviridae</i> .....	14
1.3.4.1. <i>Orthobunyavirus</i> .....	15
1.3.4.1.1. La fiebre del Oropouche.....	15
1.3.5. Familia <i>Reoviridae</i> .....	16
1.4. Vectores de transmisión.....	17
1.4.1. <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> .....	18
1.4.2. <i>Culicoides paraensis</i> .....	19

1.5. Sintomatología.....	20
1.6. Epidemiología. ....	21
1.7. Técnicas de diagnóstico. ....	24
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
2.1.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	25
2.1.2. MATERIAL EXPERIMENTAL .....	25
2.1.2.1. Fuente de las muestras y/o unidades biológicas. ....	25
2.1.3. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO.....	25
<b>2.2. MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
2.2.1. Estandarización molecular de la PCR para detección Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en el laboratorio. ....	28
2.2.2. Detectar la presencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en muestras de suero de pacientes con síndrome febril mediante la técnica de PCR. ....	38
2.2.3. Determinación de la presencia y frecuencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en muestras de suero de pacientes con síndrome febril. ....	42
2.2.4. Correlacionar los parámetros clínicos con la presencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en los pacientes con síndrome febril. ....	43
<b>CAPITULO III</b> .....	<b>44</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1. RESULTADOS EXPERIMENTALES</b> .....	<b>44</b>
3.1.1. Estandarización molecular de la PCR para detección Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en controles positivos.....	44
3.1.2. Amplificación del ARN de arbovirus (Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ....	50

3.1.3. Determinación de la presencia y frecuencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en muestras de suero de pacientes con síndrome febril. ....	54
3.1.4. Correlación de los parámetros clínicos con la presencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en los pacientes con síndrome febril. ....	58
CONCLUSIONES .....	64
RECOMENDACIONES .....	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS .....	74



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Mecanismos de transmisión para arbovirus. Todos usan como vectores a los mosquitos <sup>16</sup> .....	2
<b>Figura 2.-</b> CHIKV distribución geográfica a lo largo de los años <sup>22</sup> .....	5
<b>Figura 3.-</b> Mapa de los países con transmisión autóctona (color morado) o casos importados de CHIKV (color lila) <sup>24</sup> .....	6
<b>Figura 4.-</b> Número acumulado de DENV desde 1943 <sup>31</sup> .....	9
<b>Figura 5.-</b> Número de casos reportados de fiebre de DENV entre probables y confirmados <sup>30</sup> .....	10
<b>Figura 6.-</b> Destinos tomados por los viajeros provenientes de Brasil en el 2016, principales transportadores del ZIKV <sup>35</sup> .....	12
<b>Figura 7.-</b> Casos autóctonos confirmados de ZIKV hasta el 10 de agosto del 2017 <sup>37</sup> .....	14
<b>Figura 8.-</b> Ciclo de transmisión de OROV <sup>39</sup> .....	16
<b>Figura 9.-</b> Mapa de distribución del Aedes aegypti, de color azul donde no se registran casos y de color rojo donde hay casos <sup>44</sup> .....	17
<b>Figura 10.-</b> Mapa de distribución del Aedes albopictus, de color azul donde no se registran casos y de color rojo donde hay casos <sup>44</sup> .....	17
<b>Figura 11.-</b> Distribución de seis arbovirus transmitidos por Culicoides, incluido el OROV <sup>46</sup> .....	20
<b>Figura 12.-</b> Incubación de muestras y la solución reguladora de unión a 72°C. 29	
<b>Figura 13.-</b> Programación del termociclador Light Cycler ® 2.0. ....	31

<b>Figura 14.-</b> Preparación de mix para PCR convencional y repartición de 17 $\mu$ L en cada tubo, listo para agregar 3.0 $\mu$ L de ADNc .....	37
<b>Figura 15.-</b> Peso del agar y medición del Tris, Acetato y EDTA 1X (TAE), para la preparación del gel de agarosa al 1.5%. .....	38
<b>Figura 16.-</b> Muestras de pacientes con síndromes febriles provenientes de Piura, recolectadas en colaboración con la Dirección Regional de Salud de Piura – Red de Salud Morropón – Chulucanas entre los meses de mayo y agosto de 2016... ..	40
<b>Figura 17.-</b> Alícuota de muestra de suero y preparación de la solución “A”.....	41
<b>Figura 18.-</b> Ambiente pre-PCR, preparación de mix. ....	42
<b>Figura 19.-</b> Resultado de la PCR para detección de DENV, la curva de amplificación del control DENV -1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4 se muestra positiva (A), en el caso del control negativo (B) no se da una amplificación, por lo que se hace valido el resultado.....	45
<b>Figura 20.-</b> Resultado de la PCR para detección de ZIKV la curva de amplificación del control Zika PRVABC59 virus se muestra positiva (A), en el caso del control negativo (B) no se da una amplificación, por lo que se hace valido el resultado. ....	46
<b>Figura 21.-</b> Resultado de la PCR para detección de CHIKV la curva de amplificación del control Chikungunya R80422a virus se muestra positiva (A), en el caso del control negativo (B) no se da una amplificación, por lo que se hace valido el resultado. ....	46
<b>Figura 22.-</b> Curva de disociación de la PCR para diagnóstico de DENV, la Tm que se obtuvo fue de 68.32.....	47
<b>Figura 23.-</b> Curva de disociación de la PCR para diagnóstico de ZIKV, la Tm que se obtuvo fue de 71.85.....	48

<b>Figura 24.-</b> Curva de disociación de la PCR para diagnóstico de CHIKV, la $T_m$ que se obtuvo fue de 67.50.....	49
<b>Figura 25.-</b> Estandarización de sonda obtenida del CDC para OROV donde el control positivo (A) muestra una banda definida a 300 pb como se puede comprobar con ayuda del marcador de peso molecular (WM), en el control negativo no se visualiza ninguna banda, por lo que se hace válido el resultado. 49	49
<b>Figura 26.-</b> Resultado de muestras amplificadas por PCR para DENV, <b>A:</b> Control positivo del CDC, <b>B:</b> Control negativo y los restantes son las muestras evaluadas. ....	51
<b>Figura 27.-</b> Resultado de muestras amplificadas por RT-PCR para ZIKV, <b>A:</b> Control positivo del CDC, <b>B:</b> Control negativo y los restantes son las muestras evaluadas. ....	51
<b>Figura 28.-</b> Resultado de muestras amplificadas por RT-PCR para CHIKV, <b>A:</b> Control positivo del CDC, <b>B:</b> Control negativo y los restantes son las muestras evaluadas. ....	52
<b>Figura 29.-</b> Alineamiento de los cebadores BS-S y BS-C con la secuencia Oropouche virus culture NCPV:1409261v segment S, complete sequence (Fuente NCBI).....	52
<b>Figura 30.-</b> Gel de agarosa al 1.5% para la identificación de OROV. <b>a-h:</b> muestras de pacientes con síndrome febril, siendo <b>a</b> y <b>b</b> muestras con resultado positivo, <b>i:</b> marcador de peso molecular, <b>j:</b> control positivo, <b>k:</b> control negativo, <b>l:</b> tamaño del amplicón de OROV buscado 300pb.....	53
<b>Figura 31.-</b> Distribución de casos de Dengue virus, Zika virus, Chikungunya virus y Oropouche virus por edades.....	55
<b>Figura 32.-</b> Distribución de frecuencia de casos por edades.....	56
<b>Figura 33.-</b> Distribución de casos de Dengue virus, Zika virus, Chikungunya virus y Oropouche virus por géneros. ....	57

<b>Figura 34.-</b> Frecuencias de las infecciones virales por sexo de los pacientes....	58
<b>Figura 35.-</b> Scatter-Matriz de la correlación de los signos y síntomas para las diferentes infecciones en la población. Coeficiente de correlación de Pearson (r) y valor de significancia (p).....	62
<b>Figura 36.-</b> Kit High Pure Viral RNA (Roche Life Science, Mannheim, Alemania) usado para la extracción de ácidos nucleicos. ....	77
<b>Figura 37.-</b> Preparación de solución “A” para la extracción de ARN y alícuota del tampón de elución para su incubación a 72°C .....	77
<b>Figura 38.-</b> Centrifugación de muestras para extracción a condiciones de 8000g por 1 minuto. ....	78
<b>Figura 39.-</b> Adición del tampón de lavado para el lavado de la muestra para la extracción de ARN.....	78
<b>Figura 40.-</b> Kit usado para PCR, <i>RealTime ready RNA Virus Master</i> (Roche Life Science, Mannheim, Alemania). ....	79
<b>Figura 41.-</b> Preparación de Mix para RT-PCR dentro de cabina de seguridad..	79
<b>Figura 42.-</b> Reparto de Mix en capilares para RT-PCR y cierre de capilares considerados control negativo, para el caso de DENV, ZIKV y CHIKV.....	80
<b>Figura 43.-</b> Área de carga de muestra de ARN para la PCR, carga de muestras y de control positivo en cada caso para DENV, ZIKV, CHIKV. ....	80
<b>Figura 44.-</b> Muestras completas en capilares siendo colocadas en el del termociclador Light Cyler ® 2.0, para posteriormente ser programado con las condiciones adecuadas para DENV, ZIKV, CHIKV. ....	81
<b>Figura 45.-</b> Preparación de Mix para PCR convencional de OROV. ....	81
<b>Figura 46.-</b> Colocando la 17µL de Mix en cada tubo pequeño para luego agregar 3µL de muestra.....	82

**Figura 47.-** Muestras colocadas en termociclador y programadas según los tiempos y temperaturas indicados. .... 82

**Figura 48.-** Gel corriendo para la identificación de OROV a 120V durante 1 hora..... 83



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Número de casos de DENV reportados en el Perú en los últimos cinco años <sup>34</sup> .....	11
<b>Tabla 2.-</b> Los 10 principales países en ocurrencia en América para <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i> <sup>44</sup> .....	19
<b>Tabla 3.-</b> Arbovirosis que afectan a humanos <sup>47</sup> .....	22
<b>Tabla 4.-</b> Detección de sensibilidad y especificidad en pruebas de ELISAS (NS1, IgM, IgG) para DENV <sup>53</sup> .....	24
<b>Tabla 5.-</b> Composición de la solución “A”. .....	28
<b>Tabla 6.-</b> Mix usada para la amplificación por ensayo de RT-PCR para DENV, ZIKV y CHIKV. ....	30
<b>Tabla 7.-</b> Programación y condiciones para la ampliación de DENV. ....	31
<b>Tabla 8.-</b> Programación y condiciones para la ampliación de ZIKV. ....	32
<b>Tabla 9.-</b> Programación y condiciones para la ampliación de CHIKV. ....	32
<b>Tabla 10.-</b> Cebadores y sondas utilizadas para el proceso de amplificación. ....	33
<b>Tabla 11.-</b> Primera mix para el paso de ARN a ADNc. ....	35
<b>Tabla 12.-</b> Segunda mix para el paso de ARN a ADNc. ....	35
<b>Tabla 13.-</b> Programación utilizada para el paso de ARN a ADNc. ....	36
<b>Tabla 14.-</b> Mix usada para la amplificación por ensayo de PCR para OROV... ..	36
<b>Tabla 15.-</b> Programación y condiciones para la amplificación de OROV. ....	37

**Tabla 16.-** Evaluación de los controles positivos para DENV (DENV -1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4), ZIKV (Zika PRVABC59 virus) y CHIKV (Chikungunya R80422a) ..... 44

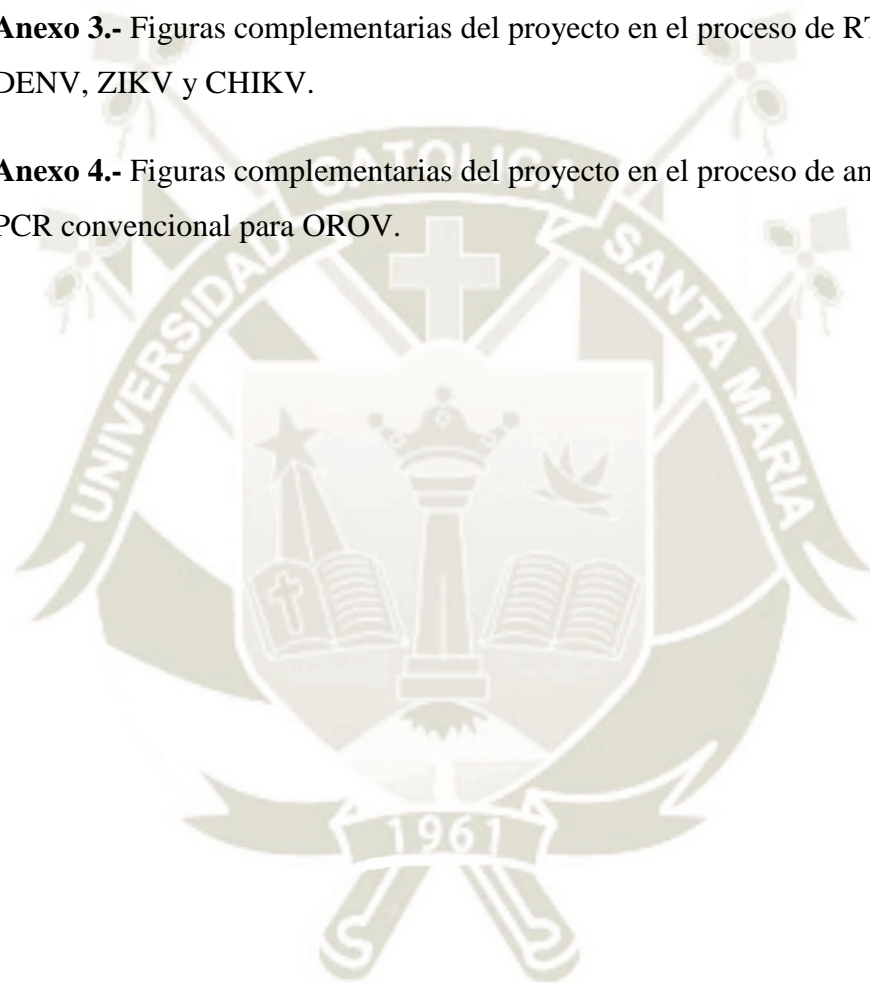
**Tabla 17.-** Arbovirus clasificación por edades y sexo. .... 55

**Tabla 18.-** Distribución de casos de Dengue virus, Zika virus, Chikungunya virus y Oropouche virus por signos y síntomas clínicos, considerando datos de Odds y Odds ratio. .... 60



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.-</b> Modelo de ficha de datos y consentimiento informado.	75
<b>Anexo 2.-</b> Figuras complementarias del proyecto en el proceso de extracción.	77
<b>Anexo 3.-</b> Figuras complementarias del proyecto en el proceso de RT-PCR para DENV, ZIKV y CHIKV.	79
<b>Anexo 4.-</b> Figuras complementarias del proyecto en el proceso de amplificación por PCR convencional para OROV.	81



## ABREVIATURAS

DENV	:	Dengue virus
ZIKV	:	Zika virus
CHIKV	:	Chikungunya virus
OROV	:	Oropouche virus
MAYV	:	Mayaro virus
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
DIRESA	:	Dirección Regional de Salud
IIN	:	Instituto de Investigación Nutricional
SE	:	Semana epidemiológica
AFI	:	Enfermedad febril aguda
OMS	:	Organización Mundial de la Salud
CF	:	Fiebre del Chikungunya
ELISA	:	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
NS1	:	Proteína no estructural 1
IgM	:	Inmunoglobulina M
IgG	:	Inmunoglobulina G
ARN	:	Ácido ribonucleico
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
CDC	:	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
Cp	:	Punto de cruce
Tm	:	Temperatura <i>Melting</i>

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se identificó la frecuencia de los arbovirus Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en pacientes con síndrome febril del departamento de Piura ubicado al norte del Perú, mediante la prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa. Las muestras fueron obtenidas mediante la Dirección Regional de Salud Piura – Red de Salud Morropón – Chulucanas y procesadas en el Instituto de Investigación Nutricional (IIN) ubicado en Lima. Se diseñó un estudio transversal descriptivo usando muestras de conveniencia. La toma de muestras y recolección de datos se realizó en los establecimientos de salud durante el periodo del mes de abril hasta agosto del 2016 por el personal autorizado y capacitado. En el estudio se consideró 214 muestras procedentes de pacientes con síndrome febril de todas las edades que cumplieron con ciertos criterios de inclusión. Las muestras de suero obtenidas fueron procesadas mediante una reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche, los recuentos de los casos fueron analizados por pruebas estadísticas como el test *t-student* para una distribución de 2 colas para datos pareados, el test  $\chi^2$  en tablas de 2x2 y una matriz de correlación de Pearson. En los resultados obtenidos de un total de 214 muestras, las más altas prevalencias correspondieron a Dengue (30.8%) y Oropouche (28.5%), el Zika tuvo una frecuencia intermedia (12.6%) y Chikungunya tuvo la frecuencia más baja (3.3%). Con respecto a la clasificación por edades y géneros, quedo demostrada que no existe diferencia significativa en ninguno de los casos, así mismo en el caso de signos y síntomas clínicos tampoco se comprobó diferencia significativa en ninguno de los casos. En conclusión, se determinó la presencia y frecuencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en muestras de suero de pacientes con síndrome febril mediante la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa, siendo un método de alta especificidad y sensibilidad. Siendo Oropouche uno de los más importantes hallazgos de esta investigación ya que su presencia en esta región del país era desconocida.

**Palabras clave:** Dengue, Zika, Chikungunya, Oropouche, reacción en cadena de la polimerasa, frecuencia, pruebas moleculares.

## ABSTRACT

In the present research work, the frequency of Dengue, Zika, Chikungunya and Oropouche arboviruses was identified in patients with febrile syndrome from the department of Piura located in northern Peru, using the molecular polymerase chain reaction test. The samples were obtained through the Regional Directorate of Health Piura - Health Network Morropón - Chulucanas and processed in the Institute of Nutritional Research (IIN) located in Lima. A descriptive cross-sectional study was designed using convenience samples. Sampling and data collection were carried out in health facilities during the period from April to August 2016 by authorized and trained personnel. The study considered 214 samples from patients with febrile syndrome of all ages who met certain inclusion criteria. The serum samples obtained were processed by a polymerase chain reaction for the identification of Dengue, Zika, Chikungunya and Oropouche, the counts of the cases were analyzed by statistical tests such as the t-student test for a 2-tailed distribution for paired data, the  $\chi^2$  test in 2x2 tables and a Pearson correlation matrix. In the results obtained from a total of 214 samples, the highest prevalences corresponded to Dengue (30.8%) and Oropouche (28.5%), Zika had an intermediate frequency (12.6%) and Chikungunya had the lowest frequency (3.3%). With respect to the classification by age and gender, it was shown that there is no significant difference in any of the cases, likewise in the case of clinical signs and symptoms no significant difference was found in any of the cases. In conclusion, the presence and frequency of Dengue, Zika, Chikungunya and Oropouche were determined in serum samples from patients with febrile syndrome using the molecular technique of polymerase chain reaction, being a method of high specificity and sensitivity. Oropouche being one of the most important findings of this investigation since its presence in this region of the country was unknown.

**Keywords:** Dengue, Zika, Chikungunya, Oropouche, polymerase chain reaction, frequency, molecular tests.

## INTRODUCCIÓN

Las arbovirosis se han convertido en un problema de salud pública grave, ya que la investigación, control y prevención cada día es más complicado, y es que la verdadera dificultad no es sólo su diversidad genómica o la mala identificación debido a sus síntomas clínicos similares sino también la rápida expansión de sus vectores, lo cual ha dado como resultado su propagación<sup>1</sup>. En los últimos años se ha dado un incremento acelerado en la frecuencia con la que se presentan estos síndromes febriles, así como la extensión geográfica a zonas con climas templados, afectando a millones de personas cada año<sup>2</sup>.

Las infecciones por arbovirus infecciones han ido tomando importancia en la salud pública llegando a convertirse en una gran amenaza para todos, debido a su amplia distribución y rápida adaptabilidad a nuevos terrenos, con el transcurso del tiempo y la extensión de climas cálidos, se ha visto acrecentada su extensión geográfica<sup>2</sup>.

Los arbovirus son un grupo taxonómicamente heterogéneo<sup>1</sup>, y además un conjunto de virus bastante amplio<sup>2</sup>, por lo que la pronta y certera identificación de los agentes virales responsables de los síndromes febriles es de vital importancia. Esto permitirá contar con una vigilancia epidemiológica activa, así como la posibilidad de realizar distintas investigaciones que permitan lograr avances, en la prevención, que hasta el momento ha sido muy poco efectiva, así como en el tratamiento que es inexistente, debido a la complejidad de estos virus.

Desde 1897, la principal causa de nuevas enfermedades humanas son los virus, siendo poco menos de la mitad virus transmitidos por artrópodos<sup>3</sup>. El término “Arbovirus” empieza a ser usado a partir de 1942, año en el que se aísla el virus responsable de la Encefalitis en animales<sup>4</sup>. La amenaza de estos agentes infecciosos ha ido en aumento a partir de la década de los 60's creciendo con gran velocidad en los últimos 20 años, lo cual es asociado a diferentes factores como: mayor contacto con la vida silvestre en las regiones que están en desarrollo, aumento en el turismo y el comercio mundial<sup>3</sup>.

Los arbovirus como DENV, ZIKV, CHIKV, OROV, MAYV, entre otros han brotado en lugares nuevos y han renacido en zonas endémicas en las que se habían dado por

erradicados estos microorganismos, además por la alta tasa de mutación y variación en la secuencia genética se ha visto cambios en la patogenicidad<sup>5</sup>. Es así que en el 2016 se presentó 31 868 casos de DENV en todo el Perú, entre confirmados (17 055) y probables (14 813); en el 2017 hasta la SE 02 se registró 105 casos confirmados y 507 probables<sup>6</sup>; mientras en ZIKV son 1 855 los afectados en el 2016, en el 2017 hasta la SE 09 fueron 1 005 los casos, entre confirmados y probables<sup>7</sup>, en el caso de CHIKV en el 2016 se presentó 1 339 infectados con el virus, y en el 2017 hasta la SE 16 son 655 casos (entre casos confirmados y probables)<sup>8</sup> y en el caso de OROV en el año 2016 se notificó 57 casos<sup>9</sup>, posteriormente no se tiene registro de otros casos.

El aumento de la incidencia de los arbovirus en el Perú ha ocasionado un desequilibrio en el sector salud y en su economía, lo que ha implicado el desabastecimiento de medicamentos y una limitación del personal para el cuidado de las personas infectadas; es importante considerar que estos síndromes febriles no tienen un tratamiento en específico que pueda detenerlo, sólo tratamientos sintomáticos o empíricos que disminuirán la sensación de malestar<sup>10</sup>. Los estudios realizados, así como los avances que se logren para combatirlos y controlarlos son de vital importancia ya que van a permitir brindar mejores servicios a los afectados y aminorar los gastos en el sector salud.

En la actualidad para la identificación de arbovirus, las pruebas moleculares son las más recomendadas. En esta investigación se va a hacer uso de la PCR la cual ya ha sido utilizada en otras investigaciones con arbovirus<sup>11-13</sup>. El uso de ésta técnica no solo ha mejorado el diagnóstico clínico, sino también la vigilancia de los vectores<sup>14</sup>.

La presente investigación tiene como objetivo identificar y evaluar las frecuencias de DENV, ZIKV, CHIKV y OROV en pacientes con síndromes febriles provenientes del departamento de Piura durante el periodo de abril - agosto de 2016.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Detectar Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en pacientes con síndrome febril mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Piura, entre los meses de abril y agosto de 2016

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarización molecular de la PCR para detección de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en el laboratorio.
2. Detectar la presencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en muestras de suero de pacientes con síndrome febril mediante la técnica de PCR.
3. Determinar la frecuencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en los pacientes con síndrome febril.
4. Correlacionar los parámetros clínicos con la presencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en los pacientes con síndrome febril.

## HIPÓTESIS

Si las técnicas moleculares son utilizadas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas es posible la detección de arbovirus (Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



## CAPÍTULO I

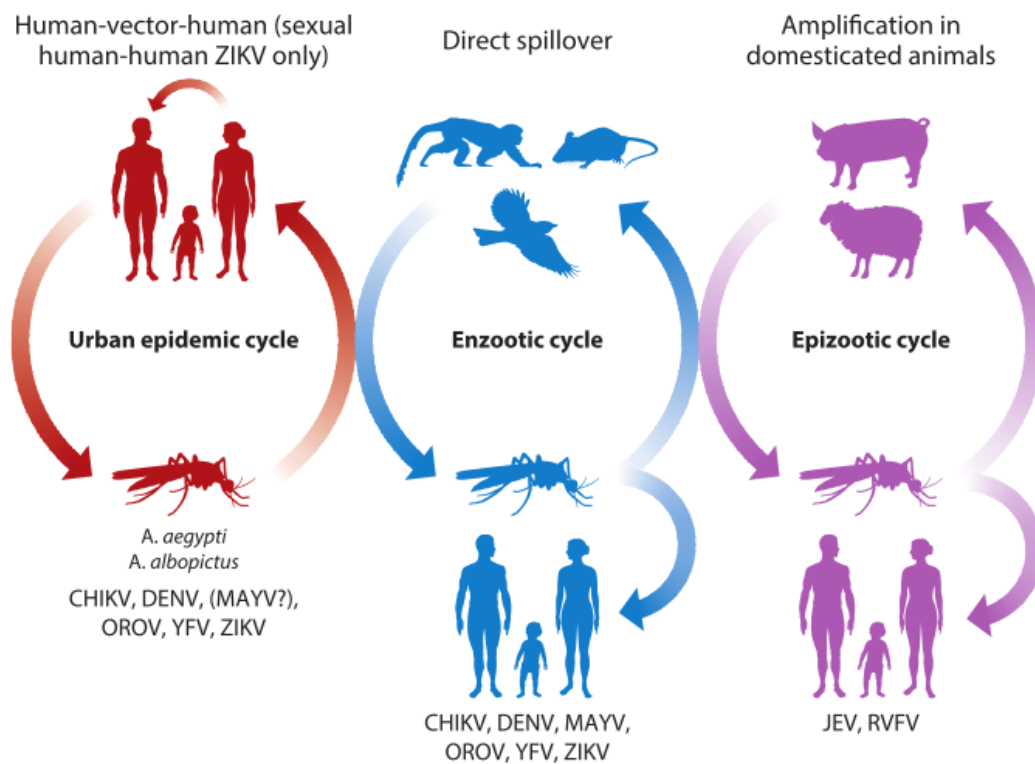
### MARCO TEÓRICO

#### 1.1. Aspectos Generales de lo Arbovirus.

En los últimos 20 años hemos sido testigos de cómo es que los virus humanos se han convertido en una verdadera amenaza para la salud y la vida, debido a factores como la posibilidad de tener mayor contacto con la vida silvestre, el aumento de viajes a lugares que antes parecía imposible llegar y el incremento del comercio mundial influyen para que éstas enfermedades emergentes aumenten exponencialmente<sup>3</sup>.

Los arbovirus han estado en la historia de la humanidad a lo largo de los años, en el año de 1881 el médico y científico Carlos Finlay propone que la fiebre amarilla (enfermedad causada por arbovirus) es transmitida por artrópodos y esta teoría es reafirmada en el año de 1901 por Walter Reed<sup>15</sup>.

Las arbovirosis cuentan con un ciclo de transmisión ancestral, teniendo tres diferentes tipos de mecanismos de infección: el directo, en el que se da una transmisión del artrópodo al humano; el de amplificación, en el que primero el virus es transmitido del artrópodo a un animal para luego por medio del artrópodo infectar al humano y por último el de transición, en el que pasa de un artrópodo a un humano se amplifica en este y luego mediante otro artrópodo se sigue transmitiendo a otros humanos, este ciclo es el que mayormente se da en las zonas urbanas, donde el contagio se ha hecho cada vez mayor<sup>16</sup>. En la actualidad las enfermedades producidas por los arbovirus como el DENV, ZIKV, CHIKV y OROV se conocen que son transmitidas por mosquitos vectores<sup>2, 15, 16</sup>, tal como se muestra en la figura 1.



**Figura 1.-** Mecanismos de transmisión para arbovirus. Todos usan como vectores a los mosquitos<sup>16</sup>.

Existen 5 especies en particular que son vectores de arbovirus, el DENV, ZIKV, y CHIKV son causados por la picadura de *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus* dependiendo de la región, y el OROV se transmite por la picadura del *Culex pipiens*. Para que ocurra la transmisión del virus al hospedero, las hembras fecundadas transmiten el virus a través de la saliva<sup>17</sup>. La saliva del mosquito o vector tiene efectos en varios procesos biológicos de los mamíferos, es este tipo de inoculación lo que ayuda a la replicación y diseminación de estos virus<sup>2</sup>.

Actualmente los arbovirus son la causa más común de la enfermedad febril humana en el mundo, convirtiéndose en un tema de preocupación debido a su re emergencia en los últimos años, especialmente en zonas tropicales, con temperaturas altas y bastante humedad<sup>17</sup>.

En un informe del Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (2014) se pronosticó que entre los años de 1990 y 2100 habrá un aumento de 1.1 a 6.4°C en la temperatura mundial, en donde se resaltó el efecto negativo que tendrá el aumento

de temperatura en las enfermedades infecciosas, especialmente en enfermedades transmitidas por vectores, afectando tanto la ecología de dichas enfermedades como su distribución y el número de casos. En particular las temperaturas altas pueden acortar la duración de la replicación del virus y aumentar la reproducción del mosquito<sup>18</sup>. En conclusión, las variaciones climáticas van a contribuir directa o indirectamente en la incidencia y distribución de los arbovirus

### 1.2. Síndrome febril.

Síndrome febril, también conocido como enfermedad febril aguda (AFI) es aquella fiebre que tiene una duración menor a una semana y que no cuenta con una fuente de origen identificada y en algunos casos están mal caracterizadas, debido a que no existe un diagnóstico preciso, por lo que no suele tener un tratamiento adecuado debido a la falta de información etiológica<sup>19</sup>.

A pesar de no ser reconocida como una enfermedad por la OMS es una de las mayores causas de ingreso hospitalario en las zonas endémicas teniendo una tasa de letalidad de 5% - 24%<sup>11</sup>.

### 1.3. Clasificación.

Los arbovirus causantes de los síndromes febriles son un grupo heterogéneo<sup>17</sup>, lo cual hace muy difícil su clasificación ya que no existen criterios muy claros para su agrupamiento, a pesar de esto se ha podido dar una clasificación, que ha tomado como criterios las descripciones de arquitectura genómica, así como las proteínas virales y las estrategias de replicación que diferencia a cada virus. Ésta agrupación comprende cinco familias virales: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae*, *Bunyaviridae* y *Reoviridae*<sup>20</sup>, la cual será considerada para este trabajo.

A pesar de esta clasificación la mayoría de arbovirus (84% aproximadamente) se distribuyen solo entre tres familias, *Togaviridae*, *Flaviviridae* y *Bunyaviridae*<sup>3</sup>, en las cuales se encuentran virus que han resurgido en los últimos años afectando cada vez más la vida del hombre.

### 1.3.1. Familia *Togaviridae*.

La familia *Togaviridae* está compuesta por virus que tienen un genoma ARN de cadena sencilla y con sentido positivo, no segmentado de aproximadamente 11.7 kb esta familia se ve integrada por dos géneros importantes: *Rubivirus* (*Rubeola Virus* (RV) y *Alphavirus*<sup>13</sup>. Siendo este último el más importante.

#### 1.3.1.1. *Alphavirus*.

La organización taxonómica originalmente se hizo a partir de las relaciones antigénicas resultado de las pruebas serológicas, lo cual significó la formación de siete complejos antigénicos basados en niveles de reactividad, pero en la actualidad se ha cambiado a pruebas más específicas en las que se realiza comparaciones de secuencias genómicas<sup>21</sup>.

Los *Alphavirus* pueden causar enfermedades agudas y febriles como encefalitis o artralgia en animales y /o en seres humanos, tales como la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV), Encefalitis Equina del Este (EEEV), Encefalitis Equina del Oeste (WEEV)<sup>22</sup>, el CHIKV, entre otros. Siendo este último uno de los más importantes. Este género se caracteriza por tener la capacidad de causar enfermedades neurológicas graves<sup>21</sup>.

##### 1.3.1.1.1. Virus Chikungunya.

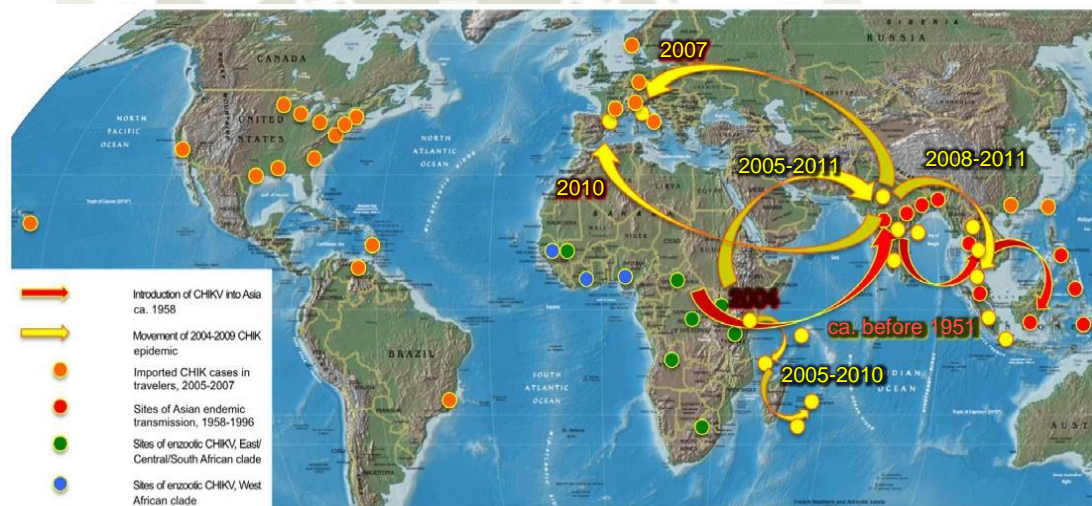
El CHIKV descrito por primera vez en 1952 por W. H. R. Lumsden<sup>15</sup>, tiene sus orígenes en África con primates no humanos<sup>16</sup>.

El nombre “Chikungunya” se deriva de una palabra en el idioma Kimakonde, que significa “llegar a ser retorcido” “doblarse”, y describe la apariencia encorvada de los pacientes con dolor en las articulaciones (artralgia). La enfermedad se presenta inicialmente en África, algunos afirman que fue descrito por primera vez durante un brote en el sur de Tanzania en 1953<sup>21</sup>.

Las primeras apariciones del CHIKV no han sido registradas, ya que en esos años se le llegó a confundir con el DENV, es así que en

1827 en Santo Tomas se vieron afectados unos observadores que presentaron síntomas como artralgia y una posterior discapacidad la cual fue atribuida al DENV pues no se había reportado la existencia del CHIKV<sup>23</sup>.

Este arbovirus causó epidemias en ciudades portuarias en el sudeste de Asia y en las Américas durante el siglo XVIII, así como apariciones esporádicas en Kenia en el año 2004, la India 2005, ingresando a Europa, Asia y América en el 2006, llegando a Italia y Francia en el 2007 y el 2010<sup>21</sup>, como se muestra en la figura 2.



**Figura 2.-** CHIKV distribución geográfica a lo largo de los años<sup>22</sup>.

En el 2013 se reportó por primera vez en San Martín (Caribe), es decir el hemisferio Occidental, posteriormente en el año 2015 se registró la presencia del CHIKV en 42 países del Caribe, América del Norte, América Central y América del Sur, teniendo alrededor de 1 094 661 casos sospechosos y 26 606 fueron confirmados<sup>23</sup>.

En la figura 3 se puede mostrar los países del continente americano con casos de CHIKV de transmisión autóctona y los que presentan casos importados.



**Figura 3.-** Mapa de los países con transmisión autóctona (color morado) o casos importados de CHIKV (color lila)<sup>24</sup>

El CHIKV es uno de los patógenos humanos con abrumadora morbilidad pero no es potencialmente mortal, a pesar de esto es considerado un importante problema de salud pública, ya que suele causar epidemias explosivas en zonas urbanas<sup>21</sup>.

La CF que es la enfermedad causada por el CHIKV, es una enfermedad tropical y altamente sintomática, similar a la artritis reumatoide, es decir con la presencia de una poliartralgia. También puede presentarse con manifestaciones neurológicas o hemorragias graves<sup>25</sup>.

Esta fiebre puede ser de tres tipos: aguda, subaguda y crónica; mayormente las complicaciones y casos graves se presenta en niños menores de 1 año, adultos mayores de 65 años y mujeres embarazadas<sup>10</sup>. En los casos crónicos

la persistencia de los síntomas puede ser desde meses a años, con una enorme carga de la enfermedad e incapacidad, es decir que puede originar artralgias crónicas y secuelas neurológicas<sup>21</sup>. En el caso del tratamiento, este sólo puede ser sintomático, es decir analgésicos, reposo y líquidos<sup>25</sup>.

### **1.3.2. Familia *Flaviviridae*.**

Los virus que conforman esta familia se han convertido en las principales causas de enfermedad y muerte en todo el mundo<sup>26</sup>.

La familia *Flaviviridae* se compone de tres géneros: *Hepacivirus* al que pertenece la especie de la hepatitis C, *Pestivirus* en el que se encuentra la especie de la diarrea viral bovina y el género *Flavivirus*, siendo el género más importante y más grande de esta familia<sup>26</sup>.

#### **1.3.2.1. *Flavivirus*.**

Son virus de una cadena de ARN positiva. Esta familia está formada por alrededor de más de 70 virus diferentes, los cuales son capaces de causar enfermedades graves y hasta mortales para los seres humanos. Incluye a especies como el virus del Nilo Occidental (VNO), virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus de la fiebre amarilla, el DENV y recientemente el ZIKV, siendo los más importantes los dos últimos ya mencionados debido al impacto en la salud y en el aspecto económico que han tenido en las últimas décadas. Esta familia tiene gran impacto en la salud pública, esto debido a su increíble potencial para emerger en zonas endémicas<sup>27</sup>.

En su mayoría el tratamiento es únicamente de apoyo es decir sintomático<sup>26</sup>.

A pesar de que existe vacunas para *Flavivirus* como la fiebre amarilla, encefalitis japonesa, entre otros, en casos como el DENV y el ZIKV, dos de los más importantes, no existe vacuna, por lo que no existe un control adecuado además los vectores y huéspedes variados hace que su distribución geográfica sea variada y extensa<sup>27</sup>.

#### 1.3.2.1.1. Dengue: “Veneno del agua”.

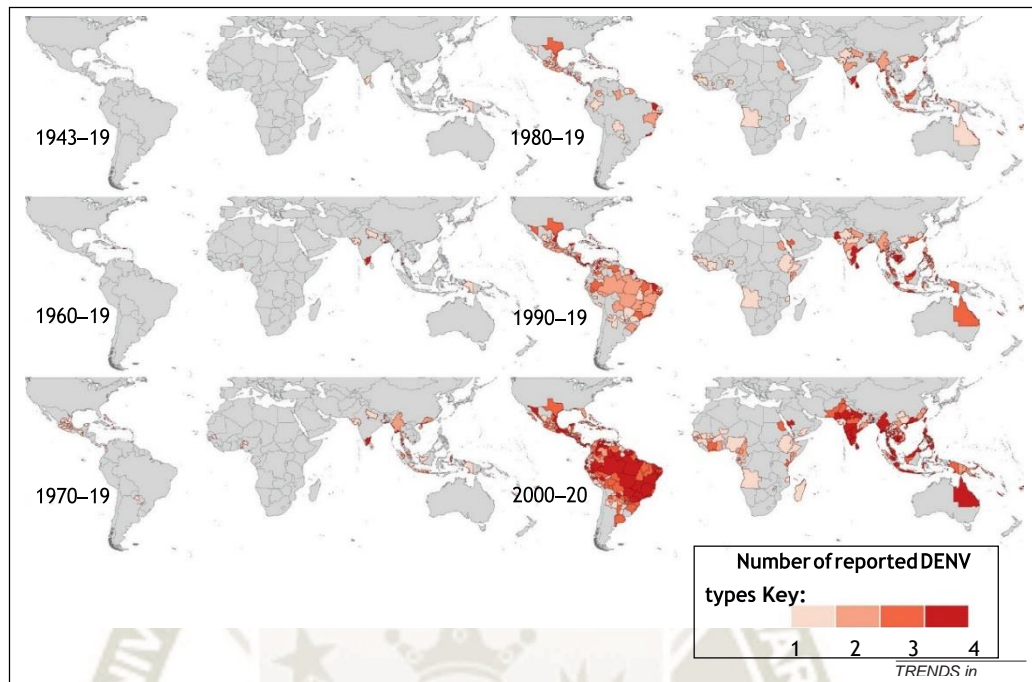
El DENV es una enfermedad viral sistémica aguda transmitida por mosquitos que se ha establecido a lo largo de los años en los ciclos epidémicos como endémica<sup>28</sup>.

A lo largo de la historia el DENV ha estado presente de manera activa, es así que se sospecha que su aparición se remonta a los años 265-420dC en la dinastía China, aunque el registro se dio recién en el año 992dC donde se le denomina a dicha infección como “Veneno del agua”, para este entonces ya se asociaba su transmisión con los insectos voladores. Posteriormente en el 1635 se manifiesta este arbovirus en las Indias Occidentales y en 1699 llega hasta el territorio de América Central, en 1780 se da una de las epidemias más importantes en Filadelfia, en 1800 se da una epidemia en las ciudades costeras tropicales urbanas, esto debido al aumento de buques y comercio, pero fue durante la Segunda Guerra Mundial que se expande<sup>29</sup>.

En 1943 en Japón se aisló el primer DENV y en 1945 en Hawái aislaron el segundo. Posteriormente se empieza a reportar epidemias, desde la India hasta las islas del Pacífico<sup>31</sup>.

Se han reportado a la fecha cuatro serotipos que son filogenética y antigénicamente diferentes (DENV1-4). El DENV1 se reportó por primera vez en 1943 en la Polinesia Francesa y en Japón como ya se mencionó anteriormente, de igual forma se confirma su presencia en 1944 y 1945 en Hawái, no llega al continente africano hasta el año de 1984 y a las Américas hasta 1977, haciéndose presente en el Perú desde 1980 a 1990. En el caso de serotipo DENV2 se da por primera vez en 1944 en Indonesia y Papúa Nueva Guinea, luego infecta en Filipinas a partir de 1954, se registró en África en el año 1964 y llegó al continente americano en 1953. El DENV3 se reportó por primera vez en 1953 en Filipinas y Tailandia, llegando a mediados de los 90's a China, Vietnam, Camboya y Singapur y al continente Americano en 1963 (Puerto Rico), de la misma forma el DENV4 aparece por primera vez en Filipinas y Tailandia en el mismo año que el DENV3, estableciéndose en 1981 en Brasil, Dominica, Puerto Rico e islas vírgenes de Estados

Unidos<sup>31</sup>. En la figura 4 se muestra el número acumulado de casos de DENV desde 1943 hasta el 2000.



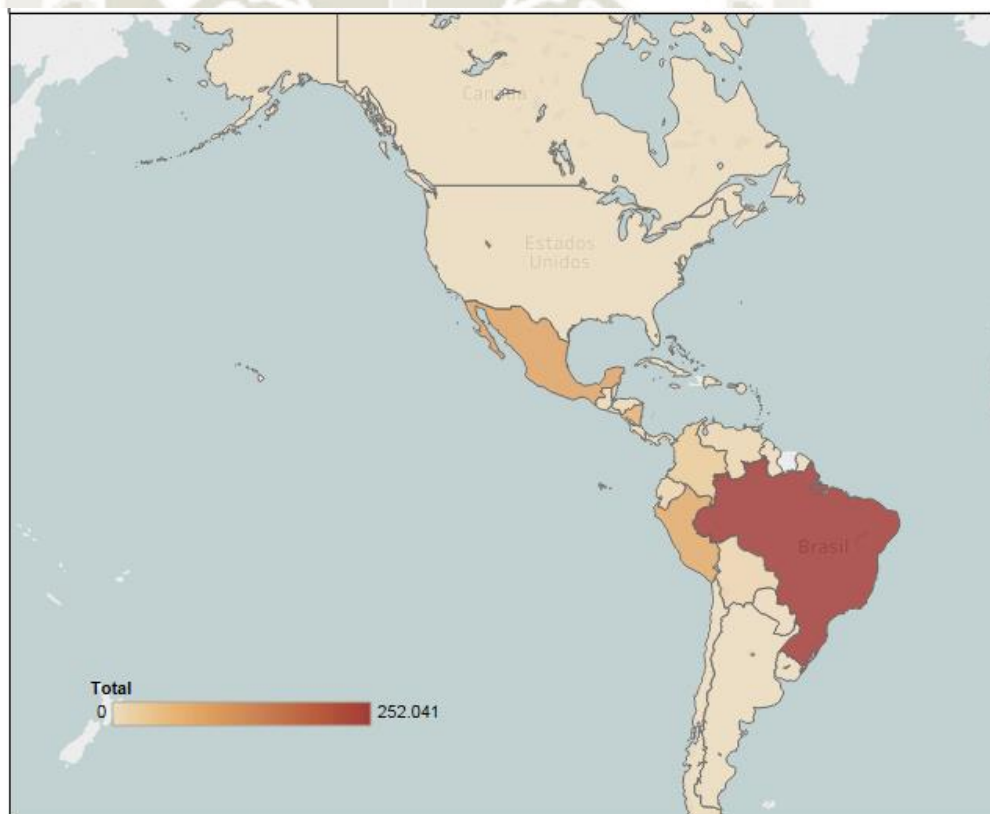
**Figura 4.-** Número acumulado de DENV desde 1943<sup>31</sup>.

En 1970 es cuando colapsa la campaña de erradicación del DENV, y se da una reintroducción de este arbovirus en América y Asia<sup>31</sup>. Por lo que en 1980 empieza a resurgir<sup>29</sup>.

El DENV es un problema creciente para la salud, solo en las Américas el costo anual es aproximadamente de 2 billones de dólares, lo cual afecta enormemente la economía de los países sobre todo los latinoamericanos. Esta infección ha aumentado debido al cambio climático, a la escasa disponibilidad de agua, al crecimiento de la población, las migraciones, la inadecuada disposición de residuos (neumáticos en desuso), entre otros<sup>32</sup>.

De igual manera es importante la detección temprana de este virus para lo que se hace uso de diferentes métodos ya sea el aislamiento en cultivo celular, la detección mediante PCR o antígenos durante los primeros 5 días, pasado esto se usa la detección de anticuerpos<sup>32</sup>.

En las últimas décadas los casos de DENV se han visto incrementados en por lo menos 30 veces más, solo en el continente americano entre los años 2003 al 2013 los casos de DENV se han quintuplicado, teniendo solo en el 2013 alrededor de 2.3 millones de casos dejando un saldo de 1 289 fallecidos. En el 2014 se informó de 1 173 248 casos con un total de 684 muertos, por lo que se puede asegurar que la tasa de letalidad se ha visto disminuida en los últimos años<sup>32</sup>, lo cual no significa que deje de existir una población vulnerable que se ve seriamente afectada con este virus, es así que entre los países que conforman las Américas que presentan una mayor letalidad se encuentra el Perú. En la figura 5 se presenta el número de casos reportados de DENV en el 2017.



El Perú es un país en el que el DENV se ha hecho presente durante mucho tiempo, es así que los primeros registros de la fiebre del DENV es en los años de 1700, 1818, 1850 y 1876, posteriormente no se tuvo manifestaciones hasta el siglo XX aproximadamente a partir del año 1984 debido a la falta de vigilancia luego

de la erradicación del mosquito *Aedes aegypti* en el año de 1956, se desencadenó una epidemia en el año de 1990 en las zonas amazónicas, y es a partir de este año que ingresan los 4 serotipos del DENV al país, el DENV1 en 1990, DENV2 en 1995, DENV3 en el 2001 y DENV4 en el 2008<sup>32</sup>.

Estos 4 serotipos con diferentes genotipos van a proporcionar una protección cruzada muy limitada, es decir por muy poco tiempo, por el contrario la infección previa de uno de los serotipos va a predisponer a las formas graves de DENV, siendo esto uno de los principales obstáculos para la elaboración de una vacuna contra el DENV, ya que al inducir a un proceso inmunológico no solo se va a provocar una protección, sino que se puede inducir a una infección de gravedad<sup>27</sup>.

En la última década el mayor número de casos de DENV se dio en el año 2015 con un total de 35 837 afectados<sup>34</sup>, y en el 2017 SE 05 ya tenemos alrededor de 2 151 casos entre confirmados y probables<sup>33</sup>, como se muestra en la tabla 1 al finalizar el 2017 ya se tenía 76 093 afectados.

**Tabla 1.-** Número de casos de DENV reportados en el Perú en los últimos cinco años<sup>34</sup>.

Pais	Código	2013	2015	2016	2017	2018	Total
Perú	604	13.771	35.837	31.868	76.093	4.134	161.703
<b>Total</b>		13.771	35.837	31.868	76.093	4.134	161.703

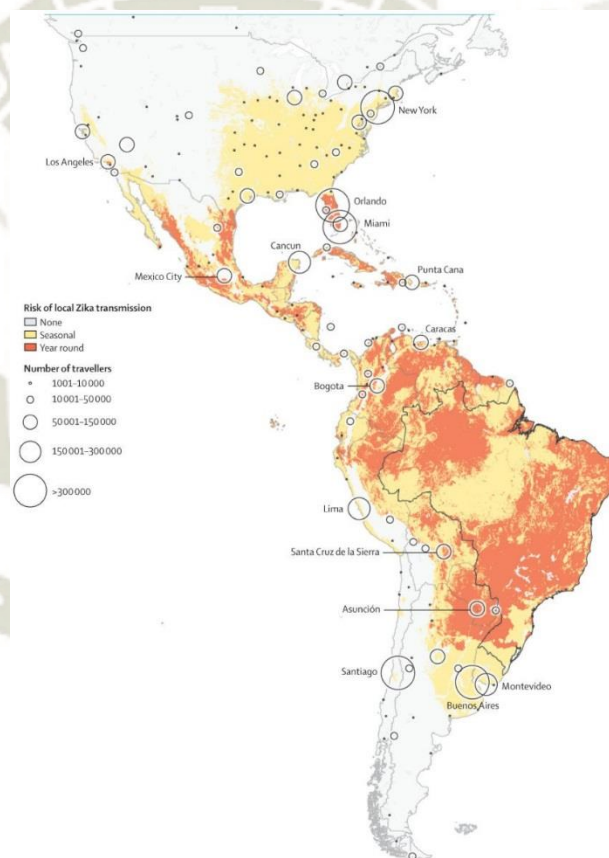
#### 1.3.2.1.2. Virus Zika.

Es un virus envuelto con cápside icosaédrica, y su genoma es ARN monocatenario positivo; su nombre proviene del bosque Zika en Uganda donde se aisló por primera vez el 18 de abril de 1947 de un mono Rhesus y a partir de ahí se han registrado en África, y Asia, por lo general como una enfermedad leve. En 1968 se aísla por primera vez de un humano en Nigeria, África. Existen dos linajes: el africano y el asiático<sup>10</sup>.

En el año 2007 se da el primer gran brote de la enfermedad causada por la infección ZIKV se informó en la isla de Yap (Micronesia), en donde al

menos el 61% era mujeres de 36 años, después de esto en el 2013 se da un brote en la Polinesia Francesa, en donde se registró 70 casos con complicaciones neurológicas<sup>10</sup>.

En el 2015 se confirma casos en Brasil, en este mismo año se informó de una asociación entre la infección por el ZIKV y el síndrome de la microcefalia, es así como se le empieza a relacionar con las anomalías neurológicas<sup>35</sup>. De igual forma se le empieza a relacionar con los casos de Guillain – Barré<sup>36</sup>. En la figura 6 se muestra algunos de los destinos que tomaron viajeros provenientes de Brasil en el 2016 luego de la aparición del ZIKV en este país.



**Figura 6.-** Destinos tomados por los viajeros provenientes de Brasil en el 2016, principales transportadores del ZIKV<sup>35</sup>.

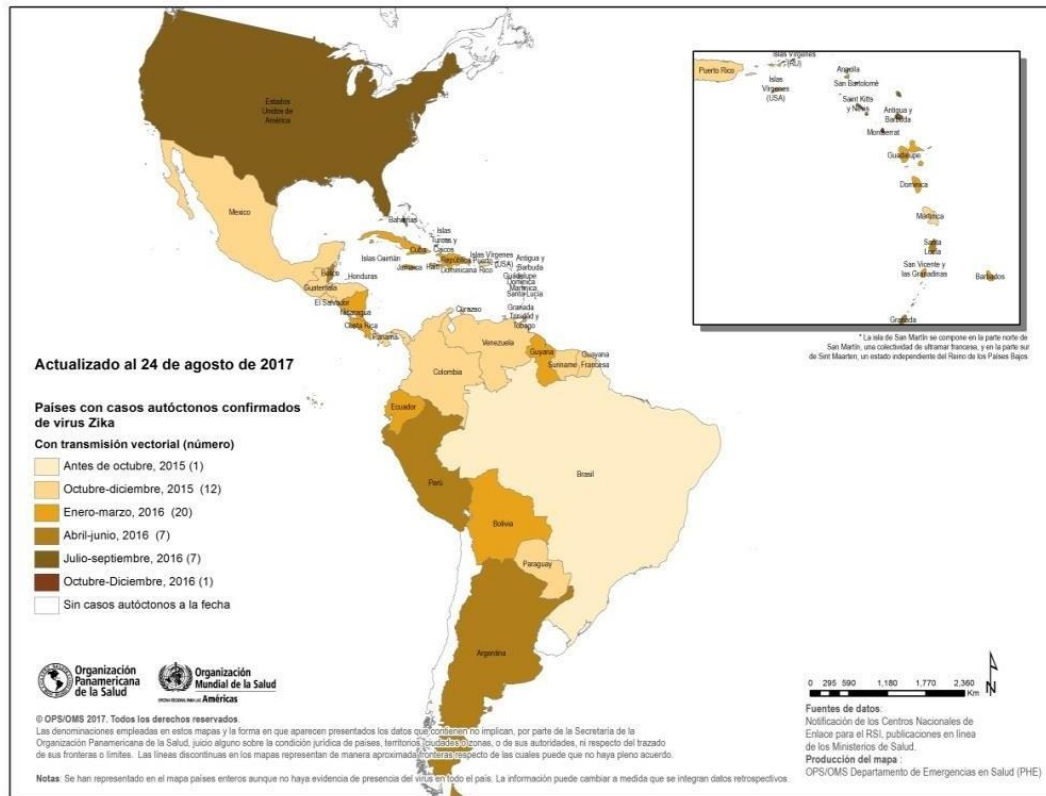
La actual cepa del ZIKV, ha afectado en primer lugar al país de Chile, la Isla de Pascua en el 2014, luego atacó a Brasil en el 2015 afectando a por

lo menos 14 estados y ahora en los últimos años ha seguido invadiendo numerosos países de las Américas<sup>10</sup>.

En la última actualización epidemiológica sobre el ZIKV en el 2016 se puede observar que hasta la SE 44 no se ha reportado ningún país/territorio nuevo de las Américas que haya confirmado la transmisión autóctona del ZIKV, pero si se mantuvo los 48 países ya antes reportados que reconfirmaron los casos autóctonos, ésta lista está conformada por: Anguila, Antigua y Barbuda, Argentina, Aruba, Barbados, Belice, Bolivia (Estado Plurinacional de), Bonaire, San Eustaquio, Saba; Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Curazao, Dominica, Ecuador, El Salvador, Estados Unidos de América, Granada, Guadalupe, Guatemala, Guayana Francesa, Guyana, Haití, Honduras, Jamaica, Martinica, México, Monserrat, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Puerto Rico, República Dominicana, San Bartolomé, San Martin, San Vicente y las Granadinas, Santa Lucía, Saint Kitts y Nevis, Sint Maarten, Suriname, Trinidad y Tobago, Islas Turcas y Caicos, Islas Vírgenes de los Estados Unidos, las Islas Vírgenes Británicas, Venezuela (República Bolivariana de) y Perú.

Por otro lado, se notificó cinco países en los que el ZIKV ha sido transmitido sexualmente: Argentina, Canadá, Chile, Estados Unidos de América y Perú. En Perú se observa un notorio aumento en el número de casos que se han ido notificando desde la SE 1 hasta la SE 3 del 2017.

En las últimas semanas se han confirmado casos de síndrome congénito asociado con la infección por el virus del ZIKV en países como México, Argentina, Colombia, los Estados Unidos de América, Guadalupe, Guatemala, Martinica y República Dominicana. Desde el 2016 no se ha notificado nuevos países con casos de Síndrome de Guillan-Barre asociado con la infección por el ZIKV<sup>37</sup>. En la figura 7 se muestra los casos autóctonos confirmados de ZIKV hasta el 2017.



**Figura 7.-** Casos autóctonos confirmados de ZIKV hasta el 10 de agosto del 2017<sup>37</sup>.

### 1.3.3. Familia *Rhabdoviridae*.

Esta familia se ha visto identificada tanto en plantas como en animales ya sean mamíferos, aves, reptiles o peces; esta familia incluye a especies conocidas como el virus de la rabia (RABV), el virus de la estomatitis vesicular Indiana (VSIV), entre otros<sup>38</sup>.

Cuenta con una cadena de ARN con sentido negativo. Esta familia esta a su vez dividida en 8 géneros: *Lyssavirus* (rabia), *Vesiculovirus* (estomatitis vesicular), *Perhabdovirus*, *Sigmavirus* (*Drosophila melanogaster*), *Ephemerovirus*, *Tibrovirus*, *Tupavirus* y *Sprivivirus*<sup>38</sup>.

### 1.3.4. Familia *Bunyaviridae*.

Esta familia posee un ARN monocatenario de sentido negativo y suele infectar tanto vertebrados como plantas. Los miembros de esta familia comparten muchas características moleculares en común, pero a pesar de esto se divide en cinco

géneros: *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Tospovirus* (fiebre amarilla), y *Orthobunyavirus*<sup>39</sup>, siendo el más importante este último.

#### 1.3.4.1. *Orthobunyavirus*.

Es un género que aproximadamente está constituido por alrededor de 50 virus de los cuales muchos son zoonóticos y son una amenaza para los seres humanos, como es el caso de la fiebre del Oropouche<sup>40</sup>.

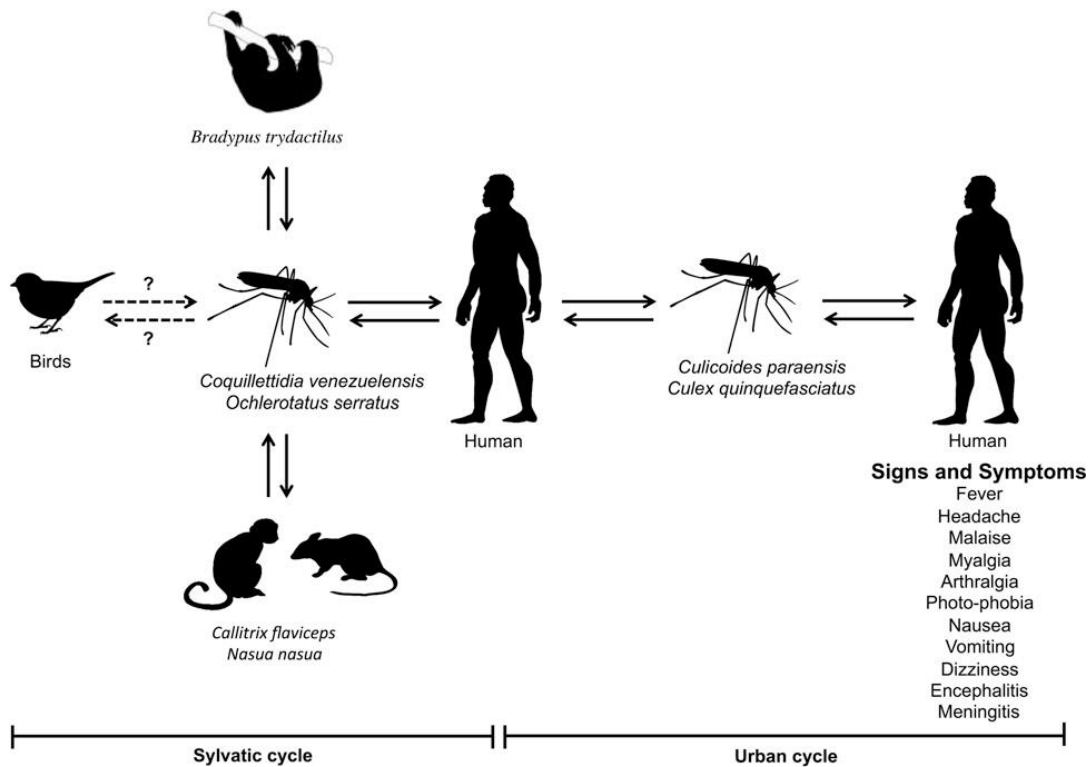
##### 1.3.4.1.1. La fiebre del Oropouche.

El nombre Oropouche proviene de la ciudad de Oropouche Vegas que está ubicada en una isla de Trinidad y Tobago, donde en el año de 1955 se da un caso de dicha fiebre, siendo aislado por primera vez el OROV tanto del paciente como de mosquitos *Coquilletidia venezuelensis*, luego de esta manifestación del virus, en 1960 es aislado por primera vez en Brasil a partir de la sangre de un perezoso por la zona de Belém-Brasilia, en 1961 es de nuevo identificado en la misma ciudad, convirtiéndose en una gran epidemia afectando a por lo menos 11 000 personas. Después de esto comienza a afectar a estados como Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondonia y Tocantins; y paso a manifestarse en otros países, en 1989 ingresa a Panamá, en 1992 llega al Perú, presentándose por primera vez en la ciudad de Iquitos que pertenece al departamento de Loreto; al parecer el virus llegó a través de la cuenca amazónica desde Brasil. El OROV es el agente causal de la fiebre del Oropouche<sup>41</sup>.

La fiebre del Oropouche es uno de los síndromes febriles más comunes en los últimos años, la frecuencia de estos brotes ha aumentado, convirtiéndose en una amenaza para la salud pública en el continente americano, sobre todo en la zona sur<sup>42</sup>.

Causando más de treinta epidemias en América Central y del Sur, así como más de medio millón de infectados en los últimos 40 años<sup>40</sup>.

A diferencia de los otros arbovirus ya mencionados, este no tiene como vector al mosquito *Aedes*, sino que usa como medio de transporte al *Culicoides paraensis*<sup>39</sup>, como se muestra en la figura 8.



**Figura 8.-** Ciclo de transmisión de OROV<sup>39</sup>.

Entre los síntomas que presenta la fiebre del Oropouche está: mialgia, artralgia, anorexia, mareos, escalofríos y fotofobia<sup>41</sup>.

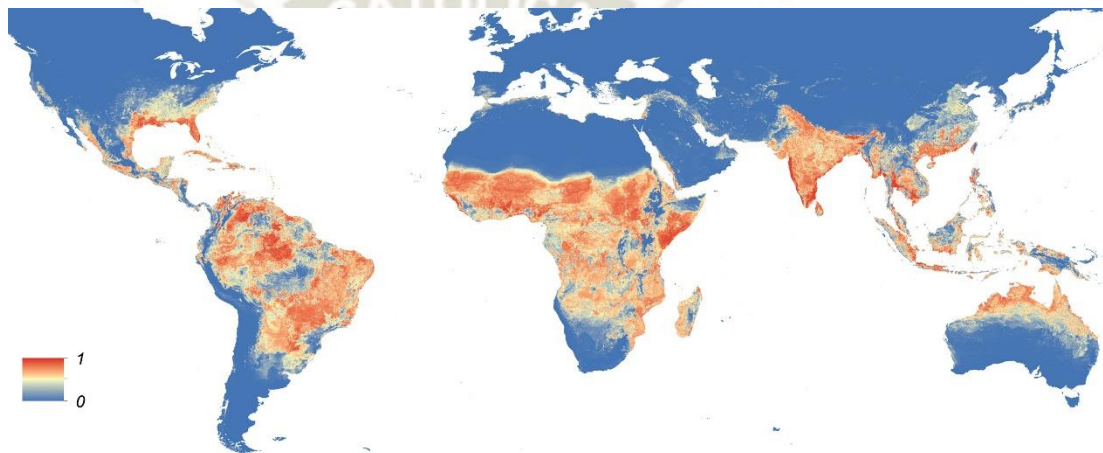
### 1.3.5. Familia Reoviridae.

Esta familia consta de alrededor de 15 géneros, los cuales se pueden agrupar en dos subfamilias *Sedoreovirinae* y *Spinareovirina*; estos virus afectan tanto a vertebrados como a invertebrados, plantas y hongos, entre los más conocidos géneros que conforma esta familia están: *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, y *Phytoreovirus*<sup>43</sup>.

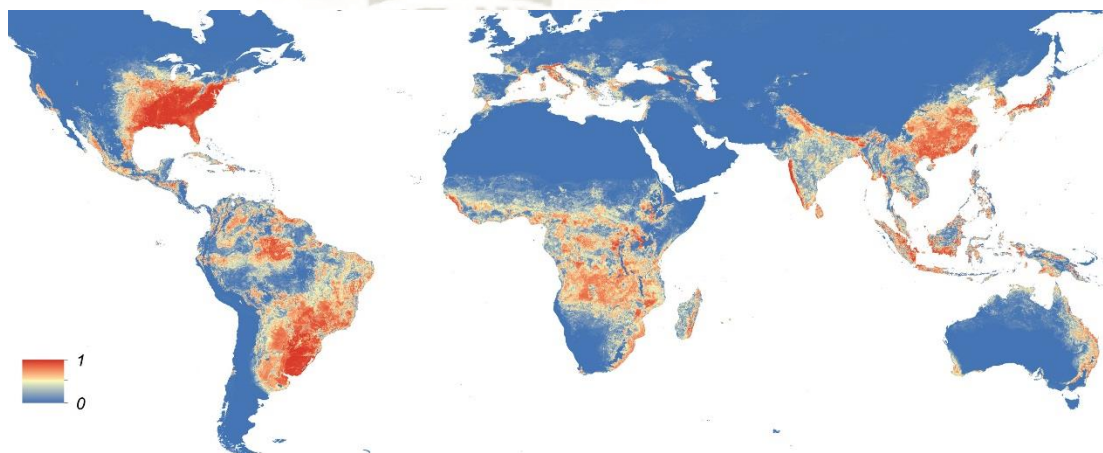
#### 1.4. Vectores de transmisión.

Los virus que ocasionan síndromes febriles como el Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche son transmitidos por distintos vectores.

Tanto el DENV, ZIKV y CHIKV tienen un vector en común, el mosquito *Aedes aegypti* o el *Aedes albopictus*, estos mosquitos también son vectores habituales de otras enfermedades como, por ejemplo, la fiebre amarilla<sup>10, 23, 29</sup>. En la figura 9 y la figura 10 se evidencia la distribución del *Aedes aegypti* y el *Aedes albopictus* hasta el 2015.



**Figura 9.-** Mapa de distribución del *Aedes aegypti*, de color azul donde no se registran casos y de color rojo donde hay casos<sup>44</sup>.



**Figura 10.-** Mapa de distribución del *Aedes albopictus*, de color azul donde no se registran casos y de color rojo donde hay casos<sup>44</sup>.

En el caso del OROV el vector que permite su expansión es el mosquito *Culicoides paraensis*<sup>41</sup>.

#### 1.4.1. *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

El *Aedes aegypti* tiene su origen en África de donde se extendió a regiones tropicales y subtropicales, en cambio el *Aedes albopictus* es originado en Asia, desde donde se propagó hacia las islas en los océanos Índicos y Pacíficos<sup>44</sup>.

Como se mencionó anteriormente el *Aedes aegypti* tiene sus raíces en África, teniendo como ancestro al *Aedes formosus*, debido a la trata de esclavos y al comercio es que este mosquito empieza a extenderse por todo el mundo. Posteriormente estas dos especies empiezan a difundirse a Europa, Estados Unidos y Brasil, en la actualidad están en casi todas las regiones de América<sup>44</sup>.

Tanto el DENV, ZIKV y CHIKV son transmitidos a los humanos por la picadura de una hembra infectiva *Aedes* mosquito, que adquiere principalmente el virus al alimentarse de la sangre de una persona infectada. Dentro del organismo del mosquito, el virus infecta el intestino medio y posteriormente se extiende a las glándulas salivales durante un período de 8-12 días. Después de este período de incubación, el virus puede ser transmitido a los seres humanos durante el posterior sondeo o de alimentación. Los estados inmaduros se encuentran en hábitats llenos de agua, sobre todo en recipientes artificiales estrechamente asociados a las viviendas humanas y, a menudo en el interior<sup>45</sup>.

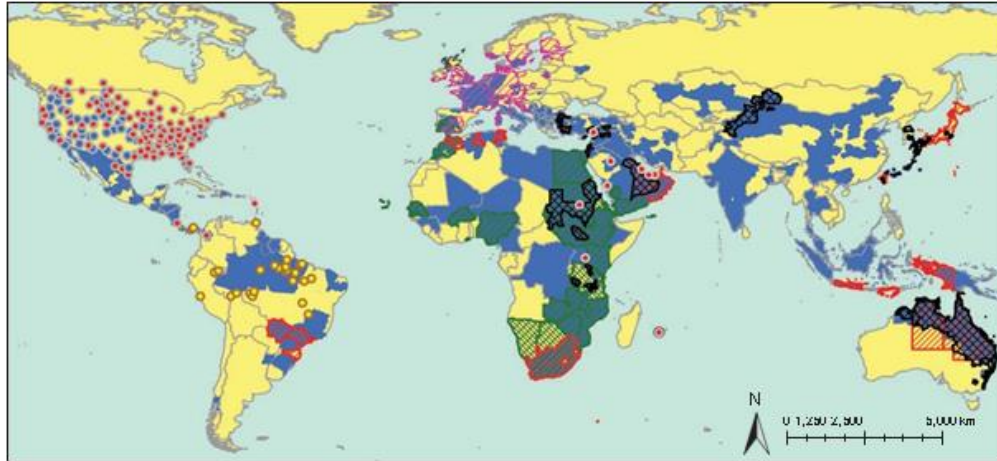
Esta invasión mundial de los arbovirus se debe en gran parte a la gran expansión que han conseguido sus vectores. En la tabla 2 se muestra los principales países del continente americano en los que se ha detectado la presencia de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

**Tabla 2.-** Los 10 principales países en ocurrencia en América para *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*<sup>44</sup>.

	<i>A. Aegypti</i>		<i>A. Albopictus</i>	
	País	Ocurrencias	País	Ocurrencias
América	Brasil	5 044	Brasil	3 441
	Estados Unidos	436	Estados Unidos	1 594
	Méjico	411	Méjico	50
	Cuba	177	Islas Caimán	15
	Argentina	170	Haití	13
	Trinidad y Tobago	152	Guatemala	12
	Venezuela	130	Venezuela	7
	Colombia	128	Colombia	3
	Puerto Rico	120	Cuba	3
	Perú	89	Puerto Rico	3

#### 1.4.2. *Culicoides paraensis*.

El OROV ha tomado mucha importancia en los últimos años, es transmitido mediante la picadura de un mosquito, *Culicoides paraensis*. Este vector está bastante extendido en áreas tropicales y subtropicales del continente americano como se puede observar en la figura 11. Sus larvas suelen alimentarse de materiales orgánicos en descomposición, tales como troncos de árboles, cascaras de frutas, entre otros<sup>41</sup>.



**Figura 11.-**Distribución de seis arbovirus transmitidos por *Culicoides*, incluido el OROV<sup>46</sup>.

OROV circula de forma natural en los bosques, y su transmisión ha sido relacionada con las prácticas agrícolas, que crean sitios de desarrollo de larvas y aumentan las tasas de contacto humano, lo que permite que el virus pueda ser introducido en áreas de habitación humana. El *Culicoides paraensis* es una especie diurna activa. La temperatura, la humedad, el viento y la lluvia afectan la supervivencia de los adultos y su actividad. Actualmente se ha visto que para su control se puede retirar los residuos de hojas de plátano, que le sirve como reservorio<sup>46</sup>.

### 1.5.Sintomatología.

Al ser el DENV, ZIKV, CHIKV y OROV virus que pertenecen a un mismo conjunto, tienen síntomas muy parecidos creando durante el diagnóstico clínico de los pacientes con AFI, por lo que las infecciones por síndromes febriles suelen no ser identificadas fácilmente<sup>41</sup>.

Los síntomas que caracterizan a un síndrome febril en general son: fiebre, exantema, mialgias, cefalea, artralgias sobre todo en manos y pies, conjuntivitis y en casos graves hemorragias y neuralgias<sup>23, 29, 41</sup>.

## 1.6.Epidemiología.

Los arbovirus causan enfermedades infecciosas ya sea en plantas o animales, pero en los últimos 70 años se han convertido en las infecciones más importantes y comunes que atacan a los seres humanos causando grandes pérdidas económicas, así como millones de casos de afectados, lo que da como resultado un desbalance en el sector salud. Los casos de arbovirosis han aumentado rápidamente sobre todo en las regiones endémicas, así como en zonas donde estos virus no existían o no estaban reportados por la carencia del diagnóstico.

Es así que uno de los países de Sudamérica que se ha visto significativamente afectado por la presencia de estos arbovirus es el Perú, teniendo en cuenta que nuestro país cuenta con una diversidad geográfica y climática variada que hace posible la propagación de los arbovirus<sup>47</sup>.

En los últimos años el DENV ha tenido un rápido crecimiento y expansión en muchas zonas nuevas del país, esto debido a las fuertes lluvias, las malas condiciones sanitarias, la mayor frecuencia de viajes, el aumento del comercio, entre otros. Piura, Lambayeque, La Libertad, Tumbes, Amazonas, Loreto, Madre de Dios y Ucayali son los departamentos más perjudicados por este arbovirus. Solo en el 2016 se presentaron en total 31 868 casos (entre confirmados y probables de los serotipos DENV1, DENV2 y DENV3), en el 2017 se dieron 76 093 casos (entre confirmados y probables de los serotipos DENV2 y DENV3) y en lo que va del año se han registrado alrededor de 4 134 casos probables de los serotipos DENV2 y DENV4<sup>34</sup>.

En el caso de ZIKV es un arbovirus que en tan solo unos años ha alcanzado su máximo apogeo, y es que desde que ingreso en el país este se ha visto amenazado por completo, siendo las más susceptibles las mujeres gestantes. En el 2016 se han registrado alrededor de 2 177 casos, llegando a tener una tasa de incidencia de 7 por cada 100 000 habitantes<sup>48</sup>. En el 2017 se registraron 6 498 casos y en este año hasta la SE 07 se tiene 441 casos entre confirmados y probables<sup>49</sup>.

En la tabla 3 se puede apreciar los arbovirus que afectan a los seres humanos, entre los cuales se encuentran el DENV, ZIKV, CHIKV y OROV, estudiados en esta investigación.

**Tabla 3.-** Arbovirosis que afectan a humanos<sup>47</sup>.

Virus	Familia	Vector	Hospedadores vertebrados	Distribución geográfica
<b>Chikungunya</b>	<b>Togaviridae</b>	<b>Mosquitos: Aedes and Culex spp.</b>	<b>Primates, birds, cattle, and rodents</b>	África, Asia, Europa, Américas, Oceanía
Mayaro	<i>Togaviridae</i>	Mosquitos: Haemagogus spp.	Primates, other mammals, birds	South and Central America
Ross River	<i>Togaviridae</i>	Mosquitos: Aedes and Culex spp.	Marsupials, other mammals, birds	Oceania and Asia
O'nyong-nyong	<i>Togaviridae</i>	Mosquitos: Anopheles spp.	?	Africa
Sindbis	<i>Togaviridae</i>	Mosquitos: Aedes, Culex, and Culiseta spp.	Birds	Europe, Africa, Oceania, Asia
Barmah Forest	<i>Togaviridae</i>	Mosquitos: Aedes and Culex spp.	Birds? Marsupials, Others?	Oceania
Eastern equine Encephalitis	<i>Togaviridae</i>	Mosquitos: Culiseta, Aedes, Coquillettida, and Culex spp.	Birds, horses, other mammals	Americas
Western equine Encephalitis	<i>Togaviridae</i>	Mosquitos: Culex, Aedes, Ochlerotatus, and Coquillettida spp.	Birds, horses, other mammals	Americas
Venezuelan equine Encephalitis	<i>Togaviridae</i>	Mosquitos: Culex, Ochlerotatus, Anopheles, Mansonia, Psorophora, Aedes spp. And Others	Horses, Rodents, Other mammals, Birds	Americas
<b>Dengue</b>	<b>Flaviviridae</b>	<b>Mosquitos: Aedes spp</b>	<b>Primates</b>	<b>Asia, Americas, Africa, Europe, Oceania</b>
Yellow Fever	<i>Flaviviridae</i>	Mosquitos: Aedes and Haemogogus spp.	Primates	South America, Africa
West Nile	<i>Flaviviridae</i>	Mosquitos: Culex spp	Birds, Horses, Other Mammals	Africa, Asia, Europe, Oceania, Americas
Japanese encephalitis	<i>Flaviviridae</i>	Mosquitos: Culex spp	Birds, Pigs	Asia, Oceania
Murray Valley encephalitis	<i>Flaviviridae</i>	Mosquitos: Culex spp	Birds	Oceania
<b>Zika virus</b>	<b>Flaviviridae</b>	<b>Mosquitos: Aedes spp</b>	<b>Primates</b>	<b>Africa, Asia, Oceania, Central and South America</b>
Rocio	<i>Flaviviridae</i>	Mosquitos: Psorophora and Aedes spp	Birds	South America
St. Louis encephalitis	<i>Flaviviridae</i>	Mosquitos: Culex spp	Birds, Bats, Other Mammals	Americas
Kyasanur Forest disease	<i>Flaviviridae</i>	Ticks: Hemaphysalis spp.	Primates, Rodents, Other Mammals	Asia

Omsk hemorrhagic fever	<i>Flaviviridae</i>	Ticks: Dermacentor and Ixodes spp  Mosquitoes:?	Rodents, Voles, Other Mammals	Europe
Tick-borne encephalitis	<i>Flaviviridae</i>	Ticks: Ixodes spp	Rodents, Goats, Sheep, Cows, Other Mammals, Birds?	Europe, Asia
Sandfly fever	<i>Bunyaviridae</i>	Sandflies: <i>Phlebotomus</i> spp.	Birds? Mammals?	Europe, Asia, Africa
Rift Valley fever	<i>Bunyaviridae</i>	Mosquitoes: Aedes, Ochlerotatus, Stegomyia, Anopheles, Culex, Neomelanicion, Eretmapodites and others	Cows, Sheep, Camels, Goats and Other Mammals	Africa, Asia
La Crosse encephalitis	<i>Bunyaviridae</i>	Mosquitoes: Aedes spp	Rodents	North America
Crimean-Congo hemorrhagic fever	<i>Bunyaviridae</i>	Ticks: <i>Hyalomma</i> spp	Cows, Sheep, Goats, Hares and Other Mammals	Europe, Asia, Africa
<b>Oropouche</b>	<b><i>Bunyaviridae</i></b>	<b>Midges: Culicoides sp</b>	<b>Primates? Sloths? Birds?</b>	<b>Central and South America</b>
Severe febrile Thrombocytopenia Syndrome	<i>Bunyaviridae</i>	Ticks: Haemaphysalis sp	?	Asia
Chandipura	<i>Rhabdoviridae</i>	Sandflies: <i>Phlebotomus</i> and <i>Sergentomyia</i> spp.	Hedgehogs, Others?	Asia and Africa
Bluetongue	<i>Reoviridae</i>	Midges: Culicoides spp	Sheep, Cows, Other Mammals	Africa, Asia, Europe, Oceania, Americas (all except Antarctica)

CHIKV es un caso similar, un arbovirus que apenas se conoce, el cual ha causado alertas sanitarias y ha seguido invadiendo departamentos como Tumbes y Piura<sup>50</sup>. En el 2016 se registraron alrededor de 1 126 casos, en el 2017 se calculó 1 383 casos todos entre confirmados y probables, y en lo que va del 2018 hasta la SE 13 se han tonificado 122 casos entre confirmados y probables<sup>51</sup>.

En el caso del OROV, no ha sido identificado como un virus mortal, más si sigue siendo el causante de muchos casos de infecciones<sup>52</sup>. Actualmente en el Perú no se encuentra un registro oficial de casos.

### 1.7. Técnicas de diagnóstico.

Para el diagnóstico de los arbovirus las técnicas que se utilizan son muy similares. En muchas de las investigaciones sobre arbovirus se usa la técnica bioquímica ELISA para la detección de IgM la cual identifica al virus a partir del tercer día de la enfermedad, y su presencia persiste durante 2 a 3 meses; en algunos casos como el DENV se hace uso de tiras rápidas. Otra de las técnicas que se ha usado es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas específicas de NS1, el cual ha servido de gran ayuda para la diferenciación de las infecciones primarias y secundarias del DENV, así mismo este tipo de ensayo permite la determinación de la enfermedad en la primera semana. En la tabla 4 se muestra la sensibilidad y especificidad de las pruebas de ELISAS, ya sea NS1, IgM o IgG para DENV<sup>53</sup>.

**Tabla 4.-** Detección de sensibilidad y especificidad en pruebas de ELISAS (NS1, IgM, IgG) para DENV<sup>53</sup>.

	Sensibilidad	Especificidad
NS1 ELISA	83.6%	97.8%
IgM ELISA	40.0%	97.8%
IgG ELISA	58.2%	55.6%

Sin embargo, en los últimos años se ha empezado a usar técnicas moleculares como: la técnica de PCR, el secuenciamiento de *microarrays* de ADN la cual utiliza sondas diseñadas para identificar ciertas secuencias virales, entre otras<sup>54</sup>. Estas técnicas al ser más sensibles y rápidas vienen desplazando a las pruebas bioquímicas.

## CAPÍTULO II

### 2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biología molecular del Centro de Investigación e Innovación de la Facultad de Ciencias de la Salud de Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC) en Chorrillos, y en el laboratorio de Biología molecular del Instituto de Investigación Nutricional (IIN) ubicado en La Molina.

#### 2.1.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

##### 2.1.2.1. Fuente de las muestras y/o unidades biológicas.

Las muestras de suero sanguíneo que fueron utilizadas en el estudio fueron recolectadas en coordinación con la Dirección Regional de Salud (DIRESA) de Piura, de diferentes pacientes con síntomas de síndrome febril de los centros médicos de la provincia de Morropón, departamento de Piura.

Luego fueron conservadas a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y transportadas al IIN, donde fueron procesadas.

#### 2.1.3. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

##### 2.2.2.1. Material biológico

- Muestras de suero sanguíneo

##### 2.2.2.2. Material de vidrio y plástico:

- Tubos de 1.5mL estériles.
- Micropipetas de diferente volumen: 10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L
- Puntas para Micropipetas de diferente volumen: 10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L
- Bolsas de bioseguridad.
- Cajas refrigeradas para tubos de 1.5mL.
- *Vacurette® TUBE Serum Separador Clot activador*

#### 2.2.2.3. Insumos y reactivos químicos.

- *Vacurette® TUBE Serum Separator Clot Activator.*
- *High Pure Viral RNA Kit* (Roche Life Science, Mannheim, Alemania).
- *First Strand cDNA Synthesis* (Roche Life Science, Mannheim, Alemania).
- *RealTime ready RNA Virus Master* (Roche Life Science, Mannheim, Alemania).
- Cebadores.
- Agarosa.
- Tris, Acetato y EDTA 1X.

#### 2.2.2.4. Equipos e instrumentos

- Cabina de bioseguridad II.
- Cabina de seguridad *AirClean® Systems AC600 Series PCR Workstations*
- Termobloque *VWR Scientific*
- Centrífuga *Sigma 1-14K*
- Termociclador convencional *Biometra T-Personal 48 Thermocycler*
- Termociclador tiempo real *Light Cycler® 2.0*

- Cámara de electroforesis *PowerPac™ Basic Power Supply*
- Fuente de poder *PowerPac™ Basic Power Supply*
- Sistema documentador *Transiluminador UV, MUV series Major Science*
- *Vortex VWR Scientific*
- Autoclave *JSR Autoclave Sterilizer 45L*
- Refrigeradora *DAEWOO*
- Congeladora a  $-80^{\circ}\text{C}$
- Cámara fotográfica *Sony*.

#### 2.2.2.5. Otros materiales

- Agua destilada.
- Alcohol 96%
- Hipoclorito de sodio 10%
- Guardapolvos
- Bata quirúrgica estéril
- Guantes quirúrgicos
- Mascarillas
- Gorros
- Cubre zapatos
- Cajas de tecnopor
- Gel pack tippic (refrigerante)

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. Estandarización molecular de la PCR para detección Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en el laboratorio.

Se uso como controles positivos de DENV, ZIKV, CHIKV y OROV ARN viral procedente del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC): virus ZIKV cepa PRVABC59, virus CHIKV cepa R80422a, para el virus DENV se utilizaron ya combinación de las cepas DENV -1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4

#### a. Extracción de ARN de los controles positivos CDC

La extracción de ARN se realizó a partir de 200 $\mu$ L de los controles positivos con el *kit High Pure Viral RNA* (Roche Life Science, Mannheim, Alemania).

Como paso previo se incubó 200 $\mu$ L del tampón de elución a 72°C, el cual será utilizado en la última fase de la extracción. Luego se agregó 250 $\mu$ L de la solución “A” (cuya composición está especificada en la tabla 5), esto con el propósito de lisar el virus y degradar las proteínas que se encuentren unidas al ARN.

**Tabla 5.-** Composición de la solución “A”.

Solución “A”	
Componentes	Volumen ( $\mu$ L)
Solución reguladora de unión	200.0
Poly A	4.0
Proteinasa K	50.0

Se mezcló en vortex y luego se incubó durante 10 minutos a 72°C para favorecer la lisis, como se muestra en la figura 12.



**Figura 12.-** Incubación de muestras y la solución reguladora de unión a 72°C.

Posteriormente se adicionó 100 $\mu$ L de solución reguladora de unión y se mezcló por inversión, este reactivo se va a encargar de proveer un pH adecuado para que el ARN pueda quedar atrapado a la membrana, ya que esto solo se da en presencia de alta concentración de sales, después se armó una columna con filtro (membrana en la que quedará atrapada el ARN), se colocó la muestra y se centrifugó por 1 minuto a 8000 g.

Después se descartó el tubo colector, se agregó 500 $\mu$ L de tampón de eliminación de inhibidores y se centrifugó por 1 minuto a 8000 g, el tampón de eliminación de inhibidores tiene como propósito eliminar los inhibidores, deshaciéndose de los contaminantes que puedan interferir en la PCR.

Se descartó el tubo colector y se adicionó 450 $\mu$ L de tampón de lavado, se centrifugó por 1 minuto a 8000 g, se descartó el tubo colector y se agregó 450 $\mu$ L de tampón de lavado se volvió a centrifugar por 1 minuto a 8000 g e inmediatamente se centrifugó por 10 segundos a 13000 g. El tampón de lavado es previamente preparado con etanol y tiene la capacidad de remover las sales, impurezas o residuos que no se hayan adherido a la membrana y puedan estar fluyendo a través de la columna interfiriendo en las futuras reacciones.

Por último, se descartó el tubo colector, se rotuló un Eppendorf y se colocó la columna, se agregó 100 $\mu$ L de tampón de elución, se incubó por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 minuto a 8000 g, se repitió el

procedimiento una vez más y se guardó la muestra a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El tampón de elución va a desprender el ARN de la membrana de sílica, permitiendo que los ácidos nucleicos atraviesen la membrana durante la centrifugación, siendo recuperados para su posterior uso.

Posterior a la extracción se realizó una evaluación de la concentración y la pureza del ARN de las muestras extraídas con un espectrofotómetro UV /VIS, usando una absorbancia de 260 nm en la que se puede medir la concentración específica de los ácidos nucleidos y las absorbancias de 280 nm y 230 nm donde se midió la absorbancia de las proteínas y de fondo, lo que nos indicó la presencia de posibles contaminantes

#### **b. PCR tiempo real para la de detección de DENV, ZIKV y CHIKV de los controles positivos del CDC**

Se usó el kit *Real Time Ready RNA Virus Master* (Roche Life Science, Mannheim, Alemania). Se preparó un mix con un volumen final de  $15\mu\text{L}$  como se muestra en la tabla 6, luego se agregó  $5\mu\text{L}$  de ARN ya extraído.

**Tabla 6.-** Mix usada para la amplificación por ensayo de RT-PCR para DENV, ZIKV y CHIKV.

RT-PCR Mix	
Componentes	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Enzima Virus Master	0.4
Buffer	4.0
Cebador F	1.0
Cebador R	1.0
Sonda	1.0
Agua libre de ARNsas	7.6
ARN	5.0
<b>Volumen Final</b>	<b>20.0</b>

Por último, se llevó al termociclador Light Cycler ® 2.0 y se dio las condiciones necesarias según el arbovirus que se detectó como se muestra en la figura 13, siendo la principal variable la temperatura de hibridación, la cual va depender de la temperatura Melting de los cebadores con los que se trabaje en cada uno de los casos, las condiciones se encuentran especificadas en la tabla 7, tabla 8 y tabla 9, para el caso de DENV, ZIKV y CHIKV, según corresponde.



**Figura 13.-** Programación del termociclador Light Cycler ® 2.0.

**Tabla 7.-** Programación y condiciones para la ampliación de DENV.

RT-PCR para DENV			
Etapas de la RT-PCR	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	1	55°C	8 minutos
Desnaturalización	1	95°C	30 segundos
Amplificación	45	95°C	1 segundo
		55°C	20 segundos
		72°C	1 segundo
Enfriamiento	1	4°C	30 segundos

**Tabla 8.-** Programación y condiciones para la ampliación de ZIKV.

RT-PCR para ZIKV			
Etapas de la RT-PCR	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	1	55°C	8 minutos
Desnaturalización	1	95°C	30 segundos
Amplificación	60	95°C	1 segundo
		55°C	20 segundos
		72°C	1 segundo
Enfriamiento	1	4°C	30 segundos

**Tabla 9.-** Programación y condiciones para la ampliación de CHIKV.

RT-PCR para CHIKV			
Etapas de la RT-PCR	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	1	55°C	8 minutos
Desnaturalización	1	95°C	30 segundos
Amplificación	60	95°C	1 segundo
		57°C	20 segundos
		72°C	1 segundo
Enfriamiento	1	4°C	30 segundos

A continuación, en la tabla 10 se puede apreciar los cebadores y las sondas con las que se trabajó en cada uno de los casos, así mismo se indica la secuencia que se utilizó, el tamaño del amplicón y la referencia de donde se obtuvo dichos cebadores.

**Tabla 10.-** Cebadores y sondas utilizadas para el proceso de amplificación.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Amplificación (pb)	Referencia
DENV-F	5'-AGG ACY AGA GGT TAG AGG AGA -3'	107	Leparc-Goffart et al., 2009
DENV-R	5'- CGY TCT GTG CCT GGA WTG AT - 3'		
DENV-Sonda	5'-FAM-ACA GCA TAT TGA CGC TGG GAR AGA CC-TAMRA-3'		
CHIKV-F	5'- AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA G -3'	209	Pastorino et al., 2005.
CHIKV-R	5'- CCA AAT TGT CCY GGT CTT CCT - 3'		
CHIK-Sonda	5'-FAM-CCA ATG TCY TCM GCC TGG ACA CCT TT-TAMRA-3'		
ZIKV-F	5'- AAR TAC ACA TAC CAR AAC AAA GTG GT - 3'	109	Faye et al., 2013.
ZIKV-R	5'- TCC RCT CCC YCT YTG GTC TTG-3'		
ZIKV-Sonda	5'- FAM-CTYAGACCAGCTGAAR-TAMRA-3'		
BS-S	5'- GTG GGG TCC AAT TTG C - 3'	300	Moreli et al., 2002.
BS-C	5'- TGA ACC CTA TGC ATC T - 3'		

Los cebadores con los que se trabajó fueron extraídos de la bibliografía mencionada en la tabla 10, como se muestra en dicha tabla las secuencias utilizadas para los casos de DENV, ZIKV y CHIKV corresponden a cebadores degenerados esto debido a la diversificación de las bases, es decir que en estos cebadores están incluidas degeneraciones en aquellas bases puntuales que presentan

un mayor grado de variabilidad o solo conocemos la secuencia de aminoácidos, con el único objetivo de poder identificar las posibles mutaciones o variaciones de estos virus.

En la tabla 11 se puede apreciar cómo es que variaron las condiciones al momento de realizar la estandarización.

**Tabla 11.-** Comparación de las condiciones usadas para los cebadores en la bibliografía de las que fueron extraídos y durante la estandarización

Cebadores	Condiciones estandarizadas	Condiciones de bibliografía
<b>DENV</b>	Transcriptasa reversa: 55°C por 8 minutos, desnaturalización: 95°C por 30 segundos, amplificación: 45 ciclos de 95°C por 1 segundo, 55°C por 20 segundos y 72°C por 1 segundo; enfriamiento: 4°C por 30 segundos	No menciona
<b>ZIKAV</b>	Transcripción reversa: 55°C por 8 minutos, desnaturalización: 95°C por 30 segundos, amplificación: 60 ciclos de 95°C por 1 segundo, 55°C por 20 segundos, 72°C por 1 segundo; enfriamiento: 4°C por 30 segundos	Transcriptasa reversa: 50°C por 10 minutos, desnaturalización: 95°C por 15 minutos, amplificación: 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto
<b>CHIKV</b>	Transcriptasa reversa: 55°C por 8 minutos, desnaturalización: 95°C por 30 segundos, amplificación: 60 ciclos de 95°C por 1 segundo, 57°C por 20 segundos, 72°C por 1 segundo; enfriamiento: 4°C por 30 segundos	Transcripción reversa a 50 ° C durante 20 min, desnaturalización inicial a 95 ° C durante 2 min y 45 ciclos con 95 ° C por 5 s, 60 ° C por 1 min
<b>OROV</b>	Desnaturalización: 95°C por 5 minutos, amplificación: 45 ciclos de 95°C por 1 minuto, 45°C por 45	Amplificación: 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, 55°C por 60 segundos, 72°C por 60

	segundos, 72°C por 45 segundos, enfriamiento: 72°C por 10 minutos	segundos, enfriamiento: 72°C por 5 minutos
--	----------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------

**c. PCR convencional para la detección de OROV con controles positivos.**

**Paso de ARN a ADNc**

Se preparó una primera mix con el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche Life Science, Mannheim, Alemania) con un volumen final de 4µL, al cual se le agregó 2.5µL de ARN, como se muestra en la tabla 12 y se incubó por 10 minutos a 65°C.

**Tabla 12.-** Primera mix para el paso de ARN a ADNc.

1° Mix	
Componentes	Volumen (µL)
Cebador ARN	1.0
Agua libre de ARNasa	3.0
ARN	2.5
Volumen final	6.5

Después de esto se preparó una segunda mix como se puede ver en la tabla 13 de un volumen final de 3.5µL y se mezcló con los 6.5µL de la 1° Mix, se llevó al termobloque donde se programó los tiempos y las temperaturas pertinentes, mostradas en la tabla 14.

**Tabla 13.-** Segunda mix para el paso de ARN a ADNc.

2° Mix	
Componentes	Volumen (µL)

Buffer	2.0
Inhibidor de ARNasa	0.25
DNTPs	1.0
Transcriptor Reverse Transcriptasa	0.25
1° Mix	6.5
Volumen final	10.0

**Tabla 14.-** Programación utilizada para el paso de ARN a ADNc.

Programación de ARN a ADNc	
Temperatura	Tiempo
25°C	10 minutos
55°C	30 minutos
85°C	5 Minutos

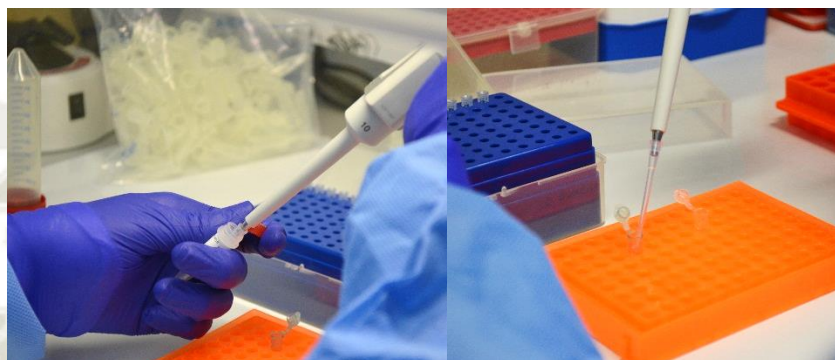
#### **Amplificación por ensayo de PCR convencional**

Se preparó un mix usando la enzima *KAPA Taq Ready Mix* (2x) con un volumen final de 17  $\mu$ L como se puede ver en la tabla 15, para luego agregarle 3  $\mu$ L de ADNc y completar un volumen final de 20  $\mu$ L.

**Tabla 15.-** Mix usada para la amplificación por ensayo de PCR para OROV.

PCR mix	
Componentes	Ml
Enzima KAPA Taq Ready Mix	10.0
Cebador R	0.8
Cebador F	0.8
Agua libre de ARNasa	5.4
ADNc	3.0
Volumen final	20.0

La preparación de la mix se realizó en una cabina como se puede ver en la figura 14, mientras que el ADNc se agregó en el área de repartición de muestras.



**Figura 14.-** Preparación de mix para PCR convencional y repartición de 17 $\mu$ L en cada tubo, listo para agregar 3.0 $\mu$ L de ADNc

Luego se colocó la mix en el termociclador con la programación mostrada en la tabla 16.

**Tabla 16.-**Programación y condiciones para la amplificación de OROV.

RT-PCR para OROV			
Etapas de la RT-PCR	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1	95°C	5 minutos
Amplificación	45	95°C	1 minuto
		45°C	45 segundos
		72°C	45 segundos
Enfriamiento	1	72°C	10 minutos

Los cebadores usados se muestran en la tabla 10.

### Elaboración del gel de agarosa y electroforesis.

Para preparar el gel se pesó 1.5 g de agarosa, luego disolvió en 100mL de Tris, Acetato y EDTA (1X), se calentó un poco, para lograr una mezcla homogénea, se agregó 6  $\mu$ L de Bromuro de Etidio, como se muestra en la figura 15, se colocó en la cubeta y finalmente se puso el peine. Cuando el gel se ha polimerizado se sumergió en TAE y se cargó las muestras, finalmente se dejó correr durante 60 minutos a 110V.



**Figura 15.-** Peso del agar y medición del Tris, Acetato y EDTA 1X (TAE), para la preparación del gel de agarosa al 1.5%.

**2.2.2. Detectar la presencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en muestras de suero de pacientes con síndrome febril mediante la técnica de PCR.**

**a. Pacientes y muestreo**

**Lugar de toma de muestra**

Se diseñó un estudio transversal descriptivo usando muestras de conveniencia. La toma de muestras y la recolección de datos se realizó en coordinación con los establecimientos de salud por el personal autorizado y previamente capacitado, haciendo el llenado de las fichas de datos epidemiológicos. El estudio fue realizado en el departamento de Piura en colaboración con la Dirección

Regional de Salud de Piura – Red de Salud Morropón – Chulucanas entre los meses de mayo y agosto de 2016.

### **Criterios de inclusión**

Pacientes que asistieron al establecimiento de salud con síndrome febril agudo, temperatura axilar superior o igual a 38°C en un periodo menor a 7 días; junto con uno o más de los siguientes síntomas: escalofríos, dolor de cabeza, mareos, tos, dolor de garganta, náuseas y/o vómitos, pérdida de apetito, dolor de espalda, disuria, mialgias, artralgias, dolor retro-ocular, erupción cutánea, melena, hemorragia nasal, sangrado de encías, petequias, equimosis, esputo teñido de sangre, dolor abdominal, dolor de pecho, fatiga y estado mental alterado.

Así mismo para el procesamiento de las muestras se consideró todas las que tenían una ficha de datos completa y el consentimiento informado firmado por el paciente, en caso de menores de edad firmado por los padres o apoderados (anexo 01).

### **Criterios de Exclusión**

Pacientes con muestras conservadas de manera inadecuada, sin ficha de datos o incompleta y/o muestras sin hojas de consentimiento informado. No fueron excluidas ninguna de las muestras.

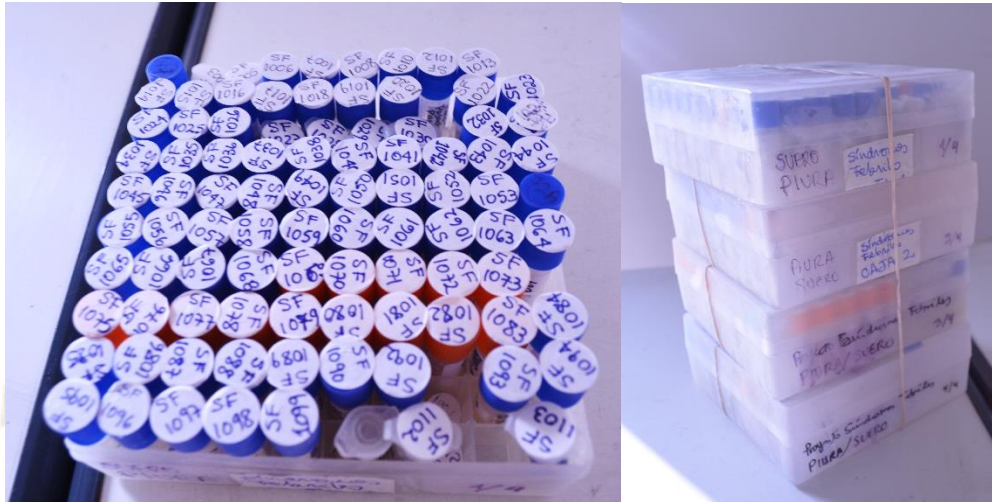
### **Declaración de ética**

El estudio fue aprobado por la Junta de Ética en Investigación del Hospital Regional de Cajamarca, Perú (Anexo 02)

### **Recolección de muestras de síndrome febril**

Se recolectaron 214 muestras de suero mediante el uso de *Vacurette® TUBE Serum Separator Clot Activator* (Vacurette, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), fueron transportadas al laboratorio de biología molecular en el IIN y todas fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Su transporte se realizó en cajas de tecnopor junto con paquetes de gel refrigerante, buscando mantener

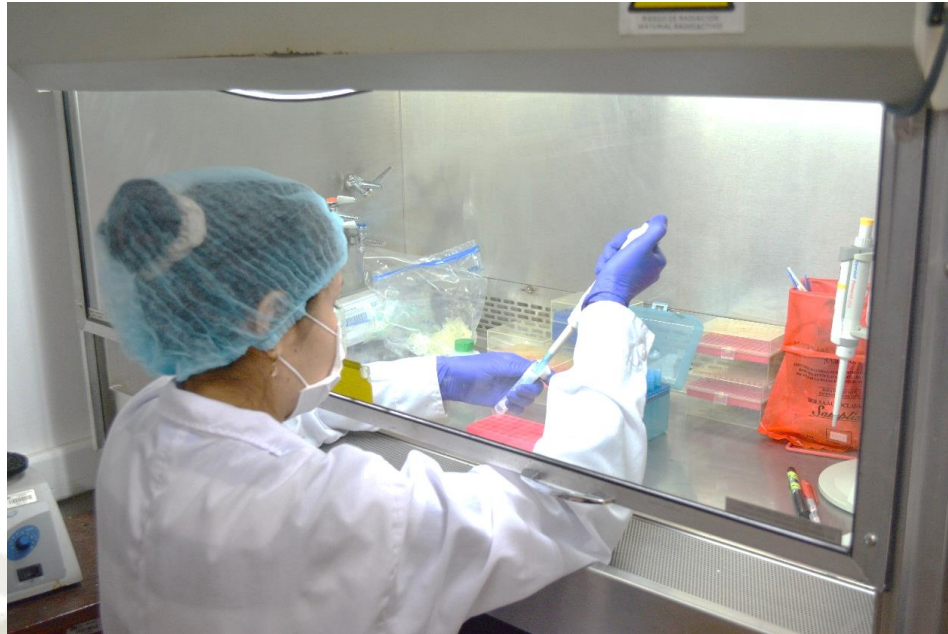
las muestras a una temperatura adecuada para su conservación. En la figura 16 se puede apreciar la codificación y el orden en que se almacenaron las muestras a utilizar.



**Figura 16.-** Muestras de pacientes con síndromes febriles provenientes de Piura, recolectadas en colaboración con la Dirección Regional de Salud de Piura – Red de Salud Morropón – Chulucanas entre los meses de mayo y agosto de 2016.

#### **b. Extracción de ácidos nucleicos de muestras de síndrome febril**

La extracción de ARN se realizó a partir de 200  $\mu$ L de las muestras de suero con el kit *High Pure Viral RNA* (Roche Life Science, Mannheim, Alemania), como se muestra en la figura 13 se realiza una alícuota de la muestra para poder procesarla, lo que resta de suero se procede a almacenarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para su conservación.



**Figura 17.-** Alícuota de muestra de suero y preparación de la solución “A”

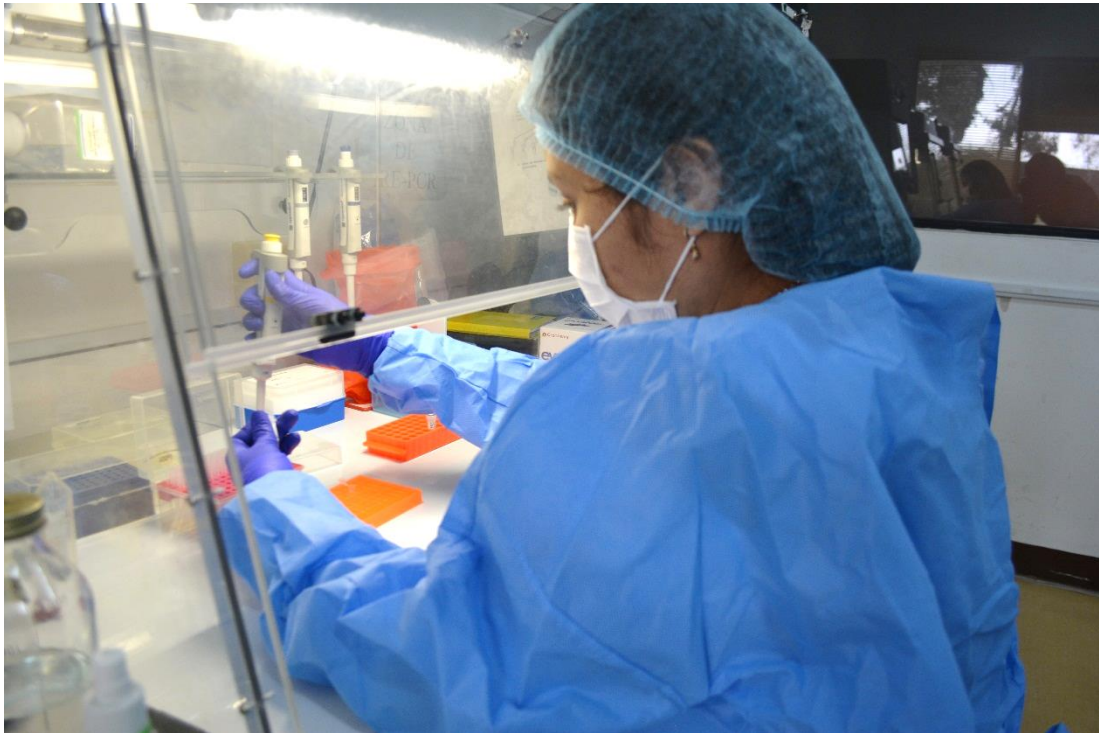
Posteriormente se realizó el mismo procedimiento que fue utilizado para la extracción de ácidos nucleicos de los controles positivos del CDC.

Por último, se procedió a verificar mediante espectrofotometría la calidad del ARN obtenido, respectivamente. Las lecturas se realizaron con un espectrofotómetro UV /VIS, usando una absorbancia de 260 nm en la que se puede medir la concentración específica de los ácidos nucleidos y las absorbancias de 280 nm y 230 nm donde se midió la absorbancia de las proteínas y de fondo, lo que nos indicó la presencia de posibles contaminantes

### **c. PCR a tiempo real para la detección de DENV, ZIKV y CHIKV.**

Para la detección de estos tres arbovirus se hizo uso de la técnica de RT-PCR en tiempo real, para lo cual se usó el kit *Real Time Ready RNA Virus Master* (Roche Life Science, Mannheim, Alemania). Usando la misma metodología que en el caso de los controles positivos del CDC.

Para la preparación de la mix con un volumen final de 15  $\mu\text{L}$  se hizo uso de una cabina de seguridad para evitar una posible contaminación como se observa en la figura 18.



**Figura 18.-** Ambiente pre-PCR, preparación de mix.

**d. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de OROV.**

Para el caso de OROV se llevó a cabo el mismo procedimiento que con el control positivo brindado por el CDC.

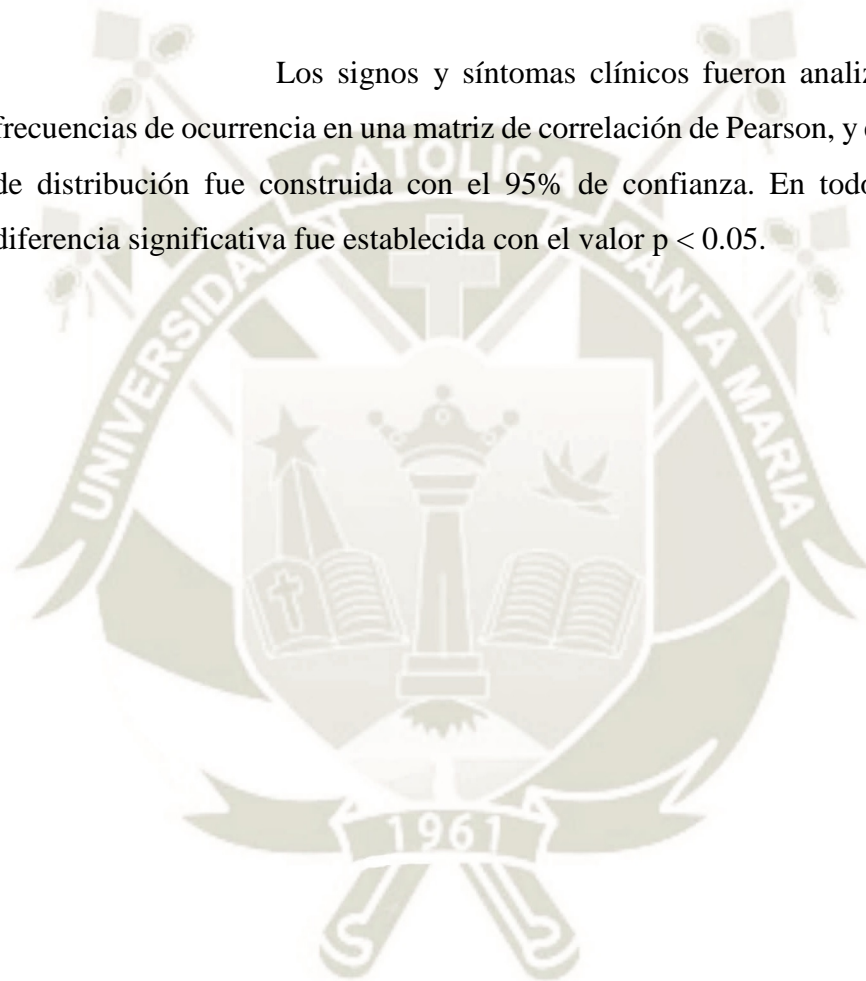
**2.2.3. Determinación de la presencia y frecuencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en muestras de suero de pacientes con síndrome febril.**

Los recuentos de los casos agrupados por edades fueron analizados con el test *t*-student para una distribución de 2 colas para datos pareados.

La distribución por sexos para cada categoría fue analizada con el test-  $\chi^2$  en tablas de 2x2 usando el 50% como frecuencia esperada para cada sexo.

#### **2.2.4. Correlacionar los parámetros clínicos con la presencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en los pacientes con síndrome febril.**

Los signos y síntomas clínicos fueron analizados usando las frecuencias de ocurrencia en una matriz de correlación de Pearson, y el área del eclipse de distribución fue construida con el 95% de confianza. En todos los análisis la diferencia significativa fue establecida con el valor  $p < 0.05$ .



## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1.RESULTADOS EXPERIMENTALES

Un total de 214 muestras de suero de pacientes con síndrome febril fueron analizadas mediante PCR para detectar DENV, ZIKV, CHIKV y OROV. La PCR fue realizada en tiempo real para el caso de DENV, ZIKV y CHIKV.

##### 3.1.1. Estandarización molecular de la PCR para detección Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en controles positivos.

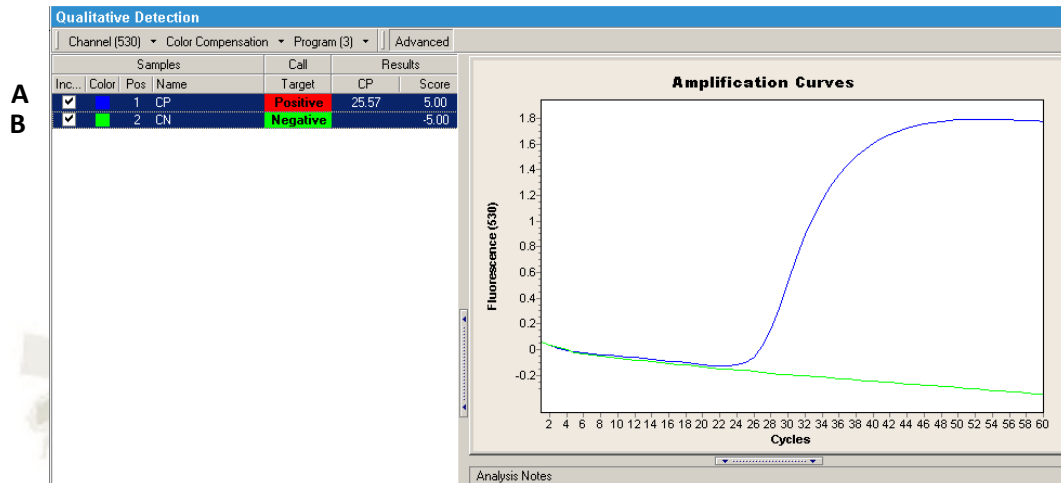
Los resultados de la PCR realizada a los controles positivos otorgados por el CDC se muestran en la tabla 17, donde se puede ver los datos del ciclo umbral (Cp) punto en el que la reacción de amplificación se inicia y la puntuación, valor numérico que permite comprobar si el resultado de la muestra es positivo (mayor igual a +1), negativo (menor igual a -1) o incierto (valores ubicados entre -1 y +1)

**Tabla 17.-** Evaluación de los controles positivos para DENV (DENV -1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4), ZIKV (Zika PRVABC59 virus) y CHIKV (Chikungunya R80422a)

Controles positivos CDC	Ciclo umbral (CP)	Puntuación (Score)
DENV -1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4	25.57	5.0
Zika PRVABC59 virus	35.35	5.0
Chikungunya R80422a	23.82	5.0

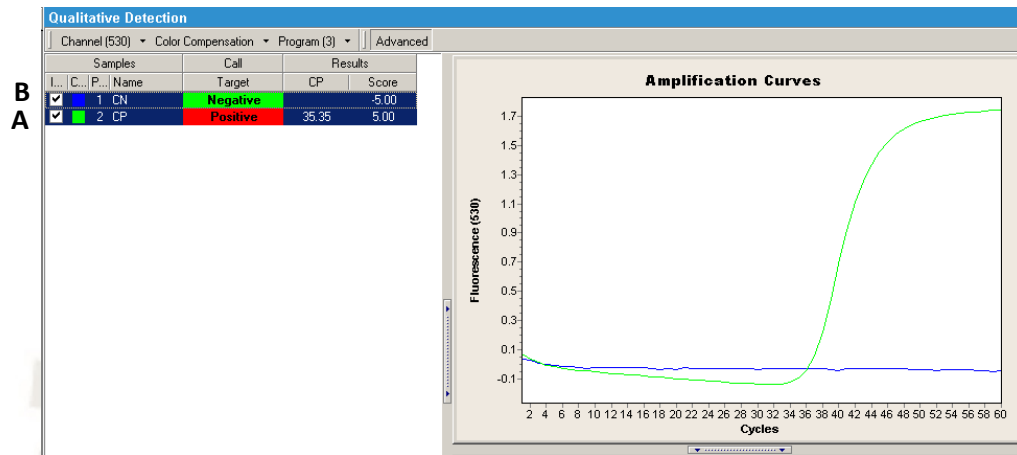
En la figura 19 se muestra el resultado de la PCR en tiempo real del control del CDC para DENV, en el cual se obtuvo un Cp de 25.57 y un score de 5.00 lo que

comprueba que el resultado es positivo. En otro estudio realizado para la identificación de DENV y otros arbovirus en el 2003 se consideró negativos todos los valores de Cp mayores a  $40^{55}$ .



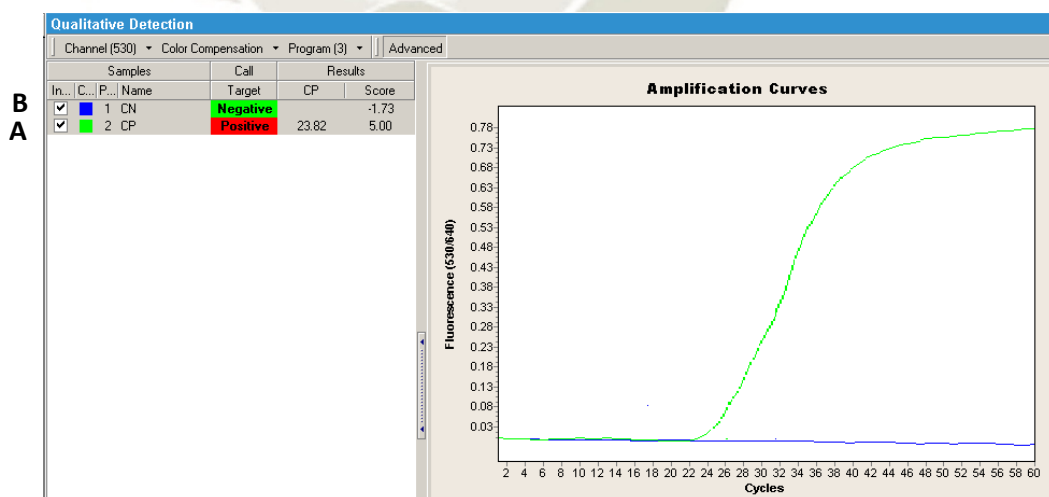
**Figura 19.-** Resultado de la PCR para detección de DENV, la curva de amplificación del control DENV -1 Haw, DENV-2 NGC, DENV-3 H87 y DENV-4 se muestra positiva (A), en el caso del control negativo (B) no se da una amplificación, por lo que se hace valido el resultado.

En la figura 20 se muestra el resultado de la PCR en tiempo real del control del CDC para ZIKV, en el cual se obtuvo un Cp de 35.35 y un score de 5.00 lo que comprueba que el resultado es positivo. En un estudio realizado en el 2017 en el que se evaluó eventos clave que modula la infección del Zika en células clínicamente relevantes (como macrófagos placentarios) se consideró positivos las muestras con valores de Cp a partir de 20 y  $30^{56}$ .



**Figura 20.-** Resultado de la PCR para detección de ZIKV la curva de amplificación del control Zika PRVABC59 virus se muestra positiva (A), en el caso del control negativo (B) no se da una amplificación, por lo que se hace valido el resultado.

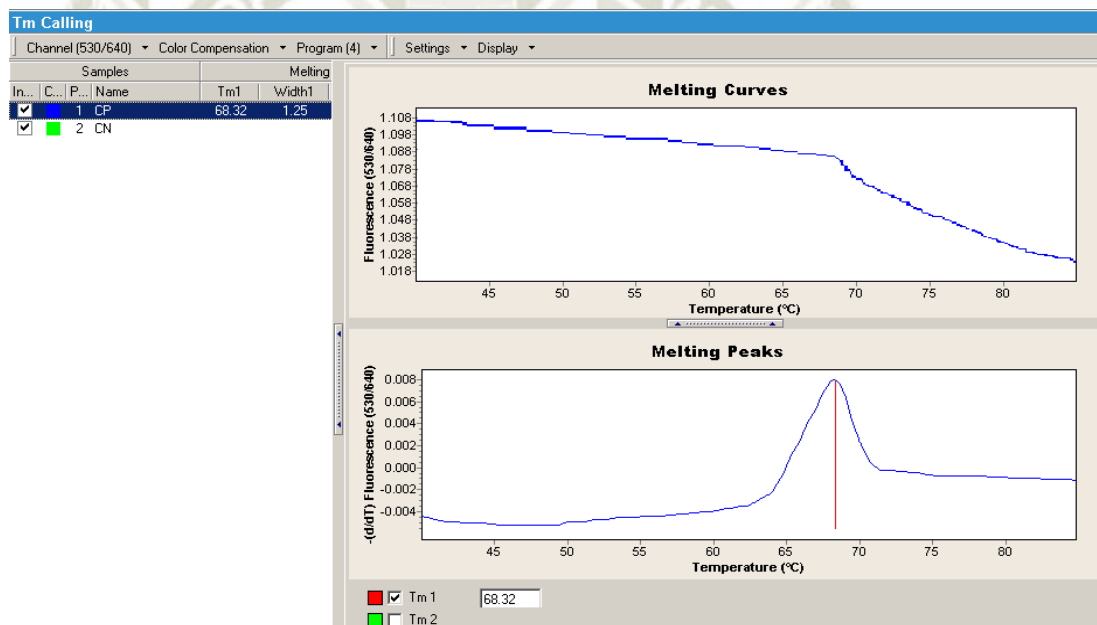
En la figura 21 se muestra el resultado de la PCR en tiempo real del control del CDC para CHIKV, en el cual se obtuvo un Cp de 23.82 y un score de 5.00 lo que comprueba que el resultado es positivo. En un estudio entomológico sobre Chikungunya en Singapur se consideró como resultados positivos aquellos valores que se encontraron entre 19 y 30.78 de Cp<sup>57</sup>.



**Figura 21.-** Resultado de la PCR para detección de CHIKV la curva de amplificación del control Chikungunya R80422a virus se muestra positiva (A), en el caso del control negativo (B) no se da una amplificación, por lo que se hace valido el resultado.

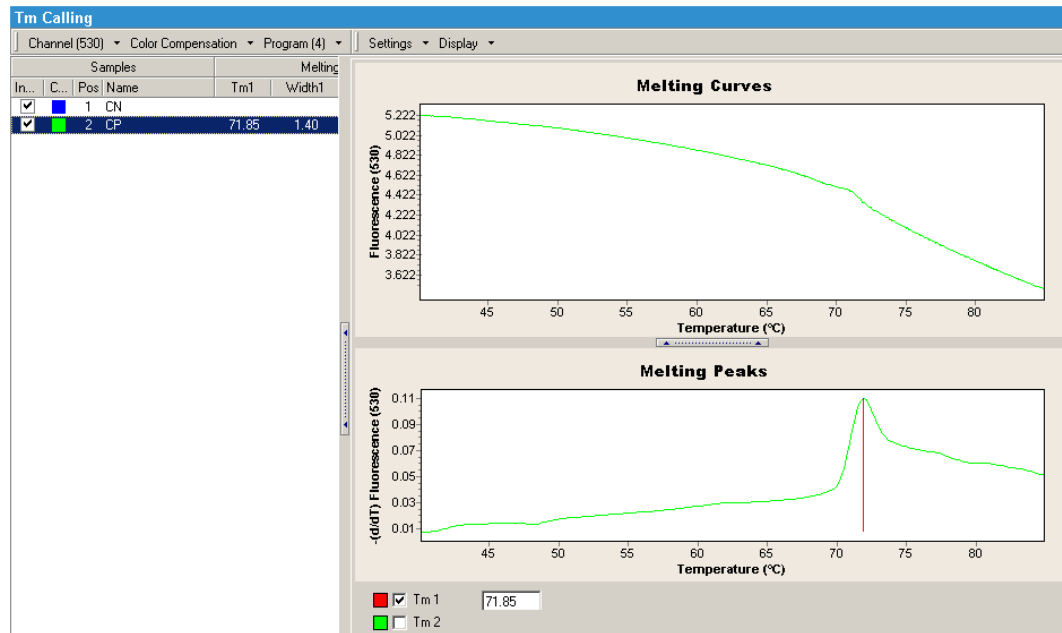
Como se puede apreciar los valores de  $C_p$  son variables, esto va a depender totalmente de la concentración de ARN inicial en la muestra, en la presente investigación se consideró tanto los valores de  $C_p$ , el score y la curva para dar como positivo o negativo un resultado.

Para comprobar la especificidad de los cebadores se recurrió al análisis de las curvas de disociación ( $T_m$ ), en el caso de los cebadores usados para el DENV, el  $T_m$  fue de 68.32 como se puede ver en la figura 22, siendo un valor mucho más bajo en comparación con el  $T_m$  obtenido en el estudio realizado para la identificación de DENV y otros arbovirus en el 2003 donde los resultados oscilaron en un rango de 79 a 83<sup>55</sup>.



**Figura 22.-** Curva de disociación de la PCR para diagnóstico de DENV, el  $T_m$  que se obtuvo fue de 68.32.

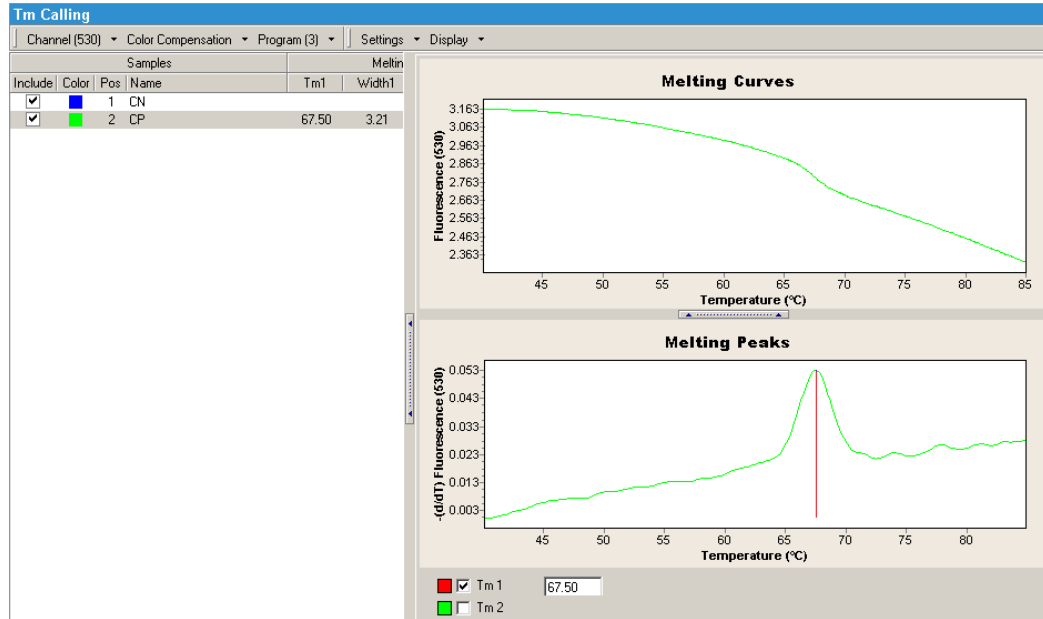
En los cebadores usados para ZIKV, el  $T_m$  fue de 71.85 como se ve en la figura 23, siendo un valor más bajo en comparación con el  $T_m$  obtenido en un estudio realizado en el 2016 en el que se detectó ZIKV usando SYBR Green donde el  $T_m$  fue de 80.35<sup>58</sup>.



**Figura 23.-** Curva de disociación de la PCR para diagnóstico de ZIKV, la Tm que se obtuvo fue de 71.85.

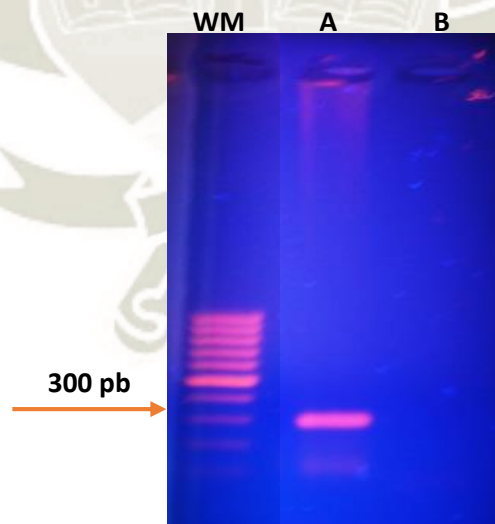
En el caso de CHIKV el Tm fue de 67.50 como se puede ver en la figura 24, siendo un valor bajo en comparación con el Tm que se obtuvo en un estudio realizado en el 2007, donde se obtuvo resultados en un rango de 81.3 a 81.9, en dicho estudio realizó una RT-PCR en tiempo real usando SYBR Green para detectar y cuantificar CHIKV en muestras de suero<sup>59</sup>.

La diferencia en los valores Tm que fueron reportados en este estudio con respecto a investigaciones que se han realizado se debe sobre todo a la diferencia en los cebadores usados en esta investigación, los cuales se han ido modificando en búsqueda de mejores resultados y mayor especificidad, otros factores que pueden influir son los equipos usados para procesar las muestras y las condiciones que se les dio.



**Figura 24.-** Curva de disociación de la PCR para diagnóstico de CHIKV, la Tm que se obtuvo fue de 67.50

En el caso de OROV se elaboró un gel en el que se comprobó la especificidad del control como se muestra en la figura 25.



**Figura 25.-** Estandarización de sonda obtenida del CDC para OROV donde el control positivo (A) muestra una banda definida a 300 pb como se puede comprobar con ayuda del marcador de peso molecular (WM), en el control negativo no se visualiza ninguna banda, por lo que se hace valido el resultado.

### 3.1.2. Amplificación del ARN de arbovirus (Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La calidad y cantidad del ARN fue evaluada con el espectrofotómetro Nano-Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific) evaluándose la absorbancia A260/A280 donde los valores se encontraron entre los rangos de 1.87 – 2.73, en el caso de la absorbancia A260/A230 los valores se encontraron entre los rangos de 2.15 – 2.22, con estos resultados obtenidos se determinó que la calidad de ARN extraído era buena, por lo que se consideró que se podía proceder a realizar la PCR. Con esta prueba ninguna muestra fue excluida del estudio.

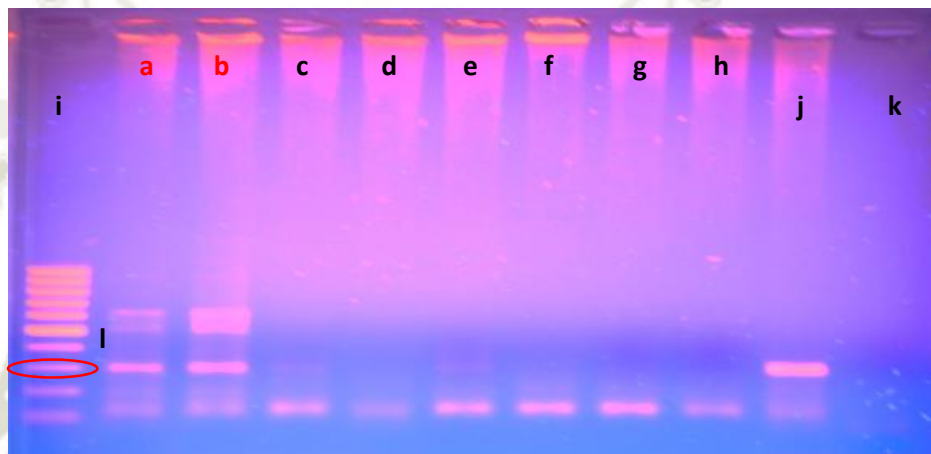
Como se puede apreciar en las figuras 26, 27 y 28 las muestras fueron evaluadas con un control positivo (CDC) y un control negativo, se tomó en cuenta para hacer validos los resultados tanto la presencia de curva como el “*Crossing point*” (Cp), “*Threshold point*” (Ct) o “ciclo umbral”, punto en el que la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal siendo considerado como el punto en el que la reacción de amplificación se inicia. En el caso de resultados inciertos se repitió las corridas para poder dar un resultado certero.

En la figura 26 se puede observar el resultado de algunas muestras amplificadas mediante PCR para evaluar la presencia de DENV para lo cual se usó tres cebadores DENV-F, DENV-R y DENV-Probe. En el caso de la figura 27 se muestra el resultado de las muestras sometidas a una PCR para ZIKV, usando los cebadores ZIKV-F, ZIKV-R, ZIKV-Probe. Por último, en la figura 28 se observan los resultados obtenidos para CHIKV, para lo que se usó como cebadores CHIKV-F, CHIKV-R, CHIKV-Probe, todos los cebadores fueron previamente alineados y las secuencias se encuentran especificadas en la tabla 10. El equipo *Light Cycler 2.0* que fue usado para hacer la PCR detectó la presencia de curva y se evaluó el Cp para dar los resultados como positivos, negativos o inciertos.





Los resultados no fueron valorados con curvas ni  $C_p$ , ya que el método utilizado es una PCR convencional en la que solo se usó dos cebadores BS-S y BS-C, (cuya secuencia se encuentra de manera explícita en la tabla 10), por lo que se evaluó la presencia de bandas a la altura de 300pb, las cuales fueron identificadas con ayuda de un marcador de peso molecular que tiene un rango de 100 a 1000pb como se puede apreciar en la figura 30, en cada gel preparado se colocó 17 muestras, 1 control positivo, 1 control negativo y en el centro el marcador de peso molecular, todo esto con el objetivo de comprobar la validez de los resultados.



**Figura 30.-** Gel de agarosa al 1.5% para la identificación de OROV. **a-h:** muestras de pacientes con síndrome febril, siendo **a** y **b** muestras con resultado positivo, **i:** marcador de peso molecular, **j:** control positivo, **k:** control negativo, **l:** tamaño del amplicón de OROV buscado 300pb.

El uso una RT-PCR para el caso de DENV, ZIKV y CHIKV se debe a la alta especificidad y sensibilidad con la que cuenta esta prueba, además de haber logrado un protocolo estándar con buenos resultados.<sup>54</sup>

El uso de pruebas serológicas para detectar anticuerpos específicos como IgM e IgG en arbovirus pueden ser eficaces, pero existe la posibilidad de darse reacciones cruzadas, en las cuales en lugar de detectar ZIKV se considera positivo a DENV.<sup>53</sup>

La importancia de estos ensayos moleculares radica en la detección y diferenciación de los patógenos en la fase aguda de la enfermedad siendo altamente específicos y sensibles.

### **3.1.3. Determinación de la presencia y frecuencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en muestras de suero de pacientes con síndrome febril.**

El total de casos (214 casos) fue agrupado en la categoría de síndrome febril (AFI), y en 161 casos el agente viral fue diagnosticado molecularmente. Las frecuencias más altas correspondieron a DENV (30.8%) y OROV (28.5%). El ZIKV fue encontrado con una frecuencia intermedia de (12.6%), y el CHIKV fue encontrado con la frecuencia más baja (3.3%).

En un estudio realizado en el mismo año a 139 pacientes, entre los meses de enero y marzo en el departamento de Madre de Dios se identificó como agentes etiológicos de mayor frecuencia a CHIKV (9.4%) y OROV (8.6%) mientras que DENV (6.5%) y ZIKV (5.0%) tuvieron menor presencia<sup>59</sup>.

La diferencia entre los dos resultados se puede deber a la zona geográfica en la que está ubicada cada uno de los departamentos ya que Madre de Dios se encuentra en el Sureste, a diferencia de Piura que está ubicada al Noroeste, así mismo existe gran influencia del clima que presenta cada una de estas regiones y la época del año en que se haya tomado dichas muestras.

En la tabla 18 se puede observar los resultados obtenidos de manera desglosada por edades y por género.

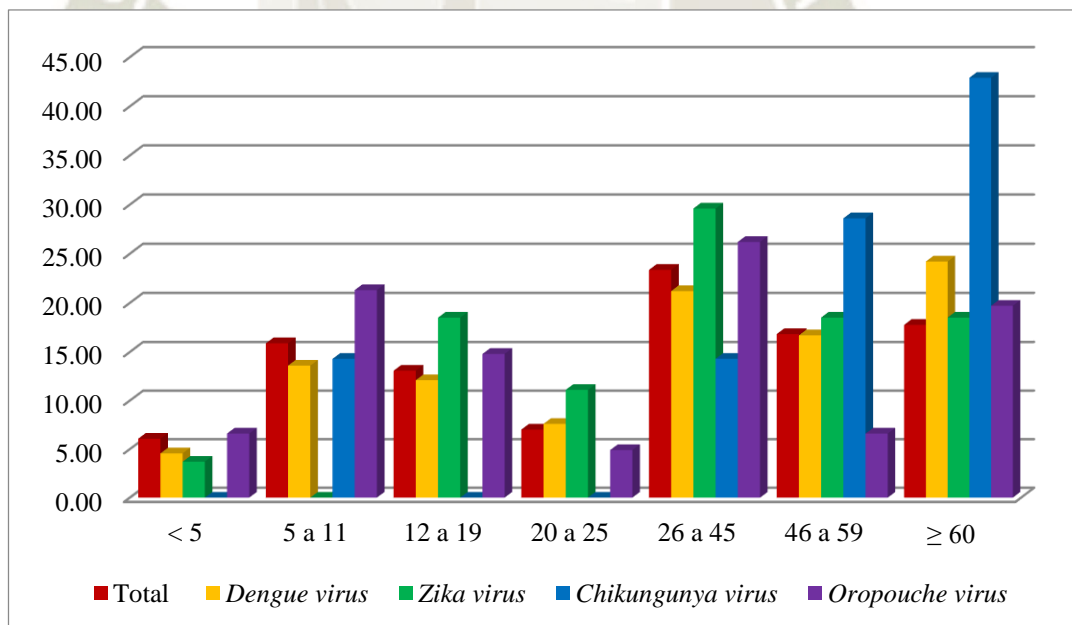
En el caso del estudio realizado en Madre de Dios la población ubicada en el rango de 20 a 44 años fue el grupo con mayor frecuencia de casos positivos tanto para DENV (55.6%), ZIKV (57.1%), CHIKV (53.8%) y OROV (58.3%), obteniéndose datos significativamente más altos en comparación con las frecuencias que se encontraron en otros grupos de edades, siendo la frecuencia más baja el grupo de personas mayores de 45 años (15.8%)<sup>59</sup>.

La frecuencia por edades para las infecciones virales en la población estudiada es mostrada en la figura 28, mostrando aparentemente un mayor número de casos en adultos de 26 a 45 años, así como en adultos mayores de 60 años.

**Tabla 18.-** Arbovirus clasificación por edades y sexo.

	Total de casos n=214 (%)	Dengue virus (n=66)	Zika virus (n=27)	Chikungunya virus (n=7)	Oropouche virus (n=61)
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Edad</b>					
< 5	13 (6.07)	3 (4.56)	1 (3.7)	0 (0)	4 (6.6)
5 a 11	34 (15.89)	9 (13.6)	0 (0)	1 (14.3)	13 (21.3)
12 a 19	28 (13.08)	8 (12.1)	5 (18.5)	0 (0)	9 (14.8)
20 a 25	15 (7.01)	5 (7.6)	3 (11.1)	0 (0)	3 (4.9)
26 a 45	50 (23.36)	14 (21.2)	8 (29.6)	1 (14.3)	16 (26.2)
46 a 59	36 (16.82)	11 (16.7)	5 (18.5)	2 (28.6)	4 (6.6)
≥ 60	38 (17.76)	16 (24.2)	5 (18.5)	3 (42.9)	12 (19.7)
<b>Género</b>					
Femenino	115 (53.74)	35 (53.03)	16 (59.3)	4 (57.1)	28 (45.9)
Masculino	99 (46.26)	31 (46.97)	11 (40.7)	3 (42.9)	33 (54.1)

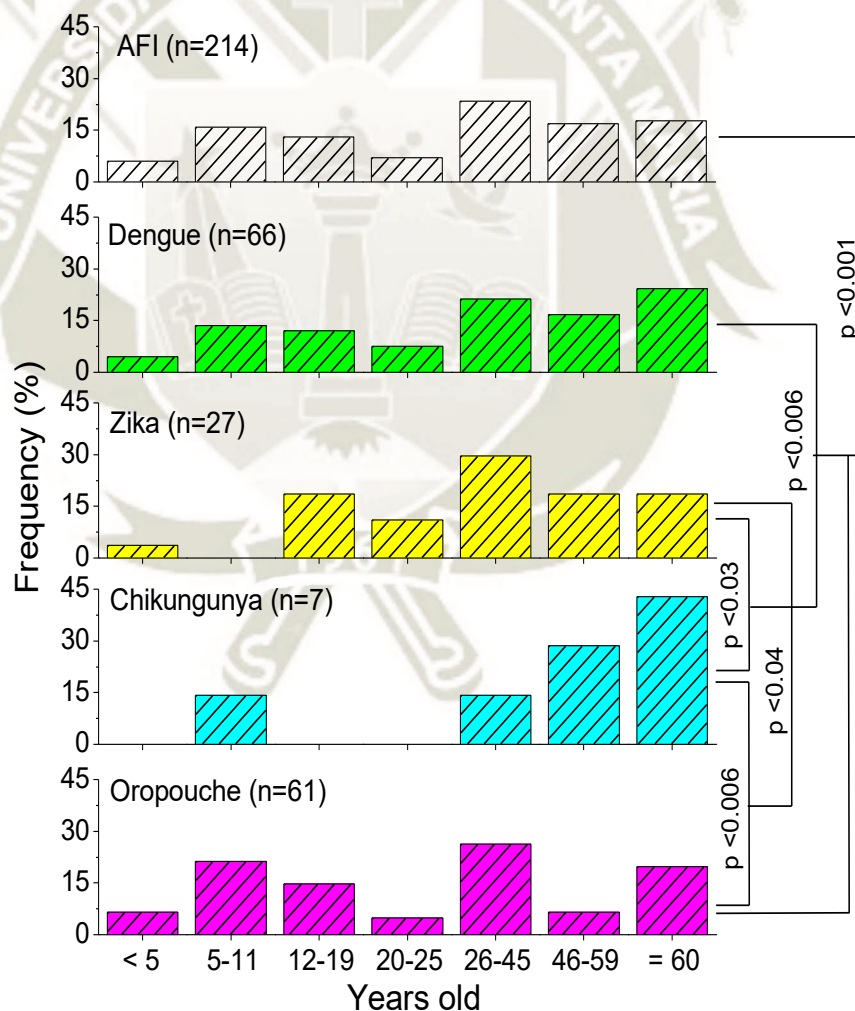
Como se puede observar los estudios realizados en Madre de Dios y en Piura presentan mayor frecuencia en adultos de 20 a 45 años.



**Figura 31.-** Distribución de casos de Dengue virus, Zika virus, Chikungunya virus y Oropouche virus por edades

Para evaluar la significancia de estos resultados, fueron analizados con el test *t*-student para una distribución de 2 colas para datos pareados

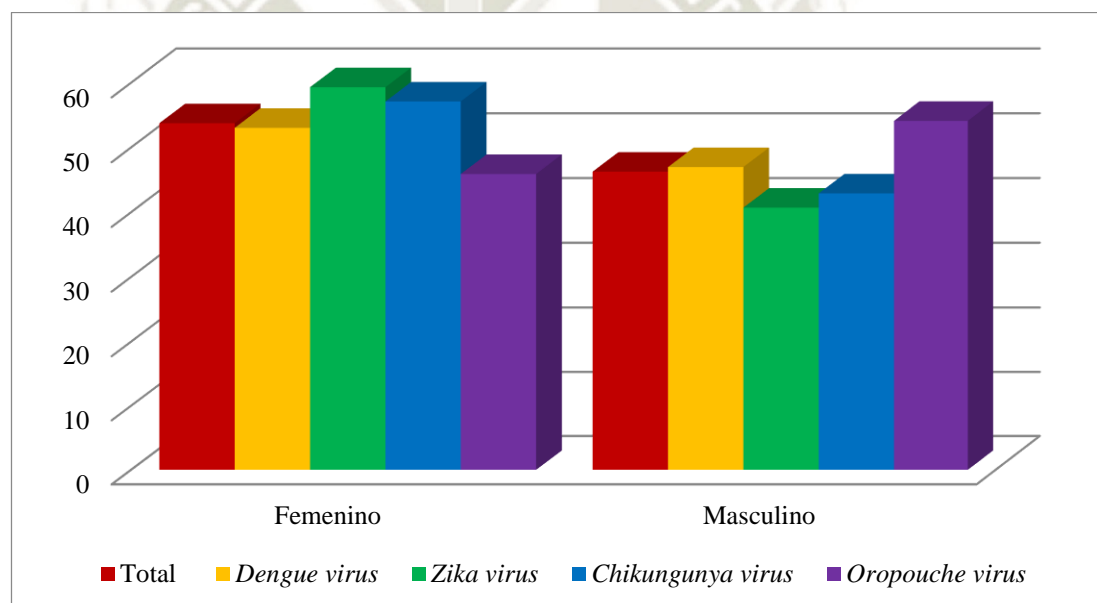
mostrada en la figura 29, donde se puede destacar que la distribución del síndrome febril (AFI) es significativamente diferente ( $p < 0.001$ ) en comparación a las distribuciones por edades de las infecciones virales causadas por los virus DENV, ZIKV, CHIKV y OROV. Además, se puede observar que las distribuciones por edades fueron significativamente diferentes para los distintos agentes virales, excepto para el virus DENV y OROV que mostraron una similar distribución ( $p = 0.638$ ) y donde se observó una alta prevalencia en el grupo de niños de 5-11 años y adultos jóvenes 26-45 años. La infección por virus ZIKV se caracterizó por la muy reducida presencia de casos entre la población de niños (menores de 5 años y grupo de 5-11 años). Mientras que la infección por virus CHIKV mostro mayor prevalencia en la población de adultos y adultos mayores.



**Figura 32.-** Distribución de frecuencia de casos por edades.

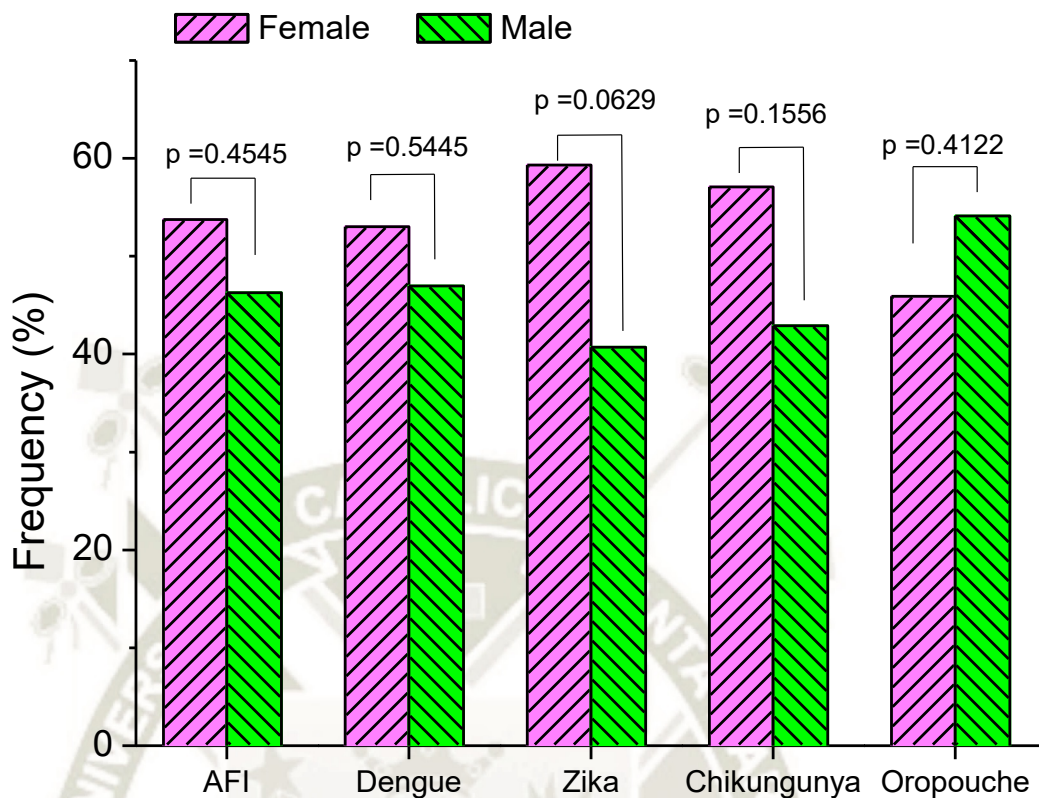
Con este estudio se puede concluir que las edades no van a ser un factor determinante para poder identificar al agente causal del AFI (Síndrome febril), es decir que no podemos relacionar las edades con respecto a los arbovirus, estos datos solo nos sirve para saber cuál es la población vulnerable en cada caso, es así que por ejemplo en el caso de DENV y OROV como se puede ver en la figura 29 no existe una diferencia significativa en las edades, por lo que los dos presentan mayor prevalencia en niños de 5-11 años y adultos jóvenes 26-45 años.

Otra característica poblacional estudiada fue el sexo de los pacientes. En la figura 30 se puede ver que existe un mayor número de casos en personas del género femenino.



**Figura 33.-** Distribución de casos de Dengue virus, Zika virus, Chikungunya virus y Oropouche virus por géneros.

Al igual que en el caso de las edades, se evaluó la significancia de estos resultados. Para esto se analizó cada categoría con el test- $\chi^2$  en tablas de 2x2 usando el 50% como frecuencia esperada para cada sexo, en la figura 31 podemos observar los resultados de este análisis, aquí se muestra que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) asociadas al sexo de los pacientes y las infecciones virales diagnosticadas.



**Figura 34.-** Frecuencias de las infecciones virales por sexo de los pacientes.

Debido a estos resultados se puede afirmar que el género tampoco es un factor determinante para poder realizar la identificación del agente causal del AFI (Síndrome febril), por lo que no va a existir una relación entre el género y el arbovirus, en este caso al no existir una diferencia significativa entre los dos grupos tampoco se puede definir las poblaciones vulnerables ya que los AFI pueden presentarse tanto en mujeres como en hombres de igual forma. En el caso del departamento de Madre de Dios se hizo la misma evaluación observándose que no existe diferencias significativas entre los géneros<sup>59</sup>, lo que reafirma la teoría que este dato etiológico no es un factor determinante.

### 3.1.4. Correlación de los parámetros clínicos con la presencia de Dengue, Zika, Chikungunya y Oropouche en los pacientes con síndrome febril.

El análisis de los signos y síntomas para las infecciones virales estudiadas se muestra en la tabla 19

Signos y Síntomas	Total n=214 (%)	Odds	Dengue virus (n=66)		odds- ratio	Zika virus (n=27)		odds- ratio	Chikungunya virus (n=7)		odds- ratio	Oropouche virus (n=61)		odds- ratio
			n (%)	Odds		n (%)	odds		n (%)	Odds		n (%)	odds	
Fiebre	205 (95.79)	22.7778	62 (93.9)	15.5000	0.6805	24 (88.9)	8.0000	0.3512	7 (100)	>6	3.0293	60 (98.4)	60.0000	2.6341
Cefalea	202 (94.39)	16.8333	63 (95.5)	21.0000	1.2475	25 (92.6)	12.5000	0.7426	7 (100)	>6	4.0990	58 (95.1)	19.3333	1.1485
Mialgia	186 (86.92)	6.6429	56 (84.9)	5.6000	0.8430	25 (92.6)	12.5000	1.8817	5 (71.4)	2.5000	0.3763	50 (82.0)	4.5455	0.6843
Artralgia	171 (79.91)	3.9767	55 (83.3)	5.0000	1.2573	22 (81.5)	4.4000	1.1064	6 (85.7)	6.0000	1.5088	42 (68.9)	2.2105	0.5559
Hiporexia	162 (75.70)	3.1154	48 (72.7)	2.6667	0.8560	18 (66.7)	2.0000	0.6420	7 (100)	>6	22.1481	47 (77.1)	3.3571	1.0776
Dolor retro-ocular	153 (71.50)	2.5082	47 (71.2)	2.4737	0.9862	18 (66.7)	2.0000	0.7974	6 (85.7)	6.0000	2.3922	36 (59.0)	1.4400	0.5741
Dolor lumbar	126 (58.88)	1.4318	41 (62.1)	1.6400	1.1454	16 (59.3)	1.4545	1.0159	5 (71.4)	2.5000	1.7460	30 (49.1)	0.9677	0.6759
Nauseas / Vómitos	118 (55.14)	1.2292	37 (56.1)	1.2759	1.0380	12 (44.4)	0.8000	0.6508	6 (85.7)	6.0000	4.8814	36 (59.0)	1.4400	1.1715
Odinofagia	93 (43.46)	0.7686	19 (28.8)	0.4043	0.5260	8 (29.6)	0.4211	0.5478	5 (71.4)	2.5000	3.2527	27 (44.3)	0.7941	1.0332
Erupción cutánea	41 (19.16)	0.237	8 (12.1)	0.1379	0.5820	6 (22.2)	0.2857	1.2056	2 (28.6)	0.4000	1.6878	11 (18.0)	0.2200	0.9283
Dolor abdominal intenso y continuo	12 (5.61)	0.0594	2 (3.0)	0.0313	0.5260	1 (3.7)	0.0385	0.6474	1 (14.3)	0.1667	2.8056	3 (4.9)	0.0517	0.8707
Petequias	6 (2.80)	0.0288	1 (1.5)	0.0154	0.5333	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (14.3)	0.1667	5.7778	0 (0)	0.0000	0.0000
Epistaxis	5 (2.34)	0.0239	2 (3.0)	0.0313	1.3063	1 (3.7)	0.0385	1.6077	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000
Vómitos persistentes	4 (1.87)	0.019	1 (1.5)	0.0154	0.8077	1 (3.7)	0.0385	2.0192	0 (0)	0.0000	0.0000	2 (3.3)	0.0339	1.7797
Disminución de plaquetas	4 (1.87)	0.019	0 (0)	0.0000	0.0000	2 (7.4)	0.0800	4.2000	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (1.6)	0.0167	0.8750
Incremento de hematocrito	4 (1.87)	0.019	0 (0)	0.0000	0.0000	2 (7.4)	0.0800	4.2000	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (1.6)	0.0167	0.8750
Dolor torácico o disnea	3 (1.40)	0.0142	1 (1.5)	0.0154	1.0821	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (1.6)	0.0167	1.1722
Disminución brusca de la T°	3 (1.40)	0.0142	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (3.7)	0.0385	2.7051	1 (14.3)	0.1667	11.7222	1 (1.6)	0.0167	1.1722
Gingivorragia	2 (0.93)	0.0094	2 (3.0)	0.0313	3.3125	1 (3.7)	0.0385	4.0769	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000
Equimosis	2 (0.93)	0.0094	1 (1.5)	0.0154	1.6308	1 (3.7)	0.0385	4.0769	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000
Decaimiento excesivo o lipotimia	2 (0.93)	0.0094	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (3.7)	0.0385	4.0769	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (1.6)	0.0167	1.7667
Extremidades frías o cianóticas	2 (0.93)	0.0094	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (3.7)	0.0385	4.0769	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (1.6)	0.0167	1.7667

Mareos	1 (0.47)	0.0047	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (3.7)	0.0385	8.1923	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000
Melena	1 (0.47)	0.0047	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (1.6)	0.0167	3.5500
Hipotensión arterial	1 (0.47)	0.0047	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (1.6)	0.0167	3.5500
Pulso rápido y débil	1 (0.47)	0.0047	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (1.6)	0.0167	3.5500
Diferencial de la PA <20 MMHg	1 (0.47)	0.0047	0 (0)	0.0000	0.0000	1 (3.7)	0.0385	8.1923	0 (0)	0.0000	0.0000	0 (0)	0.0000	0.0000

**Tabla 19.-** Distribución de casos de Dengue virus, Zika virus, Chikungunya virus y Oropouche virus por signos y síntomas clínicos, considerando datos de Odds y Odds ratio.

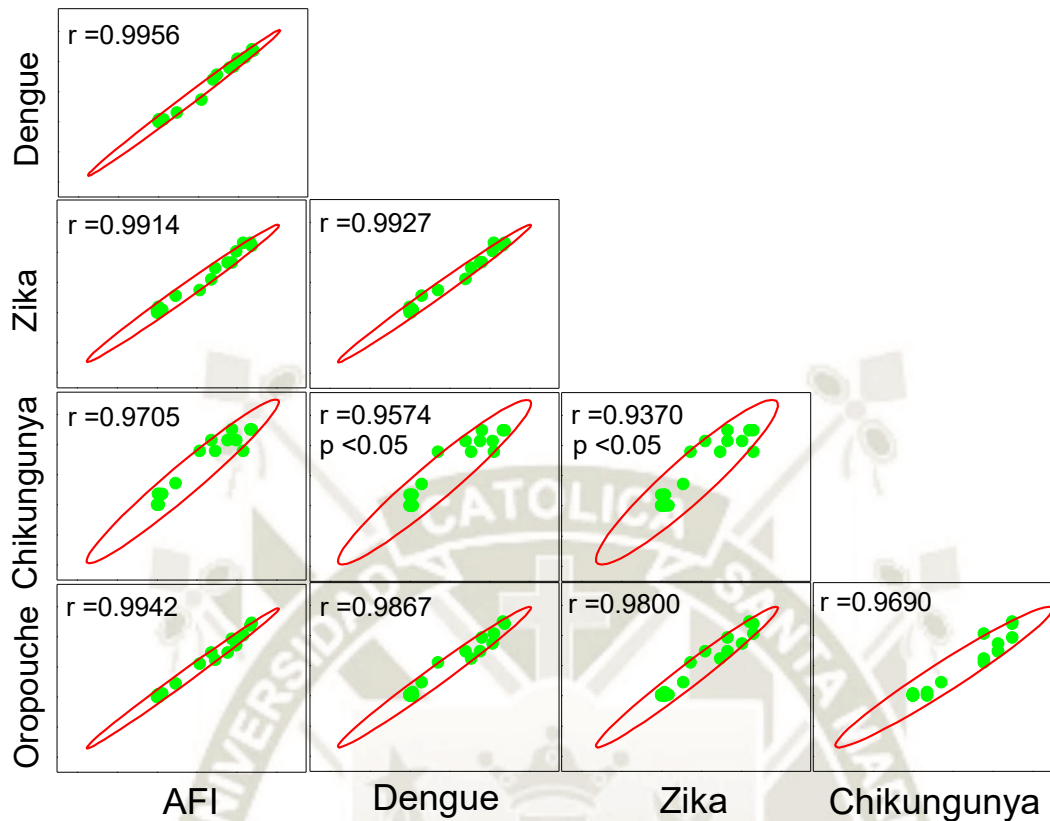


Los síntomas clínicos asociados al síndrome febril fueron registrados en los 214 casos por el médico tratante. En la tabla 18 se muestra los datos de frecuencia de síntomas clínicos, de los cuales las prevalencias más altas correspondieron a fiebre (95.8%), cefalea (94.4%), mialgia (86.9%), artralgia (79.9%), hiporexia (75.7%) y dolor retro-ocular (71.5%); con una frecuencia intermedia se encontró el dolor lumbar (58.9%), náuseas y/o vómitos (55.1%) y odinofagia (43.5%).

Se puede observar una sintomatología similar al estudio realizado en Madre de Dios en el 2016, donde la cefalea se presente con una frecuencia de (79.9%) seguida por mialgia (65.5%), artralgia (63.3%), hiporexia (34.5%) dolor retro-ocular (33.8%) y náuseas (28.8%)<sup>59</sup>. Por lo que se puede afirmar que estos síntomas son los más frecuentes en casos de AFI.

Así mismo la tabla 18 cuenta con dos datos adicionales, odds y odds ratio, los cuales nos van a indicar la probabilidad con la que se pueden dar estos signos y síntomas en las AFI causadas por cada uno de estos diferentes arbovirus, siendo datos estadísticos que se pueden tomar como base para otros estudios.

Los signos y síntomas clínicos fueron analizados usando las frecuencias de ocurrencia en una matriz de correlación de Pearson, y el área del eclipse de distribución fue construida con el 95% de confianza. Este análisis se muestra en la figura 32. En general, se observa que los 27 signos y síntomas utilizados para el diagnóstico clínico de una AFI se correlacionan altamente con los signos y síntomas clínicos de las infecciones virales de DENV, ZIKV, CHIKV y OROV. Además, las diferentes infecciones virales se correlacionan en cuanto a sus signos y síntomas, a excepción de la infección por el virus CHIKV en comparación al DENV y ZIKV, donde al parecer los signos y síntomas podrían ser diferenciados. Sin embargo, esta aparente diferenciación clínica de la infección viral por CHIKV debe ser considerada con cautela debido al reducido número de casos (n=7) reportado en este estudio. Por otro lado, en general se puede indicar que difícilmente se puede realizar un diagnóstico clínico de las infecciones virales reportadas en este estudio. Así, es clara la necesidad de realizar una identificación del agente viral mediante los métodos de diagnóstico molecular puesto que los signos y síntomas son compartidos entre las infecciones causadas por virus DENV, ZIKV, CHIKV y OROV.



**Figura 35.-** Scatter-Matriz de la correlación de los signos y síntomas para las diferentes infecciones en la población. Coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) y valor de significancia ( $p$ ).

En los últimos años han aumentado ciertos factores que han hecho posible la supervivencia y la migración de los arbovirus, factores climáticos como el aumento de la temperatura y la humedad; o factores como la globalización, los viajes y el crecimiento del comercio en todo el mundo, lo que ha permitido exportar e importar vectores<sup>29</sup>.

En el Perú año a año la presencia de los arbovirus ha sido cada vez más sólida, debido a las condiciones con las que cuenta el país. Por ejemplo, en el caso del DENV el año 2014 se registró alrededor de 2890 casos<sup>32</sup> lo que permite indicar que el arbovirus sigue presente en el país, en igual situación se encuentran arbovirus como el ZIKV, CHIKV y OROV, aunque este último con menos conocimiento público.

Piura está ubicada en la zona occidental norte del Perú, este departamento ha sido afectado por los arbovirus, pero no se ha hecho un estudio a profundidad de la cantidad de casos de síndromes febriles que se presenta cada año ni mucho menos el origen específico de cada una de estas fiebres.

En comparación con el estudio realizado en el mismo año en el departamento de Madre de Dios, se puede ver la diferencia significativa en la frecuencia de casos encontrados en Piura, hallándose una gran presencia de DENV, pero sobre todo de OROV, arbovirus que no se había notificado antes en la zona noroeste del país.

Como se comprobó con este estudio el diagnóstico de este tipo de infecciones causadas por arbovirus se confunde fácilmente debido a sus síntomas clínicos poco específicos, por lo que tienen un diagnóstico erróneo en la mayoría de los casos. Ni los diferentes síntomas, ni la diferencia de edad, ni el género pueden funcionar como un factor determinante para identificar al arbovirus que causa la AFI, por lo que el uso de pruebas moleculares para su diagnóstico cobra aún mayor importancia, puesto que como se mencionó antes en las pruebas serológicas existe la posibilidad de obtener reacciones cruzadas, por lo que los resultados dejan de ser confiables. En cambio, los ensayos moleculares pueden detectar y diferenciar de manera específica y sensible cada uno de los patógenos que causen las infecciones, en este caso DENV, ZIKV, CHIKV y OROV.

## CONCLUSIONES

- 1) En la presente investigación se logró estandarizar la prueba molecular de PCR para la detección de DENV, ZIKV, CHIKV y OROV haciendo uso de controles positivos del CDC, en el caso de los virus evaluados con PCR tiempo real (DENV, ZIKV, CHIKV) se tomó en cuenta la presencia de curva y  $C_p$  para dar los resultados como positivos, negativos o inciertos. En el caso del virus evaluado por PCR convencional (OROV) se consideró la presencia de banda.
- 2) Se logró determinar la presencia e identificar la frecuencia de DENV, ZIKV, CHIKV y OROV en muestras de suero de pacientes con síndrome febril, mediante la técnica de PCR, llegando a la conclusión que uno de los métodos más adecuados para identificación de estos patógenos son las pruebas moleculares, debido a su alta especificidad y sensibilidad. La técnica de PCR es un método de biología molecular confiable y altamente sensible, el cual ha permitido determinar la frecuencia de los arbovirus en un corto periodo de tiempo, a comparación de otras pruebas inmunológicas, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) favorece el diagnóstico en cualquier etapa del síndrome febril, ya que identifica una secuencia específica del virus, en cambio las pruebas inmunológicas como las ELISAS, solo identifican la presencia de antígenos o anticuerpos específicos, los cuales van a depender del tiempo de enfermedad que tenga el paciente.
- 3) De un total de 214 muestras recabadas en el departamento de Piura ubicado al Norte del Perú, se ha encontrado que los arbovirus con mayor frecuencia son DENV con un 30.8% y OROV con un 28.5% de casos, el ZIKV se encontró con una frecuencia intermedia de 12.6% y el CHIKV fue encontrado con la frecuencia más baja de 3.3%. Estos resultados permiten demostrar que existe la presencia de estos cuatro arbovirus en esta región del Perú, todo esto mediante el uso de la PCR. Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que todos los casos de síndromes febriles son ocasionados por el DENV, hemos

comprobado que la realidad es otra, que existen otros responsables que deben estudiarse con más detalle.

- 4) Por último, se llegó a la conclusión de que los signos y síntomas clínicos no son un factor determinante para poder identificar al agente causal del AFI (Síndrome febril), mediante este trabajo se ha comprobado que en general los signos y síntomas clínicos difícilmente nos van a servir para realizar un diagnóstico clínico de las infecciones virales reportadas en el estudio, ya que estos son compartidos entre las infecciones causadas por virus DENV, ZIKV, CHIKV y OROV , lo cual nos indica la clara necesidad de las pruebas moleculares como la PCR para poder lograr la identificación viral.
- 5) Uno de los hallazgos más importantes que dejó la investigación es la presencia del OROV en esta región, ya que hasta los últimos reportes epidemiológicos emitidos no se ha considerado la presencia de este virus en el departamento de Piura, esto por falta de un adecuado diagnóstico y del uso de las pruebas adecuadas.

## RECOMENDACIONES

1. Hacer una previa investigación de los cebadores que se desea utilizar, empezando con un previo alineamiento con diferentes secuencias del virus y terminando por la definición de las temperaturas que se deban utilizar en cada caso.
2. Hacer una PCR de prueba con los cebadores, sondas, temperaturas y condiciones escogidas, usando un control positivo y un control negativo, para así comprobar que los resultados son los esperados, en caso no sea así, ajustar las condiciones que se utilizaran con las muestras.
3. Para futuras investigaciones se recomienda el uso de la PCR como una prueba Gold standar debido a su alta especificidad y sensibilidad, por lo que es importante continuar las investigaciones haciendo uso de esta prueba molecular, ya que como se ha comprobado en el estudio los signos y síntomas no son factores determinantes para identificar al arbovirus causante del síndrome febril.
4. Continuar la investigación con otros arbovirus que probablemente puedan encontrarse en la zona, ya que solo en este estudio quedan 53 casos de síndromes febriles no identificados, por lo que se puede especular la presencia de otros arbovirus.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arredondo-García J, Méndez-Herrera A, Medina-Cortina H. Arbovirus en Latinoamérica. *Acta pediátrica de México*. 2016;37(2):111-31.
2. Pingen M, Bryden SR, Pondeville E, Schnettler E, Kohl A, Merits A, et al. Host inflammatory response to mosquito bites enhances the severity of arbovirus infection. *Immunity*. 2016;44(6):1455-69.
3. Rosenberg R, Johansson MA, Powers AM, Miller BR. Search strategy has influenced the discovery rate of human viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(34):13961-4.
4. Organization WH. Los arbovirus y su importancia en patología humana: informe de un Grupo Científico de la OMS [se reunió en Ginebra del 26 de septiembre al 1 de octubre de 1966]. 1967.
5. Marcondes CB, Contigiani M, Gleiser RM. Emergent and Reemergent Arboviruses in South America and the Caribbean: Why So Many and Why Now? *Journal of medical entomology*. 2017;54(3):509-32.
6. MINSA - Centro Nacional de Epidemiología PyCdE. Casos de dengue por departamentos Perú 2017. 2017;SE 02.
7. MINSA - Centro Nacional de Epidemiología PyCdE. Enfermedad por virus Zika - Perú 2016 y 2017. 2017;SE 09.
8. MINSA - Centro Nacional de Epidemiología PyCdE. Número de casos de Chikungunya por años, Perú 2015 - 2017. 2017;SE 16.
9. OMS. Enfermedad por el virus de Oropouche - Perú. 2016.

10. Barrera-Cruz A, Díaz-Ramos RD, López-Morales AB, Grajales-Muñiz C, Viniestra-Osorio A, Zaldívar-Cervera JA, et al. Lineamientos técnicos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección por virus Zika. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2016;54(2).
11. Iroh Tam P-Y, Obaro SK, Storch G. Challenges in the etiology and diagnosis of acute febrile illness in children in low-and middle-income countries. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2016;5(2):190-205.
12. Deckard DT. Male-to-male sexual transmission of Zika virus—Texas, January 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65.
13. Villinger J, Mbaya MK, Ouso D, Kipanga PN, Lutomiah J, Masiga DK. Arbovirus and insect-specific virus discovery in Kenya by novel six genera multiplex high-resolution melting analysis. *Molecular ecology resources*. 2017;17(3):466-80.
14. Huang C, Slater B, Campbell W, Howard J, White D. Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse-transcription–polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 2001;94(1-2):121-8.
15. Kantor IN. Dengue, zika y chikungunya. *Medicina (Buenos Aires)*. 2016;76(2):93-7.
16. Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and other emerging vector-borne viral diseases. *Annual review of medicine*. 2017(0).
17. Forshey BM, Guevara C, Laguna-Torres VA, Cespedes M, Vargas J, Gianella A, et al. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000–2007. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(8):e787.

18. Tong MX, Hansen A, Hanson-Easey S, Xiang J, Cameron S, Liu Q, et al. Perceptions of capacity for infectious disease control and prevention to meet the challenges of dengue fever in the face of climate change: A survey among CDC staff in Guangdong Province, China. *Environmental research*. 2016;148:295-302.
19. Lorenzi OD, Gregory CJ, Santiago LM, Acosta H, Galarza IE, Hunsperger E, et al. Acute febrile illness surveillance in a tertiary hospital emergency department: comparison of influenza and dengue virus infections. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2013;88(3):472-80.
20. Londoño JEO, González SV. Nominación y clasificación de los virus de los vertebrados. *Fondo Editorial Biogénesis*.23-36.
21. Weaver SC, Winegar R, Manger ID, Forrester NL. Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. *Antiviral research*. 2012;94(3):242-57.
22. Quiroz E, Aguilar PV, Cisneros J, Tesh RB, Weaver SC. Venezuelan equine encephalitis in Panama: fatal endemic disease and genetic diversity of etiologic viral strains. *PLoS neglected tropical diseases*. 2009;3(6):e472.
23. Halstead SB. Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(4):557.
24. OPS/OMS. Número de casos reportados de fiebre chikungunya en las Américas. Países / territorios con transmisión autóctona o casos importando de Chikungunya en las Américas. 2017;SE – 49, 2013 a SE – 51, 2017.
25. Kucharz EJ, Cebula-Byrska I. Chikungunya fever. *European journal of internal medicine*. 2012;23(4):325-9.

26. Baharuddin A, Amir Hassan A, Chye Sheng G, Bakhtiar Nasir S, Othman S, Yusof R, et al. Current approaches in antiviral drug discovery against the Flaviviridae family. *Current pharmaceutical design*. 2014;20(21):3428-44.
27. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*. 2012;30(29):4301-6.
28. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
29. Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*. 2013;5:299-309.
30. Américas PdIeSdl. Fiebre por Dengue en las Américas. 2017.
31. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*. 2014;22(3):138-46.
32. Cabezas C, Fiestas V, García-Mendoza M, Palomino M, Mamani E, Donaires F. Dengue in Peru: a quarter century after its reemergence. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*. 2015;32(1):146-56.
33. MINSA. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. 2017;SE 05.
34. Américas PdIeSdl. Fiebre por Dengue en las Américas. 2018.
35. Bogoch II, Brady OJ, Kraemer MUG, German M, Creatore MI, Kulkarni MA, et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *The Lancet*. 2016;387(10016):335-6.

36. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IML, Horovitz DDG, Cavalcanti DP, Pessoa A, et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2016;65(3):1-4.
37. Organization PAH. Countries and territories of the Americas with confirmed autochthonous cases of Zika virus (vector-borne transmission). 2015-2017; Washington, D.C.
38. Walker PJ, Firth C, Widen SG, Blasdell KR, Guzman H, Wood TG, et al. Evolution of genome size and complexity in the rhabdoviridae. *PLoS Pathog*. 2015;11(2):e1004664.
39. Briese T, Calisher CH, Higgs S. Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants? *Virology*. 2013;446(1-2):207-16.
40. Bowden TA, Bitto D, McLees A, Yeromonahos C, Elliott RM, Huiskonen JT. Orthobunyavirus ultrastructure and the curious tripodal glycoprotein spike. *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003374.
41. Travassos da Rosa JF, de Souza WM, Pinheiro FP, Figueiredo ML, Cardoso JF, Acrani GO, et al. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96(5):1019-30.
42. Tilston-Lunel NL, Hughes J, Acrani GO, da Silva DE, Azevedo RS, Rodrigues SG, et al. Genetic analysis of members of the species Oropouche virus and identification of a novel M segment sequence. *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 7):1636-50.
43. Day J. Rotavirus infections. *Diseases of Poultry* 13th ed: Wiley-Blackwell. 2013:381-91.

44. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *elife*. 2015;4.
45. Castellanos J, Bello J, Velandia-Romero M. Manifestaciones neurológicas durante la infección por el virus del dengue. *Infectio*. 2014;18(4):167-76.
46. Purse BV, Carpenter S, Venter GJ, Bellis G, Mullens BA. Bionomics of temperate and tropical *Culicoides* midges: knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides*-borne viruses. *Annu Rev Entomol*. 2015;60:373-92.
47. Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop*. 2017;166:155-63.
48. Daniel Aspilcueta-Gho CBV, Martín Menel Calderón, Sánchez JGCY. Zika virus infection in Peru: from threat to a health problem. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. 2017;63 (1), 57-64.
49. MINSA. Centro Nacional de Epidemiología PyCde. Número de casos de Zika. SE 6. 2018.
50. Tárraga-Granilla L, López-Huamanrayme, E, Grajeda, P. Turismo y el riesgo de propagación del virus Chikungunya en una provincia del Perú. *Revista Médica Herediana*. 2017;28(1): 68-69.
51. MINSA. Centro Nacional de Epidemiología PyCde. Número de casos de Chikungunya. SE 16. 2018.

52. Patiño-Barbosa AM, & Rodríguez-Morales, A. J. . ¿DEBEMOS ESPERAR UNA MAYOR EXPANSIÓN DE DISTINTOS ARBOVIRUS EN LAS AMÉRICAS? CIMEL. 2017;22 (2).
53. Granger D, Leo YS, Lee LK, Theel ES. Serodiagnosis of dengue virus infection using commercially available antibody and NS1 antigen ELISAs. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;88(2):120-4.
54. Berthet N, Paulous S, Coffey LL, Frenkiel MP, Moltini I, Tran C, et al. Resequencing microarray method for molecular diagnosis of human arboviral diseases. *J Clin Virol*. 2013;56(3):238-43.
55. Shu, P. Y., Chang, S. F., Kuo, Y. C., Yueh, Y. Y., Chien, L. J., Sue, C. L., ... & Huang, J. H. Development of group-and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *Journal of clinical microbiology*. 2003; 41(6), 2408-2416.
56. Gavegnano, C., Bassit, L. C., Cox, B. D., Hsiao, H. M., Johnson, E. L., Suthar, M., ... & Schinazi, R. F. Jak inhibitors modulate production of replication-competent Zika virus in human Hofbauer, trophoblasts, and neuroblastoma cells. *Pathogens & immunity*. 2017; 2(2), 199.
57. Tan, C. H., Wong, P. S. J., Li, M. Z. I., Tan, S. Y. S., Lee, T. K. C., Pang, S. C., ... & Lu, D. Entomological investigation and control of a chikungunya cluster in Singapore. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011; 11(4), 383-390.
58. Xu, M. Y., Liu, S. Q., Deng, C. L., Zhang, Q. Y., & Zhang, B. Detection of Zika virus by SYBR green one-step real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*. 2016; 236, 93-97.
59. Alva-Urcia, C., Aguilar-Luis, M. A., Palomares-Reyes, C., Silva-Caso, W., Suarez-Ognio, L., Weilig, P., ... & del Valle-Mendoza, J. Emerging and reemerging arboviruses: a new threat in Eastern Peru. *PloS one*. 2017; 12(11), e0187897.



Anexo 1.- Modelo de ficha de datos y consentimiento informado.

		<b>Ficha de investigación clínico-epidemiológica para la vigilancia de arbovirosis</b>	
<small>CIE 10: dengue sin signos (A97.0) dengue con signos de alarma (A97.1) dengue grave (A97.2) Chikungunya (A92.0) Chikungunya Grave (A92.5) Zika (U06.9), ver otras especificaciones de Zika en Directiva</small>			
<b>I. SUBSISTEMA DE VIGILANCIA</b> (elegir la vigilancia que corresponde)			
a. Definición de casos * (casos que cumplen criterio clínico y epidemiológico)		<input type="checkbox"/>	
b. Vigilancia centinela** (Solo para EESS centinela)		<input type="checkbox"/>	
c. Vigilancia de febriles*** (Toma de muestras frente al incremento de febriles en EESS)		<input type="checkbox"/>	
<b>II. DATOS GENERALES:</b>			
1. Fecha de investigación:		4.EESS notificante	
2. GERESA/DIRESA/DISA:		3. Red	
5. Institución de salud: MINSA		EsSalud <input type="checkbox"/> Sanidad PNP <input type="checkbox"/> Sanidad FA Privados Otro	
<b>III. DATOS DEL PACIENTE</b>			
6. H.Clinica N°		7. Teléfono/Celular del paciente	
9. Apellido Paterno		8 Fecha de Nacimiento	
10. DNI/Pasaporte		11. Edad (años)	
11. Edad (años)		12. Género M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	
12. Género		13. Ocupación	
14. Departamento		15. Provincia	
15. Provincia		16. Distrito	
16. Distrito		17. Localidad (AH, Urb, Resid, etc)	
17. Localidad (AH, Urb, Resid, etc)		18 Dirección	
19. Gestante Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		20. Edad gestacional Semanas	
<b>IV. ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS (DATO DE IMPORTANCIA PARA ESTABLECER LUGAR DE INFECCIÓN)</b>			
21. ¿Dónde estuvo en las últimas dos semanas (14 días) antes de enfermar?			
22. País		23. Departamento	
23. Departamento		24. Provincia	
24. Provincia		25. Distrito	
25. Distrito		26. localidad	
26. localidad		27. Dirección	
27. Dirección		27. 1 Fecha de permanencia	
28. Caso autóctono Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		29. Caso importado Nacional <input type="checkbox"/>	
29. Caso importado Nacional		30. Caso importado Internacional <input type="checkbox"/>	
31. Tuvo dengue anteriormente Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		32. Año	
33. Recibió vacuna anti amarillica Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		34. Año de vacunación	
35. Tiene comorbilidad Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		36. Cual	
<b>V. DATOS CLÍNICOS</b>			
37. Fecha de inicio de síntomas:		38. Fecha de toma primera muestra	
38. Fecha de toma primera muestra		39. Fecha de toma segunda muestra	
40. Signos y síntomas frecuentes			
Fiebre T °C		<b>Signos de alarma</b> Dolor abdominal intenso y continuo <input type="checkbox"/> Dolor torácico o disnea <input type="checkbox"/> Vómitos persistentes <input type="checkbox"/> Derrame seroso al examen clínico y/o por estudio de imágenes (ascitis o derrame pleural o pericárdico) <input type="checkbox"/> Disminución brusca de la Tª o hipotermia <input type="checkbox"/> Disminución de la diuresis (disminución del volumen urinario) <input type="checkbox"/> Hepatomegalia <input type="checkbox"/> Ictericia <input type="checkbox"/> Estado mental alterado (somnolencia, inquietud, irritabilidad o convulsión) <input type="checkbox"/> Incremento del hematocrito <input type="checkbox"/>	
a. Manos <input type="checkbox"/> b. Pies <input type="checkbox"/>		<b>Signos de gravedad</b> Pulso débil e indetectable <input type="checkbox"/> Extremidades frías o cianóticas <input type="checkbox"/> Diferencial de Presion Arterial ≤ 20 mmHg <input type="checkbox"/>	
Mialgias <input type="checkbox"/> Cefalea <input type="checkbox"/> Dolor ocular o retroocular <input type="checkbox"/> Dolor lumbar <input type="checkbox"/> Rash /exantema <input type="checkbox"/> Conjuntivitis no purulenta (ojos rojos) <input type="checkbox"/> Náuseas/vómitos <input type="checkbox"/> Otros: ..... <input type="checkbox"/>		<b>Compromiso grave de órganos</b> Especifique: ..... <b>Sangrado grave</b> Especifique: ..... <b>Escala de Glasgow</b> Apertura ocular (1-4) ..... Respuesta motora (1-6) ..... Respuesta verbal (1-5) .....	
<b>VI. EXAMENES DE LABORATORIO</b>			
LLENADO POR EL LABORATORIO REFERENCIAL			
41. Prueba solicitada		42. Positivo <input type="checkbox"/> 43. Negativo <input type="checkbox"/>	
43. Negativo		44. Fecha de resultado	
c. Aislamiento viral <input type="checkbox"/> b. qRT-PCR Suero <input type="checkbox"/> f. qRT-PCR Orina <input type="checkbox"/> d. ELISA IgM (1era muestra) <input type="checkbox"/> e. ELISA IgM (2da muestra) <input type="checkbox"/> g. Otros: ..... <input type="checkbox"/> h. Muestra de tejido para inmunohistoquímica <input type="checkbox"/>		a. ELISA NS1-Dengue <input type="checkbox"/>	
<b>VII. EVOLUCIÓN DE CASOS GRAVES Y EGRESO (SOLO PARACASOS HOSPITALIZADOS)</b>			
45 Hospitalizado Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		46. Fecha hospitalización	
47. Falleció <input type="checkbox"/>		48. Fecha defunción	
49. Fue referido <input type="checkbox"/>		50. Fecha referencia	
50. Fecha referencia		51. Hospital CS	
<b>VIII. CLASIFICACIÓN</b>			
52. Dengue sin signos de alarma Probable <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/>		57. Zika <input type="checkbox"/> Sospechoso <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/>	
53. Dengue con signos de alarma		58. Fiebre amarilla <input type="checkbox"/> Síndrome febril Probable <input type="checkbox"/> Confirmado <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/>	
54. Dengue grave			
55. Chikungunya			
56. Chikungunya grave			
58. Otras arbovirosis			
<b>IX. OBSERVACIONES</b>			
<input type="text"/>			
<b>X. INVESTIGADOR</b>			
Nombre de la persona responsable		Firma y Sello	
Cargo:			
Celular:.....			

*Hospital Regional de Cajamarca*

**COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACIÓN**

Cajamarca, 16 de Octubre de 2015

**Dra. Juana Del Valle Mendoza**  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas

**Ref. PI:**

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA PLATAFORMA MULTIDISCIPLINAR PARA  
CONTENER EL IMPACTO DE SÍNDROMES FEBRILES EN ZONAS DE  
ALTO RIESGO**

De mi especial consideración:

En atención a la remisión del Protocolo indicado, tengo a bien hacer de su conocimiento que el Comité de Ética en Investigación (CEI) de nuestra institución, ha determinado **aprobar** el estudio arriba mencionado, (Exp. N° 1958851) tal como ha sido planteado, con la única observación de fijar los plazos de entrega de los resultados confirmatorios (PCR).

Se le recuerda que el plazo de aprobación tiene una duración de 24 meses contados a partir de la fecha de esta carta, la que puede ser renovada luego de la presentación del informe anual de los avances.

Sin otro particular, le saludo atentamente.

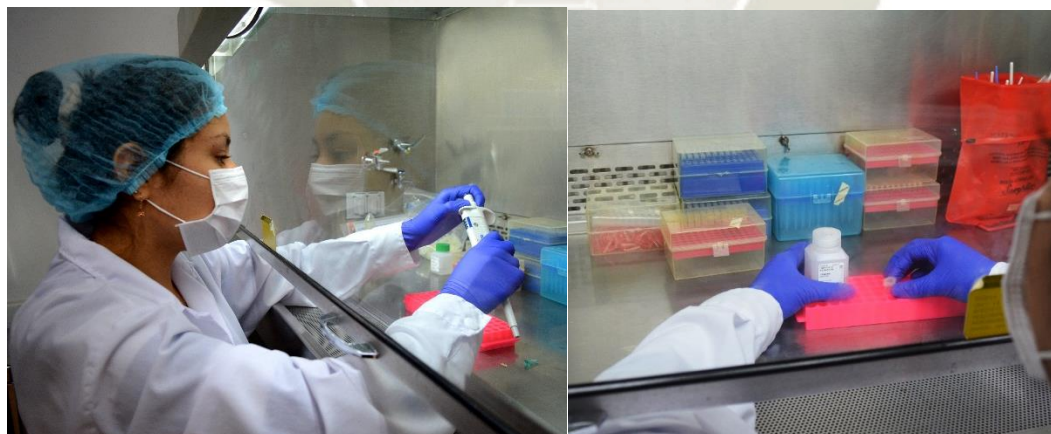


GOBIERNO REGIONAL DE CAJAMARCA  
Hospital Regional de Cajamarca  
**Dr. Nicolás Luján C. Argente**  
Presidente del Comité de Ética en Investigación  
CNP 18128 - RUC 10712

**Anexo 2.-** Figuras complementarias del proyecto en el proceso de extracción.



**Figura 36.-** Kit *High Pure Viral RNA* (Roche Life Science, Mannheim, Alemania) usado para la extracción de ácidos nucleicos.



**Figura 37.-** Preparación de solución “A” para la extracción de ARN y alícuota del tampón de elución para su incubación a 72°C



**Figura 38.-** Centrifugación de muestras para extracción a condiciones de 8000g por 1 minuto.



**Figura 39.-** Adición del tampón de lavado para el lavado de la muestra para la extracción de ARN.

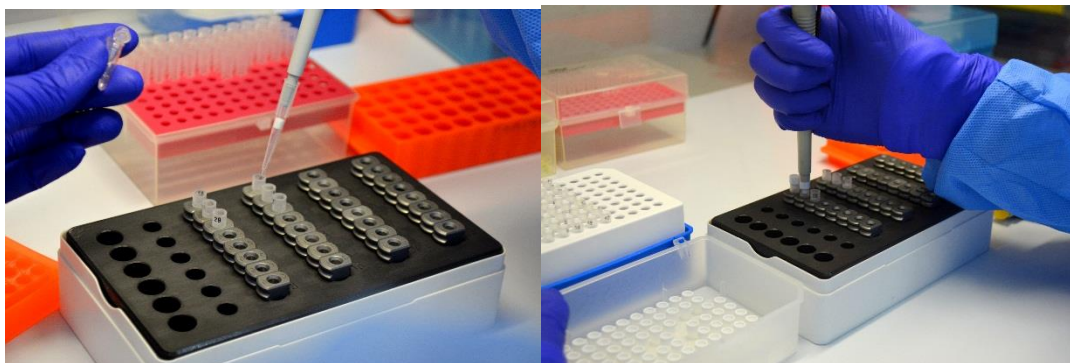
**Anexo 3.-** Figuras complementarias del proyecto en el proceso de RT-PCR para DENV, ZIKV y CHIKV.



**Figura 40.-** Kit usado para PCR, *RealTime ready RNA Virus Master* (Roche Life Science, Mannheim, Alemania).



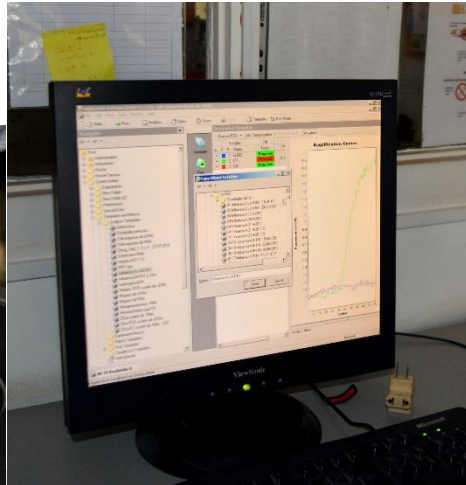
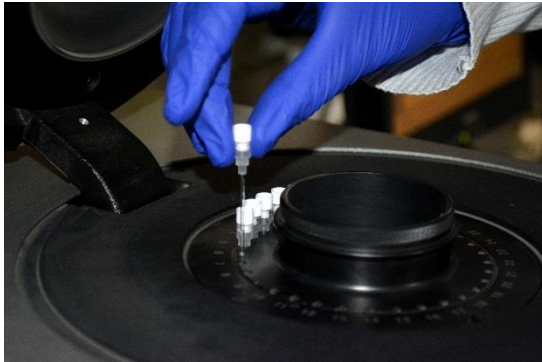
**Figura 41.-** Preparación de Mix para RT-PCR dentro de cabina de seguridad.



**Figura 42.-** Reparto de Mix en capilares para RT-PCR y cierre de capilares considerados control negativo, para el caso de DENV, ZIKV y CHIKV.

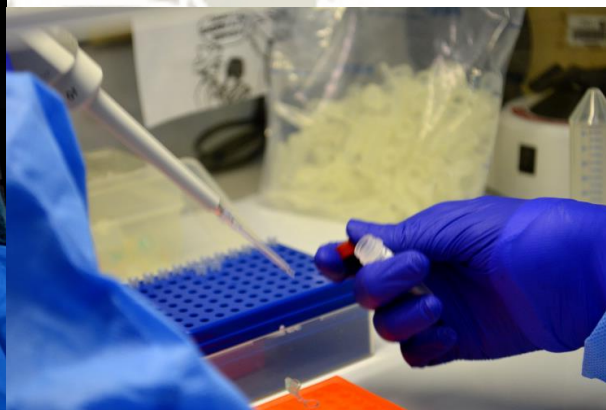


**Figura 43.-** Área de carga de muestra de ARN para la PCR, carga de muestras y de control positivo en cada caso para DENV, ZIKV, CHIKV.

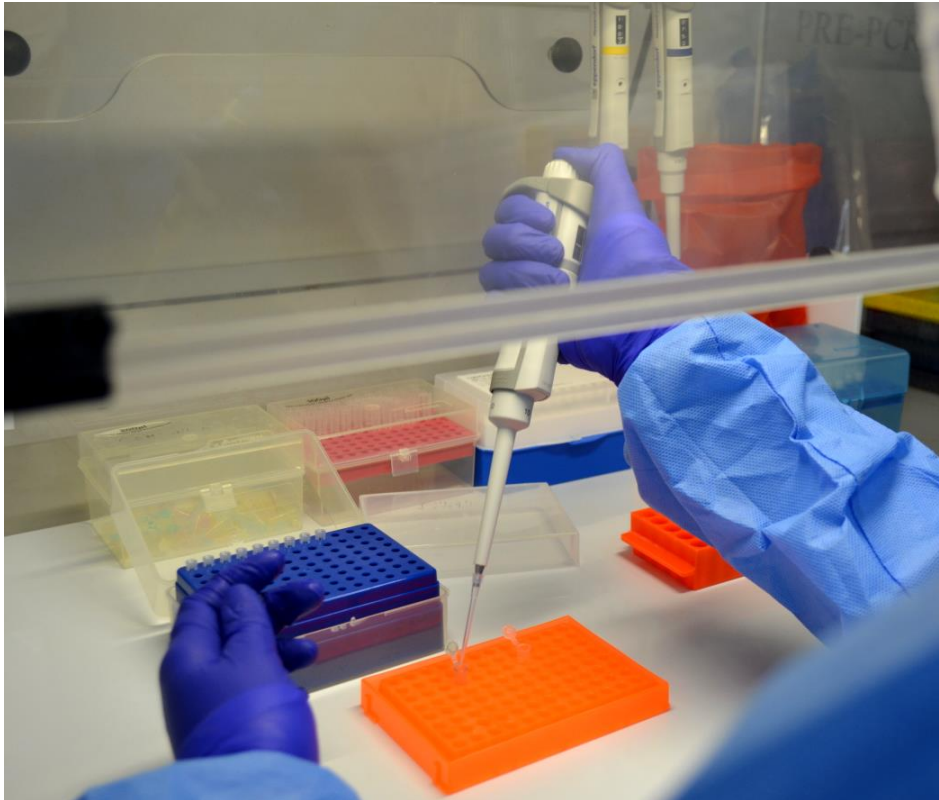


**Figura 44.-** Muestras completas en capilares siendo colocadas en el del termociclador Light Cycler ® 2.0, para posteriormente ser programado con las condiciones adecuadas para DENV, ZIKV, CHIKV.

**Anexo 4.-** Figuras complementarias del proyecto en el proceso de amplificación por PCR convencional para OROV.



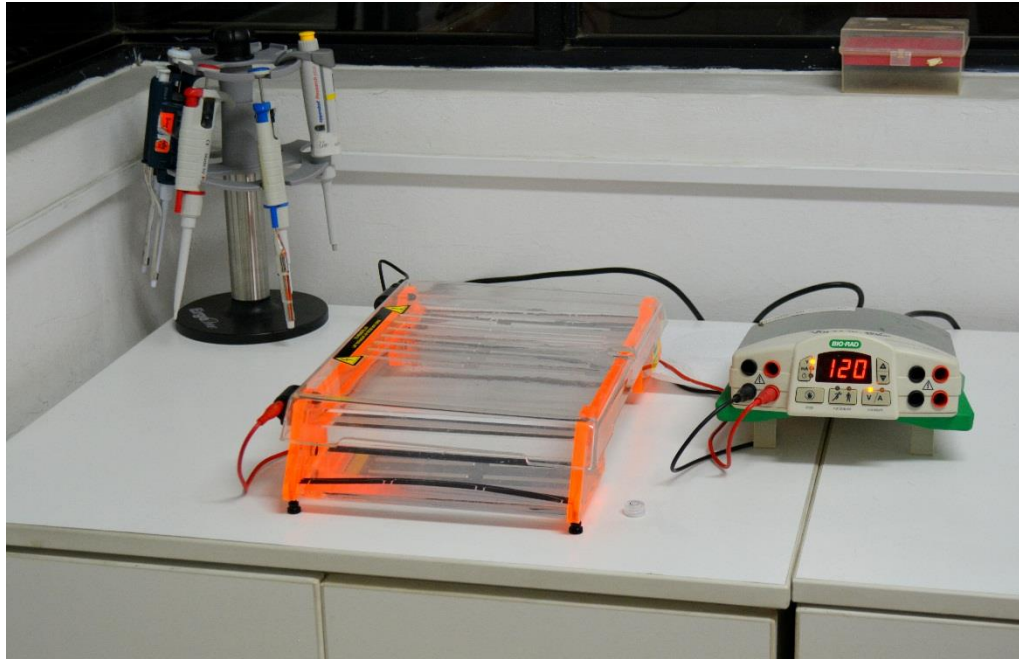
**Figura 45.-** Preparación de Mix para PCR convencional de OROV.



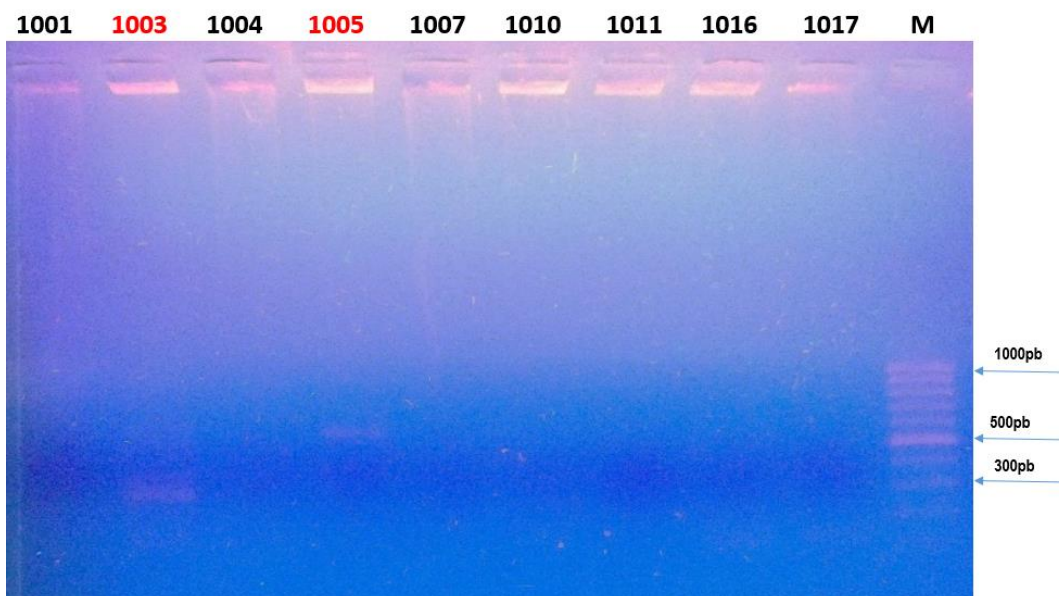
**Figura 46.-** Colocando la 17 $\mu$ L de Mix en cada tubo pequeño para luego agregar 3 $\mu$ L de muestra.



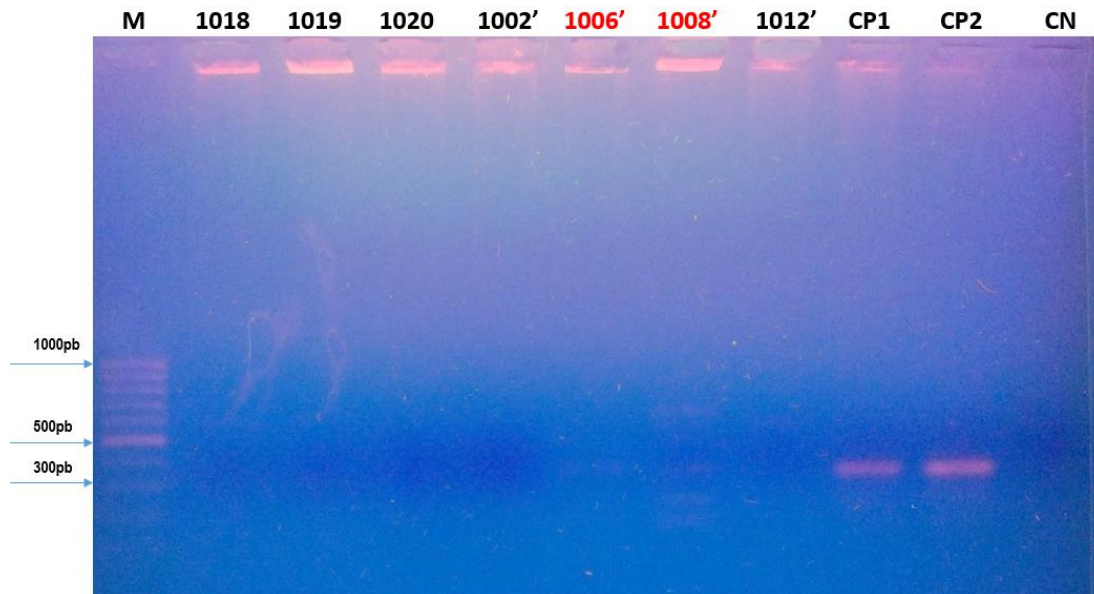
**Figura 47.-** Muestras colocadas en termociclador y programadas según los tiempos y temperaturas indicados.



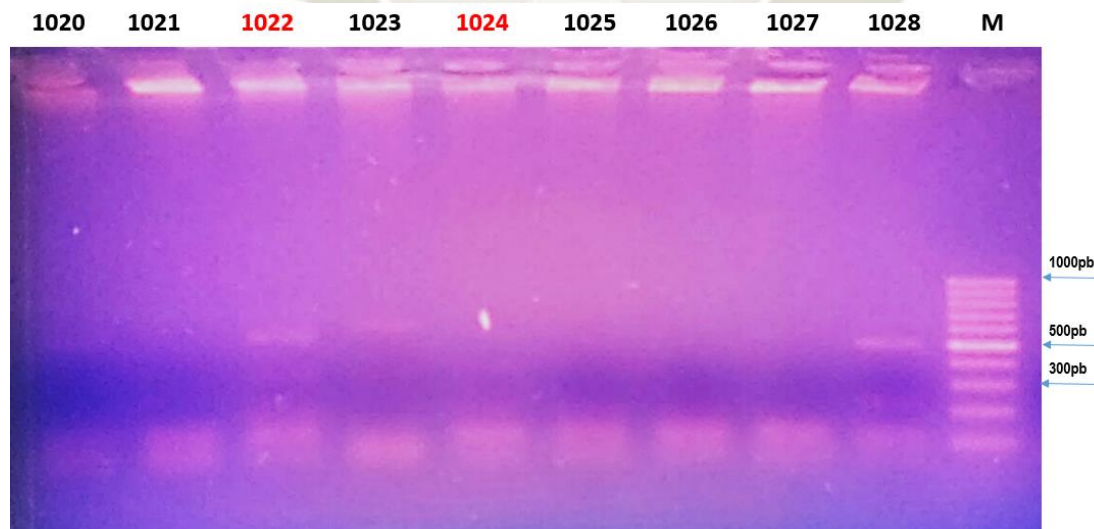
**Figura 48.-** Gel corriendo para la identificación de OROV a 120V durante 1 hora.



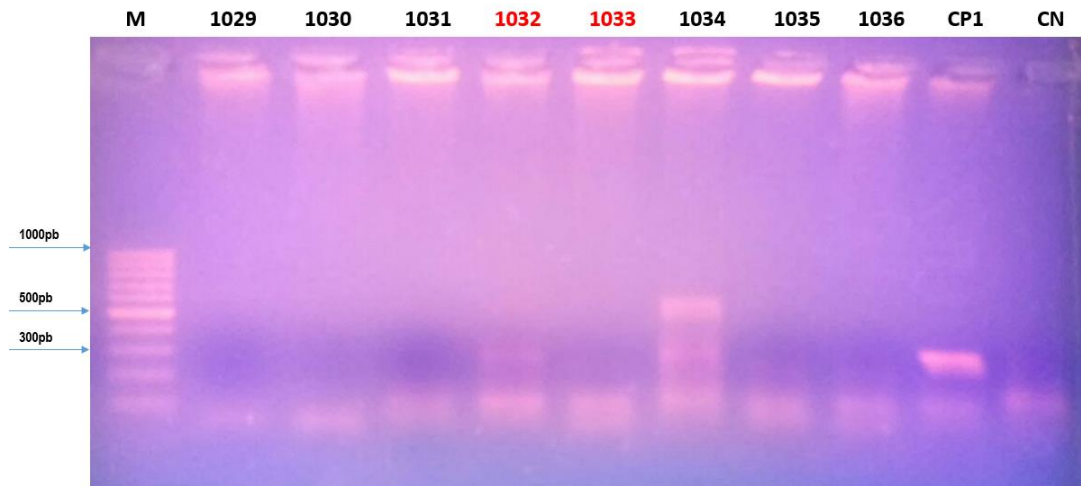
**Figura 49.-** Resultados PCR convencional de OROV



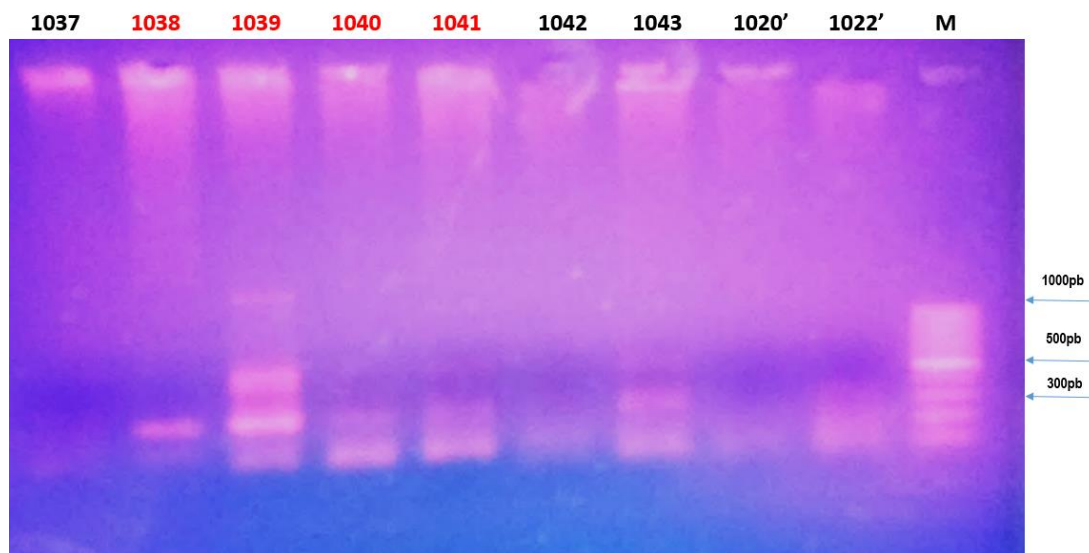
**Figura 50.-** Resultados PCR convencional de OROV



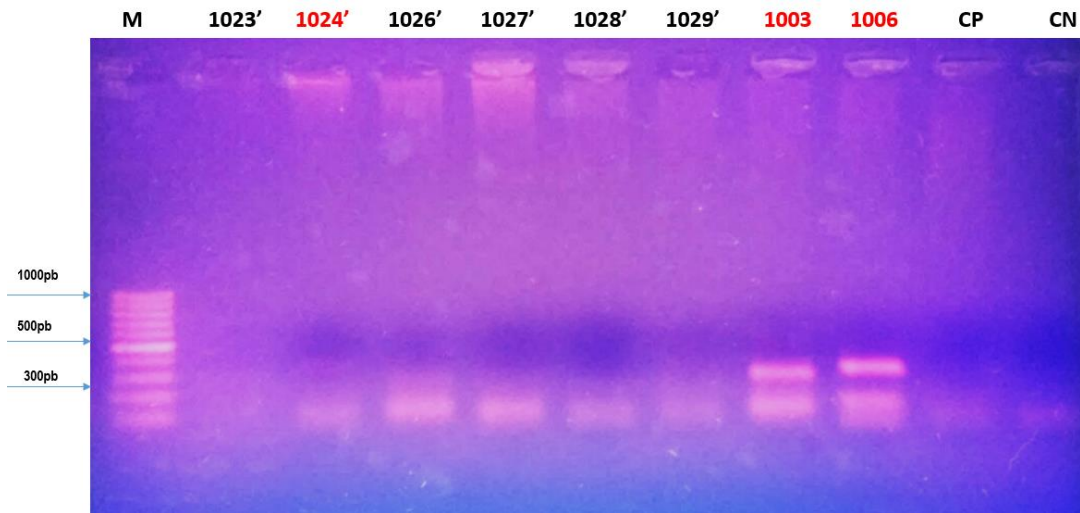
**Figura 51.-** Resultados PCR convencional de OROV



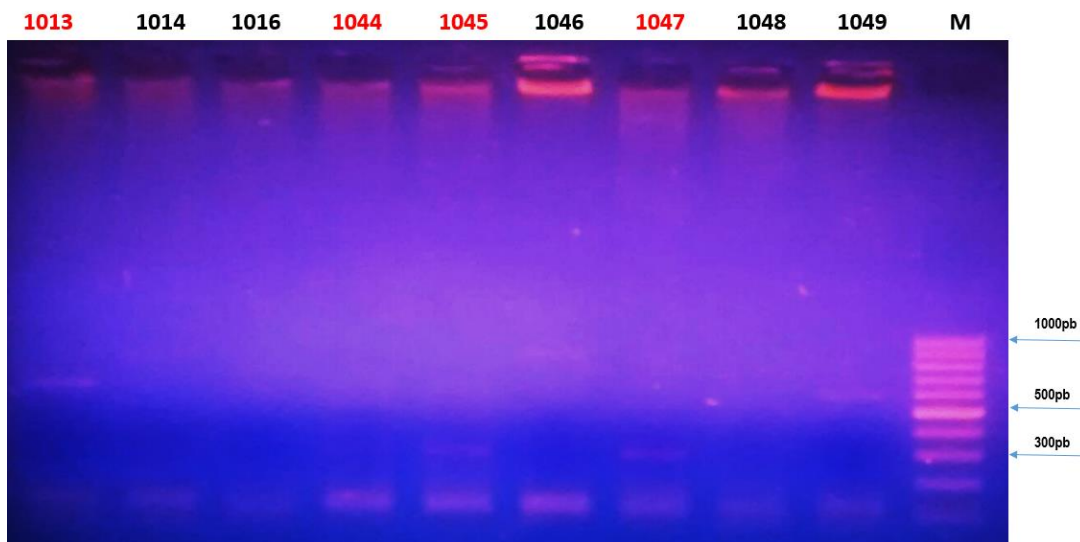
**Figura 52.-** Resultados PCR convencional de OROV



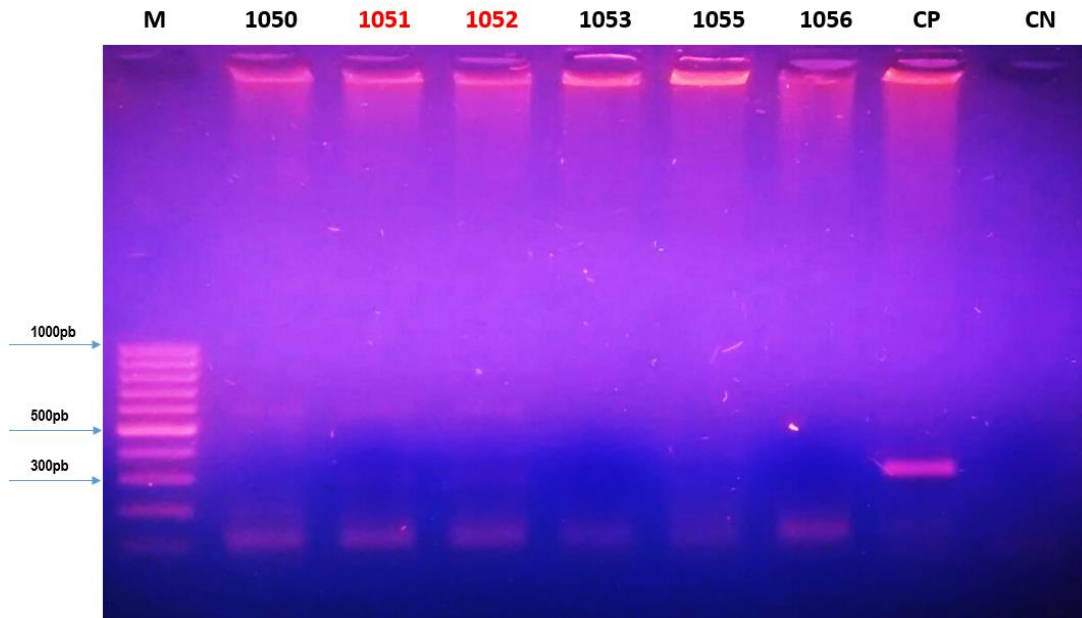
**Figura 53.-** Resultados PCR convencional de OROV



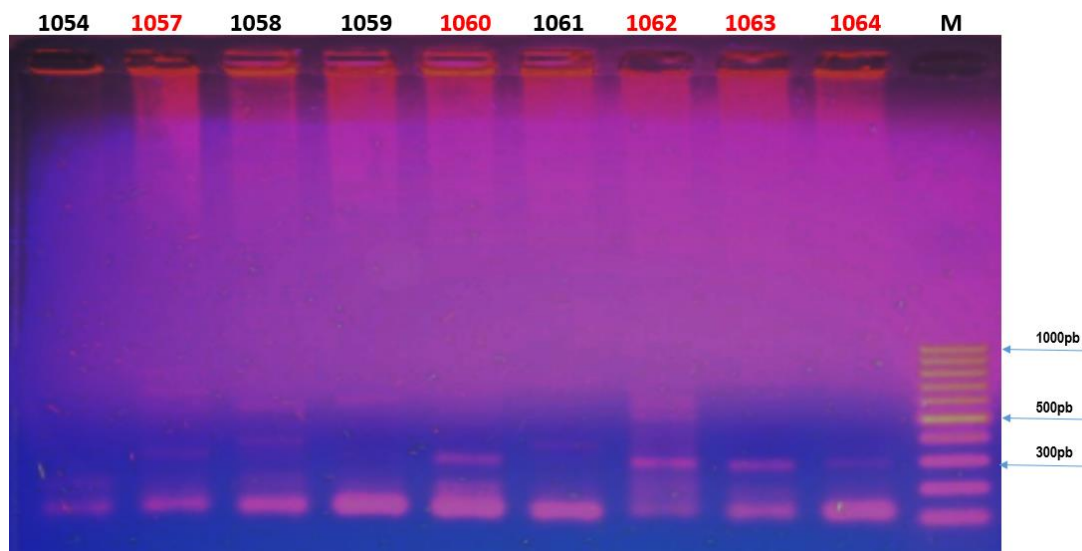
**Figura 54.-** Resultados PCR convencional de OROV



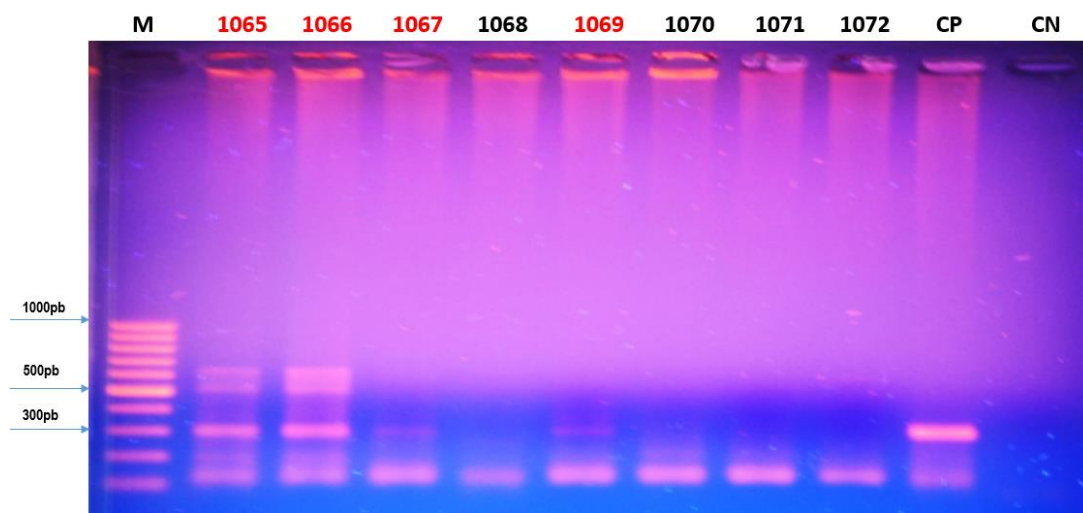
**Figura 55.-** Resultados PCR convencional de OROV



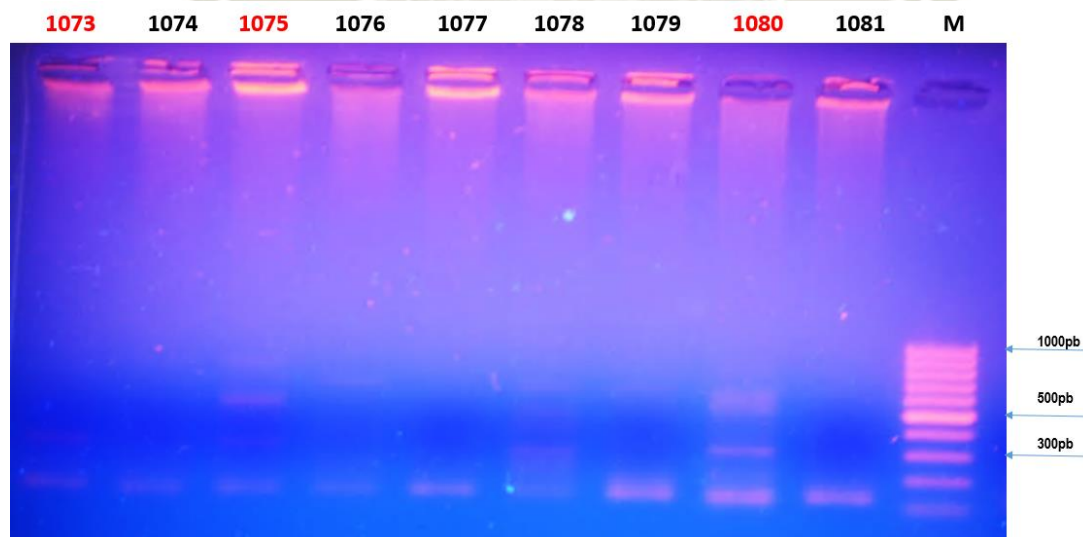
**Figura 56.-** Resultados PCR convencional de OROV



**Figura 57.-** Resultados PCR convencional de OROV



**Figura 58.-** Resultados PCR convencional de OROV



**Figura 59.-** Resultados PCR convencional de OROV

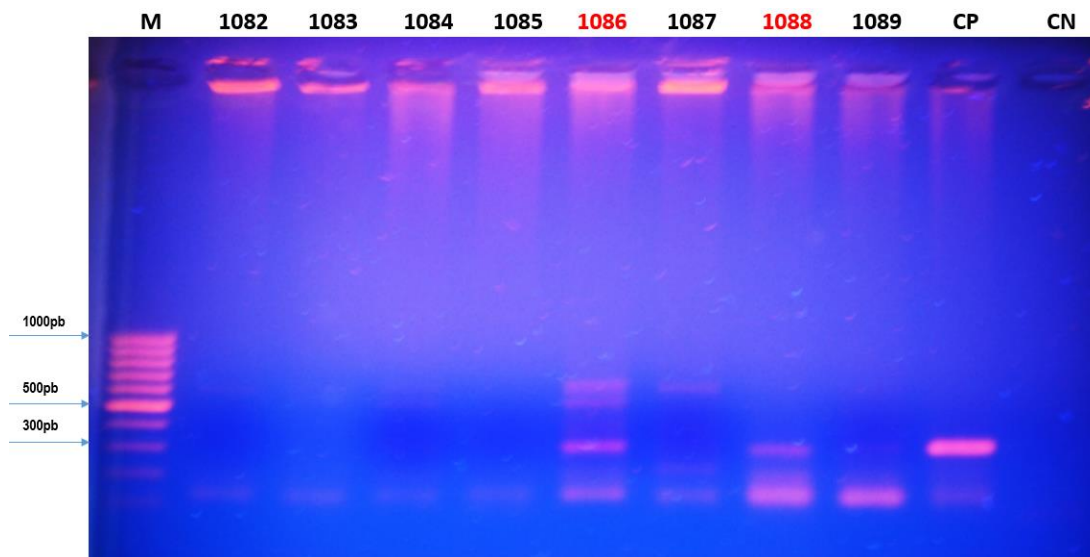


Figura 60.- Resultados PCR convencional de OROV

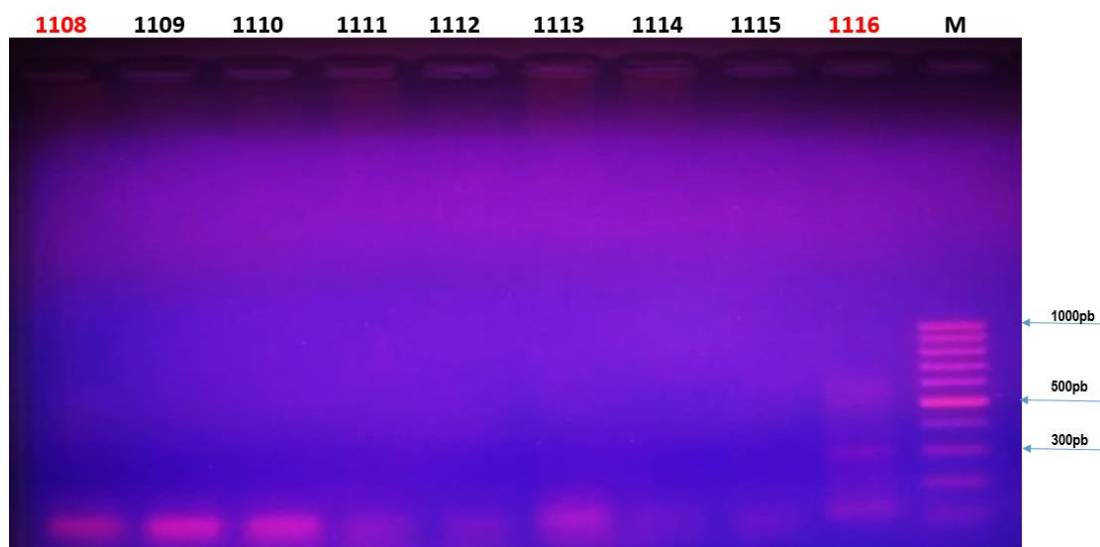
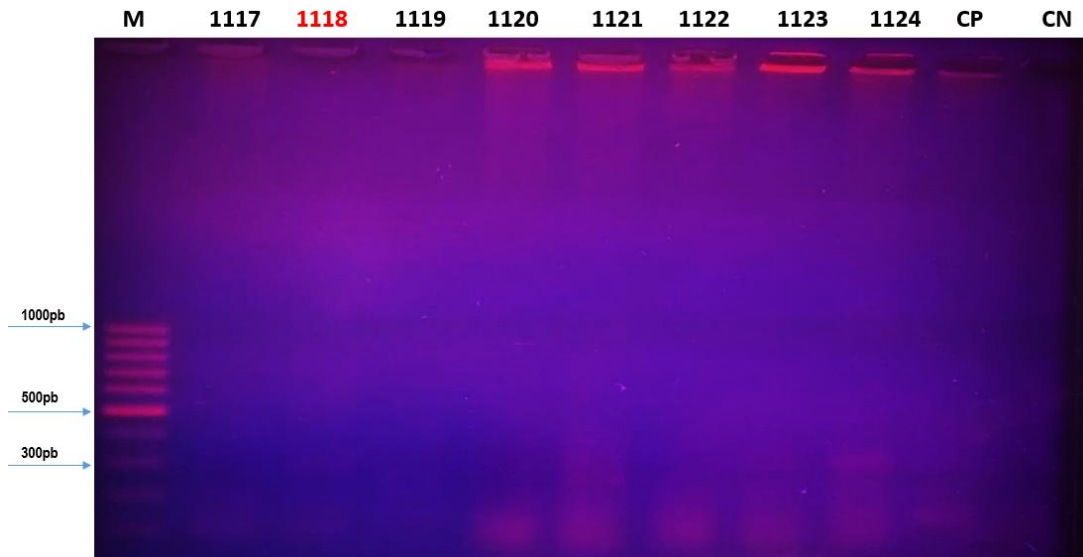
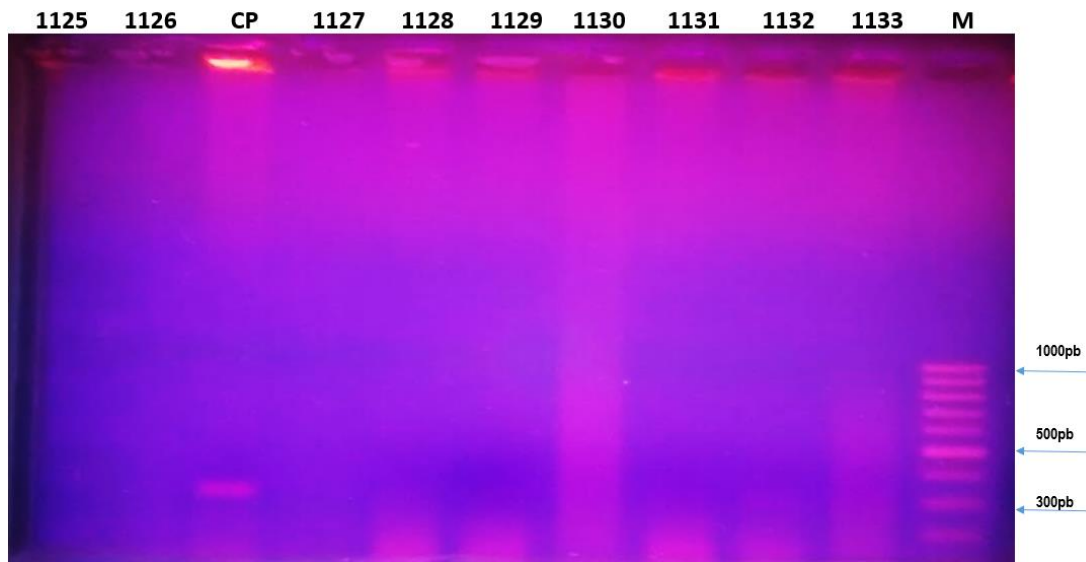


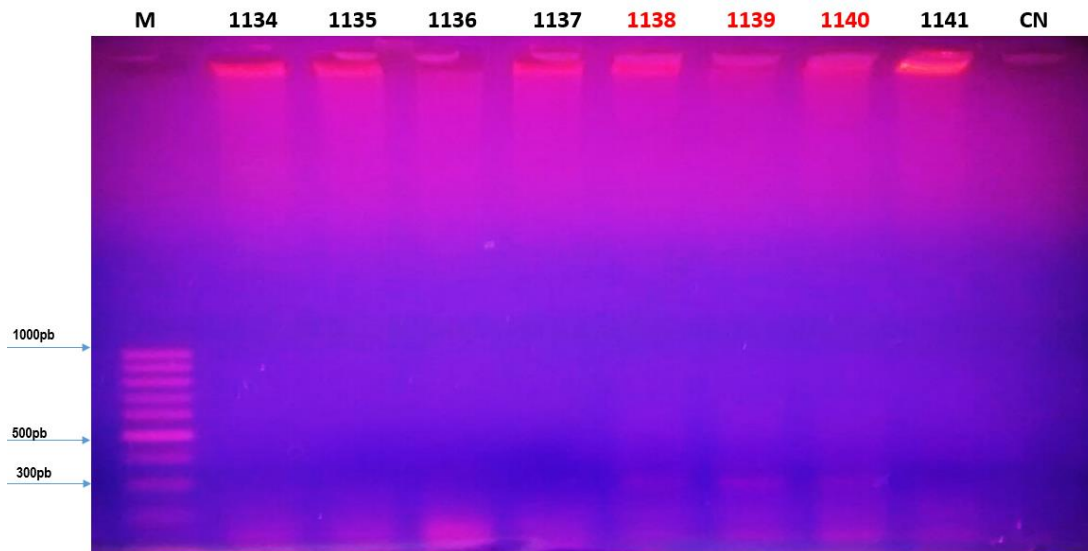
Figura 61.- Resultados PCR convencional de OROV



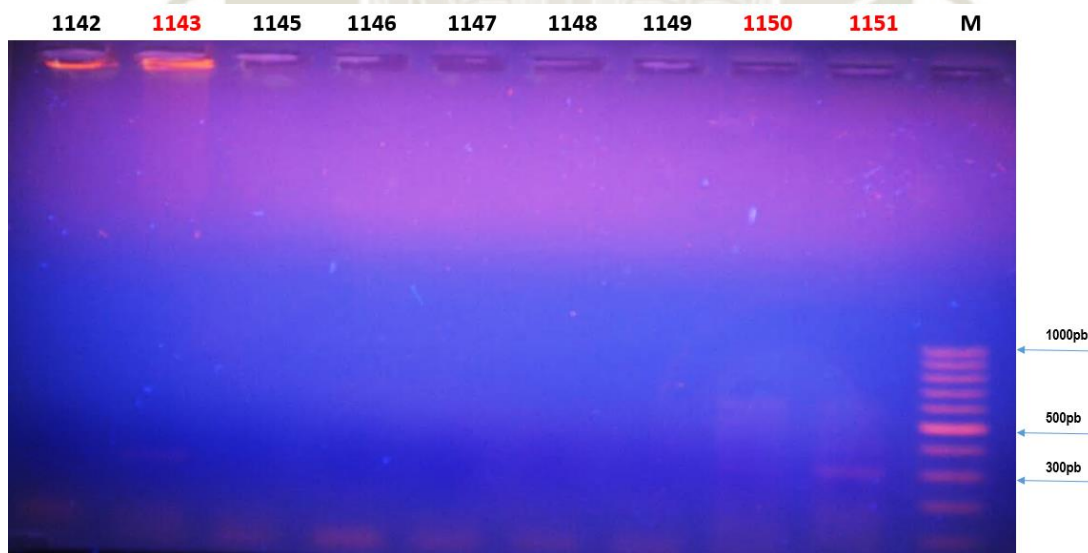
**Figura 62.-** Resultados PCR convencional de OROV



**Figura 63.-** Resultados PCR convencional de OROV



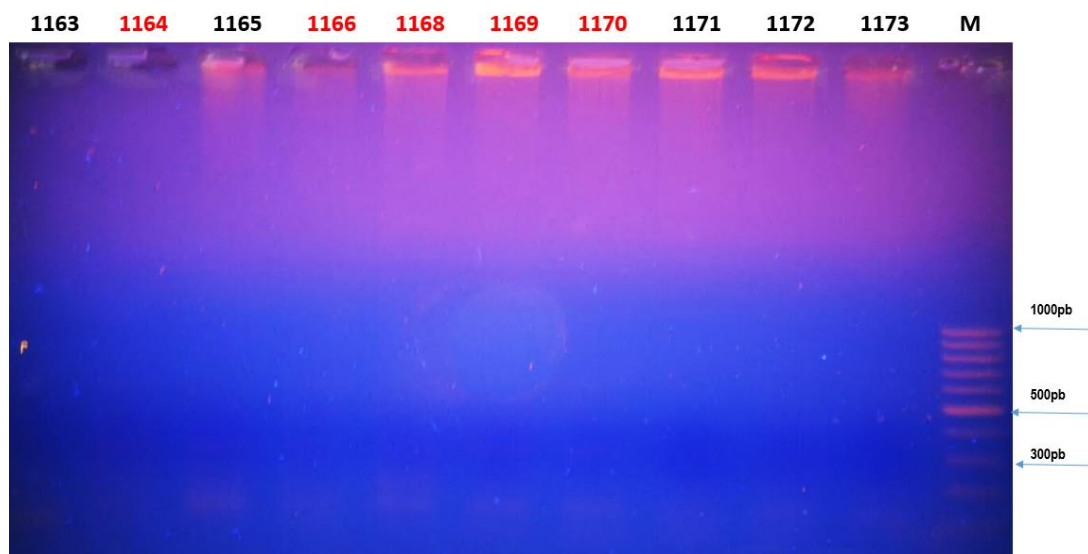
**Figura 64.-** Resultados PCR convencional de OROV



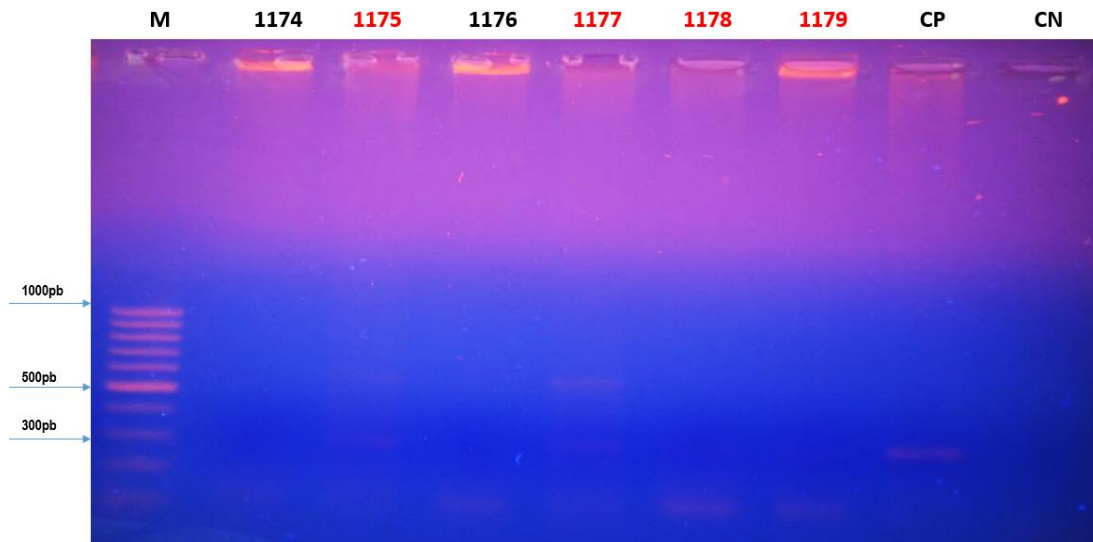
**Figura 65.-** Resultados PCR convencional de OROV



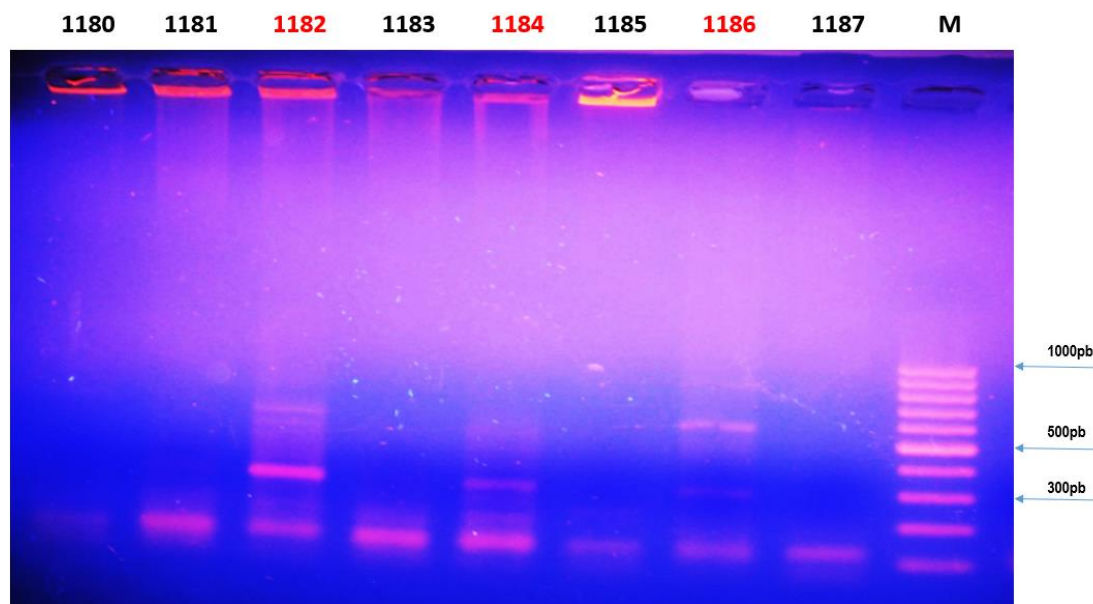
**Figura 66.-** Resultados PCR convencional de OROV



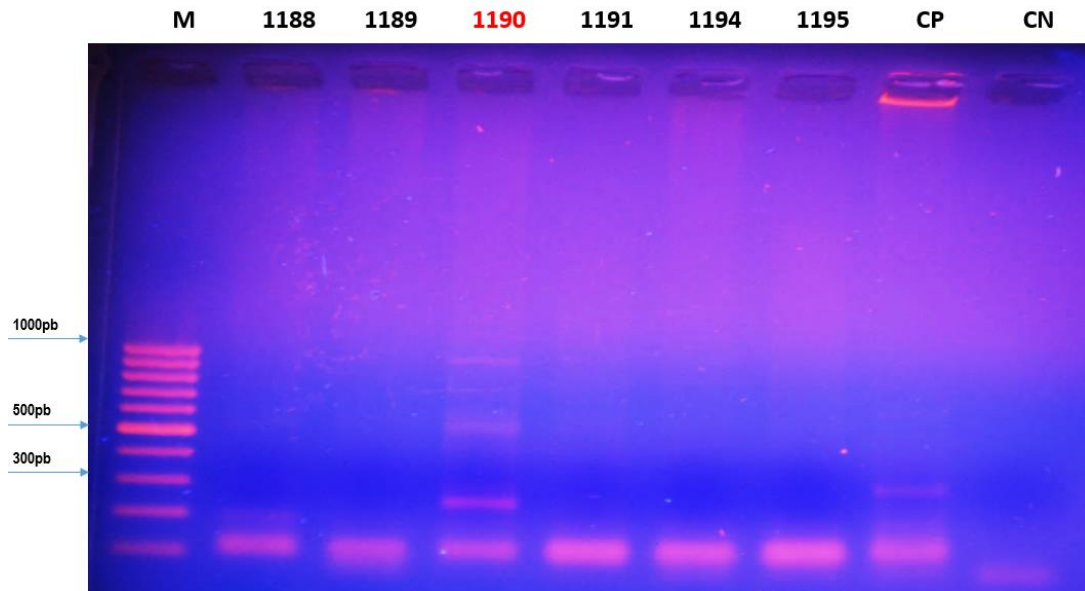
**Figura 67.-** Resultados PCR convencional de OROV



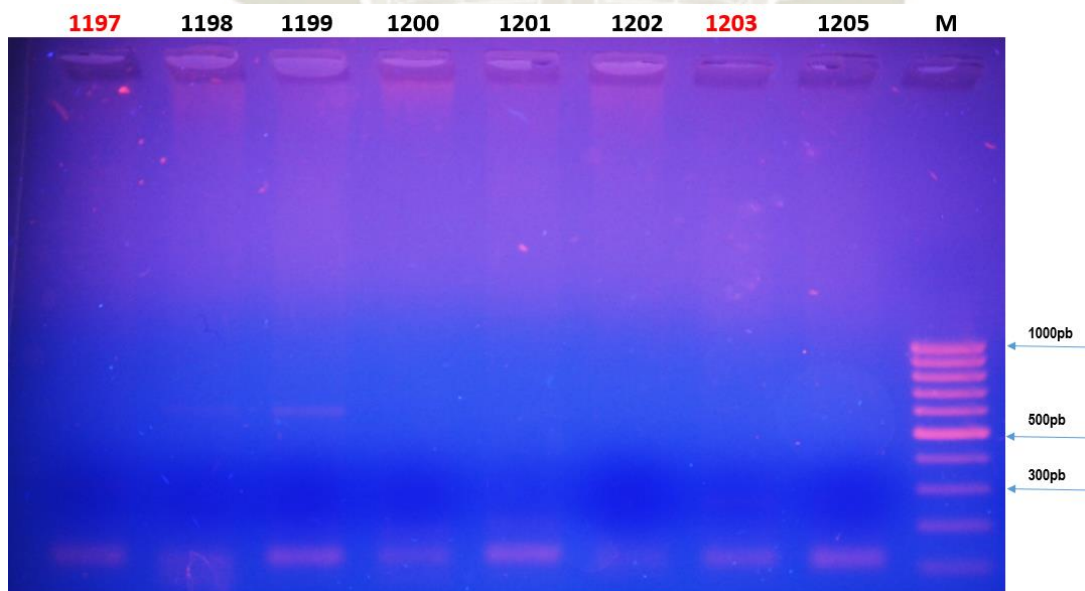
**Figura 68.-** Resultados PCR convencional de OROV



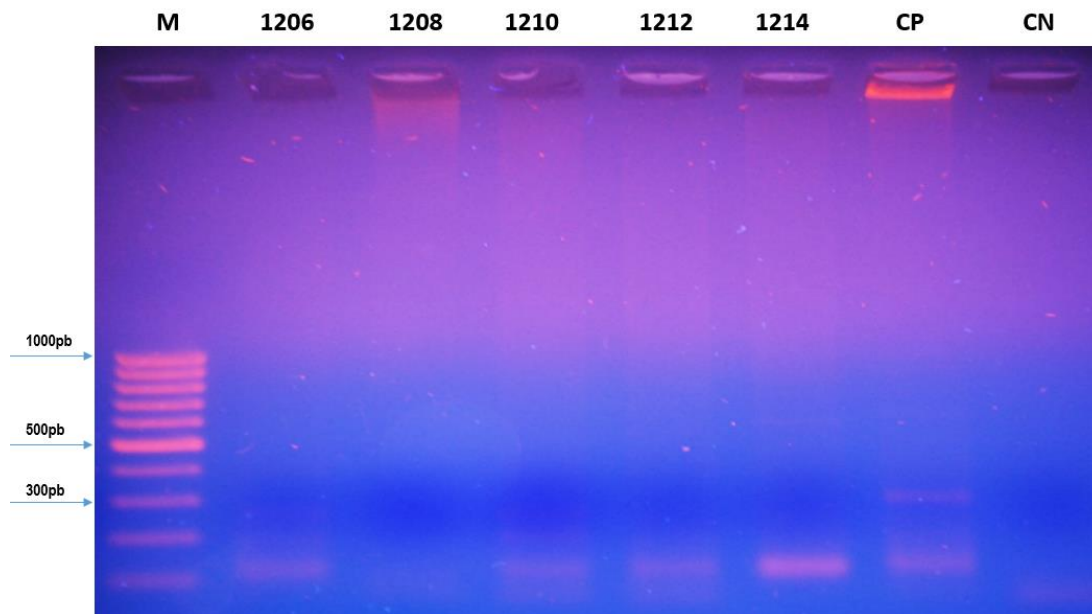
**Figura 69.-** Resultados PCR convencional de OROV



**Figura 70.-** Resultados PCR convencional de OROV



**Figura 71.-** Resultados PCR convencional de OROV



**Figura 72.-** Resultados PCR convencional de OROV