

## Artículo original

Identificación de Denv, Chikv y Zikv mediante el método  
TRIPLEX por rt-PCR en tiempo real en el LESP Jalisco, México

Ortiz-Eustasio A, K., Rodríguez-Salinas M., López-Rodríguez M., Quintero-Salgado E.

Laboratorio Estatal de Salud Pública. Secretaría de Salud Jalisco.  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa.

## Resumen

**Antecedentes:** Los arbovirus son un grupo de virus transmitidos por vectores artrópodos. Dengue, Chikungunya y Zika tienen un vector de transmisión en común; el mosquito *Aedes* (especies *Aegypti* y *Albopictus*), el cual genera gran impacto en la salud de los habitantes y en los servicios de salud, debido a las distintas fiebres causadas por este vector. En México y todo el mundo cada año se producen brotes epidemiológicos aumentando así la incidencia de casos y el riesgo de que más de la mitad de la población pueda adquirir alguna de estas enfermedades. **Objetivo:** De acuerdo a los Lineamientos para la Vigilancia de Dengue y otras Arbovirosis, el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Jalisco implementó el uso del reactivo TaqMan Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) para realizar la multidetección simultánea de los tres virus antes mencionados. **Material y Métodos:** Se realizó la extracción automatizada de ácidos nucleicos totales y detección de ARN viral por retrotranscripción y PCR en Tiempo Real para la identificación molecular. La detección y diferenciación de Dengue, Chikungunya y Zika se realizó en una sola reacción, y de las muestras positivas a Dengue se llevó a cabo la tipificación de los serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). **Resultados:** De 1,083 muestras que se analizaron 499 (46.07%) resultaron negativas a los 3 arbovirus, 413 (38.13%) fueron positivas a Virus Dengue (de los cuales 5 presentaron coinfección con Zika), se detectaron 6 (0.55 %) muestras positivas a Virus Chikungunya (solo 1 presentó coinfección con Zika), y 165 (15.23%) positivas a Zika. De la tipificación de Dengue se obtuvieron 374 (90.55%) a DENV-1, 4 (0.96%) a DENV-2 y 35 (8.47%) muestras no tipificables. La implementación del método Triplex agilizó el diagnóstico de los arbovirus. Esta técnica nos permite identificar co-infecciones en los pacientes. Es importante destacar que la oportunidad en la obtención de resultados mejora la prevención para evitar futuros brotes y epidemias que afecten a la población.

**Palabras clave:** Dengue, Zika, Chikungunya, *Aedes* arboris, Triplex, PCR.

## Abstract

**Background:** Arboviruses are a group of viruses transmitted by arthropod vectors. Dengue, Chikungunya and Zika have a transmission vector in common; the *Aedes* mosquito (*Aegypti* and *Albopictus* species), which generates a great impact on the health of the inhabitants and on health services, due to the different fevers caused by this vector. In Mexico and throughout the world, epidemiological outbreaks occur each year, increasing the incidence of cases and the risk that more than half of the population may acquire any of these diseases. **Objective:** According to the Guidelines for the Surveillance of Dengue and other Arbovirosis, the State Laboratory of Public Health of Jalisco implemented the use of the TaqMan Zika Virus Triplex Kit reagent (ZIKV / DENV / CHIKV) to perform the simultaneous multidetection of the three aforementioned viruses. **Material and Methods:** Automated extraction of total nucleic acids and detection of viral RNA by retrotranscription and Real Time PCR for molecular identification were performed. The detection and differentiation of Dengue, Chikungunya and Zika was carried out in a single reaction, and from the positive samples to Dengue the typing of serotypes was carried out (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4). **Results:** From 1,083 samples that were analyzed 499 (46.07%) were negative to the 3 arboviruses, 413 (38.13%) were positive to Dengue Virus (of which 5 had coinfection with Zika), 6 (0.55%) positive samples were detected to Virus Chikungunya (only 1 had coinfection with Zika), and 165 (15.23%) positive to Zika. From Dengue typing, 374 (90.55%) were obtained to DENV-1, 4 (0.96%) to DENV-2 and 35 (8.47%) non-typeable samples. The implementation of the Triplex method expedited the diagnosis of arboviruses. This technique allows us to identify co-infections in patients. It is important to emphasize that the opportunity to obtain results improves prevention to avoid future outbreaks and epidemics that affect the population.

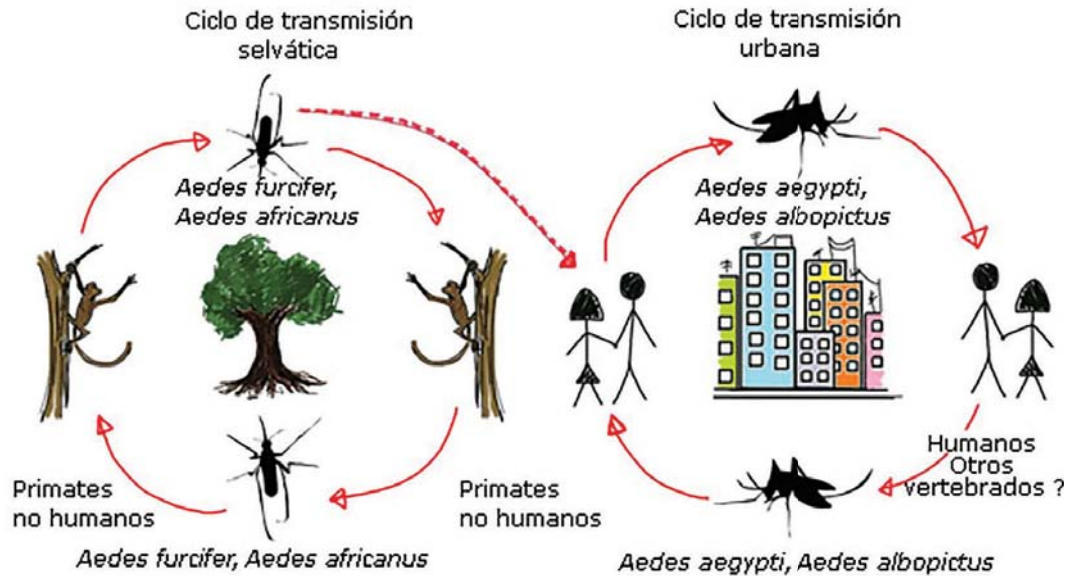
**Key words:** Dengue, Zika, Chikungunya, *Aedes*, Arbovirus, Triplex, PCR.

## Introducción

Las enfermedades de Fiebre adquiridas por algún arbovirus son transmitidas por un grupo de vectores artrópodos de los cuales los principales transmisores son las hembras mosquito de *Aedes* (*Aegypti* y *Albopictus*),

debido a que son “domésticos”, esto es porque les gusta habitar en las viviendas humanas, y por ende, si un mosquito hembra está infectada con algún virus Dengue, Chikungunya o Zika, puede ser un riesgo potencial para las personas que ahí habitan,<sup>1</sup> esto se debe al ciclo de transmisión (ver Figura 1).

**Figura 1.**  
Ciclos de transmisión y agentes transmisores del virus Chikungunya



A nivel mundial las Fiebres por arbovirus (Dengue, Chikungunya y Zika) son de las más comunes y más de la mitad de la población puede contraer algún tipo de estas enfermedades, las cuales, afectan principalmente a los países tropicales.<sup>3</sup>

En México estas enfermedades se han propagado de manera rápida; debido a las características meteorológicas del país: calor, humedad, el crecimiento poblacional, los problemas socioeconómicos que se presentan (como la falta de agua potable que obliga a las personas a usar contenedores de agua para su uso y consumo sin la precaución de taparlos incrementando el riesgo de infección). En 2009 en el estado de Jalisco se presentó un gran brote registrado en el país de fiebre por Dengue, en 2015 y en 2016 se presentaron dos fiebres más, las cuales fueron fiebre por Chikungunya y fiebre por Zika respectivamente, logrando así que los habitantes del estado se contagiaron y que el resto de este quedara vulnerable a cualquier tipo de fiebre por alguno de estos arbovirus.<sup>4</sup>

A partir del brote epidemiológico de Dengue en el 2009 la OMS, OPS, la Secretaría de Salud entre otras dependencias, han realizado un gran esfuerzo para combatir estas enfermedades, realizando brigadas preventivas, capacitando a su personal y a la población e implementando nuevos métodos de detección, las cuales son diversas técnicas para la identificación de estos arbovirus, una de ellas es la detección de ARN viral. La retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.<sup>5</sup>

Al inicio del brote epidemiológico en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Jalisco (LESPJ) se realizaba solamente la tipificación de Dengue a partir de las muestras serológicas positivas a la proteína NS1 por la técnica de ELISA, según el algoritmo correspondiente en ese periodo de tiempo. La técnica molecular utilizada para la tipificación es el protocolo de Chang que emplea una RT-PCR con sondas TaqMan para cada serotipo y se un solo juego de iniciadores.<sup>6</sup>

Posteriormente se validó en el Indre, el protocolo de Barbara Johnson para realizar la tipificación del virus de Dengue, esta técnica consiste en utilizar RT-PCR Fourplex para conocer los diferentes serotipos del virus de Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 Y DENV-4) la cual se utilizan sondas y cebadores específicos para cada tipo, todos estos en una sola mezcla de reacción con el fin de optimizar el tiempo de proceso.<sup>7</sup> Este nuevo protocolo se transfirió a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) como una nueva opción para la tipificación de DENV.

Desde el primer brote epidemiológico hasta el 2016 en el LESPJ, se realizaba una RT-PCR para conocer cada uno de los arbovirus (CHIKV/ZIKV) que se encontraban en la muestra. La tipificación de DENV se realizaba con la misma técnica partiendo de una muestra positiva a Dengue (ELISA).

A partir del 2017 el LESPJ se apegó a los lineamientos actualizados para el diagnóstico de los diferentes arbovirus y se implementó el método de Triplex fabricada por Thermo Fisher Applied Bio System, esta prueba consiste en usar muestra de suero de paciente diagnosticado como “caso probable” o “sospechoso” para identificar los tres arbovirus (DENV/CHIKV/ZIKV) que pudieran estar presentes; esto se realiza a través de una RT-PCR, las muestras deben cumplir con los criterios del algoritmo que ha establecido la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP), como la oportunidad de toma (de 0-5 días desde la aparición de los síntomas característicos a la toma) de alguna de los arbovirus que comprende la fase aguda de la enfermedad.<sup>8</sup>

## Materiales y método

Se analizaron las muestras que se recibieron en el LESPJ y que cumplían con los criterios de aceptación de los Lineamientos actuales.

La obtención de los ácidos nucleicos purificados, se realizó a través del uso del equipo automatizado MAGNA PURE LC 2.0 de ROCHE, el cual usa perlas magnéticas para la separación de los mismos.

A partir de Octubre del 2017, el LESPJ adquirió, implementó y comenzó a analizar estas muestras con el TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/

CHIKV) de Applied Biosystem, para realizar la multidetección simultánea de Dengue, Chikungunya y Zika con el fin de unificar métodos de diagnóstico en la RNLSP.

El Kit fue diseñado para detectar ARN viral, para los Virus del Zika con linaje asiático, Virus del Dengue y Virus de Chikungunya; a partir de muestras de suero, de igual manera detecta el control endógeno humano PPIA (Ciclofilina A) para monitorear la recuperación de ácido nucleico y que a la vez sirve como control de proceso para la RT-PCR. El kit incluye en un pellet liofilizado todos los reactivos necesarios, como primers y sondas específicos para cada uno de los arbovirus, enzima TaqMan, buffer, agua grado biología molecular, nucleótidos y el control PPIA; después de adicionar la muestra de ARN viral los reactivos homogenizados están listos para la RT-PCR en Tiempo Real.<sup>10</sup>

El protocolo de amplificación se programó en el termociclador ABI 7500 Fast en el cual se procesaron las muestras de ácidos nucleicos purificados. Las muestras que resultan positivas a Dengue, se tipificaron para conocer los serotipos circulantes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 Y DENV-4), mediante el protocolo de tipificación de Chang; las muestras no tipificables, fueron enviadas al Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para ser analizadas por métodos de Referencia.

Las muestras son analizadas por medio de plots de amplificación, donde para tomarse como positiva se debe presentar una curva sigmoidea entre el rango de 20 a 35 ciclos (significa que la muestra presenta carga viral positiva a alguno de los arbovirus, los cuales se identifican por medio de colores, para DENV la curva es color azul, para CHIKV es color verde, para ZIKV es color rojo y para el control PPIA es color amarillo (ver Figura 2).

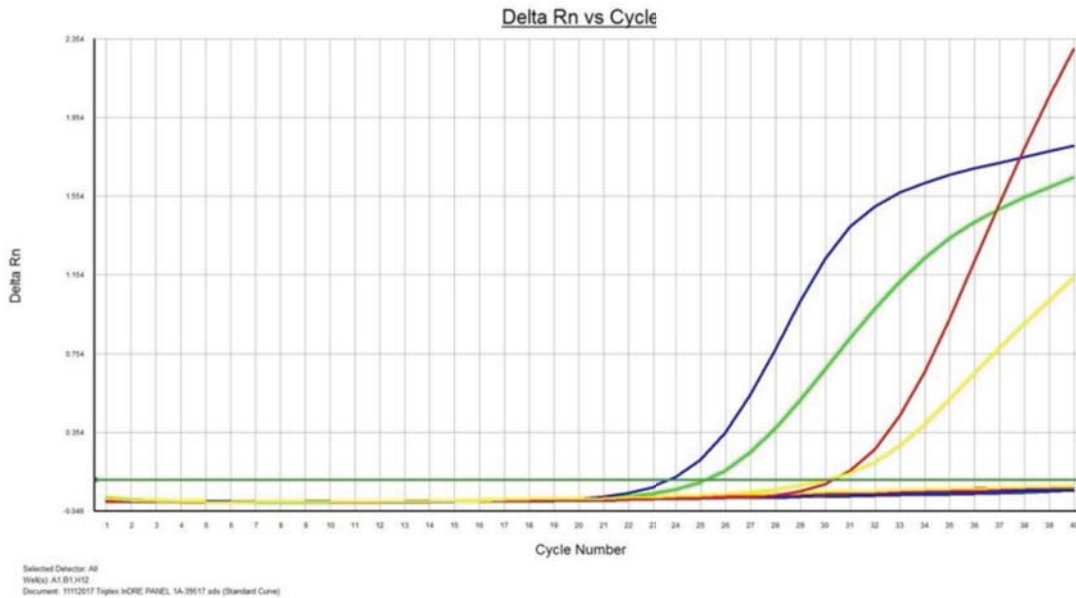
Esta prueba ha sido validada satisfactoriamente por el InDRE, y a la RNLSP se les realizan paneles de evaluación, que son pruebas de desempeño diagnóstico que permiten asegurar la correcta estandarización de la prueba para el diagnóstico de estas enfermedades. Para asegurar la confiabilidad de los resultados, el 10% de muestras negativas y 100% de las muestras positivas son enviadas al InDRE, y así se pueden identificar áreas de oportunidad y confirmar resultados del diagnóstico diferencial así como fallas técnicas u operacionales.

**Resultados y discusión**

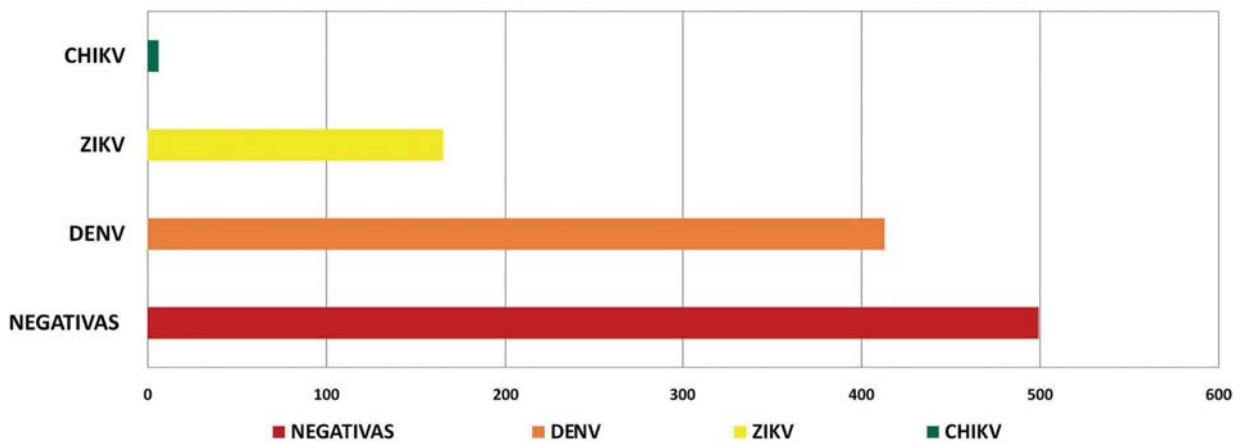
De un total de 1,083 muestras que llegaron al LESPJ para ser analizadas por medio del método de Triplex se obtuvieron los siguientes resultados:

413 (38.13%) muestras positivas al Virus Dengue, 6 (0.55%) positivas a Virus Chikungunya y 165 (15.23%) positivas a Virus Zika; mientras que 499 (46.07%) de las muestras fueron negativas a cualquiera de estos arbovirus (ver Figura 3).

**Figura 2.**  
Plot de amplificación de RT-PCR en Tiempo Real



**Figura 3.**  
Total de muestras positivas para cada arbovirus, así como negativas



Cabe destacar que con el uso del Triplex se han podido detectar 5 coinfecciones de Virus Dengue con Virus Zika, de las cuales 3 son pertenecientes a la zona metropolitana (Guadalajara, Tlaquepaque y Zapopan), probablemente por ser el rea donde radica la mayor parte de la población en el estado, también se encontró una coinfección en el municipio de Tala y otra en el municipio de san Gabriel; y se confirmó solo 1 coinfección de Virus Chikungunya con Virus Zika en el municipio de Tomatlán que pertenece a la zona costera norte del estado.

Estas detecciones con el algoritmo anterior y con los RT-PCR individuales eran difíciles de encontrar, ya que no se realizaban al 100% de las muestras.

De los 413 muestras positivas a Dengue se tipificaron e identificaron 374 del tipo DENV-1, que es el serotipo que circula con mayor frecuencia en el estado, 4 del tipo DENV-2 y 35 no subtipificados, esto no quiere decir que la muestra no presente el virus solo que la carga viral es muy baja por lo que el equipo ya no es capaz de detectarla (ver Figura 4).

## Conclusión

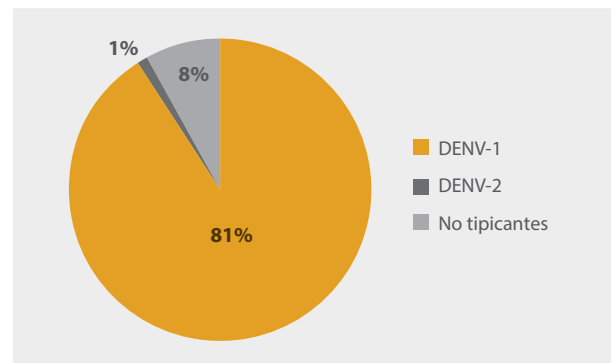
La implementación del método Triplex a mejorado y agilizado la oportunidad de diagnóstico ya que en una sola reacción podemos identificar cualquiera de los 3

arbovirusvirus Dengue, Chikungunya y Zika, y con ello obtener un resultado más oportuno.

Esta técnica permite identificar co- infecciones en los pacientes, lo que nos pone en alerta por la facilidad con lo que la población se esta infectando hasta por dos arbovirus al mismo tiempo.

Es importante destacar la prevención y control de los vectores para evitar futuros brotes que afecten a la población.

**Figura 4.**  
**Tipificación de muestras positivas a Dengue**



### Contacto:

Laboratorio Estatal de Salud Pública. Secretaría de Salud Jalisco.  
e-mail: biomol\_lespj@yahoo.com.mx

## Referencias bibliográficas

- Arredondo-García JL, Méndez-Herrera A, Medina-Cortina H. *Arbovirus en Latinoamérica*. Acta Pediatr Mex. 2016 mar; 37(2):111-131.
- Martínez F L., Torrado N. Y. *Fiebre Chikungunya*. Rev. Cubana Med. 2015; 54 (1).
- Dengue y Dengue Hemorrágico. *Centro de control y prevención de enfermedades CDC*. [Disponible en]: <http://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/dengue/>
- Organización Mundial de la Salud OMS. *Dengue y dengue grave. Nota descriptiva No. 117* Marzo 2018 [disponible en]: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>
- Instituto Nacional de Salud Pública. *El dengue en México: un problema prioritario de salud pública*. Salud Pública Méx 1995; Vol. 37(sup 1):12-20
- Li-Jung Chien,1 Tsai-Ling Liao,1 Pei-Yun Shu,1 Jyh-Hsiung Huang,1 Duane J. Gubler,2,† and Gwong-Jen J. Chang2. *Development of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays To Detect and Serotype Dengue Viruses*. J Clin Microbiol. 2006 Apr; 44(4): 1295–1304. PMID: PMC1448645
- Barbara W. Johnson,\* Brandy J. Russell, and Robert S. Lanciotti. *Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay*. J Clin Microbiol. 2005 Oct; 43(10): 4977–4983. PMID: PMC1248506
- Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de Dengue por laboratorio*. Dirección general de la epidemiología. INDRE.
- Lineamiento para la vigilancia por laboratorios del Dengue y otras arbovirosis*. Dirección general de la epidemiología. INDRE.
- TaqPath™ Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) (0.1-mL) Product Information Sheet. Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific. 2016.



## Bibliografía

- Barrera C. A., Díaz R. R., Viniegra O. A., Grajales M. C., Dávila T. J. *Lineamientos técnicos para la prevención y tratamiento de la fiebre Chikungunya*. Rev Med Inst Mex Seg Soc. 2015; 53(1):102-19.
- Center for Disease Control and Prevention. *Areas with Zika*. Disponible en: <http://www.cdc.gov/zika/geo/index.html>
- *Detección entomoviológica de Dengue en México*. Dirección General de Epidemiología DGE del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica InDRE. [disponible en]: [http://www.indre.salud.gob.mx/interior/deteccion\\_ento\\_virologica\\_de\\_dengue.html](http://www.indre.salud.gob.mx/interior/deteccion_ento_virologica_de_dengue.html)
- *Dengue. Guías para el Diagnóstico, Tratamiento, Prevención y Control*. TDR, OMS. Edición 2009. Distribuido por OPS en 2011.
- *Dengue 2012. Herramientas (educativas) y documentos clave*. Secretaría de Salud, México.
- De la Mora-Covarrubias A, Jiménez-Vega F, Treviño-Aguila. *Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos Aedes (Stegomyia) aegypti de Ciudad Juárez, Chihuahua, México*. Salud Pública de México, 2010; 52 (2):127-133.
- European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). *Rapid Risk assessment: Zika Virus infection out-break, French Polynesia*. Febrero 2014.
- Musso D, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ, *Zika virus: following the path of dengue and Chikungunya?* Lancet. 2015; 386(9990):243-4.
- *Manual Estandarizado para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vectores*. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, México
- *Lineamientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica y diagnóstico por laboratorio de infección por virus Zika*. Dirección General de epidemiología Secretaría de Salud, Dic 2015.
- *Lineamientos para el manejo clínico de los pacientes con el virus Chikungunya (CHIKV)*. Ministerio de Salud y Protección Social. República de Colombia.
- Loreto H. M., Díaz C. C., Garrido L. *Fiebre Chikungunya. Manifestaciones reumáticas de una infección emergente en Europa*. Reumatol Clin. 2015; 11:161-4-Vol.11 Núm. 3
- Organización Panamericana de la Salud (OPS)/ Organización Mundial de la Salud. *Chikungunya. Nota descriptiva N° 327*. México. Marzo, 2018.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS)/ Organización Mundial de la Salud. *Enfermedad por virus de Zika. Nota descriptiva actualizada*. México. Actualización epidemiológica, Octubre 2015.
- Restrepo J. B. N. *Infección por el virus del Chikungunya*. Rev CES Med. 2014; 28(2):313-323.
- Secretaría de Salud. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. *Enfermedad por virus de Chikungunya*. Marzo, 2015.
- Secretaría de Salud. Dirección General de Regulación Sanitaria. *Tipificación del Virus Chikungunya mediante RT-qPCR Tiempo Real*. (Documento Controlado).
- Zanluca C, de Melo VC, Mossiman AL, Dos Santos CN, Luz K *First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(4):569-72.