

Producción de plásmidos recombinantes para su uso como controles de la técnica RT-PCR para el diagnóstico de los virus Chikungunya y Zika

Production of recombinant plasmids as controls of diagnosis technique (RT-PCR) of Chikungunya and Zika viruses

Nathaly Andrea Mayora Hernández¹, Luis Gerardo Medina Pestana¹, José Antonio Valor Páez¹, Vanessa Karina Vera Bellafiore¹, Jesús David Reyes Osorio¹ & Daría Elena Camacho García^{1,2}

RESUMEN

El diagnóstico molecular de arbovirus es indispensable para identificar agentes etiológicos, particularmente en zonas endémicas para al menos uno de ellos. Estas deben ser validadas con controles positivos, los cuales están clásicamente representados por virus vivos, cuya obtención puede ser riesgosa, laboriosa y costosa. El objetivo de este estudio fue producir plásmidos recombinantes para su uso como controles positivos en la validación de la técnica RT-PCR para el diagnóstico de los virus Chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV). A partir de los ARN extraídos de los virus [CHIKV (LARD809-GC) y ZIKV (MR766)] se obtuvieron por RT-PCR fragmentos parciales de ADN correspondientes a secuencias nucleotídicas de los genes E1 y NS5 de los virus Chikungunya y Zika, respectivamente, para ser clonados en el plásmido comercial pGEM[®]-T Easy. La clonación se confirmó mediante PCR de colonias y PCR de ADN plasmídicos extraídos a partir de las colonias recombinantes. Se logró la producción de dos plásmidos recombinantes CHIKV-E1/pGEM[®]-T Easy y ZIKV-NS5192/pGEM[®]-T Easy con cada una de las secuencias especificadas, para su uso en la validación y control de las técnicas moleculares descritas en este reporte, para el diagnóstico de agentes virales CHIKV y ZIKV, evitando la manipulación de cultivos celulares y garantizando una fuente confiable de controles positivos.

Palabras clave: Chikungunya, Zika, ADN recombinante, Diagnóstico, RT-PCR.

SUMMARY

The use of molecular techniques for the viral diagnosis requires the use of positive controls. Classically, the controls are live viruses, whose manipulation may be risky, laborious and expensive. The objective of this study was produced recombinant plasmids to obtain cloned sequences of Chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) virus for their use as controls in the specific diagnostic by RT-PCR. DNA fragments were obtained from RNA [CHIKV (LARD809-GC) and ZIKV (MR766)] using specific primers to amplify the nucleotide sequences from fragments of Envelope 1 protein (E1) of CHIKV and Non Structural 5 protein (NS5) of ZIKV genomes. The 548 bp (CHIKV) and 192 bp (ZIKV) bands were purified from agarose gel and ligations were performed with the cloning vector pGEM[®]-T Easy. The *Escherichia coli* XL1-Blue MRF⁺ cells were transformed with the ligation mixture, the recombinant colonies were identified by colony PCR using the specific primers to the specific viral agent. One recombinant colony from CHIKV and six recombinant colonies from ZIKV were obtained from which plasmidic DNAs were extracted. The plasmidic DNAs were used as reaction controls in CHIKV and ZIKV RT-PCR, obtaining the characteristic bands. The cloning of the sequences was successful to produce the recombinant plasmids (CHIKV-E1/pGEM[®]-T Easy y ZIKV-NS5192/pGEM[®]-T Easy) to use in the validation of RT-PCR techniques.

Keywords: Chikungunya, Zika, recombinant DNA, diagnosis, RT-PCR.

¹ Laboratorio Regional de Diagnóstico e Investigación del Dengue y otras Enfermedades Virales (LARDIDEV)/Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED), Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

² Departamento Clínico Integral, escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo (sede Aragua, Maracay, Venezuela).

ORCID: 0000-0003-1711-3530 / 0000-0002-4599-1608 / 0000-0003-0883-7713 / 0000-0003-2408-5718 / 0000-0003-2402-4974 / 0000-0002-4475-060x

*Autor de Correspondencia: marcomarruffo@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de infecciones virales es de especial interés, particularmente de agentes que causan enfermedades que impactan en la salud pública, como es el caso de los arbovirus. Entre estos, se describen los flavivirus y alfavirus, los cuales hacen estragos en la salud de las poblaciones donde logran introducirse y en algunos casos permanecer endémicos (Gubler *et al.*, 2007; Strauss & Strauss, 1994).

El alfavirus Chikungunya (CHIKV) causa una infección caracterizada por intensos dolores articulares de inicio abrupto, fiebre elevada, entre otros. La poliartralgia es recurrente en 30-40% de los individuos infectados y puede persistir por años (Schwartz & Albert, 2010), así como limitar a las personas para la ejecución de sus actividades. En 2013, fue reportada la transmisión local de este virus en la región de las Américas, específicamente en la isla de San Martín (Fischer *et al.*, 2014). En Enero de 2015, la infección por CHIKV había sido identificada en 42 países o territorios del Caribe, Centroamérica, Suramérica y Norteamérica (OPS, 2015). La incidencia de casos se estimó entre 6,9%-13,8% (Oletta, 2016), mientras que Camacho *et al.* (2016) reportaron una positividad mayor (19,2%) para el estado Aragua, ubicado en la región centro norte de Venezuela. Países de las Américas con características similares como República Dominicana y Surinam alcanzaron una positividad de 41 y 68 %; respectivamente (Pimentel *et al.*, 2014; Van Genderen *et al.*, 2016), lo que sugiere que la cantidad de afectados en el país, pudo ser mayor. De acuerdo a reportes de los organismos de salud entre 2018 y hasta la semana epidemiológica 24 del año 2020, el número de casos acumulados es de 509 (OPS/OMS, 2020a).

Por su parte, la infección que causa el flavivirus Zika (ZIKV), puede tornarse un gran problema de relevancia médica, considerando el potencial que posee para causar complicaciones en algunos de los individuos infectados, durante el embarazo puede causar microcefalia y otras malformaciones congénitas, que constituyen el síndrome congénito por el ZIKV (WHO, 2018). La infección también se asocia a otras complicaciones como el parto prematuro y aborto espontáneo. En niños y adultos, la infección se asocia a un aumento

del riesgo de complicaciones neurológicas, como el síndrome de Guillain-Barré, la neuropatía y la mielitis (WHO, 2018; Krauer *et al.*, 2017), particularmente en grupos vulnerables como las mujeres en edad reproductiva. En Venezuela, desde la confirmación de su introducción en 2015 (OMS, 2015) se reportó el siguiente número de casos acumulados por año, 17 (2015), 61691 (2016), 0 (2017), 209 (2018), 76 (2019), en 2020 hasta la semana epidemiológica 23, el número ascendía a 11 (OPS/OMS, 2020b). Esta enfermedad, como otras notificables se detecta en gran medida a través de sistemas de vigilancia pasiva. Sin embargo, dada la alta proporción de personas asintomáticas entre las personas infectadas con el ZIKV, la falta de especificidad de la presentación clínica entre los casos y la complejidad del diagnóstico de laboratorio en un contexto de circulación simultánea de virus estrechamente relacionados, la detección viral representan un gran reto, ya que la ausencia de confirmación de casos no garantiza que no esté en circulación o que la transmisión local haya sido interrumpida (OPS/OMS, 2020b), lo que implica la necesidad de optimizar metodologías que favorezcan el diagnóstico, control y prevención de las mismas.

Por la emergencia que causaron la introducción de CHIKV y ZIKV en el país, se consideró la implementación de las técnicas RT-PCR para amplificación de un fragmento parcial del gen que codifica la proteína Envoltura 1 (E1) para CHIKV (Collao *et al.*, 2010) y la proteína no estructural NS5 para ZIKV (Balmet *et al.*, 2012). Para la validación de estas metodologías se necesitan controles positivos, convencionalmente representados por sueros positivos que en el tiempo pueden agotarse o semillas virales, cuya obtención demanda el uso de técnicas laboriosas de cultivo celular, y en algunos casos elevados requerimientos de bioseguridad (Camacho *et al.*, 2016) que implican equipamiento y personal altamente calificado, lo cual no siempre es posible. Una alternativa para la obtención de controles positivos permanente, es la tecnología de ADN recombinante para clonar secuencias específicas del genoma del agente viral de interés. El objetivo de este trabajo fue producir plásmidos recombinantes con secuencias nucleotídicas de fragmentos parciales de los genes E1 de CHIKV y NS5 del ZIKV, utilizando los cebadores descritos

por Collao *et al.* (2010) y Balm *et al.*, (2012) para su uso como controles positivos en la validación específica de estas metodologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras biológicas

Se empleó como fuente de ARN viral la cepa del CHIKV [genotipo asiático LARD809-GC] aislada a partir de una muestra de suero diagnóstico positivo a CHIKV Collao *et al.* (2010), el suero fue inoculado en monocapa confluyente de células Vero [DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), Suero de Ternera Fetal 2%] e incubadas durante 10 días a 37°C, CO2 5%. Transcurrido este tiempo, las células fueron cosechadas y centrifugadas a 3310 x g, el sobrenadante fue distribuido en alícuotas y almacenado a -70°C hasta su uso. El ARN de ZIKV fue obtenido a partir de la cepa MR766 (Uganda, 1947, N° acceso: AY632545) gentilmente donado por la Dra. M. J. Alves (Instituto Ricardo Jorge de Aguas de Moura, Portugal).

Vector de clonación y células bacterianas: se emplearon el plásmido comercial pGEM®-T Easy (Promega) diseñado para clonar productos de PCR y las células bacterianas Escherichiacoli XL1-Blue MRF' (Stratagene®) [genotipo: supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thirelA1, lacf (proAB+ lacIIacZ ΔM15, Tn10, Tetr)] para multiplicar y amplificar los plásmidos.

Extracción de ARN: para obtener el ARN de CHIKV se utilizaron 140 μL del sobrenadante de cultivos virales empleando el estuche comercial QIAamp QIAGEN® (QIAGEN Inc.; California, E.U.A), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN de ZIKV que había sido mantenido en tampón AVL fue extraído siguiendo igualmente las instrucciones del mencionado estuche comercial.

Ensayos de RT-PCR

RT-PCR semi-anidada para identificación de CHIKV: se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Collao *et al.* (2010) empleando cebadores para amplificar un fragmento del gen E1 de CHIKV. Se realizó una primera

reacción (RT-PCR) para obtener un productos genómico de 548 pb, para ello se utilizó un par de cebadores, específicamente el cebador directo Sequpp1+: 5'-TTACCCNTTYATGTGGGG-3' y el cebador reverso Seqlow 1-: 5'-TRAAGCCAGATGGTGCC-3' (Degeneraciones: Y: T/C, R: A/G), mientras que para la segunda reacción con la cual se obtendría un producto de 469 pb, se emplearon los cebadores Sequpp1+ y Seqchik nested 1-: 5'-TRAAGCCAGATGGTGCC-3' (Degeneraciones: Y: T/C, R: A/G). Brevemente, se agregaron 5 μL del ARN extraído a mezclas de reacción que contenían: tampón de reacción AMV/Tfl(5X), dNTP's (0,2 mM), MgSO4 (1 mM), cebador directo Sequpp1+ (0,4 mM), cebador reverso Seqlow1- (0,4 mM), AMV-RT (1 U), Tflpolymerase (1 U). Las reacciones fueron sometidas a condiciones de tiempo y temperatura (38°C por 45 min, 30 ciclos de 94°C por 2 min, 94°C por 30 seg, 62°C por 3 min y extensión final 68°C por 5 min) en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA). La segunda reacción se realizó agregando 1 μL del producto de la primera reacción de reverso transcripción y amplificación a una mezcla que contenía los reactivos: tampón de reacción GoTaq® Flexi (5X), dNTP's (0,1mM), MgCl2 (1 mM), cebador directo Sequpp1+ (0,4 mM), cebador reverso Seqchik nested1- (0,4 mM), Taqpolymerase (1 U). La mezcla de reacción se colocó en termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA) bajo las siguientes condiciones de tiempo y temperatura (94°C por 2 min, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos y una extensión final 72°C por 5 min) en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA).

RT-PCR para identificación de ZIKV: para amplificar un fragmento de 192 pb correspondiente a un fragmento parcial del gen NS5 del genoma de ZIKV se siguió la metodología descrita por Balm *et al.*, (2012). Los cebadores empleados fueron ZIKVF90271+: 5'-CCTTGGATTCTTGAACGAGGA-3' y ZIKVR91971-: 5'-AGAGCTTCATTCTCCAGATCAA-3'. Se agregaron 5 μL del ARN extraído a mezclas de reacción contentivas de tampón de reacción AMV/Tfl (5X), dNTP's (0,2mM), MgSO4 (1 mM), cebador directo ZIKVF90271+ (0,4 mM), cebador reverso ZIKVR91971- (0,4 mM), AMV

RT (1 U), *Tfl* polymerase (1 U), Las reacciones fueron sometidas a las siguientes condiciones de tiempo y temperatura un ciclo inicial de 50°C por 30 min, 94°C por 15min, 30 ciclos de 94°C de 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y extensión final de 72°C por 5 min en termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA).

Los productos de reacción fueron analizados mediante geles de agarosa al 2% en tampón de electroforesis TAE (Tris Base 0,9 M, Acido Bórico 0,9 M, EDTA 0,01 M, pH: 8,5) a 100 V por 30 min. Los productos de reacción se colocaron en los pozos dispuestos en el gel con tampón de muestra (Xilencianol 0,02%, Azul de Bromofenol 0,02%, Glicerol al 50%) y Bromuro de etidio (1 µg/mL). Los geles fueron analizados en equipo de fotodocumentación (Gel Doc™ 2000 Gel Documentation Systems, Bio-Rad) empleando el programa bioinformático Quantity One®. Las bandas observadas fueron comparadas con un marcador comercial de tamaño molecular (100 bp DNA step ladder Axygen®). Los tamaños de banda esperados fueron para CHIKV 548 pb y 469 pb para la primera y segunda reacción, respectivamente. En el caso de ZIKV, el tamaño de banda esperado fue de 192 pb.

Purificación de los productos de amplificación

Las bandas observadas en los geles para la primera reacción de amplificación para CHIKV y ZIKV fueron cortadas a partir del gel correspondiente a cada agente viral y purificadas empleando el estuche comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) de acuerdo a las instrucciones descritas por el fabricante.

Construcción de los ADN recombinantes

Para ligar los fragmentos de ADN amplificados y el vector comercial pGEM®-T Easy se empleó la enzima T4 ADN ligasa. La mezcla de reacción se realizó en una relación molar vector-inserto 1:5 y se llevó a cabo en condiciones iónicas adecuadas (Tris-HCl 30 mM (pH 7,8), MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM). La incubación se realizó a 4°C durante 12 h.

Preparación y transformación de células competentes (E. coli XL1BLUE MRF')

Inicialmente, se cultivaron las células bacterianas *E. coli* XL1BLUE MRF' en 5 mL de medio LB [Luria Bertani (Tryptona 10 g/L, extracto de Levadura 5g/L, NaCl 5 g/L, pH:7.0)] a 37°C y agitación constante (200 rpm) durante toda la noche, transcurrido este tiempo se agregó 1 mL del cultivo en 50 mL del medio LB, se incubó a 37°C y se mantuvo en agitación constante (200 rpm) hasta obtener una absorbancia a 600nm entre 0,4-0,6. Transcurrido el tiempo de incubación las células fueron centrifugadas durante 15 min a 1500 g 4°C, el sedimento obtenido fue resuspendido en 10 mL de una solución de CaCl₂ (100 mM) y nuevamente centrifugadas en las condiciones previamente mencionadas, el sedimento fue resuspendido en 4 mL de solución (CaCl₂ 100 mM, Glicerol 15%) a 4°C para ser almacenadas a -80°C en alícuotas de 200 µL hasta su uso.

Las células competentes fueron transformadas con las mezclas de ligación mediante choque térmico (30 min 4°C, 90 seg 42°C, 2 min 4°C). A cada tubo se agregaron 800 µL de medio LB precalentado (42°C), luego fueron incubados a 37°C en agitación constante (200 rpm) durante 1 hora. Con espátula de Drigalski se esparcieron 200 µL de las preparaciones en placas con agar LB-Ampicilina 100 µg/mL pre-tratadas (X-Gal 2,4 mg/mL, IPTG 0,08 M). Se incubaron a 37°C durante 12 horas para observar la presencia de colonias azules (no recombinantes) y blancas (recombinantes).

Identificación de las colonias recombinantes

Análisis de las colonias recombinantes mediante la técnica PCR de colonias

Se seleccionaron colonias blancas que fueron colocadas en un volumen final de 25 µL de mezclas de reacción para PCR [tampón de reacción (GoTaq® Flexi Buffer Colorless 5X), MgCl₂ (1 mM), dNTP's (0,2 mM), cebadores específicos previamente descritos para la primera PCR según agente viral (CHIKV o ZIKV) (0,2 mM), *Taq* polimerasa (GoTaq® Flexi, Promega) (1U)]. Las mezclas de reacción fueron sometidas a desnaturalización inicial de 94°C por 5 min,

seguidas de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 2 min y extensión final de 72°C por 7 min en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA). Se incluyó una colonia azul como control negativo. El resultado de la amplificación se verificó en gel de agarosa al 2%, el tamaño de las bandas fue comparado con el marcador de tamaño molecular 100 bp DNASTepladder (Axygen).

Extracción de ADN plasmidico

Verificada la recombinación de los insertos en el vector comercial pGEM®-T Easy, se incubaron en agitación constante (200 rpm) durante toda la noche a 37°C 50 µL de las células transformadas en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/mL). Los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm (Rotor FA-45-24-11 Eppendorf®) y el sedimento resuspendido en 300 µL tampón TE (Tris-HCl 50 mM, pH: 8.0, EDTA 10 mM, RNAsa 100 µg/mL) e incubadas a temperatura ambiente por 15 min. Se adicionaron 300 µL de NaOH (200 mM), SDS (1%) y se mantuvieron a temperatura ambiente por 5 min, se agregó acetato de potasio (3 M, pH: 5.5), la suspensión se mantuvo incubada a 4°C por 5 min. Posteriormente, las suspensiones se centrifugaron a máxima velocidad y precipitaron con isopropanol y acetato de potasio (3 M, pH: 5.5). Finalmente, la suspensión se centrifugó durante 30 min a 14000 rpm (Rotor FA-45-24-11 Eppendorf®), al sedimento se agregó etanol 70% para su lavado y posterior centrifugación, se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas y fue conservado a -20°C hasta su posterior uso. Cada ADNp obtenido fue cuantificado mediante la lectura de densidad óptica (D.O) en espectrofotómetro de luz UV a una longitud de onda de 260 nm (A_{260}), asimismo se calculó la relación A_{260}/A_{280} como indicador de pureza de las preparaciones de ADNp (Sambrook & Russell, 2001).

Los ADNp obtenidos fueron analizados mediante PCR empleando los cebadores y condiciones mencionadas previamente según agente viral (Collao *et al.*, 2010; Balm *et al.*, 2012) empleando 1 µL de cada ADNp obtenido. Ambas reacciones fueron analizadas posteriormente en gel de agarosa al 2% donde se observaron bandas de tamaño correspondiente a cada fragmento

genómico, según agente viral, una vez que fuera comparado con el marcador de tamaño molecular 100 bp DNA step ladder (Axygen).

RESULTADOS

Se obtuvieron los plásmidos recombinantes que fueron denominados CHIKV-E1/pGEM®-T Easy y ZIKV-NS5192/pGEM®-T, los cuales contienen las secuencias parciales de los fragmentos genómicos E1 y NS5 correspondientes a CHIKV y ZIKV; respectivamente. Los resultados de transformación de células competentes con las mezclas de ligación específicas para cada virus, permitieron la identificación de una colonia blanca (recombinantes) para CHIKV y seis para ZIKV, las cuales al ser evaluadas por PCR de colonias evidenciaron amplificación de bandas correspondientes a los tamaños esperados para la primera y segunda PCR de CHIKV, específicamente 548 pb y 469 pb (Fig. 1); mientras que para ZIKV el tamaño esperado fue de 192 pb (Fig. 2). Se realizó la extracción de ADNp a partir de colonias positivas, los mismos fueron cuantificados por espectrofotometría donde se verificó una concentración de 125 µg/mL para CHIKV y de 1300 µg/mL para ZIKV, con una relación A_{260}/A_{280} de 1,9 indicando pureza de los

Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los fragmentos genómicos correspondientes al gen E1 del alfavirus CHIKV obtenidos a partir de la colonia recombinante producto de la transformación de las células *Escherichia coli* XL1-Blue MRF con la mezcla de ligación inserto (CHIKV-E1) vector (pGEM®-T Easy). A. 1. Fragmento de 548 pb de la primera reacción de PCR, M. Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen). B. 1 y 2. Fragmento de 469 pb correspondiente a la segunda reacción (PCR semianidada), M. Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen).

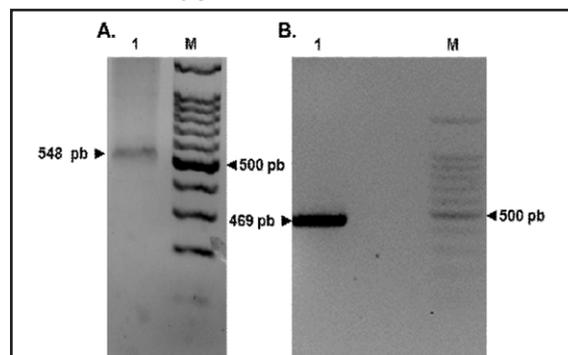
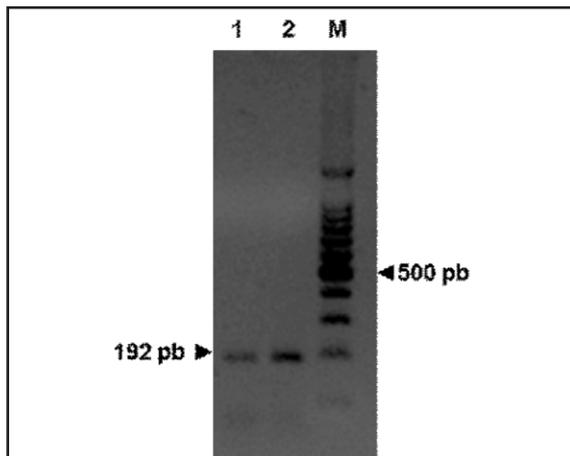


Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del fragmento genómico correspondiente al gen NS5 del flavivirus ZIKV obtenido a partir de la colonia recombinante producto de la transformación de las células *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' con la mezcla de ligación inserto (ZIKV-NS5) vector (pGEM®-T Easy). 1. Fragmento de 192 pb de la primera reacción de PCR, M. Marcador (100 pb DNA step ladder, Axygen).



productos. Los ADNp fueron empleados como ADN molde para análisis por PCR empleando los cebadores específicos para cada virus, el resultado permitió evidenciar amplificación de los productos mediante la presencia de bandas de acuerdo al tamaño de banda esperado.

DISCUSIÓN

Las técnicas de laboratorio requieren el uso de controles positivos para su validación e interpretación (Navarrete-Castro *et al.*, 2004; Acevedo *et al.*, 2009, Camacho *et al.*, 2016), este requerimiento incluye las metodologías moleculares, como la PCR. En este estudio se reporta la producción de plásmidos empleando la tecnología de ADN recombinante para su uso como controles positivos específicamente en las metodologías descritas por Collao *et al.* (2010) y Balm *et al.* (2012), para el diagnóstico de CHIKV y ZIKV; respectivamente. La estrategia de clonación realizada en el presente estudio ha sido reportada para otros genomas virales (Camacho *et al.*, 2016) resultando eficaz. Sin embargo, es importante destacar que la producción de controles siguiendo esta estrategia molecular es aplicable a otras técnicas de PCR diagnósticas, con la limitante de

que debe ser desarrollada para cada metodología en particular.

Con la introducción de CHIKV en 2014 y de ZIKV en 2015 en Venezuela, se pusieron en marcha las técnicas descritas por Collao *et al.* (2010) y Balm *et al.* (2012) a fin de fortalecer el diagnóstico oportuno y certero de las mismas, considerando que estas infecciones no pueden ser diagnosticadas de manera específica solo con las manifestaciones clínicas, debido a que son muy similares a las producidas por otros arbovirus de comportamiento endémico (e.g. Dengue) en regiones geográficas como Venezuela. De allí, la importancia de contar con técnicas de laboratorio sensibles y específicas, como la PCR, considerada una buena elección para los laboratorios de diagnóstico e investigación (Sánchez-Seco *et al.*, 2001; Lanciotti *et al.*, 1992), ya que además de ofrecer buenos índices de sensibilidad y especificidad, los resultados se obtienen en menor tiempo favoreciendo el diagnóstico, control y prevención.

Una vez producidos los plásmidos recombinantes de interés, y específicos para la metodología molecular que el laboratorio decida poner en marcha, cada laboratorio puede asegurar un banco de controles positivos permanente, evitando la dependencia tecnológica de otros países y/o casas comerciales para la adquisición de los controles y minimizando la ejecución de procedimientos laboriosos para obtener cepas virales mediante cultivos celulares y/o inoculación en otros sistemas de multiplicación viral, como ratones lactantes (Guzmán & Kourí, 1996). Los resultados obtenidos demostraron la clonación de productos de PCR amplificados con el uso de los cebadores reportados por Collao *et al.* (2010) y Balm *et al.* (2012), lo que asegura la validación de estas técnicas garantizando la reproducibilidad de los resultados, además de la multiplicación permanente de los plásmidos recombinantes asegurando un suministro de controles positivos, acorde a las necesidades del laboratorio y que podrían eventualmente ser donados a otros laboratorios que empleen como metodologías diagnósticas para CHIKV y ZIKV, las PCRs reportadas por Collao *et al.* (2010) y Balm *et al.* (2012). La estrategia desarrollada es aplicable para la obtención de controles positivos de las

metodologías mencionadas y para cualquier otra técnica de PCR empleada para el diagnóstico viral y de cualquier otro agente infeccioso.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Ricardo Jorge de Aguas de Moura (Portugal) por la gentil donación del ARN genómico de la cepa de referencia del virus Zika MR766 (Uganda, 1947, N° acceso: AY632545) a través de VIRORED-CYTED.

Conflicto de interés

Los autores/as declaran no tener conflictos de interés con la publicación de este documento.

REFERENCIAS

Acevedo A. M., Santana E., Díaz de Arce H., Pérez L.J., Caballero A., Suárez L. & Sánchez O. (2009). Desarrollo de controles positivos para métodos moleculares de detección de virus de influenza aviar. *Rev. Salud Anim* **31**: 50-54.

Balm M., Lee C., Lee H., Chiu L., Koay E. & Tang J. (2012). A Diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika Virus. *J. Med. Virol.* **84**: 1501-1505.

Borgherini G., Poubeau P., Staikowsky F., Lory M., Le Moullec N., Becquart J. P., *et al.* (2007). Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clin. Infect. Dis.*, **44**: 1401-1407.

Camacho D., Reyes J., Franco L., Comach G. Ferrer E. (2016). Clonación de secuencias de Alfavirus y Flavivirus para su uso como controles positivos en el diagnóstico molecular. *Rev. Peru. Med. Exp. y Salud Publica*, **33**: 269-273.

Camacho D. E., Ferrer E., Triana-Alonso J. L., Ferreras A. C., Graterol H., Comach G. *et al.* (2012). *Amplificación de la región 5' UTR-C del genoma de los cuatro serotipos de Virus Dengue*. Salus online. Documento en línea: <https://www.redalyc.org/pdf/3759/375939022009.pdf> [Consultado: 2020, Julio, 05].

Collao X., Negredo A., Cano J., Tenorio A., de Ory F., Benito A., *et al.* (2010). Different Lineages of

Chikungunya Virus in Equatorial Guinea in 2002 and 2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **82**: 505-507.

Gubler D. J., Kuno G. & Markoff L. (2007). Flaviviruses. 1153-1252. En: Knipe, DM, Howley, PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia PA USA.

Guzmán M. G. & Kourí G. (1996). Advances in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **3**: 621-627.

Fischer M., Staples J. E., Arboviral Diseases Branch, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, CDC. (2014). Notes from the field: chikungunya virus spreads in the Americas - Caribbean and South America, 2013-2014. *Morb Mortal Wkly Rep*; **63**: 500-501.

Krauer F., Riesen M., Reveiz L., Oladapo O. T., Martínez-Vega R., Porgo T. V., *et al.* (2017). Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain-Barre syndrome: systematic review. *PLoS Med*, **14**: e1002203.

Lanciotti R. S., Calisher C. H., Gubler D. J., Chang G. J. & Vorn-dam A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **30**: 545-551.

Navarrete-Castro J., Martínez-Rodríguez M., Siria-Torreblanca N. & Calderón-Rodríguez G.M. (2004). Clonación de una secuencia representativa de la región no traducible 5' (5'-UTR) del virus de la hepatitis C. *Bioquímica*. **29**: 11-17.

Oehler E., Watrin L., Larre P., Leparac-Goffart I., Lastere S., Valour F., *et al.* (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill*. **19**: 20720.

Ogden R. C. & Adams D. A. (1987). Electrophoresis in agarose y acrylamide gels. *Meth. Enzymol.*, **152**: 61-87.

Oletta J. F. (2016). Epidemia de fiebre chikungunya en Venezuela, 2014-2015. *Gac Med Caracas*, **124**: 122-137.

- Oliveira Melo A. S., Malinger G., Ximenes R., Szejnfeld P. O., Alves Sampaio S. & Bispo de Filippis A. M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound. Obstet Gynecol*, **47**: 6–7.
- OMS (2015). *Infecção por el virus de Zika-Venezuela*. Documento en línea: <https://www.who.int/csr/don/03-december-2015-zika-venezuela/es/> [Consultado: 2020, Abril, 05].
- OPS (2015). *Number of reported cases of chikungunya fever in the Americas, by country or territory 2013-2014 cumulative cases (Updated 23 Oct 2015)*. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas 2015; 2016. Documento en línea. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=5927&Itemid=40931&lang=en [Consultado: 2020, Julio, 24].
- OPS/OMS (2020a). *Temas. Chikungunya*. Documento en línea. <https://www.paho.org/data/index.php/es/temas/chikv-es.html> [Consultado: 2020, Julio, 05]
- OPS/OMS (2020b). *Temas. Zika*. Documento en línea. <https://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-zika.html> [Consultado: 2020, Julio, 05]
- Pimentel R., Skewes-Ramm R. & Moya J. (2014). Chikungunya in the Dominican Republic: lessons learned in the first six months [in Spanish]. *Rev. Panam. Salud Publica*, **36**: 336-341.
- Sambrook J, Russel D. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3a ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez-Seco M. P., Rosario D., Quiroz E., Guzmán G. & Tenorio A. (2001). A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J of V Methods*, **95**: 153-161.
- Strauss J. H. & Strauss E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. *Microbiol Rev*; **58**: 491-562
- Schwartz O. & Albert M. L. (2010). Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol*; **8**: 491–500.
- Van Genderen F. T., Krishnadath I., Sno R., Grunberg M. G., Zijlmans W. & Adhin M. R. (2016). First Chikungunya Outbreak in Suriname; Clinical and Epidemiological Features. *PLoS Negl. Trop. Dis.*; **10**: e0004625.
- WHO (2018). *Enfermedad por el virus de Zika*. Documento en línea: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus> [Consultado: 2020, Julio, 05].

Recibido el 06/04/2020
Aceptado el 15/07/2020