

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE
MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA

POSGRADO DE CIENCIAS GENÓMICAS

TITULO DE TESIS

Estudio de arbovirus poco comunes en muestras de
pacientes mexicanos: Detección y análisis evolutivo.

PRESENTA

OSCAR ARRIAGA CADENA

POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS

DIRECTORA

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

CO-DIRECTORA

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy

Ciudad de México, Julio del 2026

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dr. Jesús Miguel Torres Flores,
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Secretario: Dra. Claudia Selene Zárate Guerra,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Vocal: Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTORA

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra
Universidad Autónoma de la
Ciudad de México

Agradecimientos.

A mi directora la Dra. Claudia Selene Zárate Guerra, mi codirectora la Dra. Martha Eugenia Yocupicio Monroy y mi Asesor el Dr Jesus Torres Flores por su infinita paciencia, asesoría y ayuda en todo momento, en serio no se como me aguantaron ya por tanto tiempo y siempre haciéndolos correr o en límites de tiempo muy cortos, como ahora, una disculpa por eso tratare de mejorar.

A todos los doctores del posgrado en ciencias genómicas de la UACM por hacerme sentir parte de la comunidad, me siento como un amigo más, aunque soy bastante ruidoso, trataré de bajar mi volumen de voz, pero a todos les tengo un cariño genuino. Salvo sus excepciones xD.

A mis lectoras la Dra Minerva Camacho y a la Dra Lili Cánovas por apoyarme como lectoras de esta tesis. Además al Dr Esteban Muñoz de la Coordinación de Calidad de Insumos y Laboratorios Especializados, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por proporcionar las muestras usadas en este proyecto.

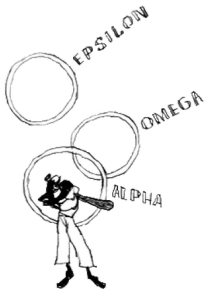
Vivi y Caty por siempre estarme apoyando con esto en todo momento aunque me vieron destruido, siempre hubo alguien de ahí que me escuchaba.

Mención especial a Dannita y a Olguita, que existía un apoyo no solo académico sino una amistad la cual se hizo aún más profunda, estando en los buenos momentos y en los aún más frecuentes malos momentos, pero siempre estando al pie del cañón conmigo, eso lo agradezco y valoro mucho.

También quiero agradecer a mis amigos del laboratorio, miren que tanto me cambió la maestría que hasta me dan ganas de reconocerlos. A Kevin, Paulina, Angela, Fabriccio y Laura por siempre compartir un momento y hacerme ver que no todo era malo, e inclusive a Karla y Fany que no conviví mucho con ustedes. Agregando a mis amigos que hice en la maestría, de los cuales pude aprender y crecer como persona. E inclusive los que ya no están a mi lado.

A mi familia, gracias por tanto y perdonen por tan poco, hemos avanzado tanto en tan poco tiempo que me da esperanza saber que no necesitamos más, solo de verdad enfocarnos en una meta, eso nos hace monstruos prometedores en esta vida y que el cielo es muy cercano como límite.

Gracias a la UACM por la beca de obtención de grado por 6 meses que me permitió concluir este proyecto. Además agradezco al Gobierno de México Este trabajo contó con el apoyo de la subvención 302979 del CONAHCYT y de los proyectos CCyT-2023-IMP-08 de la UACM. OAC es beneficiario de la beca SECIHTI n.º 4017916.



“Dentro de 2 años te volveré a escribir y te diré que ha pasado” Eso fue un mensaje que dejé en la licenciatura, parece poco pero las cosas han cambiado tanto que parece que han pasado 10 años. Hemos crecido y valoramos cosas de las cuales no creímos tenerles importancia, pero de verdad nos importan.



Este proceso fue demasiado pesado quisimos renunciar varias veces e inclusive explotamos en lágrimas jaja (imagen de cómo nos veíamos a la izquierda) siempre en un estado de ataque, de hecho si las personas a las cuales les agradeces no hubiesen estado, tal vez no estaríamos haciendo este recuento.



Ya no somos ese chico que se sentía solo, ya no soñamos con la superioridad y entendimos que no somos nada en este mundo tan basto de gente brillante y talentosa, pero también entendimos que tenemos un margen de mejora, casi infinito limitado por nuestra propia mortalidad, uno que disfrutamos. Si nuestra anterior versión nos viera, nos tendría lástima por nuestra debilidad, y de alguna manera también sentiríamos la misma lástima hacia él.

La vida nos recompensó con varias cosas, amigos reales de lugares que nunca creímos, pero han estado de maneras que parecen poca cosa, pero de verdad nos impactaron, personas alejándose en el momento justo e inclusive una hermosa novia (asi la veo siempre, aunque ella no lo acepte) la cual debemos tratar bien, no muchas personas nos aguantan y muchas menos andarían contigo, cuidala.



Somos distintos, con los mismos gustos pero con mentalidad distinta una más sana, una más madura, una que ya busca la manera de disfrutar más de las cosas de las que renegamos y somos felices.

¿Estamos orgullosos de este logro? ¡No!

¿Lo repetiríamos? ¡Menos!

Aún no somos el hombre que queremos ser, pero si estamos muy lejos del niño que fuimos. Maduramos en muy poco tiempo y espero con ansias al Dr que seremos. ¡Nos vemos!

Índice

Índice.....	1
Resumen.....	3
Abstract.....	4
Índice de tablas.....	5
Índice de figuras.....	6
Abreviaturas.....	8
1. Introducción.....	9
1.1 Distribución de vectores responsables de infecciones arbovirales.....	10
1.2 Ciclo de transmisión de los arbovirus.....	12
1.3. Diversidad Taxonómica.....	16
1.4 Situación epidemiológica de los arbovirus en la región de América.....	22
1.5 Vigilancia epidemiológica en América.....	26
2. Antecedentes Particulares.....	29
2.1 Detección de arbovirus poco frecuentes en América Latina.....	29
2.2 Avances tecnológicos para la caracterización genómica.....	31
2.3 Análisis filogenético y filodinámico de arbovirus emergentes.....	34
2.4 Comparación metodológica.....	36
2.4.1 Métodos moleculares aplicados a cada género ventajas y limitaciones.....	37
3. Hipótesis.....	42
4. Justificación.....	42
5. Objetivo General.....	42
5.1 Objetivos Específicos.....	42
6. Estrategia experimental.....	43
7. Metodología.....	44
7.1 Diseño de iniciadores para Orthoflavivirus, Alphavirus y OROV.....	44
7.2 Estandarización de iniciadores de Orthoflavivirus, Alphavirus y OROV.....	45
7.3 Muestras de pacientes.....	47
7.4 Aislamiento de virus y obtención de muestras para secuenciación.....	47
7.5 Extracción de RNA viral a partir de las muestras de pacientes.....	47
7.6 RT-PCR para la detección de arbovirus de baja prevalencia.....	48
7.7 Secuenciación de genoma completo.....	49
7.7.1 Procesamiento y detección de Herpes Simplex Virus tipo 2 (HSV-2).....	49
7.8 Preprocesamiento de lecturas obtenidas de la secuenciación masiva y filtrado de secuencias.....	50
7.8.1 Eliminación de secuencias del hospedero y mapeo inicial.....	51
7.8.2 Ensamblaje de novo y validación.....	52
7.8.3 Anotación e identificación taxonómica.....	52
7.9 Genotipificación.....	52

7.10 Análisis filodinámicos.....	52
7.11 Redes de haplotipos.....	53
8. Resultados.....	54
8.1 Diseño y estandarización de la amplificación por RT-PCR de los iniciadores para Orthoflavivirus, Alphavirus y OROV.....	54
8.2 Procesamiento y aislamiento viral a partir de los sueros de pacientes.....	57
8.3 Detección molecular de arbovirus en muestras clínicas mediante PCR.....	62
8.4 Limpieza de lecturas y ensamblaje de novo.....	63
8.5 Anotación e identificación taxonómica.....	64
8.6 Detección del genoma de HSV-2 en las muestras de suero.....	67
8.7 Análisis filogenético y genotípico.....	68
8.8 Análisis filodinámico de HSV-2 y DENV-3.....	71
8.9 Red de haplotipos de HSV-2 y DENV-3.....	76
9. Discusión.....	81
10. Conclusiones.....	88
11. Referencias.....	89
12. Anexos.....	98

Resumen

Las infecciones por arbovirus representan un problema importante de salud pública debido a la diversidad de virus involucrados, la amplia distribución de sus vectores y la similitud de los cuadros clínicos que producen. En regiones donde dengue, Zika y Chikungunya son virus endémicos, el diagnóstico suele enfocarse en éstos mediante pruebas moleculares dirigidas; sin embargo, otros arbovirus de baja prevalencia pueden circular sin ser detectados. El objetivo de este trabajo fué identificar arbovirus poco frecuentes en muestras de suero de pacientes con sintomatología compatible con arbovirosis.

Se analizaron 106 muestras de suero de pacientes atendidos en unidades del Instituto Mexicano del Seguro Social, recibidas inicialmente como negativas al panel Triplex para el dengue, Zika y Chikungunya. Las muestras fueron inoculadas en células Vero y C6/36 para evaluar la presencia de efecto citopático. Cuatro muestras (55, 63, 69 y 97) produjeron efecto citopático, principalmente en células Vero, lo cual podría estar asociado a la replicación viral, por lo que los sobrenadantes de cultivo fueron enviados a secuenciación masiva. Además, el tamizaje por RT-qPCR mostró positividad a Flavivirus en la muestra 97, mientras que las pruebas para Alphavirus y virus Oropouche fueron negativas para todas las muestras.

La secuenciación masiva de los sobrenadantes de células Vero permitió recuperar genomas virales prácticamente completos. El análisis de los contigs mediante BLAST identificó la presencia del virus herpes simple tipo 2 en las muestras 55, 63 y 69, y del virus del dengue serotipo 3 en la muestra 97. La presencia de virus herpes simple tipo 2 fue corroborada mediante PCR de punto final en el suero y en los sobrenadantes de células Vero, con amplificación de los blancos UL30 y gG2/US4. Los análisis filogenéticos y de redes de haplotipos ubicaron a las secuencias de virus herpes simple tipo 2 dentro de la diversidad global conocida, sin evidencia de un grupo exclusivo de México. En la muestra 97 se identificó a virus del dengue serotipo 3 genotipo III, linaje 3III_B.3.2, el cual se agrupa dentro de la diversidad global reciente de este virus.

En el subgrupo secuenciado no se detectaron arbovirus poco frecuentes; sin embargo, la identificación del virus herpes simple tipo 2 resalta la utilidad de los enfoques genómicos no dirigidos para ampliar el diagnóstico etiológico y fortalecer la vigilancia viral.

Abstract

Arboviral infections represent a major public health concern due to the diversity of viruses involved, the widespread distribution of their vectors, and the similarity of the clinical manifestations they produce. In regions where dengue, Zika, and chikungunya viruses are endemic, diagnosis is generally focused on these pathogens using targeted molecular assays; however, other low-prevalence arboviruses may circulate undetected. The aim of this study was to identify uncommon arboviruses in serum samples from patients presenting with symptoms compatible with arboviral infection.

A total of 106 serum samples from patients treated at the Mexican Institute of Social Security (IMSS) were analyzed. These samples had previously tested negative using the Triplex molecular assay for dengue, Zika, and chikungunya viruses. Samples were inoculated into Vero and C6/36 cell cultures to evaluate the presence of cytopathic effect (CPE). Four samples (55, 63, 69, and 97) produced CPE, predominantly in Vero cells, suggesting viral replication, and their culture supernatants were subsequently subjected to high-throughput sequencing. In addition, RT-qPCR screening detected a flavivirus only in sample 97, whereas all samples tested negative for alphaviruses and Oropouche virus.

High-throughput sequencing of the Vero cell culture supernatants enabled the recovery of nearly complete viral genomes. BLAST analysis of the assembled contigs identified herpes simplex virus type 2 (HSV-2) in samples 55, 63, and 69, and dengue virus serotype 3 (DENV-3) in sample 97. The presence of HSV-2 was further confirmed by endpoint PCR in both serum and Vero cell culture supernatants through amplification of the UL30 and gG2/US4 targets. Phylogenetic and haplotype network analyses placed the HSV-2 sequences within the known global diversity of the virus, with no evidence of a lineage restricted to Mexico. Sample 97 was classified as DENV-3 genotype III, lineage 3III_B.3.2, clustering within the recent global diversity of this virus.

Although no uncommon arboviruses were detected among the sequenced samples, the identification of HSV-2 highlights the value of untargeted genomic approaches for expanding etiological diagnosis and strengthening viral surveillance.

Índice de tablas

Tabla 1. Arbovirus poco frecuentes que han circulado en América y sus vectores principales por género viral.....	23
Tabla 2. Tasas de infección y estimación por MLE del virus del Oeste del Nilo por especie de mosquito en Chihuahua, México septiembre–octubre de 2019.....	24
Tabla 3. Resultados mínimos de laboratorio en pacientes con tamizaje para USUV y otros arbovirus en Colombia, durante el periodo 2021-2022.....	30
Tabla 4. Ejemplos de caracterización genómica de arbovirus poco prevalentes en América.....	31
Tabla 5. Ventajas y limitaciones de las principales estrategias de laboratorio para la detección molecular de virus.....	36
Tabla 6. Arbovirus responsables de brotes epidémicos en América.....	44
Tabla 7. Iniciadores diseñados para cada grupo viral.....	54
Tabla 8. Resultados del preprocesamiento de lecturas y depleción de lecturas derivadas del hospedero de las bibliotecas utilizadas para el ensamblaje <i>de novo</i>	63
Tabla 9. Registro del ensamblaje <i>de novo</i> de los contigs obtenidos tras la depleción del hospedero...64	
Tabla 10. Top-1 tBLASTx/BLASTx por muestra.....	64
Tabla 11. Profundidad media de lectura, cobertura de los genomas consenso e identidad obtenidos tras la depleción del hospedero y el ensamblaje <i>de novo</i>	65
Tabla 12. Diferencias por pares (sitios A/C/G/T comparables.....	66
Tabla 13. Genes de HSV-2 que se usaron como marcadores filodinámicos.....	72

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de la distribución global de registros del género <i>Aedes</i> construido mediante reportes de la ciudadanía.	11
Figura 2. Mapeo de la idoneidad de la temperatura futura para escenarios de transmisión de <i>A. aegypti</i> y <i>A. albopictus</i>	12
Figura 3. Ciclos de transmisión de los arbovirus y sus agentes participantes.....	13
Figura 4. Ciclo infeccioso de los arbovirus en mosquitos.....	14
Figura 5. Ciclo replicativo de los arbovirus.....	15
Figura 6. Clasificación taxonómica y tipo de genoma de los arbovirus.....	17
Figura 7. Organización del genoma de los virus del género <i>Orthoflavivirus</i>	18
Figura 8. Organización del genoma de los virus de la familia <i>Togaviridae</i>	19
Figura 9. Organización del genoma de los virus del género <i>Orthobunyavirus</i>	19
Figura 10. Organización del genoma de los virus del género <i>Phlebovirus</i>	20
Figura 11. Organización del genoma de los virus del género <i>Orbivirus</i>	21
Figura 12. Organización del genoma de los virus de la familia de los <i>Rhabdoviridae</i>	21
Figura 13. Distribución de los arbovirus más frecuentes en América.....	22
Figura 14. Número de casos confirmados de Oropouche del 2024 al 2025 adaptado de datos proporcionados por los respectivos países y reproducidos por la OPS/OMS.....	25
Figura 15. Manifestaciones clínicas comunes en cuadros no graves de arbovirosis.....	26
Figura 16. Algoritmo de detección de arbovirus.....	27
Figura 17. Mapa de distribución de arbovirus poco frecuentes, dentro del continente americano.....	29
Figura 18. Árbol filogenético de tres segmentos del virus Oropouche.....	35
Figura 19. Ensayo RT-PCR en tiempo real de Pan- <i>Alphavirus</i>	38
Figura 20. Estrategia experimental.....	43
Figura 21. Estandarización de la temperatura de alineamiento para la amplificación del genoma de <i>Orthoflavivirus</i> , <i>Alphavirus</i> y OROV por RT-PCR en punto final.....	55

Figura 22. Detección de RNA de <i>Orthoflavivirus</i> , <i>Alphavirus</i> y OROV mediante RT-PCR en punto final.....	56
Figura 23. Distribución de las muestras analizadas.....	58
Figura 24. Distribución de concentraciones de RNA de las muestras de pacientes.....	59
Figura 25. Microscopía de campo claro de las células Vero y C6/36 inoculadas con el suero de pacientes con sintomatología febril.....	61
Figura 26. Detección de <i>Orthoflavivirus</i> por RT-PCR en punto final en las muestras 90–99.....	62
Figura 27. Detección del genoma de HSV-2 en las muestras de suero 55, 63 y 69 por PCR de punto final.....	67
Figura 28. Filogenia de genoma completo del virus herpes simple tipo 2 (HSV-2) inferida mediante el método de máxima verosimilitud.....	70
Figura 29. Árbol de máxima verosimilitud del virus del dengue serotipo 3 (DENV-3) generado con Nextclade a partir de genomas de referencia de distintas regiones del mundo.....	71
Figura 30. Árboles filogenéticos escalados en el tiempo de HSV-2 contruidos a partir de cinco genes marcadores.....	74
Figura 31. Árbol filodinámico de DENV-3 escalado en el tiempo.....	76
Figura 32. Redes de haplotipos de HSV-2 para los genes UL23 (A), UL27 (B), UL30 (C), US4 (D) y US6 (E), contruidas en PopART a partir de secuencias de referencia globales.....	79
Figura 33. Red de haplotipos de DENV-3 contruida a partir de genomas completos.....	80

Abreviaturas

DNA: Ácido desoxirribonucleico	EEEV: Virus de la encefalitis equina del este	MLE: Estimación de máxima verosimilitud	RVFV: Virus de la fiebre del Valle del Rift
AIC: Criterio de información de Akaike	FASTA: Formato de secuencias biológicas	NCBI: National Center for Biotechnology Information	SFNV: Virus de la fiebre por flebótomos de Nápoles
AICc: AIC corregido	FASTQ: Formato de secuencias con calidad	NGS: Secuenciación de nueva generación	SINV: Virus Sindbis
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool	GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	NS: Proteína no estructural	SLEV: Virus de la encefalitis de San Luis
BLASTn: BLAST de nucleótidos	gB: Glicoproteína B	NS1–NS5: Proteínas no estructurales 1 a 5	SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido
BLASTx: BLAST contra proteínas	gD: Glicoproteína D	nsP1–nsP4: Proteínas no estructurales de <i>Alphavirus</i>	ssRNA: RNA de cadena sencilla
BTV: Virus de la lengua azul	gG: Glicoproteína G	ONNV: Virus O'nyong-nyong	tBLASTx: BLAST traducido en seis marcos de lectura
C6/36: Línea celular de <i>Aedes albopictus</i>	HSV: Virus herpes simple	OPS: Organización Panamericana de la Salud	TK: Timidina cinasa
CDC: Centers for Disease Control and Prevention	HSV-1: Virus herpes simple tipo 1	OROV: Virus Oropouche	Tm: Temperatura de alineamiento
cDNA: DNA complementario	HSV-2: Virus herpes simple tipo 2	pb: Pares de bases	UFBoot: Ultrafast bootstrap
CHIKV: Virus chikungunya	ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa	UTR: Región no traducida
CHPV: Virus Chandipura	IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social	PHRED: Escala de calidad de secuenciación	VEEV: Virus de la encefalitis equina venezolana
Ct: Ciclo umbral	INDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos	prM: Proteína precursora de membrana	Vero: Línea celular de riñón de mono verde africano
DENV: Virus del dengue	ISVs: Virus específicos de insectos	qPCR: PCR cuantitativa	WEEV: Virus de la encefalitis equina del oeste
DENV-3: Virus del dengue serotipo 3	JEV: Virus de la encefalitis japonesa	RNLSP: Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	WHO: World Health Organization
DNA: Ácido desoxirribonucleico	LACV: Virus La Crosse	RNA: Ácido ribonucleico	WNV: Virus del Nilo Occidental
dsRNA: RNA de doble cadena	MAYV: Virus Mayaro	RRV: Virus Ross River	YFV: Virus de la fiebre amarilla
E: Proteína de envoltura	ML: Máxima verosimilitud	RT-PCR: PCR con transcripción reversa	ZIKV: Virus Zika
ECP: Efecto citopático		RT-qPCR: PCR cuantitativa con transcripción reversa	

1. Introducción

Los arbovirus son un grupo muy diverso de virus transmitidos por artrópodos hematófagos, es decir, aquellos que se alimentan de sangre, como mosquitos, garrapatas, flebotomos y jejenes. Estos virus tienen la capacidad de infectar a una amplia gama de vertebrados, incluidos humanos, aves, roedores y primates no humanos (Varghese et al., 2023; Weaver & Reisen, 2010). Los arbovirus no forman un grupo monofilético, sino que constituyen un conjunto taxonómicamente heterogéneo de más de 500 especies clasificadas en al menos 14 familias virales; se estima que aproximadamente 150 de estas especies están asociadas con enfermedades humanas (CDC, 2020; Hubálek & Rudolf, 2012). El término “arbovirus” (del inglés *arthropod-borne virus*) fue adoptado oficialmente por la Organización Mundial de la Salud en 1967 para referirse a virus que requieren un vector artrópodo en su ciclo de transmisión entre hospederos vertebrados susceptibles (Arredondo-García et al., 2016; WHO, 1967). A diferencia de otros virus zoonóticos, los arbovirus deben replicarse activamente tanto en el vector como en el hospedero vertebrado para mantenerse en la naturaleza, lo cual les confiere una alta adaptabilidad ecológica y favorece su dispersión geográfica (Weaver & Reisen, 2010; Díaz et al., 2022).

Las manifestaciones clínicas de las infecciones arbovirales son similares entre sí y van desde cuadros febriles, hasta formas graves como encefalitis, fiebre hemorrágica o síndrome de shock, dependiendo del virus involucrado, el estado inmunológico del hospedero y otros factores ambientales (Damasceno-Caldeira et al., 2023; López-Vélez & Molina, 2022). En las regiones tropicales y subtropicales estos virus representan un problema de salud pública debido a que son endémicos de dichas áreas geográficas, además de otros factores como la urbanización no planificada y el cambio climático los cuales influyen en la expansión de vectores (Rocklöv & Dubrow, 2020).

Los avances en tecnologías y técnicas moleculares, en particular la secuenciación de nueva generación (NGS) y los enfoques metagenómicos, han transformado el estudio de los arbovirus al permitir una mejor detección, caracterización genómica y análisis evolutivo de virus ya conocidos, así como la identificación de virus emergentes y virus específicos de insectos (ISVs), especialmente en regiones biodiversas como América Latina (Blitvich & Firth, 2015). Más que un incremento sustancial en el número de arbovirus reconocidos, estas

herramientas han ampliado la resolución con la que se estudia su diversidad genética, sus relaciones filogenéticas y la detección de linajes o variantes previamente no caracterizadas. En este contexto, los métodos de secuenciación han fortalecido la vigilancia viral y han permitido una comprensión más profunda de la evolución y ecología de estos virus (Varghese et al., 2023; Ali et al., 2023).

1.1 Distribución de vectores responsables de infecciones arbovirales

La distribución de los vectores, así como su reproducción y supervivencia están determinados por factores climáticos y ecológicos. Como se había mencionado anteriormente existen varios vectores, pero los mosquitos son los más relevantes en la propagación de arbovirus de importancia médica y muestran patrones de distribución a nivel mundial que cambian dependiendo del género y la especie.

De todos los mosquitos, los del género *Aedes*, en particular *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, han mostrado la mayor expansión geográfica en las últimas décadas (Figura 1). Originalmente restringidas a zonas tropicales y subtropicales de África, estas especies han colonizado nuevas regiones de Asia, América, Europa y Oceanía. Esta expansión se ha visto favorecida por factores como el comercio internacional y el transporte de mercancías (por ejemplo, neumáticos usados), la urbanización no planificada y el cambio climático (Kraemer et al., 2015; Gubler, 2011).

La presencia de *Ae. aegypti* se ha reportado en más de 130 países en particular en zonas urbanas de América Latina, el sudeste asiático y África. Por su parte, *Ae. albopictus* muestra mayor tolerancia al frío, lo que le ha permitido establecerse en zonas templadas de Europa, Estados Unidos, el norte de Asia y Sudamérica.

Por otra parte, los mosquitos del género *Culex*, como *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens* y *Culex tarsalis*, están presentes en casi todo el mundo. Su reproducción en aguas estancadas con materia orgánica los hace particularmente exitosos en ambientes urbanos con infraestructura deficiente (Petersen et al., 2013).

Los mosquitos no son los únicos vectores relevantes. En ciertas regiones del mundo, otros artrópodos desempeñan un papel importante en la transmisión de arbovirus, incluyendo los jejenes del género *Culicoides* (especialmente en áreas tropicales y húmedas), los flebótomos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, así como diversas especies de garrapatas de las

familias *Ixodidae* y *Argasidae*. Aunque su distribución suele ser más localizada, estos artrópodos pueden actuar como transmisores eficientes de arbovirus bajo condiciones ambientales adecuadas (Elliott, 2014; WHO, 2022).

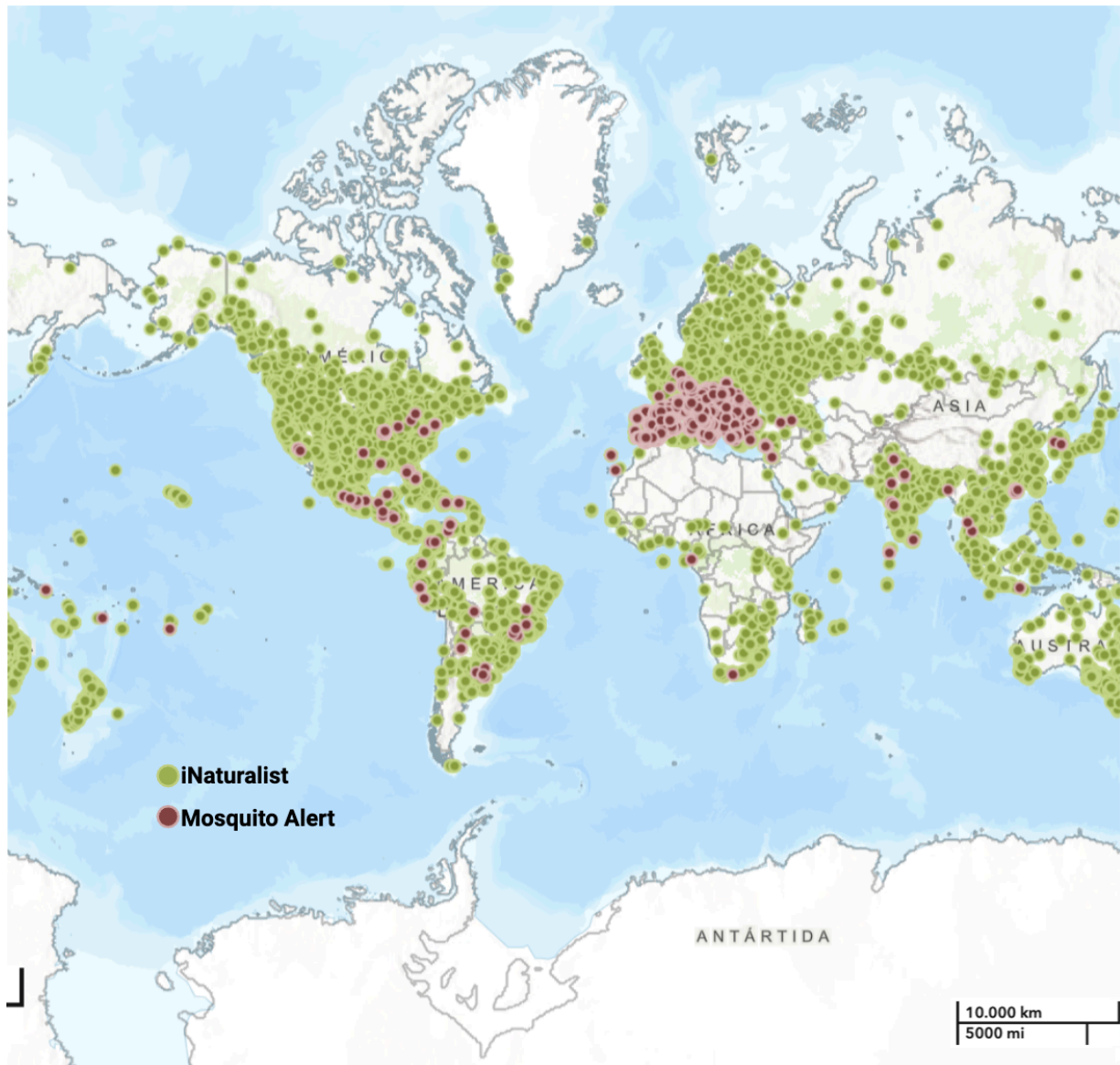


Figura 1. Mapa de la distribución global de registros del género *Aedes* construido mediante reportes de la ciudadanía. Los puntos verdes corresponden a observaciones registradas en la plataforma iNaturalist, mientras que los puntos rojos corresponden a la plataforma Mosquito Alert. El mapa muestra la presencia reportada de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y otras especies del género, con datos recopilados hasta la fecha a partir de fotografías y reportes de voluntarios.

A nivel mundial, la expansión en la distribución de estos vectores ha sido favorecida por el cambio climático (Figura 2), la deforestación, el crecimiento urbano no planificado, la globalización del comercio y los movimientos poblacionales. Estos factores no solo permiten la introducción de vectores en regiones previamente libres de ellos, sino que también

contribuyen al aumento de la densidad vectorial y a la prolongación de los períodos de transmisión estacional (Rocklöv & Dubrow, 2020). Como consecuencia de estos cambios ambientales y socioeconómicos, las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de las enfermedades infecciosas globales y causan más de 700,000 muertes al año (WHO, 2022). En particular, los mosquitos del género *Aedes* son responsables de una parte considerable de esta carga, ya que su capacidad para reproducirse en ambientes urbanos, su actividad diurna y su comportamiento antropofílico los convierten en vectores altamente eficientes en contextos densamente poblados (Gubler, 2011; Kraemer et al., 2015). La reemergencia y expansión de estos vectores en nuevas regiones ha sido determinante en el aumento reciente de arbovirosis a escala global.

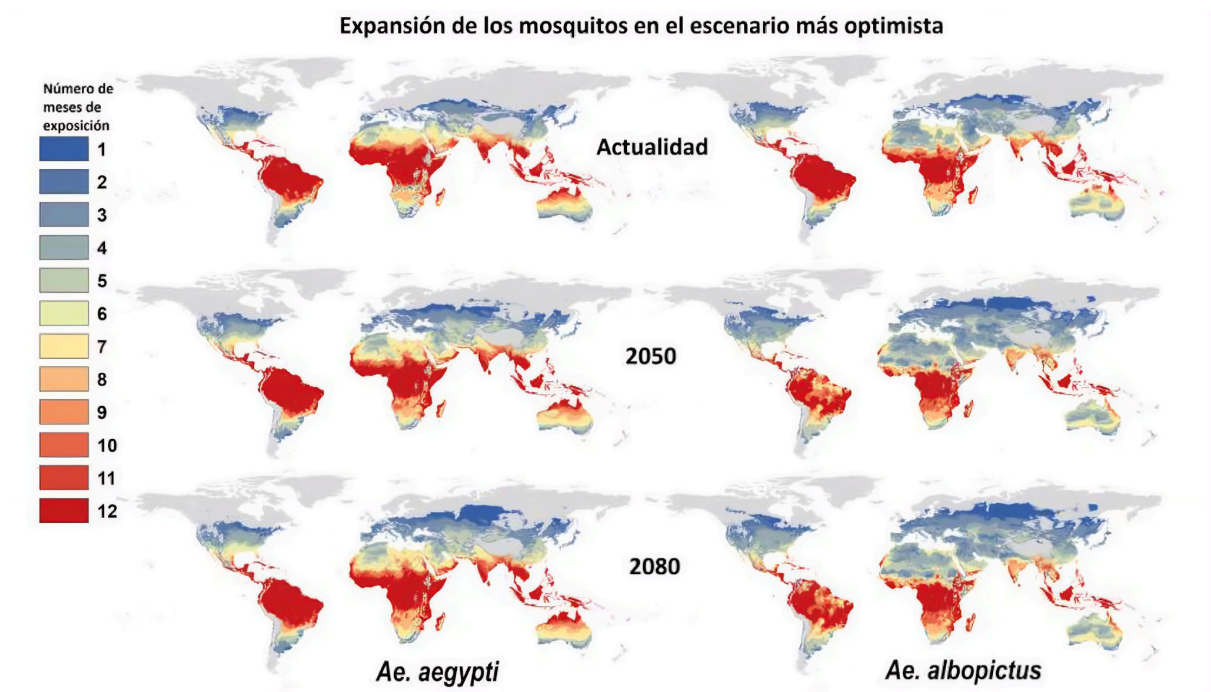


Figura 2. Mapeo de la idoneidad de la temperatura futura para escenarios de transmisión de *A. aegypti* y *A. albopictus*. Imagen modificada de Ryan et al., 2019.

1.2 Ciclo de transmisión de los arbovirus

Los arbovirus se transmiten mediante ciclos que involucran vectores hematófagos y hospederos vertebrados, y que pueden clasificarse como selvático, de transición y urbano (Figura 3).

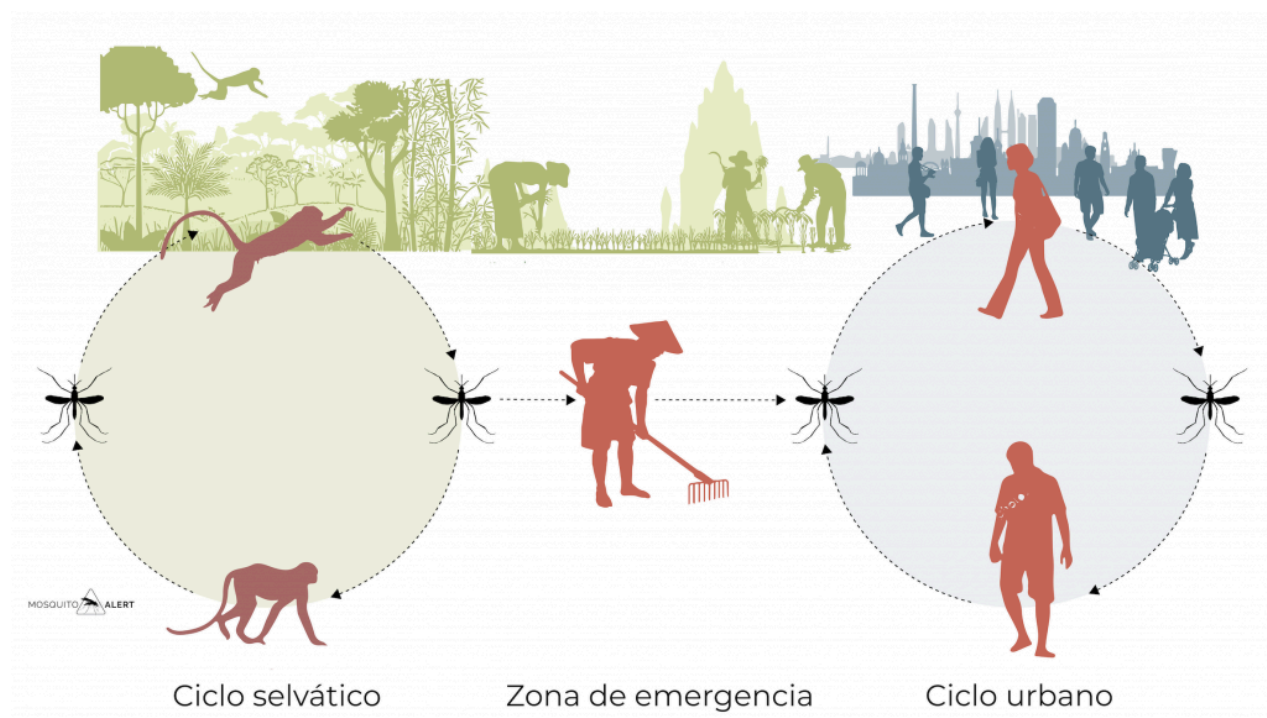


Figura 3. Ciclos de transmisión de los arbovirus y sus agentes participantes. Imagen tomada de Richter-Boix, 2020.

En el ciclo selvático (también llamado enzoótico), el virus se mantiene circulando entre vectores silvestres, como mosquitos del género *Haemagogus*, y reservorios animales, como primates no humanos o aves, sin participación directa de los humanos. Sin embargo, las personas pueden infectarse incidentalmente al entrar en estos entornos naturales, como ocurre en regiones tropicales (Vasconcelos et al., 2001; Weaver & Reisen, 2010). En determinadas condiciones ecológicas y sociales, estos virus pueden escapar del ciclo selvático y comenzar a transmitirse en zonas rurales o periurbanas donde coexisten vectores silvestres y domésticos, animales de cría y humanos. Este escenario da lugar al ciclo de transición o epizootico, caracterizado por la aparición de brotes en animales domésticos o humanos a partir de reservorios naturales, donde las aves silvestres actúan como reservorios y *Culex* spp. como vectores puente hacia los humanos (Petersen et al., 2013; Ikegami & Makino, 2011). Finalmente, algunos arbovirus han logrado adaptarse completamente a un ciclo urbano, en el que los humanos funcionan como principales hospedadores amplificadores y la transmisión ocurre principalmente entre personas mediante vectores domiciliarios como el *Aedes aegypti* (Gubler, 2011; Kuno & Chang, 2005). Estos escenarios de transmisión dependen de la capacidad del virus para infectar y replicarse en el vector y en el hospedero vertebrado. Por ello, en las Figuras 4 y 5 se resumen las etapas.

Estos escenarios de transmisión dependen de la capacidad del virus para infectar y replicarse en el vector y en el hospedero vertebrado. Por ello, en las Figuras 4 y 5 se resumen las etapas clave del ciclo replicativo en el mosquito y en el humano, respectivamente, las cuales sustentan la dinámica de mantenimiento y propagación de los arbovirus.

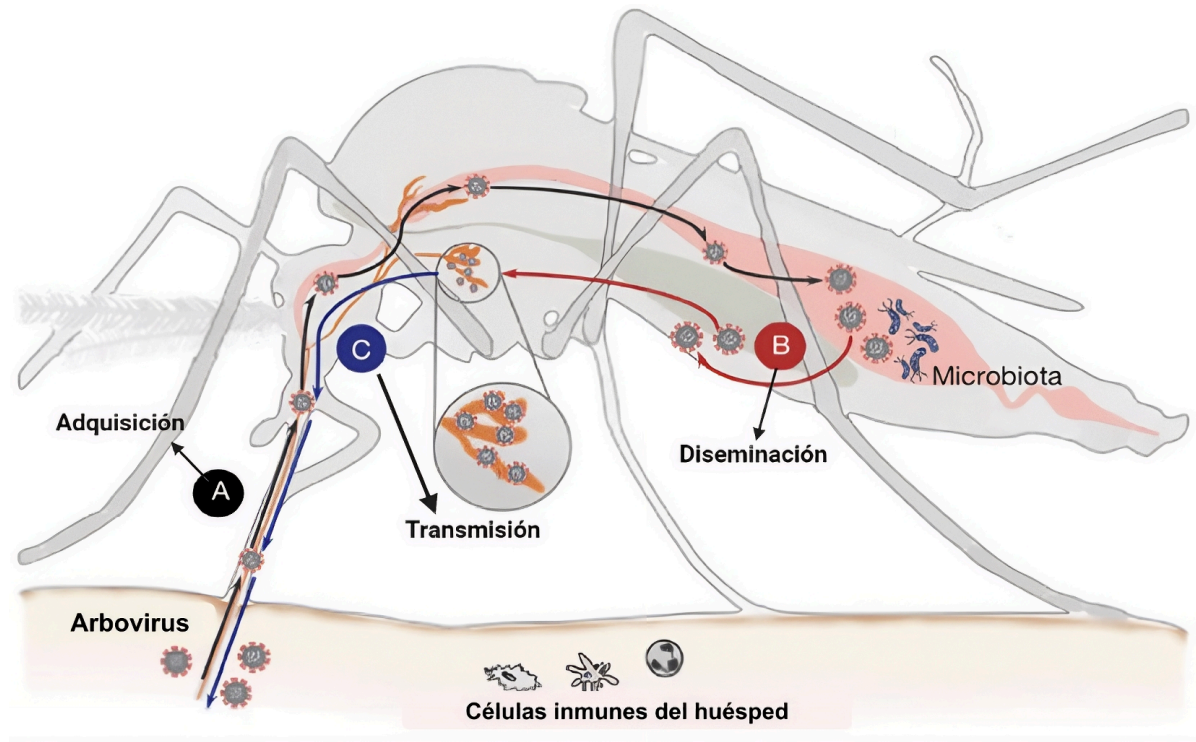


Figura 4. Ciclo infeccioso de los arbovirus en mosquitos. Se muestra el recorrido biológico del virus desde su ingreso al intestino medio durante la alimentación sanguínea (A), su replicación y escape hacia la hemolinfa modulado por la microbiota local (B), hasta su acumulación y secreción en las glándulas salivales (C) para cerrar el ciclo de transmisión en el vector. Imagen tomada y modificada de Wu, 2019.

En los mosquitos, el ciclo reproductivo de los arbovirus comienza cuando la hembra ingiere sangre de un hospedador que se encuentra infectado (adquisición), entonces las partículas virales entran al intestino medio, donde el virus atraviesa la membrana peritrófica e infecta las células epiteliales intestinales. Pasada esta primera ronda de replicación, las partículas virales cruzan la membrana basal y se diseminan a través de la hemolinfa hacia órganos secundarios (diseminación) incluyendo las glándulas salivales, donde ocurre una intensa replicación. Posterior a este período de incubación extrínseca, el mosquito es capaz de transmitir el virus a través en una nueva ingesta de sangre a un nuevo hospedador, cerrando el ciclo en el vector. Factores como la microbiota intestinal del mosquito pueden modular este proceso, afectando su competencia vectorial (Wu, 2019).

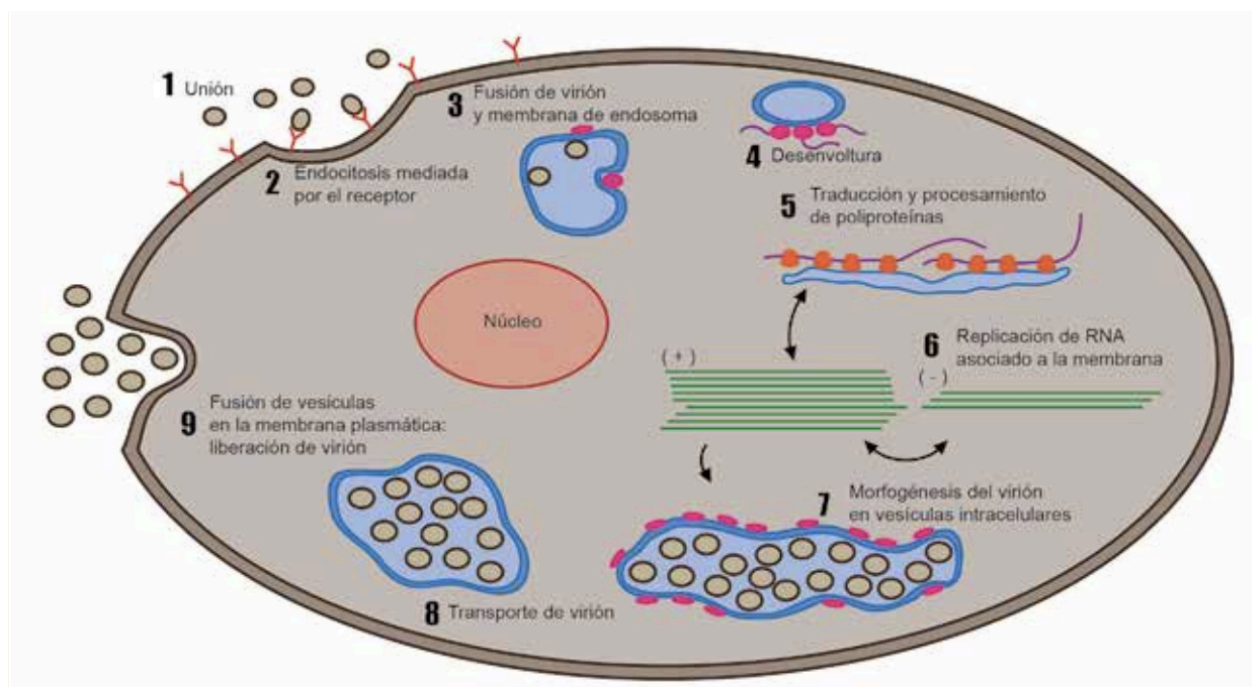


Figura 5. Ciclo replicativo de los arbovirus. Imagen tomada y modificada de Wu, 2019.

En el humano, u otro vertebrado susceptible, la infección se inicia cuando el mosquito inocula el virus en la piel y tejido subcutáneo junto con su saliva la cual contiene componentes inmunomoduladores capaces de favorecer la infección inicial (Guerrero et al., 2020). Las partículas virales reconocen y se unen a receptores específicos en la membrana de las células blanco, como queratinocitos, macrófagos y células dendríticas, ingresando por endocitosis mediada por receptor. Posteriormente, la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal libera el genoma de RNA al citoplasma (desnudamiento), donde se traduce en poliproteínas virales que luego son procesadas para generar proteínas estructurales y no estructurales. La replicación del RNA viral ocurre en complejos asociados a membranas intracelulares, produciendo nuevas copias del genoma que se ensamblan junto con proteínas estructurales en vesículas para llevar a cabo la morfogénesis. Los viriones maduros son transportados hacia la membrana plasmática y liberados por exocitosis, alcanzando la circulación sanguínea (viremia). Esta viremia permite la diseminación hacia órganos diana, como hígado, bazo, cerebro o articulaciones, según el tropismo viral, y marca el periodo en el que un mosquito no infectado puede adquirir el virus, reiniciando el ciclo (Rodríguez et al., 2019).

Otro de los mecanismos de transmisión reportados es la transmisión transovárica la cual consiste en que una hembra infectada transmite la infección de manera vertical a su

descendencia a través de la multiplicación del virus en los ovarios y de esta manera posteriormente en los huevos, larvas y así en adultos tanto hembras como machos, lo cual se ha documentado en diversos arbovirus (Heath et al., 2020; Mbaoma et al., 2025). Este mecanismo favorece la persistencia viral incluso durante periodos sin actividad de transmisión, cuando la circulación entre hospedadores vertebrados disminuye, como ocurre en estaciones secas o frías (Mbaoma et al., 2025).

Además de la vía vectorial, algunos arbovirus pueden transmitirse por otras rutas en circunstancias específicas. Por ejemplo, se han descrito casos de transmisión del virus Zika (ZIKV) por vía sexual, perinatal y transfusional. Asimismo, los virus como el de la fiebre del Valle del Rift (RVFV) pueden transmitirse por contacto directo con sangre o tejidos de animales infectados, representando un riesgo ocupacional para trabajadores agrícolas o veterinarios (Foy et al., 2011; Petersen et al., 2016; Ikegami & Makino, 2011).

En conjunto, los mecanismos de transmisión de los arbovirus están estrechamente ligados a la ecología del vector, la densidad y susceptibilidad de los hospedadores, y a factores ambientales y sociales como el cambio climático, la urbanización y los movimientos poblacionales, que afectan la dinámica de transmisión y favorecen la expansión geográfica de estos virus (Weaver & Reisen, 2010; Gubler, 2011).

1.3. Diversidad Taxonómica

Los arbovirus no constituyen un grupo taxonómico único ni un clado monofilético; se trata de un término operativo que engloba virus pertenecientes a múltiples familias, definidos por su transmisión biológica mediante artrópodos hematófagos (Weaver & Barrett, 2004). En términos genómicos, predominan los virus de RNA, principalmente de cadena sencilla (ssRNA) de polaridad positiva o negativa, aunque también existen arbovirus con RNA bicatenario (dsRNA); la principal excepción es el virus de la peste porcina africana (ASFV), considerado el único arbovirus de DNA (Figura 6). (Weaver & Barrett, 2004).

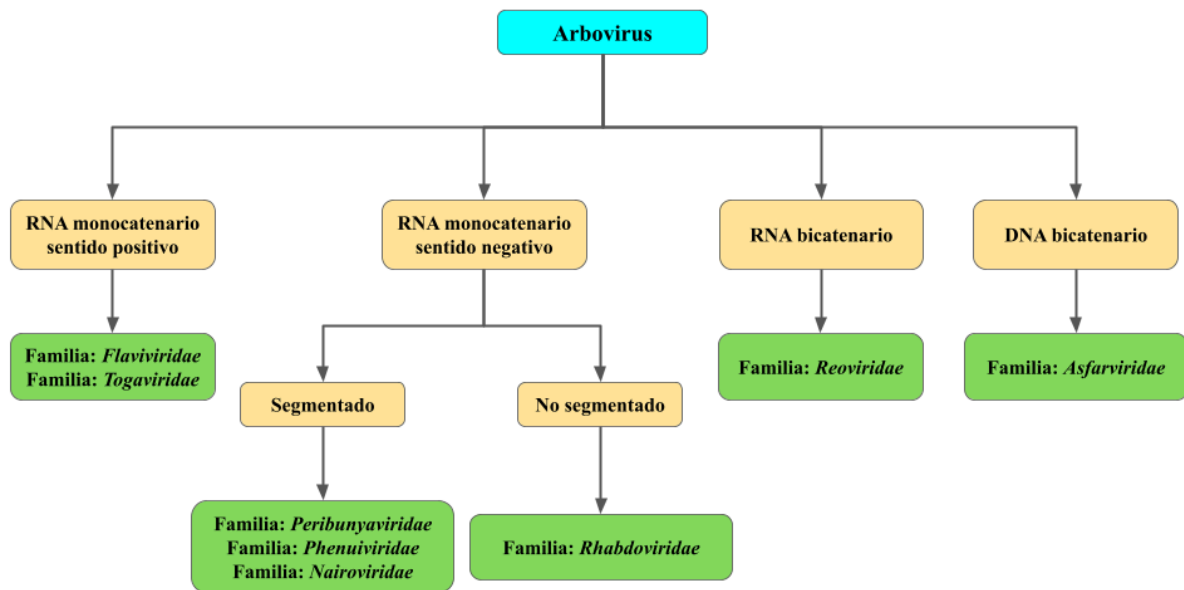


Figura 6. Clasificación taxonómica y tipo de genoma de los arbovirus. Los recuadros amarillos representan la naturaleza del genoma (tipo y polaridad) y los recuadros verdes representan las familias virales.

Dentro de la familia *Flaviviridae*, el género *Orthoflavivirus* incluye varios de los arbovirus más importantes a nivel global, como el virus del dengue (DENV), el virus de Zika (ZIKV), el virus del Nilo Occidental (WNV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV). Estos virus poseen un genoma de RNA monocatenario de sentido positivo (+ssRNA), no segmentado, de aproximadamente 10.7 kilobases, que codifica una única poliproteína, que es procesada para dar lugar a tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete no estructurales (NS1 a NS5) (Figura 7). El genoma está flanqueado por regiones no codificantes (UTRs) esenciales para la replicación viral y regulación de la traducción (Gould & Solomon, 2008; Lindenbach & Rice, 2003; Mukhopadhyay et al., 2005).

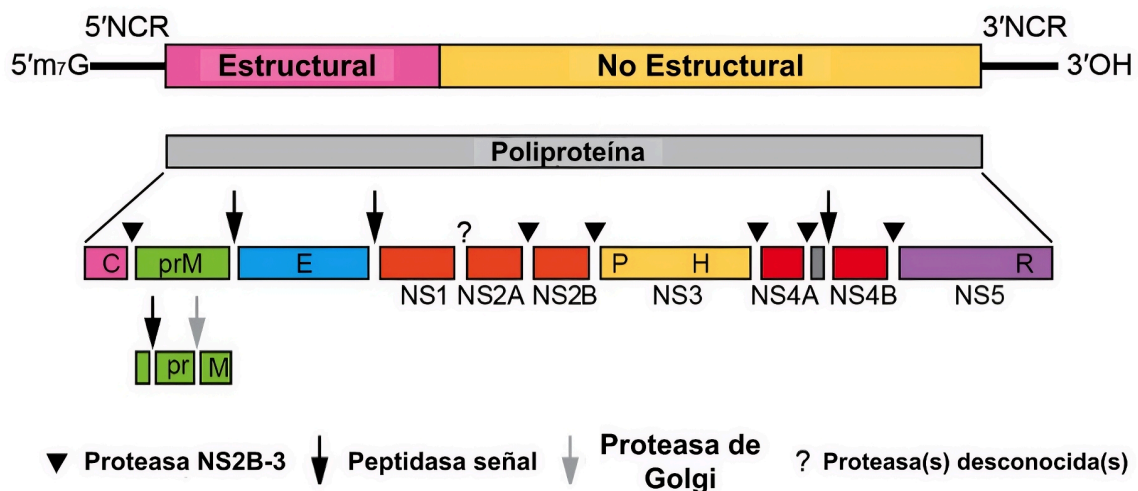


Figura 7. Organización del genoma de los virus del género *Orthoflavivirus*. El genoma consiste en un RNA monocatenario de polaridad positiva (+ssRNA) con una caperuza de 7-metilguanosina (5'-m₇G) en su extremo 5' y regiones no codificantes terminales (5'NCR y 3'NCR). Un único marco abierto de lectura codifica una poliproteína precursora que es procesada por peptidasas virales y celulares. Las puntas de flecha negras (▼) indican los sitios de corte procesados por la proteasa viral compleja NS2B-3; las flechas negras (↓) señalan los sitios de escisión por la peptidasa de señal celular; la flecha gris (↓) denota el corte tardío por la proteasa de Golgi (furina) para la maduración de prM; el signo de interrogación (?) indica sitios de procesamiento por proteasas celulares aún no determinadas completamente. Imagen tomada de ICTV Virus Taxonomy Profiles (Simmonds et al., 2017).

En la familia *Togaviridae*, el género *Alphavirus* incluye virus como el virus de chikungunya (CHIKV), el virus de Mayaro (MAYV) y los virus de la encefalitis equina del este (EEEV), del oeste (WEEV) y venezolana (VEEV), todos con potencial epidémico en humanos y animales. Los *Alphavirus* presentan un genoma de RNA monocatenario de sentido positivo (+ssRNA), no segmentado, de aproximadamente 11.7 kb. El genoma está organizado en dos regiones principales: una que codifica proteínas no estructurales (nsP1 a nsP4) directamente del genoma, y otra región traducida a partir de un RNA subgenómico que codifica las proteínas estructurales (C, E3, E2, 6K y E1) (Figura 8) (Powers et al., 2001; Strauss & Strauss, 1994; José et al., 2015).

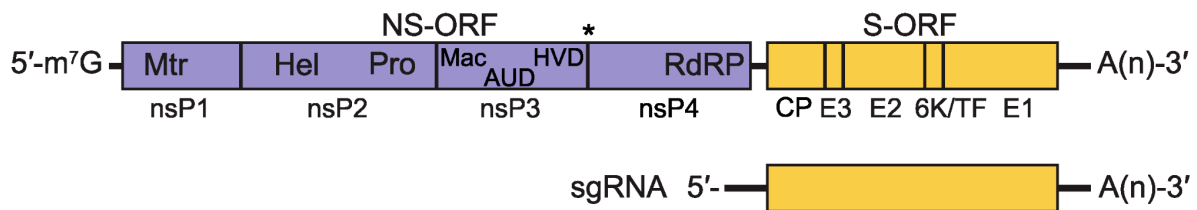


Figura 8. Organización del genoma de los virus de la familia *Togaviridae*. El genoma contiene dos marcos abiertos de lectura (ORFs). El ORF no estructural (NS-ORF) se localiza hacia el extremo 5' modificado con caperuza (5'-m₇G) y codifica las proteínas nsP1 a nsP4 responsables del complejo de replicación; el asterisco (*) indica el codón de terminación interno cuya supresión parcial regula los niveles de la polimerasa nsP4. El ORF estructural (S-ORF) se encuentra hacia el extremo 3' poliadenilado [A(n)-3'] y se expresa de manera independiente mediante la transcripción de una molécula de RNA subgenómico (sgRNA). Imagen tomada de ICTV Virus Taxonomy Profiles (Kuhn *et al.*, 2020).

Por su parte, en la familia *Peribunyaviridae*, los virus del género *Orthobunyavirus* comprenden agentes de importancia como el virus de Oropouche (OROV) y el virus de La Crosse (LACV). Estos virus tienen un genoma de RNA monocatenario de sentido negativo (-ssRNA) segmentado en tres fragmentos: L (que codifica la RNA polimerasa viral), M (que codifica glicoproteínas de envoltura y proteínas no estructurales) y S (que codifica la nucleoproteína y en algunos casos una proteína no estructural llamada NSs) (Figura 9). Esta segmentación permite eventos de reordenamiento genético ("reassortment") entre cepas (Briese *et al.*, 2021; Elliott, 2014; Gerrard *et al.*, 2007).

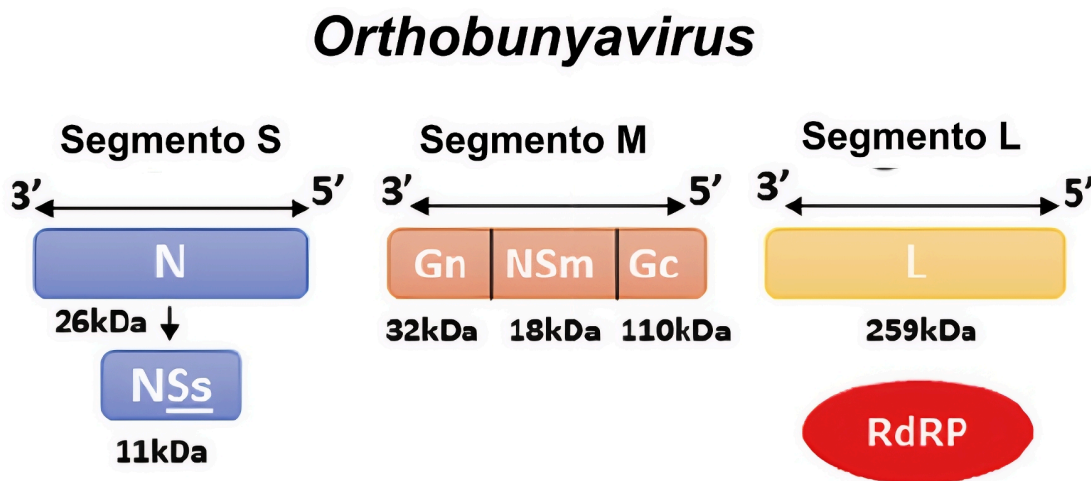


Figura 9. Organización del genoma de los virus del género *Orthobunyavirus*. Organización de las tres moléculas de RNA monocatenario de polaridad negativa (-ssRNA) que componen el genoma viral. Se indica la orientación de las cadenas (3' a 5') y el peso molecular de los productos proteicos en kilodaltons (kDa). El segmento S (Pequeño) codifica la proteína estructural N y la regulatoria NSs. El segmento M (Mediano)

codifica una poliproteína precursora estructural de la cual derivan Gn, NSm y Gc. El segmento L (Grande) codifica de manera única la proteína L con actividad polimerasa. Imagen tomada de Peinado et al., 2022.

Asimismo, la familia *Phenuiviridae* incluye al género *Phlebovirus*, donde se encuentran el RVFV y el virus de la fiebre por flebótomos de Nápoles (SFNV), ambos con impacto en salud humana y veterinaria. Estos virus también poseen un genoma de RNA monocatenario segmentado, de polaridad negativa o ambisense, compuesto por tres segmentos (L, M y S) con funciones similares a los de *Peribunyaviridae* (Figura 10). El segmento S de algunos *Phlebovirus* muestra organización ambisense, lo que añade complejidad a su expresión genética (Elliott, 2014; Ikegami & Makino, 2011; Xu et al., 2007).

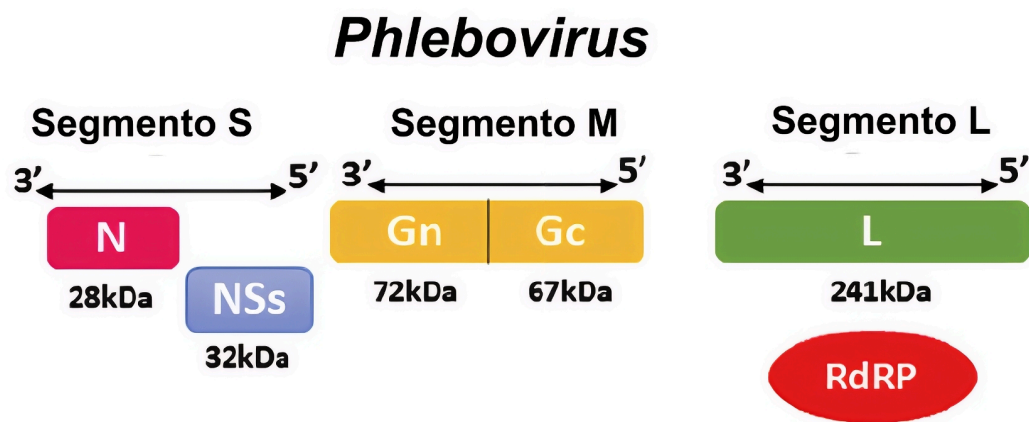


Figura 10. Organización del genoma de los virus del género *Phlebovirus*. Esquema molecular de los tres segmentos genómicos de RNA monocatenario orientado de 3' a 5'. El segmento S destaca por su naturaleza ambisentido, donde la proteína estructural N está codificada en sentido negativo y la proteína no estructural NSs en sentido positivo, separadas por una región intergénica. El segmento M codifica el precursor de las glicoproteínas maduras de la envoltura Gn y Gc. El segmento L codifica la enzima polimerasa L. Imagen tomada de Peinado et al., 2022.

Otras familias como la *Sedoviridae* que cuenta con 7 géneros como el de los *Orbivirus* que incluye al virus de la lengua azul (BTV) el cual presentan un genoma de RNA bicatenario (dsRNA) organizado en 10 segmentos (Figura 11.). Cada segmento codifica una proteína estructural o no estructural específica. Estos virus tienen cápsides multilaminares y replican en estructuras citoplasmáticas denominadas viroplasma.

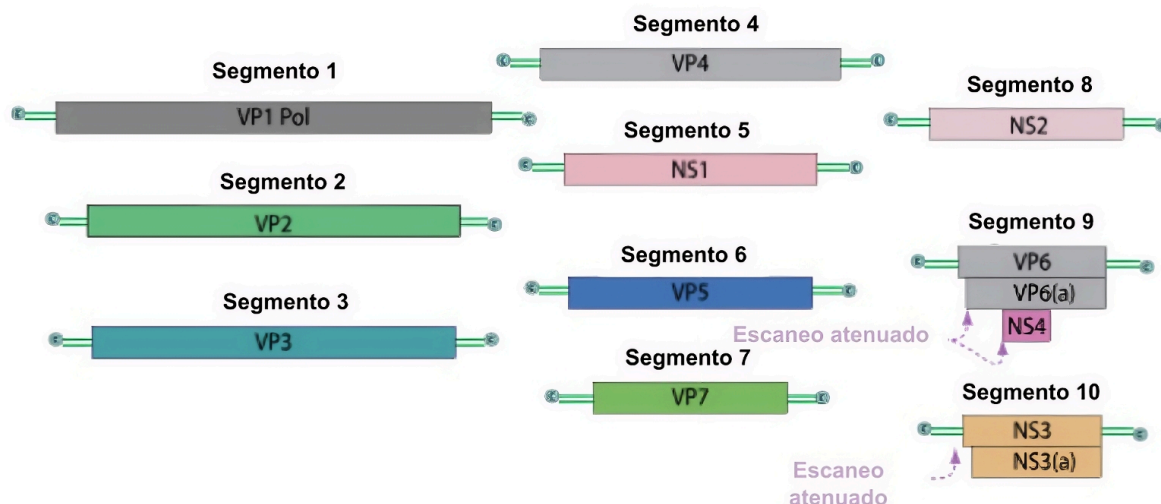


Figura 11. Organización del genoma de los virus del género *Orbivirus*. El genoma consta de 10 segmentos de RNA bicatenario (dsRNA) con estructuras de caperuza (c) en sus extremos 5'. Las flechas discontinuas moradas señalan el mecanismo de escaneo atenuado del ribosoma (leaky scanning), mediante el cual el complejo de traducción omite ciertos codones de inicio (AUG) para traducir proteínas alternativas en marcos de lectura superpuestos o codones de inicio internos en un mismo segmento de RNA, permitiendo la síntesis coordinada de VP6, VP6(a) y la proteína no estructural NS4 (Segmento 9), y de NS3 y NS3(a) (Segmento 10). Imagen tomada de ViralZone 2008 © – Swiss Institute of Bioinformatics.

Por otro lado, la familia *Rhabdoviridae* que incluye a especies de virus emergentes transmitidos por insectos como el virus de Chandipura (CHPV) o el virus de Isfahan (ISFV), posee un genoma de RNA monocatenario de sentido negativo (-ssRNA), no segmentado, de aproximadamente 11–15 kb, que codifica cinco proteínas principales: N, P, M, G y L (Figura 12.) (Mertens et al., 2005; Damasceno-Caldeira et al., 2023; Walker et al., 2018; Dietzgen et al., 2011).

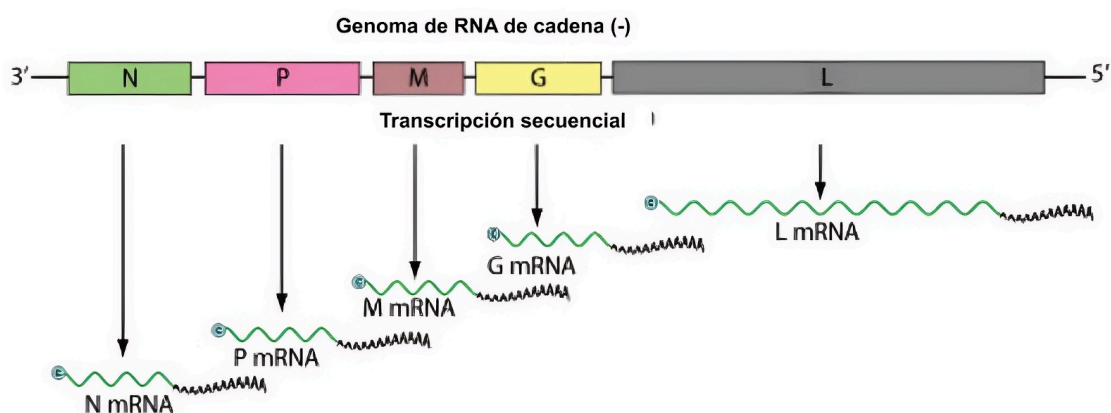


Figura 12. Organización del genoma de los virus de la familia de los *Rhabdoviridae*. El genoma está constituido por una molécula de RNA monocatenario de polaridad negativa (-ssRNA) no segmentado (orientación 3' a 5').

La RNA polimerasa inicia de manera lineal la síntesis de los mRNA individuales provistos de caperuza (c) y cola poli(A). Debido a la disociación estocástica de la polimerasa al encontrar las regiones intergénicas de control, se produce un gradiente de transcripción polarizado y decreciente hacia el extremo 5', lo que resulta en una abundancia diferencial de proteínas esenciales ($N > P > M > G > L$). Imagen tomada de ViralZone 2008 © – Swiss Institute of Bioinformatics.

Toda esta diversidad taxonómica refleja una compleja historia evolutiva, lo que plantea importantes retos para la vigilancia y el diagnóstico, especialmente en regiones tropicales donde los arbovirus emergentes aún no caracterizados siguen en circulación (Blitvich & Firth, 2015; Díaz et al., 2022).

1.4 Situación epidemiológica de los arbovirus en la región de América

En el continente americano las arbovirosis son un desafío persistente para la salud pública debido a varios ámbitos como a su elevada carga de enfermedad, su amplia distribución geográfica y potencial epidémico. De los más relevantes destacan el DENV, CHIKV y ZIKV (Figura 13), transmitidos principalmente por mosquitos del género *Aedes*, y responsables de la gran mayoría de casos reportados en las últimas dos décadas.

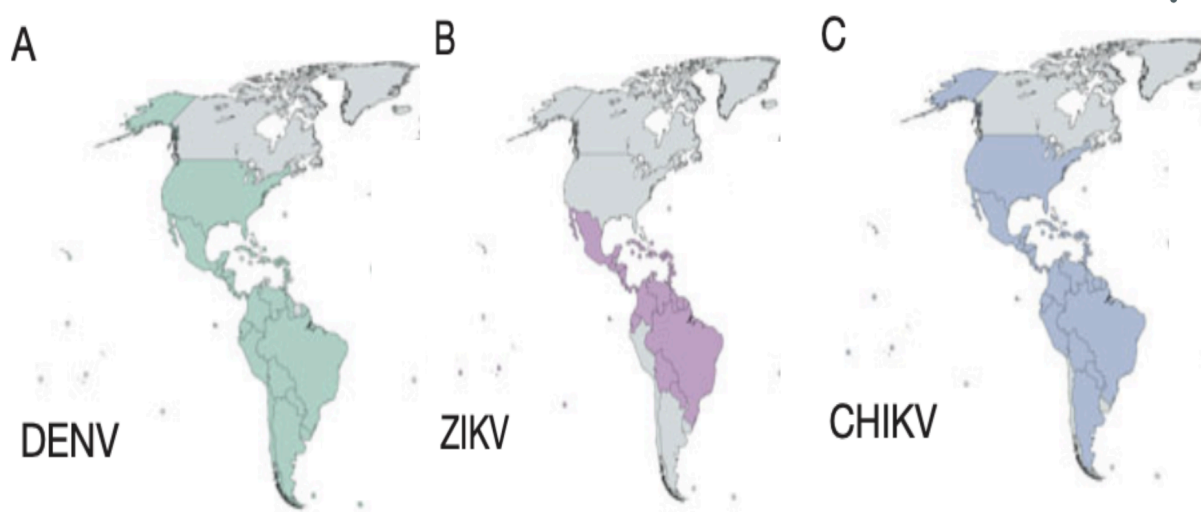


Figura 13. Distribución de los arbovirus más frecuentes en América. A) DENV: virus del Dengue (verde); (B) ZIKV: virus del Zika (morado); (C) CHIKV: virus del Chikungunya (azul). Imagen tomada de Wu et al., 2019.

El DENV es el arbovirus más común en América. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en 2024 se notificaron más de 9 millones de casos en 43 países y territorios del continente lo que representa un incremento sustancial respecto a los 4 millones de casos registrados en 2023 (OPS, 2024).

El CHIKV, que fue introducido en el continente en 2013, causó una epidemia de rápida expansión entre 2014 y 2017. Aunque su circulación disminuyó posteriormente, en 2024 se reportaron más de 180,000 casos, con el 97% concentrado en Brasil, lo que demuestra su mantenimiento endémico en ciertas regiones (OPS, 2024).

Por su parte, el ZIKV alcanzó su máxima expansión en 2015–2016 con más de 860,000 casos reportados en América. Aunque actualmente su circulación es baja persiste de forma esporádica en algunos países como Brasil, Guatemala y Paraguay, bajo monitoreo epidemiológico (PAHO, 2021).

Además de los tres arbovirus más frecuentes ya mencionados, en la región de América también circulan otros arbovirus con menor prevalencia (tabla 1), pero con un potencial epidémico y clínico considerable. Muchas veces estos arbovirus representan un desafío importante para los sistemas de vigilancia debido a su difícil diagnóstico, la limitada disponibilidad de pruebas específicas y la priorización de los virus más comunes en los algoritmos de atención clínica.

Tabla 1. Arbovirus poco frecuentes que han circulado en América y sus vectores principales por género viral.

Género	Virus	Vector (Género)	Referencia
Orthoflavivirus	Virus del Nilo Occidental (WNV)	<i>Culex spp.</i>	<i>Díaz-Badillo et al., 2011.</i>
	Fiebre Amarilla (YFV)	<i>Aedes spp. y Haemagogus spp.</i>	<i>Fernandes-Matano et al., 2021.</i>
	Encefalitis japonesa (JEV)	<i>Culex spp.</i>	<i>Yap et al., 2020.</i>
	Encefalitis de St. Louis (SLEV)	<i>Culex spp.</i>	<i>Samy et al., 2016.</i>
	Virus Usutu (USUV)	<i>Culex spp.</i>	<i>Brustolin et al., 2017.</i>
Alphavirus	Encefalitis equina del Este (EEEV)	<i>Culiseta spp., Aedes spp., Coquillettidia spp.</i>	<i>Turell et al., 2001.</i>
	Encefalitis equina venezolana (VEEV)	<i>Aedes spp., Ochlerotatus spp., Culex spp.</i>	<i>Belaunzarán-Zamudio et al., 2021.</i>
	Encefalitis equina del Oeste (WEEV)	<i>Culex spp.</i>	<i>Turell et al., 2002.</i>
	Fiebre de Mayaro (MAYV)	<i>Aedes spp., Haemagogus spp.</i>	<i>Ribeiro et al., 2016.</i>
Orthobunyavirus	Fiebre de Oropuche (OROV)	<i>Culicoides spp. Culex Quinquefasciatus</i>	<i>Cardoso et al., 2015.</i>

Entre ellos, el YFV ha causado brotes en países sudamericanos como Brasil, Bolivia y Perú. En 2025 y hasta el 25 de mayo se han notificado 235 casos humanos confirmados de fiebre amarilla en cinco países de la región de América, incluyendo 96 defunciones (OPS, 2025). En México no ha habido reportes de casos humanos aunque sí se ha documentado la presencia del virus en vectores y reservorios animales.

El WNV también se ha detectado en varios países del continente principalmente en Estados Unidos se han reportado más de 52,500 casos acumulados entre 1999 y 2022 (CDC, 2023). En México, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) ha reportado la presencia del virus en mosquitos como *Aedes aegypti* y *Aedes epactius* en el estado de Chihuahua (Tabla 2), aunque sin confirmación de casos humanos (Ortíz-Esquivel et al., 2021).

Tabla 2. Tasas de infección y estimación por MLE del virus del Oeste del Nilo por especie de mosquito en Chihuahua, México septiembre–octubre de 2019.

Especie	Tasa de infección por MLE (IC del 95%)	Límite inferior	Límite superior	Pools	Pools positivos	Individuos
<i>Aedes aegypti</i>	256.99	149.86	403.15	19	10	44
<i>Aedes epactius</i>	324.83	67.76	707.77	5	4	6
<i>Culex tarsalis</i>	298.83	108.23	601.04	9	4	17
<i>Culex quinquefasciatus</i>	20.33	8.83	40.80	33	6	300

Información tomada de Ortiz-Esquivel et al., 2021.

SLEV ha mostrado circulación esporádica en países como Argentina, Estados Unidos y México, donde ha sido identificado tanto en humanos como en mosquitos, por ejemplo, en 2024 se reportaron casos en al menos tres estados de EE. UU., principalmente en California (CDC, 2024).

Respecto a los *Alphavirus*, se han documentado casos recientes de EEEV y WEEV, en el 2024 se reportó un caso confirmado de EEEV en Massachusetts (USA), mientras que en 2023 se notificaron casos de WEEV en humanos y equinos en Argentina y Uruguay. En Brasil se confirmó un caso equino ese mismo año (OPS, 2023).

Otro virus relevante es el MAYV el cual ha sido detectado en humanos en varios países de América del Sur y el Caribe, incluyendo Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú, Surinam, Haití y Venezuela, así como en México y Panamá. Además, se han reportado casos importados en Estados Unidos (OPS, 2019).

Finalmente, el OROV ha mostrado un incremento importante en su circulación desde finales de 2022. En 2024 se reportaron 16.239 casos confirmados de Oropouche, incluidas cuatro muertes en la región de América y en 2025, entre la semana epidemiológica (SE) 1 y la SE 30, se notificaron 12.786 casos confirmados de Oropouche en la región de América. Adicionalmente se notificaron casos confirmados en once países de la región de América. Además, se han notificado 30 casos importados de Oropouche en países de la región Europea (Figura 14) (Epidemiological Update Oropouche in the Region of the Americas - 13 August 2025, 2025; Da Rosa et al., 2017; Zhang et al., 2024).

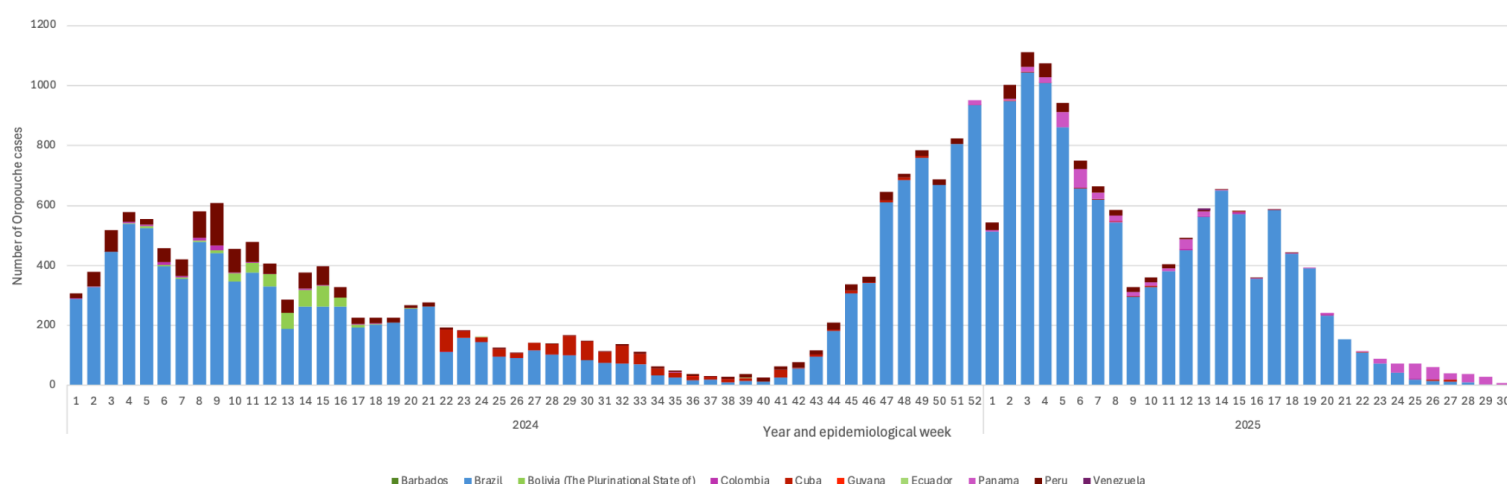


Figura 14. Número de casos confirmados de Oropouche del 2024 al 2025 adaptado de datos proporcionados por los respectivos países y reproducidos por la OPS/OMS. Imagen tomada de Actualización Epidemiológica de Oropouche en la Región de las Américas - 13 de agosto de 2025.

El panorama muestra que aun cuando la atención y recursos se concentran en los arbovirus de mayor prevalencia, existe una circulación constante y muchas veces mal diagnosticada de otros arbovirus en la región. La detección oportuna de estos patógenos mediante herramientas moleculares y la caracterización genómica son fundamentales para mejorar la vigilancia epidemiológica y mitigar riesgos sanitarios asociados a estos virus.

1.5 Vigilancia epidemiológica en América

Las infecciones de estos virus suelen presentar un cuadro agudo similar caracterizado por fiebre, cefalea, mialgia, artralgia, malestar general, exantema y síntomas gastrointestinales (Figura 15). En algunos casos, pueden añadirse manifestaciones neurológicas o hemorrágicas, pero en fases tempranas no existe un perfil clínico claramente distintivo que permita al médico tratante diferenciar entre ellos (Chauhan et al., 2022; Damasceno-Caldeira et al., 2023). Esto implica que el diagnóstico basado únicamente en la evaluación clínica es insuficiente, especialmente en regiones con cocirculación de múltiples arbovirus.

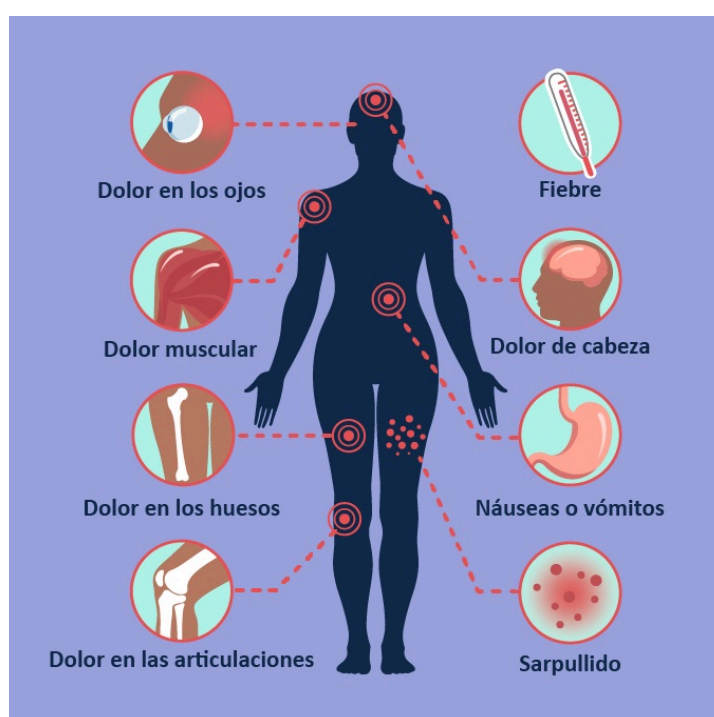


Figura 15. Manifestaciones clínicas comunes en cuadros no graves de arbovirosis. Imagen tomada de CDC.

En México, como en otros países de América Latina, se ha adoptado como estrategia diagnóstica estandarizada el uso de la prueba molecular Triplex RT-PCR, desarrollada y validada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) (Figura 16).

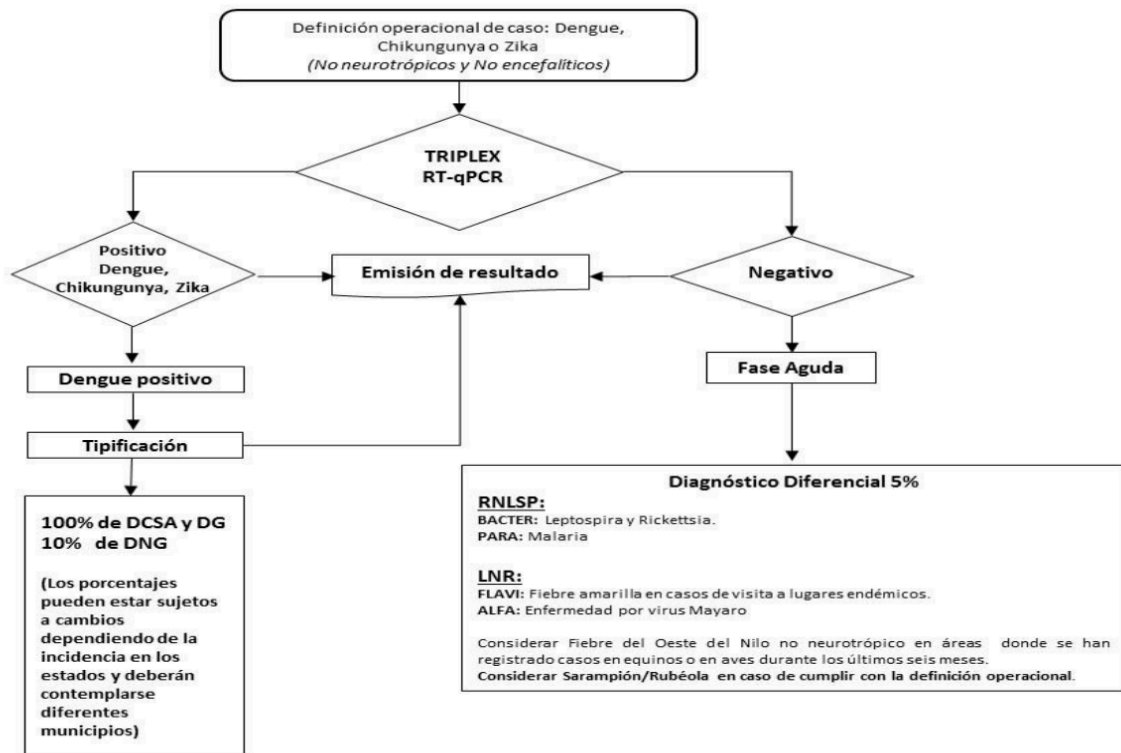


Figura 16. Algoritmo de detección de arbovirus. Imagen tomada de Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio Dengue y otras arbovirosis. Gobierno de México

Esta prueba permite la detección simultánea de DENV, ZIKV y CHIKV a partir de una única muestra de RNA extraída de suero o plasma, mejorando la eficiencia del diagnóstico en etapas agudas de la enfermedad. Este enfoque ha sido implementado en toda la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) en México, y también ha sido adoptado, con ligeras variaciones, en países como Colombia, Brasil, Perú y Argentina, en coordinación con la OPS/OMS y el uso de kits comerciales validados por agencias sanitarias (OPS, 2023).

Sin embargo, uno de los principales retos de este modelo diagnóstico centrado en tres virus es que deja fuera la posibilidad de detectar otros arbovirus, incluso en contextos donde hay sospecha clínica. Cuando el resultado del Triplex es negativo, no siempre se cuenta con protocolos establecidos para analizar otras posibles etiologías, a menos que existan alertas epidemiológicas o proyectos de investigación específicos. Esto contribuye a un subregistro importante de virus como MAYV, SLEV, VEEV o incluso OROV, cuya circulación se ha confirmado en diversos países del continente, pero que raramente son incluidos en rutinas diagnósticas (Zhang et al., 2024; Da Rosa et al., 2017).

En este contexto, los arbovirus de baja prevalencia permanecen fuera del radar epidemiológico, a pesar de su potencial de emergencia o reemergencia. Por ello, su inclusión en estrategias de vigilancia genómica, epidemiológica y entomológica resulta crucial para ampliar la comprensión de su distribución real, evolución genética y riesgo sanitario.

no humanos y mosquitos como los *Haemagogus* y *Aedes*, además que en Colombia se han descrito cuadros inicialmente compatibles con DENV que resultaron MAYV tras un diagnóstico molecular, lo que nos permite visualizar el mimetismo clínico (Torres et al., 2020; Esposito & Fonseca, 2015). En México, además de los reportes serológicos para MAYV/VEEV en comunidades rurales, WNV también se ha documentado en humanos y vectores (humanos y en *Culex quinquefasciatus*) (Elizondo-Quiroga et al., 2005; Ortiz-Esquivel et al., 2021).

Para SLEV, en México se ha detectado una variante ancestral en *Culex nigripalpus* en el Parque Nacional Palenque ubicado en Chiapas, y las filogenias del gen E ha permitido identificar ocho genotipos circulando en nuestro continente (Kopp et al., 2013; Díaz et al., 2018).

En cuanto a VEEV, existe evidencia en humanos y equinos en el norte de Sudamérica y Mesoamérica, donde se registran brotes de reemergencia que exigen diagnóstico diferencial capaz de lograr su identificación (Aguilar et al., 2011; Paniz-Mondolfi et al., 2020).

Por último, la evidencia tanto clínica y genómica sólida de USUV indica que este virus se encuentra principalmente en Europa y África, no obstante en América no hay confirmación en humanos, pero en Colombia, un estudio de vigilancia detectó fragmentos de NS5 compatibles con USUV por RT-qPCR en nueve pacientes febriles (Tabla 3); al ser solo un segmento el detectado no podemos corroborar su circulación lo que requiere confirmación por aislamiento y/o secuenciación completa antes de inferir circulación autóctona (Sánchez-Lerma et al., 2024; Moureau et al., 2007; Garcia-Oliveira et al., 2023; dos Santos et al., 2025; Vilibić-Čavlek et al., 2025).

Tabla 3. Resultados mínimos de laboratorio en pacientes con tamizaje para USUV y otros arbovirus en Colombia, durante el periodo 2021-2022.

Paciente	RT-qPCR USUV (Ct, NS5)	USUV seroconversión	IgG: CHIKV (conv.)	IgG MAYV (conv.)	IgG DENV (aguda)
4	32.4	Sí	Pos	Pos	Neg
37	30.3	No	Neg	Pos	Neg
72	26.8	No	Neg	Neg	Neg
75	32.0	Sí	Neg	Neg	Neg
82	31.0	No	Neg	Neg	Neg

84	34.3	Sí	Pos	Neg	Pos
94	33.1	No	Neg	Neg	Neg
97	32.4	No	Neg	Pos	Neg
100	29.8	ND	Neg	ND	Neg

Información Tomada de Sánchez-Lerma *et al.*, 2024

Nota: Seroconversión = IgG negativa en suero agudo y positiva en convaleciente o aumento significativo entre pares agudo-convaleciente; ND = no disponible/no realizado; Ct corresponde a RT-qPCR pan-flavivirus en NS5; valores menores indican mayor carga de RNA. conv. = suero en fase convaleciente; aguda = suero en fase aguda; Pos = positivo; Neg = negativo.

2.2 Avances tecnológicos para la caracterización genómica

La caracterización genómica es fundamental para comprender la diversidad, evolución y dinámica de los arbovirus, particularmente en aquellos de baja prevalencia. Tradicionalmente, las limitaciones en la disponibilidad de aislamientos, la infraestructura y la priorización hacia virus de mayor relevancia clínica han restringido estos estudios.

La introducción de plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS) ha transformado este panorama, al permitir la obtención de genomas completos o parciales directamente a partir de muestras clínicas o cultivos, sin requerir aislamiento previo. Esta capacidad ha posibilitado la identificación de linajes, la detección de mutaciones con relevancia funcional y la descripción de eventos de "*reassortment*" en virus segmentados como OROV (Zhang *et al.*, 2024; Naveca *et al.*, 2017). Estas herramientas también se han aplicado para confirmar casos, describir variantes emergentes, comparar cepas entre regiones y establecer relaciones filogenéticas con otras previamente registradas (Tabla 4).

Tabla 4. Ejemplos de caracterización genómica de arbovirus poco prevalentes en América.

Virus	Tipo de genoma	País(es) de estudio	Plataforma/estrategia	Referencia(s)
OROV	–ssRNA (segmentado L/M/S)	Brasil, Perú	Illumina; metatranscriptómica / tiling; análisis de " <i>reassortment</i> "	Zhang <i>et al.</i> , 2024; Naveca <i>et al.</i> , 2017.
MAYV	+ssRNA	Brasil, Colombia, Perú	Illumina/Nanopore; genotipos D/L	Mourão <i>et al.</i> , 2012; Esposito & Fonseca, 2015.
WNV	+ssRNA	EE. UU., México	Sanger/NGS; rastreo filogenético regional	Davis <i>et al.</i> , 2005; Ortiz-Esquivel <i>et al.</i> , 2021.

SLEV	+ssRNA	México; América	RT-PCR + sec. parcial / NGS; 8 genotipos (gen E)	Kopp et al., 2013 (Palenque); Díaz et al., 2018.
USUV	+ssRNA	Europa (confirmado); América (evidencia parcial)	RT-qPCR NS5 (tamizaje); requiere confirmación	Sánchez-Lerma et al., 2024 (NS5 en Colombia); Moureau et al., 2007; dos Santos et al., 2025

Entre los ejemplos más relevantes, OROV ha sido secuenciado a partir de brotes en Brasil y Perú, obteniéndose genomas completos de los segmentos L, M y S que han revelado eventos de "reassortment" entre cepas amazónicas (Zhang et al., 2024; Naveca et al., 2017). Para MAYV, estudios en Brasil, Colombia y Perú han identificado dos genotipos principales (D y L) con distribución geográfica diferenciada y posibles implicaciones en su transmisibilidad (Mourão et al., 2012; Esposito & Fonseca, 2015).

SLEV ha sido confirmado en México mediante estudios entomológicos, destacando la detección de una variante ancestral en mosquitos *Culex nigripalpus* en el Parque Nacional Palenque, Chiapas, lo que sugiere una historia evolutiva más antigua y compleja en Mesoamérica (Leendertz et al., 2013). En cuanto a USUV, la estructura molecular de su genoma y sus diferentes variantes genéticas (linajes) ha sido ampliamente estudiada en Europa, en América Latina la evidencia es incipiente; en Colombia, un estudio de vigilancia en Meta detectó por RT-qPCR un fragmento de NS5 de USUV en nueve pacientes febriles, hallazgo que, por su naturaleza parcial y la epidemiología conocida de USUV, requiere confirmación por aislamiento y secuenciación genómica antes de afirmar circulación autóctona (Sánchez-Lerma et al., 2024; Moureau et al., 2007; Garcia-Oliveira et al., 2023).

Los análisis genómicos también han permitido identificar mutaciones con impacto potencial en la biología viral, como cambios en proteínas de envoltura, polimerasas de RNA o elementos reguladores, que podrían afectar la adaptación a nuevos vectores, la virulencia o la evasión inmune (Esposito & Fonseca, 2015; Zhang et al., 2024). Estos hallazgos refuerzan la importancia de ampliar la vigilancia molecular en países con circulación de estos virus, particularmente en México, donde la disponibilidad de secuencias sigue siendo limitada.

Uno de los casos más representativos es el de OROV. A partir de brotes ocurridos en Brasil y Perú, se han generado múltiples secuencias genómicas completas de las tres regiones que componen su genoma segmentado (L, M y S), lo que ha permitido identificar eventos de "reassortment" entre cepas de diferentes regiones amazónicas (Zhang et al., 2024; Naveca et al., 2017). Estudios similares se han llevado a cabo con MAYV, especialmente en Brasil, Colombia y Perú, donde se han identificado al menos dos genotipos circulantes (D y L), con

diferencias en su distribución geográfica y posibles implicaciones en su transmisibilidad (Mourão et al., 2012; Esposito & Fonseca, 2015.).

En el caso de WNV, se ha logrado una caracterización genómica extensa desde su introducción al continente americano en 1999, principalmente en Estados Unidos, pero también en países como México, donde se han identificado cepas relacionadas filogenéticamente con las detectadas en Texas y California (Ortíz-Esquivel et al., 2021; Davis et al., 2005). Esto ha permitido rastrear su dispersión a través de vectores migratorios y establecer hipótesis sobre su mantenimiento en la región.

En el caso de SLEV, se ha confirmado su circulación en México mediante estudios entomológicos en el sureste del país. Leendertz et al. (2013) reportaron la detección de una variante ancestral del virus en mosquitos *Culex nigripalpus* recolectados en la selva tropical del Parque Nacional Palenque, en Chiapas. El análisis filogenético de estas cepas sugiere que la historia evolutiva de SLEV en Mesoamérica es más antigua y diversa de lo previamente reconocido, lo que respalda la necesidad de una vigilancia más activa y molecularmente sensible para este virus.

Por su parte, el conocimiento sobre USUV en América Latina sigue siendo limitado. Aunque este virus ha sido ampliamente caracterizado en Europa desde su emergencia en aves y humanos en las últimas décadas, en América su presencia no ha sido formalmente documentada a nivel genómico. No obstante, en Colombia, un estudio de vigilancia en Meta detectó por RT-qPCR un fragmento de NS5 de USUV en nueve pacientes febriles, hallazgo que requiere confirmación por aislamiento y secuenciación genómica antes de afirmar circulación de USUV (Sánchez-Lerma et al., 2024; Moureau et al., 2007; Garcia-Oliveira et al., 2023). Esta brecha de conocimiento representa un vacío importante en la comprensión de la diversidad de flavivirus circulantes en el continente americano.

Los esfuerzos de secuenciación también han sido clave en la identificación de mutaciones con impacto potencial en la biología viral, como cambios en proteínas de envoltura, RNA polimerasa o elementos reguladores del genoma (Esposito & Fonseca, 2015; Zhang et al., 2024). Estos hallazgos no solo tienen implicaciones filogenéticas, sino también funcionales, pues permiten generar hipótesis sobre la adaptación viral a nuevos vectores o reservorios, la posible emergencia de variantes con mayor virulencia, o la resistencia a la respuesta inmune del huésped. En el caso de OROV, se han descrito sustituciones en las proteínas Gn y Gc

asociadas con diferencias fenotípicas en infectividad celular. Asimismo, para MAYV y VEEV se han identificado regiones del genoma con señales de selección positiva en proteínas no estructurales, lo que podría influir en su transmisibilidad en distintos vectores.

En conjunto, la caracterización genómica de arbovirus poco prevalentes en América Latina ha sido fragmentaria, pero cada vez más frecuente. Estos estudios han contribuido a mejorar el conocimiento sobre su diversidad, historia evolutiva y dinámica regional (Naveca et al., 2017; Ortiz-Esquivel et al., 2021). Sin embargo, la disponibilidad de secuencias sigue siendo limitada en comparación con otros virus más estudiados, lo que justifica la necesidad de ampliar estos análisis y reforzar las capacidades de secuenciación en países donde estos virus circulan, como es el caso de México.

2.3 Análisis filogenético y filodinámico de arbovirus emergentes

El análisis filogenético y filodinámico representa una herramienta esencial para entender la evolución, dispersión y adaptación de los arbovirus, particularmente en contextos donde la circulación viral es poco documentada o emergente. Estas metodologías permiten reconstruir la historia evolutiva de los virus, inferir relaciones entre cepas y detectar eventos de diversificación asociados a cambios geográficos, ecológicos o inmunológicos (Lemey et al., 2009; Zhang et al., 2024; Naveca et al., 2017).

Los estudios filogenéticos permiten comparar secuencias virales entre diferentes regiones del genoma y entre muestras de distintas ubicaciones geográficas o periodos temporales. Esto ha sido útil para identificar introducciones múltiples de virus como WNV y MAYV en América, así como para establecer linajes virales persistentes, como se ha reportado para OROV en la Amazonía occidental (Zhang et al., 2024; Naveca et al., 2017).

Los árboles filogenéticos generados a partir de estas secuencias, especialmente mediante métodos bayesianos o de máxima verosimilitud, han permitido definir genotipos, linajes y clados específicos. En OROV, por ejemplo, se han identificado linajes que difieren entre regiones amazónicas del norte de Brasil, Perú y Ecuador (Figura 18) (Naveca et al., 2017; Zhang et al., 2024). Estos patrones sugieren una circulación regional restringida, probablemente asociada a barreras geográficas y al papel específico de ciertos vectores en cada localidad.

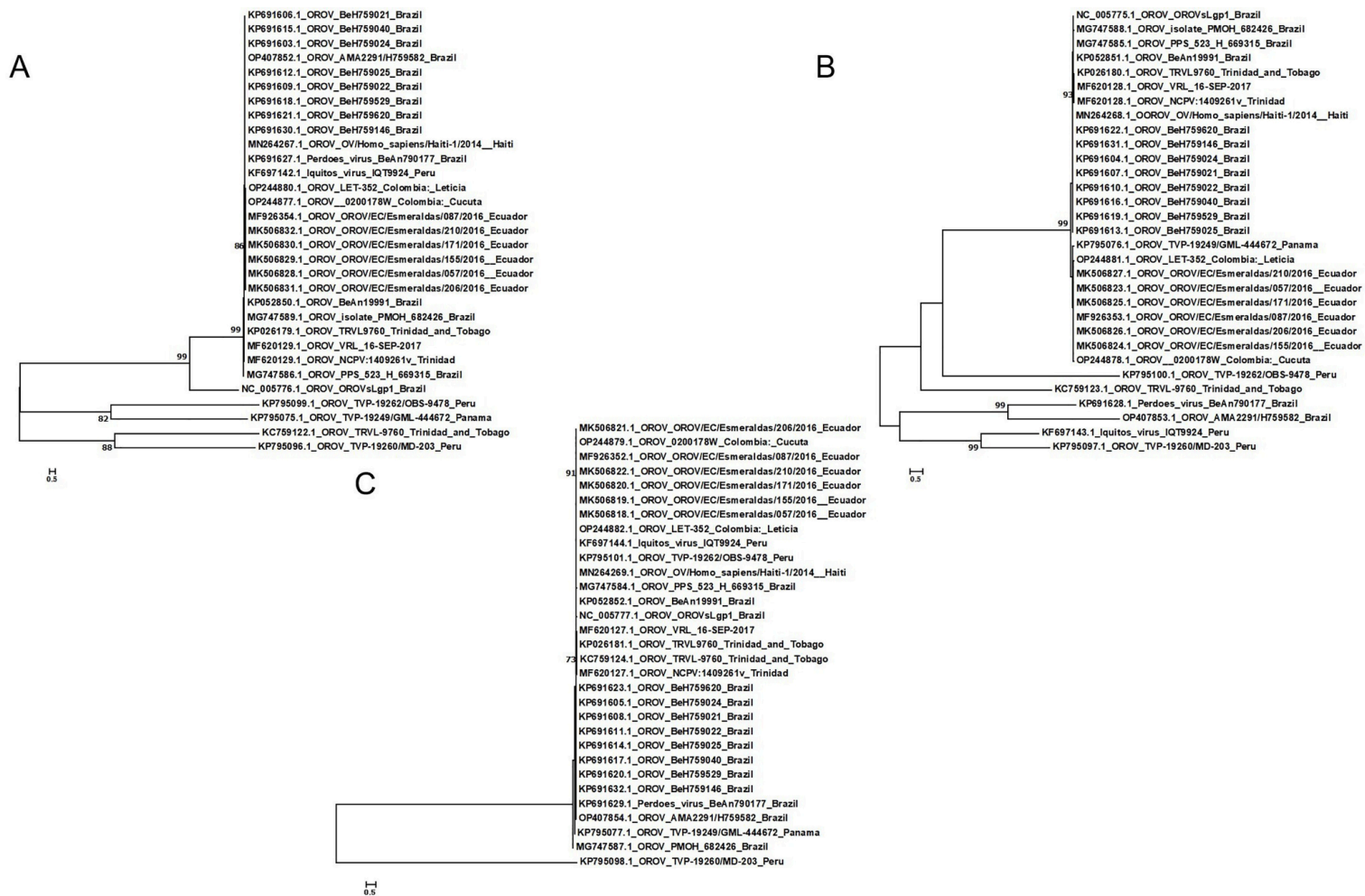


Figura 18. Árbol filogenético de tres segmentos del virus Oropouche. A para segmentos L, B para segmentos M, C para segmentos S. Imagen tomada de Zhang et al. 2024.

Por otro lado, el enfoque filodinámico permite integrar datos genéticos con información temporal y espacial, a fin de modelar la dinámica de transmisión de los virus en poblaciones humanas o animales. Esta aproximación ha sido utilizada para estimar tasas de evolución, fechas de aparición de linajes, y rutas probables de dispersión viral, mediante herramientas como BEAST, Nextstrain o PhyML (Lemey et al., 2009).

En el caso de MAYV, los análisis filodinámicos han sugerido la existencia de al menos dos genotipos (D y L), con diferencias en su tasa de evolución y posible adaptación a diferentes vectores (Esposito & Fonseca, 2015; Mourão et al., 2012). Se ha hipotetizado que uno de estos genotipos presenta una mayor afinidad con vectores urbanos, lo que podría representar un riesgo adicional para su expansión. Para OROV, se ha identificado una alta diversidad intraespecífica, con linajes que parecen estar restringidos a ciertas cuencas hidrográficas o corredores ecológicos en la región amazónica (Naveca et al., 2017; Zhang et al., 2024).

Estudios sobre SLEV también han revelado una estructuración genética geográfica en América del Norte y Mesoamérica, lo que refuerza la idea de circulación en reservorios locales con poco intercambio interregional (Leendertz et al., 2013).

Estas herramientas también son útiles para detectar señales de selección positiva, presión inmunológica o cuellos de botella poblacionales, que pueden estar relacionados con eventos de transmisión zoonótica, cambios en el vector predominante o presión por campañas de vacunación (Zhang et al., 2024; Mourão et al., 2012). Además, los análisis filodinámicos pueden detectar eventos recientes de expansión viral a partir del aumento en la diversidad genética efectiva en determinados intervalos temporales (Lemey et al., 2009).

2.4 Comparación metodológica

La comparación de metodologías moleculares aplicadas a la detección de arbovirus poco prevalentes permite evaluar no solo la eficacia diagnóstica, sino también la aplicabilidad en diferentes contextos epidemiológicos y de laboratorio. Diversas plataformas y enfoques han sido diseñados o adaptados para cada género viral, dependiendo de características genómicas particulares como el tipo de ácido nucleico, segmentación del genoma o regiones conservadas entre especies. En años recientes, el desarrollo de herramientas de detección de amplio espectro ha cobrado relevancia, como el caso del ensayo basado en RT-qPCR acoplado a microarreglos que permite detectar múltiples flavivirus con alta resolución (Patel et al., 2022), o la prueba genérica TaqMan desarrollada para mejorar la detección sensible de *Alphavirus* independientemente de su origen geográfico (Smith et al., 2021). Este tipo de enfoques permite ampliar la vigilancia molecular en áreas donde circulan múltiples arbovirus o donde existe un diagnóstico clínico inespecífico. La Tabla 5 resume ventajas, limitaciones y usos ideales.

Tabla 5. Ventajas y limitaciones de las principales estrategias de laboratorio para la detección molecular de virus.

Estrategia	Sensibilidad	Especificidad	Hallazgos que ofrece	Limitaciones frecuentes	Uso ideal
RT-qPCR monoplex (específica)	Alta	Muy alta	Confirmación rápida por diana	Requiere a priori; sensible a mutaciones en la diana	Confirmar sospecha clínica/entomo

RT-qPCR multiplex	Media–alta	Alta	Detección simultánea de varios virus	Competencia entre dianas; ligera merma vs monoplex	Brotes con etiología múltiple (Pessoa et al., 2016; Xu et al., 2022)
Pan-flavivirus NS5 (tamizaje)	Media	Media	Tamizaje amplio (fragmento NS5)	Requiere secuenciación/aislamiento para confirmar	Vigilancia sin hipótesis (Moureaux et al., 2007)
Metatranscriptómica (shotgun)	Variable (↑ con depleción rRNA)	Muy alta (tras validación)	Virus inesperados; coinfecciones; cuasiespecies	Costo/infraestructura; contaminación de bajo nivel	Casos negativos a paneles; investigación
Amplicones “tiling”	Muy alta	Alta	Genomas casi completos con baja carga	Diseño/actualización de iniciadores; sesgo de cobertura	Confirmación + WGS en clínica/brote
Captura por hibridación	Alta	Alta	Recupera diversidad alta/antigua	Costo y logística de sondas	Vigilancia con alta diversidad
Sanger (amplicón)	Media	Muy alta	Confirmación de amplicones clave	Baja resolución genómica	Verificación rápida de dianas

2.4.1 Métodos moleculares aplicados a cada género ventajas y limitaciones

Los métodos moleculares aplicados a la detección y caracterización de arbovirus han evolucionado significativamente en la última década, permitiendo un análisis más sensible, específico y rápido de estos agentes virales incluso en contextos de baja prevalencia. Cada género viral presenta características genómicas particulares que determinan la elección de estrategias moleculares adaptadas para su detección y análisis filogenético.

En el caso de los *Orthoflavivirus*, como WNV y SLEV, los métodos más comunes incluyen la amplificación mediante RT-PCR en tiempo real dirigida a regiones conservadas del gen NS5 o la envoltura (E), lo que permite tanto su detección como su diferenciación frente a otros flavivirus. Estos métodos han sido utilizados en protocolos de vigilancia entomológica y en donaciones de sangre. Adicionalmente, se ha desarrollado un enfoque basado en RT-qPCR seguido de microarreglos que permite la detección pan-flavivirus con alta resolución, facilitando la identificación incluso en escenarios de coinfección o circulación múltiple (Patel et al., 2022).

Para *Alphavirus*, como MAYV y VEEV, se han utilizado métodos de RT-PCR convencional y en tiempo real que amplifican regiones de la proteína E1 o nsP1. Estas regiones presentan

diferencias significativas entre especies, lo que permite un diagnóstico diferencial preciso. Además, se han implementado enfoques de RT-nested PCR para mejorar la sensibilidad en contextos donde la carga viral es baja, como en muestras clínicas obtenidas al final del periodo febril (Esposito & Fonseca, 2015).

En el caso de *Orthobunyavirus* como OROV, el diagnóstico molecular se complica por la segmentación de su genoma. Por ello, se han diseñado protocolos que incluyen iniciadores para las regiones L, M y S, con mayor énfasis en el segmento S, que codifica la nucleoproteína y suele tener mayor tasa de conservación. El uso de RT-PCR en tiempo real y punto final ha sido complementado con técnicas de secuenciación para confirmar la identidad del virus (Naveca et al., 2017; Zhang et al., 2024).

La secuenciación de nueva generación (NGS) se ha consolidado como un recurso clave en la identificación de variantes, eventos de resegmentación y análisis filogenéticos detallados. Dependiendo del género viral y del tipo de muestra, se pueden aplicar plataformas como Illumina o Nanopore, así como protocolos de enriquecimiento por captura o amplificación de tiling PCR. Además, estudios recientes han incorporado tecnologías complementarias como microarrays acoplados a RT-qPCR, permitiendo la identificación de múltiples especies de flavivirus con alta resolución y especificidad, como se demostró en el ensayo desarrollado por Patel et al. (2022) para la detección de pan-flavivirus.

Para *Alphavirus* recientemente se han publicado ensayos genéricos de RT-qPCR con alta sensibilidad y amplio rango de especies, lo que facilita el tamizaje en zonas donde no se conoce con certeza qué *Alphavirus* circulan (Figura 19). (Giry et al., 2017)

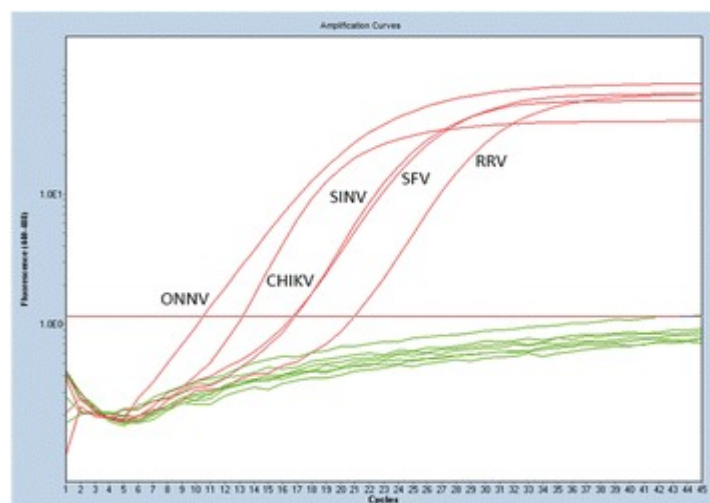


Figura 19. Ensayo RT-PCR en tiempo real para la detección de Pan-Alphavirus. Detección específica de 5 especies de *Alphavirus* cuyos controles positivos para CHIKV, ONNV, SINV, SFV o RRV se obtuvieron de cepas de referencia o se aislaron de muestras clínicas. Imagen tomada de Giry et al., 2017.

En conjunto, los métodos moleculares aplicados a cada género de arbovirus deben considerar la estructura genómica, la prevalencia local, y la disponibilidad de protocolos estandarizados y validados. La integración de estas estrategias ha permitido una mejor caracterización de arbovirus poco comunes en regiones como América Latina, facilitando su incorporación en esquemas de vigilancia y diagnóstico diferencial.

Adicionalmente, el desarrollo de ensayos moleculares multiplex ha cobrado importancia al permitir la detección simultánea de múltiples arbovirus en una sola reacción, optimizando recursos y tiempo diagnóstico. Por ejemplo, el kit comercial TaqMan® Triplex ha demostrado alta sensibilidad y especificidad para la identificación concurrente de DENV, CHIKV y ZIKV en suero humano (Kingwara et al., 2025; Pessoa et al., 2016). En otros estudios, se han diseñado ensayos RT-PCR multiplex de dos tubos que permiten detectar hasta seis arbovirus incluidos ZIKV, CHIKV, DENV, YFV, WNV y JEV en una sola corrida (Xu et al., 2022). Estas plataformas han sido aplicadas exitosamente en laboratorios de salud pública de América Latina.

Asimismo, se han reportado casos confirmados de coinfección por DENV y CHIKV en un solo paciente en Brasil, detectados por RT-qPCR (Daude et al., 2024), lo que refuerza la necesidad de estrategias diagnósticas amplias. Por otro lado, la secuenciación metatranscriptómica ha mostrado capacidad para identificar simultáneamente múltiples virus y microorganismos en una sola muestra, como lo demostró Hall-Mendelin et al. (2013) en mosquitos infectados experimentalmente. Finalmente, nuevas estrategias como RT-qPCR con análisis HRM (High Resolution Melting) también se han desarrollado para distinguir arbovirus de cinco géneros distintos (Cintra et al., 2025), abriendo nuevas posibilidades para la vigilancia integrada.

La vigilancia molecular integrada ha demostrado ser una estrategia eficaz para la detección temprana, monitoreo y respuesta ante arbovirus emergentes o poco prevalentes. Esta aproximación combina herramientas moleculares con vigilancia epidemiológica y entomológica, así como con el análisis filogenético y genómico, permitiendo una respuesta más precisa y oportuna.

Un ejemplo notable es el sistema de vigilancia implementado por el Instituto Nacional de Salud del Perú, que ha utilizado RT-PCR y secuenciación para la detección simultánea de OROV, MAYV, DENV y ZIKV durante brotes febriles en la Amazonía peruana. Esta estrategia permitió identificar circulación mixta, incluyendo infecciones por OROV que no habrían sido detectadas con abordajes clínicos convencionales (Carrera et al., 2022).

Otro caso exitoso se documentó en Brasil durante el brote de ZIKV en 2015-2016, donde el uso de RT-PCR multiplex y metagenómica permitió identificar coinfecciones entre ZIKV, CHIKV y DENV en diferentes regiones del país. Estos hallazgos fueron clave para ajustar las estrategias de manejo clínico y control vectorial (Faria et al., 2017).

En México, estudios del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) han aplicado ensayos de detección multiplex y secuenciación de nueva generación para la identificación y vigilancia de arbovirus como SLEV, WNV y MAYV en mosquitos y muestras clínicas, particularmente en el norte del país (Ortíz-Esquivel et al., 2021).

Además, proyectos internacionales como el consorcio PANDORA-ID-NET y ZIKAlliance han promovido plataformas de vigilancia genómica colaborativa en América Latina, integrando datos moleculares, clínicos y ecológicos, con herramientas bioinformáticas compartidas como Nextstrain para el rastreo en tiempo real de variantes virales (Grubaugh et al., 2019).

Estos ejemplos muestran cómo la vigilancia molecular integrada no solo mejora la capacidad de detección, sino que también permite identificar patrones de transmisión, caracterizar nuevas variantes, y responder con mayor eficiencia ante brotes.

Como se ha descrito el uso de herramientas moleculares en la detección y caracterización de arbovirus poco prevalentes ofrece ventajas significativas, pero también enfrenta limitaciones metodológicas y operativas que deben ser consideradas para una implementación efectiva. Estas limitaciones pueden abordarse a través de un enfoque mixto que considere tanto el tipo de técnica como las particularidades de cada género viral.

En cuanto a las técnicas de RT-PCR, su especificidad y sensibilidad permiten identificar rápidamente infecciones activas; sin embargo, presentan limitaciones cuando se enfrentan a una elevada variabilidad genética, especialmente en virus emergentes o poco estudiados. Por ejemplo, algunos *Orthobunyavirus* como OROV pueden no ser detectados si existen

mutaciones en las regiones blanco del genoma (Zhang et al., 2024). Además, el uso de RT-PCR en regiones endémicas puede verse limitado por la disponibilidad de reactivos estandarizados o por interferencias genéticas que afectan la diferenciación entre especies filogenéticamente cercanas.

En los *Orthoflavivirus*, uno de los retos es la reactividad cruzada entre especies estrechamente relacionadas, como DENV y ZIKV, lo que puede conducir a resultados falsos positivos o confusión diagnóstica. Aunque el desarrollo de pruebas como el microarreglo pan-Flavivirus (Patel et al., 2022) mejora la resolución, su costo y requerimientos técnicos limitan su aplicación en laboratorios con recursos reducidos.

Para *Alphavirus*, las técnicas convencionales de RT-PCR pueden no ser suficientemente sensibles en muestras con baja carga viral o en fases avanzadas de la infección. En esos casos, el uso de estrategias nested o de sistemas genéricos como el TaqMan® universal para *Alphavirus* (Smith et al., 2021) representa una alternativa eficiente, aunque también depende de equipos especializados y validaciones regionales.

En cuanto a la NGS, sus fortalezas radican en la posibilidad de descubrir virus nuevos o variantes inesperadas sin requerir información previa. Sin embargo, esta técnica requiere una infraestructura tecnológica avanzada, experiencia en bioinformática, y un análisis exhaustivo para distinguir entre virus activos, residuos genómicos o contaminantes. Además, la baja abundancia de virus en ciertas muestras clínicas puede reducir la eficacia de detección si no se aplica una estrategia de enriquecimiento previa.

En relación con los ensayos multiplex, si bien su capacidad para detectar múltiples virus en una sola reacción mejora la eficiencia diagnóstica, también puede generar desafíos en la optimización de las condiciones de amplificación para evitar competencia entre dianas. Por ejemplo, los ensayos multiplex aplicados a DENV, CHIKV y ZIKV muestran una ligera reducción de sensibilidad en comparación con ensayos monoplex, especialmente en muestras con carga viral baja (Pessoa et al., 2016; Xu et al., 2022).

A pesar de estas limitaciones, una de las principales fortalezas del enfoque molecular es su adaptabilidad. La posibilidad de actualizar iniciadores y sondas ante la aparición de nuevas variantes, así como la integración de herramientas como HRM, metagenómica y microarrays, fortalece el papel de estas técnicas en programas de vigilancia molecular integrada. Esto es

particularmente relevante en contextos como México y América Latina, donde circulan múltiples arbovirus simultáneamente y donde la vigilancia clínica suele ser inespecífica.

3. Hipótesis

Existen arbovirus poco comunes circulando en México, los cuales pueden ser identificados en muestras de pacientes con sospecha de arbovirosis negativas para DENV, ZIKV y CHIKV.

4. Justificación

La detección temprana y precisa de arbovirus emergentes es crucial para implementar medidas de control y mitigación efectivas, especialmente en regiones donde los vectores artrópodos son prevalentes. Los arbovirus son responsables de enfermedades importantes en humanos y animales, y con la creciente globalización y el cambio climático, su propagación se ha intensificado, aumentando el riesgo de brotes epidémicos y pandémicos.

Las técnicas moleculares actuales ofrecen una ventaja significativa en la detección y caracterización de estos virus. Sin embargo, debido a la diversidad genética de los arbovirus, es fundamental implementar metodologías existentes que permitan su detección oportuna, así como la identificación precisa de las especies virales presentes en muestras clínicas.

La implementación de un sistema robusto de detección molecular que integre diversas técnicas para identificar la presencia de otros arbovirus en muestras clínicas es esencial para detectar patógenos que podrían estar circulando de manera críptica en nuestro país. Este tipo de información permitirá mejorar el diagnóstico y las medidas de control epidemiológico. Además, el reporte de secuencias genómicas de estos virus contribuirá a determinar los patrones de distribución y circulación de dichos arbovirus en México y América Latina.

5. Objetivo General

Detectar y reconstruir la dinámica evolutiva de arbovirus en muestras de pacientes mexicanos con sospecha de arbovirosis y diagnóstico negativo a DENV, ZIKV y CHIKV.

5.1 Objetivos Específicos

1. Determinar la presencia de arbovirus en muestras de pacientes negativas para DENV, ZIKV y CHIKV.

2. Obtener las secuencias de genomas completos de arbovirus presentes en muestras seleccionadas.
3. Reconstruir la dinámica evolutiva y de dispersión de los virus detectados.

6. Estrategia experimental

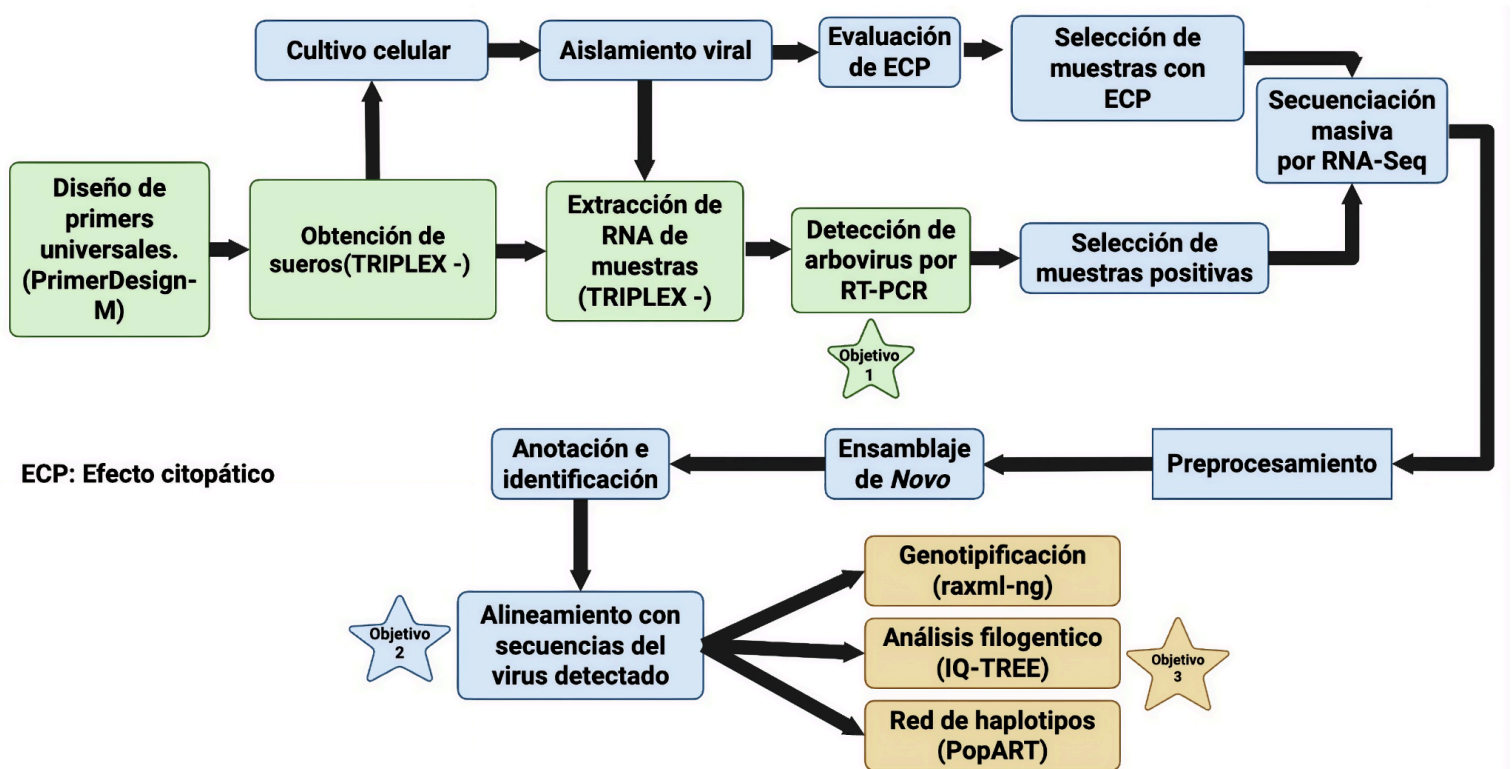


Figura 20. Estrategia experimental

7. Metodología

7.1 Diseño de iniciadores para *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* y OROV

Con el objetivo de diseñar iniciadores para detectar virus de los géneros *Orthoflavivirus* y *Alphavirus*, además del virus OROV se siguió la metodología que se describe en los siguientes párrafos.

Búsqueda de secuencias en bases de datos. Las secuencias de los virus de interés se obtuvieron de la base de datos NCBI Virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>) el día 16 de diciembre del 2024, tomando en cuenta a los virus reportados como responsables de brotes epidémicos en América presentados en la tabla 6. Los criterios de búsqueda fueron por especie viral cuyo año de colecta fuese no mayor a 5 años y que tuvieran como origen el continente americano y como hospedero el humano.

Tabla 6. Arbovirus responsables de brotes epidémicos en América.

Género	Arbovirus	País(es) afectado(s)	Año(s) de reporte
<i>Orthoflavivirus</i>	DENV	Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, República Dominicana, Venezuela	2019-2024
	ZIKV	Brasil, Guatemala, Paraguay, México, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador, Bolivia, Argentina, República Dominicana, Cuba	2020-2024
	WNV	Estados Unidos, Canadá, México, Argentina, Brasil, Colombia, Venezuela, Cuba, República Dominicana, Puerto Rico	2020-2024
	YFV	Bolivia, Brasil, Colombia, Perú, Venezuela, Ecuador, Argentina, Paraguay, Trinidad y Tobago, Guyana, Surinam, Panamá	2021-2024
	SLEV	Argentina, Estados Unidos, Brasil, Colombia, Venezuela, México, Paraguay, Uruguay, Perú, Bolivia, Ecuador	2022-2024
<i>Alphavirus</i>	EEEV	Estados Unidos, Canadá, México, Argentina, Brasil, Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador, Bolivia, Paraguay, Uruguay	2021-2024
	WEEV	Argentina, Uruguay, Brasil, Paraguay, Bolivia, Perú, Colombia, Venezuela, México, Estados Unidos, Canadá	2021-2024
	VEEV	Venezuela, Colombia, México, Perú, Ecuador, Bolivia, Brasil, Argentina, Paraguay, Uruguay, Estados Unidos	2021-2024
<i>Orthobunyavirus</i>	OROV	Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Panamá, Perú, Trinidad y Tobago, Venezuela, Surinam, Guyana, Bolivia	2023-2024

Se descargaron 15 secuencias en formato FASTA de cada virus que cumplió los criterios antes mencionados para asegurar la representatividad de cada especie. La base de datos construida se tomó como base para el diseño de iniciadores para llevar a cabo la detección de los virus mencionados. Para los *Orthoflavivirus* se buscaron iniciadores que amplifican la región que codifica para NS5, en el caso de los *Alphavirus* el fragmento a amplificar fue NSP4 y para el

caso de OROV se buscó amplificar el segmento S de su genoma. Las regiones seleccionadas son las más conservadas en cada uno de los genomas de los virus de interés. A partir de las secuencias obtenidas se construyó un alineamiento múltiple utilizando MAFFT v7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/algorithms/algorithms.html>), con la opción “*add-fragments*” para alinear todas las secuencias contra una referencia (Katoh et al., 2019 & Kuraku et al., 2013). Los alineamientos se visualizaron en AliView v1.28 para verificar su calidad (Larsson, 2014).

A partir de los alineamientos contruidos se diseñaron los iniciadores con la herramienta PrimerDesign-M (Brodin et al., 2013), (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/PRIMER_DESIGN/primer_design.html), buscando amplicones de un tamaño de 500 pb para reacciones de punto final, un tamaño de 200 pb para tiempo real, con un tamaño de iniciador de entre 18 y 21 pb y con una diferencia máxima de $T_m=1$.

7.2 Estandarización de iniciadores de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* y OROV

Para validar los iniciadores diseñados para la detección de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* y OROV, se realizaron ensayos de PCR punto final utilizando condiciones específicas para cada grupo viral. A partir de sobrenadantes de células Vero infectadas con diferentes virus pertenecientes a los *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* y de OROV se obtuvo el RNA de los virus que se usaron como controles de amplificación mediante el kit QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN). Las infecciones y obtención de los virus usados como control se realizaron tanto en el Posgrado en Ciencias Genómicas como en el Laboratorio Nacional de Vacunología y Virus Tropicales con la colaboración del Dr. Jesús Torres Flores que cuenta con un laboratorio BSL3, el cual se requiere para el manejo de algunos de estos virus.

La reacción para la amplificación del genoma de *Orthoflavivirus* y *Alphavirus* se preparó usando el kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) en un volumen final de 10 μ L, esta incluyó 5 μ L de 2X Master Mix, 0.3 μ L de primer Forward (10 μ M), 0.3 μ L de primer Reverse (10 μ M), 0.4 μ L de mezcla de enzimas 25X para RT-PCR, 80 ng de RNA como molde, y agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: 45 °C durante 15 min, 95 °C durante 10 min, seguida de 45 ciclos de a 95 °C durante 15 s, 60 °C para los iniciadores de Panflavivirus y 51 °C para los iniciadores de Panalphavirus por 30 s y finalmente una extensión a 60 °C por 30 s. Los productos amplificados se separaron en gel de agarosa al 1.5% en TBE con 44.5 mM Tris base, 44.5 mM ácido bórico y 1 mM EDTA, a 100

V. El gel se tiñó con RedGel (Thermo Fisher Scientific) y se visualizó en un fotodocumentador Gel Doc XR+ Gel Documentation System (Bio Rad).

Para la validación de los iniciadores de OROV, se utilizó como molde un plásmido TOPO-OROV portador del segmento S del genoma viral (gene ID: NC_005777.1). El procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Vacunología y Virus Tropicales, en colaboración con el Dr. Jesús Torres Flores, donde por limitaciones para la síntesis completa del segmento S, este fue sintetizado comercialmente por Integrated DNA Technologies (IDT) en dos fragmentos independientes, los cuales posteriormente fueron ensamblados mediante PCR overlap para reconstruir la secuencia completa. Posteriormente, el fragmento ensamblado se clonó en el vector pCRTTM2.1-TOPO[®] utilizando el sistema TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción de clonación se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente el producto de la reacción se utilizó para la transformación de células competentes *E. coli* One ShotTM TOP10. La mezcla de clonación se incubó con 50 µL de células competentes en hielo por 30 min, se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 30 s y se volvió a incubar en hielo por 2 min. Posteriormente, se añadieron 250 µL de medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa) precalentado y se incubó a 37 °C durante 1 h con agitación de 225 rpm. Las células se sembraron en placas de agar LB suplementadas con ampicilina (100 µg/mL), incubándose a 37 °C durante 16-18 h. Las colonias que crecieron en presencia del antibiótico se cultivaron en 5 mL de caldo LB con ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C durante 12-16 h y finalmente el plásmido contenido en cada cultivo se purificó con el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). El DNA plasmídico obtenido de las clonas positivas se utilizó como control positivo para las reacciones de RT-PCR para la detección de OROV.

Las reacciones de PCR en punto final para OROV para validar los iniciadores se prepararon en un volumen final de 10 µL, con 5 µL de 2X Master Mix (HotStarTaq Plus Master Mix Kit, Qiagen), 1.25 µL de primer Forward (2 µM), 1.25 µL de primer Reverse (2 µM), 80 ng del plásmido TOPO-OROV (control positivo) y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 3 min, seguida de 40 ciclos de las siguientes condiciones: 95 °C durante 30 s, 58°C durante 30 s y 72 °C durante 1 minuto, con una extensión final de 72 °C durante 10 min. Los productos se analizaron en gel de agarosa al 2% en TBE con 44.5 mM Tris base, 44.5 mM ácido bórico y 1 mM EDTA,

corriendo a 100 V, las bandas fueron teñidas con RedGel y se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc XR+ Gel Documentation System (Bio Rad) para confirmar la amplificación del fragmento esperado.

7.3 Muestras de pacientes

Las 106 muestras analizadas corresponden a pacientes con sospecha de arbovirosis cuyo diagnóstico fue negativo al Triplex de DENV/ZIKV/CHIKV atendidos en unidades del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) facilitadas en el marco de una colaboración con el Dr. José Esteban Muñoz-Medina.

7.4 Aislamiento de virus y obtención de muestras para secuenciación

Para el aislamiento viral, se procesaron las 106 muestras de suero incluidas en este estudio. El procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Vacunología y Virus Tropicales, en colaboración con el Dr. Jesús Torres Flores. El aislamiento se realizó utilizando dos líneas celulares: la línea Vero (derivada de riñón de mono verde africano *Chlorocebus sabaeus*) y la línea C6/36 (derivada de larvas de mosquito *Aedes albopictus*) reconocidas por su alta susceptibilidad a la infección por arbovirus. Las células Vero se cultivaron en medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco), penicilina/estreptomicina (100 U/mL y 100 µg/mL), L-glutamina 4 mM y bicarbonato de sodio (2.2 g/L), hasta alcanzar una confluencia del 80%. Por otro lado, las células C6/36 se cultivaron en medio 199 completo suplementado con 10% de SFB, penicilina/estreptomicina (100 U/mL/100 µg/mL), L-glutamina al 4 mM y bicarbonato de sodio (1.1 g/L). Las condiciones de incubación fueron de 37 °C y 5% de CO₂ para las células Vero, y de 28 °C y 5% de CO₂ para las células C6/36, manteniéndose hasta alcanzar el 80% de confluencia. Cada alícuota de suero se diluyó 1:10 en medio de mantenimiento (medio 199 con 2% de SFB) y se inoculó en las células cultivadas en placas de 6 pozos, con un volumen final de 3 mL por pozo. Tras la inoculación, el monitoreo de las células se realizó cada 24 h para registrar la aparición de efecto citopático (ECP), caracterizado por cambios morfológicos asociados con la replicación viral.

7.5 Extracción de RNA viral a partir de las muestras de pacientes.

La extracción de RNA se realizó empleando el QIAamp Viral RNA Kit para lo cual se colocaron 560 µL de buffer de lisis (AVL) mezclado con RNA “carrier” en tubos de 1.5 mL previamente rotulados. Posteriormente, se adicionaron 140 µL de cada suero (o sobrenadantes

de medio de cultivo del ensayo de aislamiento viral) a la solución, mezclándose en vórtex durante 15 s. Luego, se centrifugó por 1 min y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. A continuación, se agregaron 560 µL de etanol absoluto grado biología molecular a la mezcla, agitándose nuevamente en vórtex durante 15 s, se centrifugó por un min a 6000 x g. Posteriormente 630 µL de la mezcla se transfirieron a las columnas de afinidad y se centrifugó 6000 x g durante 1 min, se desechó el filtrado. Este procedimiento se repitió para procesar el volumen restante. Posteriormente, se añadieron 500 µL de la solución de lavado AW1 a cada columna, se centrifugó nuevamente a 6000 x g por 1 min y se desechó el filtrado. En el siguiente paso, se aplicaron 500 µL de solución de lavado AW2 a las columnas, las cuales se centrifugaron a 6,000 x g (8000 rpm) durante 3 min. Posteriormente, las columnas se trasladaron a tubos colectores de 1.5 mL nuevos y se centrifugaron a la misma velocidad por 1 min adicional para eliminar cualquier exceso de solución amortiguadora. Finalmente, las columnas se colocaron en tubos de 1.5 mL, y se añadieron 40 µL de solución amortiguadora AVE. Después de incubar a temperatura ambiente durante 1 min, se centrifugaron a 6000 x g por 1 min el RNA extraído fue cuantificado en un NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher) y se preservó en refrigeración a -70 °C hasta su uso.

7.6 RT-PCR para la detección de arbovirus de baja prevalencia

La detección de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* y OROV se realizó mediante RT-PCR en un solo paso utilizando el kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Thermo Fisher Scientific). Como control interno de amplificación se incluyó el gen GAPDH, empleando los iniciadores GAPDH-F (5'-ACAGTCAGCCGCATCTTC-3') y GAPDH-R (5'-CCAATACGACCAAATCCGTTG-3'), los cuales amplifican un fragmento de 100 pb. En cada reacción se emplearon 200 ng de RNA total previamente extraído de las muestras o sobrenadantes clínicos como molde, junto con controles positivos y negativos correspondientes a cada género viral.

Las condiciones de amplificación consistieron en una retrotranscripción inicial a 45 °C durante 15 min, seguida de 95 °C durante 10 min. Posteriormente, se realizaron 45 ciclos de 95 °C durante 15 s, 60 °C para los iniciadores de Panflavivirus, 51 °C para los iniciadores de Panalphavirus y 58 °C para los iniciadores de OROV durante 30 s y extensión a 60 °C durante 30 s. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1.5% en TBE con 44.5 mM Tris base, 44.5 mM ácido bórico y 1 mM EDTA, corriendo a 100 V. El gel se tiñó con RedGel (Thermo Fisher Scientific) y se visualizó en un fotodocumentador para

observar las bandas amplificadas. El tamaño aproximado de los amplicones se calculó teniendo como referencia un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Promega).

7.7 Secuenciación de genoma completo

La secuenciación de genoma completo de las muestras positivas a arbovirus detectados por RT-PCR, así como de muestras que mostraron un efecto citopático consistente tras tres pases seriados en cultivo celular, se realizó en el Core Lab Genomics del Tecnológico de Monterrey utilizando la plataforma Illumina NextSeq, con una estrategia paired-end (2×100 pb) en duplicado y una profundidad aproximada de 1 millón de lecturas por muestra.

El RNA enviado a secuenciar se obtuvo del suero de los pacientes y/o de los sobrenadantes de cultivos celulares. La concentración del RNA se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), asegurando una relación A260/A280 entre 1.8 y 2.0, y valores de concentración de una cantidad mínima de 1000 ng de RNA total en un volumen no mayor a 20 μ L, con una concentración mínima de 50 ng/ μ L. Los resultados de la secuenciación se entregaron como archivos en formato FASTQ junto con reportes de calidad, incluyendo número total de lecturas, porcentaje de bases con calidad Q30 y métricas generales de la corrida. Los datos crudos obtenidos fueron utilizados para el ensamblaje de genomas virales completos y análisis bioinformáticos.

7.7.1 Procesamiento y detección de Herpes Simplex Virus tipo 2 (HSV-2)

El procesamiento de muestras se realizó mediante la extracción de DNA a partir de las muestras utilizando el reactivo QuickExtract™ DNA Extraction Solution 1.0. (Lucigen) para ello, las muestras se mezclaron en una relación 1:1 con la solución QuickExtract™ y posteriormente se homogenizaron mediante vórtex durante 15 s. Las mezclas se incubaron a 65 °C durante 6 min y posteriormente se agitaron nuevamente en vórtex durante 15 s. Finalmente, las muestras se incubaron a 98 °C durante 2 min para favorecer la liberación del material genético y la inactivación de nucleasas. El DNA obtenido fue cuantificado mediante NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) y preservado a -20 °C hasta su uso.

La detección de HSV-2 se realizó mediante PCR de punto final utilizando el kit HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen) en un volumen final de 10 μ L, compuesto por 5 μ L de 2X

Master Mix, 1.25 µL de primer Forward (2 µM), 1.25 µL de primer Reverse (2 µM), 200 ng de DNA como molde y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final. Se utilizaron dos pares de iniciadores previamente descritos: el sistema UL30-1, conformado por los iniciadores Forward 5'-CCCCCGTCGAAGCTGATG-3' y Reverse 5'-TCCACGTGTGGCAGAGCACG-3', dirigido al gen UL30 de la DNA polimerasa, región conservada que permite la detección de HSV-1 y HSV-2, con un tamaño esperado del amplicón de 127 pb (Lieveld et al., 2017); y el sistema gG2-SYBR, integrado por los iniciadores Forward 5'-CCCACACCCCAACACATC-3' y Reverse 5'-CCAAGGCGACCAGACAAAC-3', dirigido a la región gG2/US4 de la glicoproteína G tipo 2, utilizado para la detección específica de HSV-2, con un tamaño esperado del amplicón de 118 pb (Liu et al., 2017).

Las condiciones de amplificación consistieron en una activación inicial de la DNA polimerasa a 95 °C durante 15 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 62 °C para ambos juegos de iniciadores durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 2% teñidos con RedGel (Thermo Fisher Scientific) y se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad).

7.8 Preprocesamiento de lecturas obtenidas de la secuenciación masiva y filtrado de secuencias.

El análisis de las secuencias se realizó con la colaboración de la M. en C. Laura Estefanía Guerrero Martínez y el M. en C. Fabricio Martínez Amador, éste inició con la evaluación de las lecturas crudas (archivos FASTQ) obtenidas de la secuenciación masiva. Cada muestra dió como resultado dos archivos, correspondientes a las lecturas forward y reverse generadas mediante secuenciación “*paired-end*”, lo que mejora la precisión de mapeo y la detección de variantes. Las lecturas que fueron entregadas por el Core Lab Genomics del Tecnológico de Monterrey incluían la remoción de adaptadores por lo que solo se evaluó la calidad de las lecturas, con base en la escala de PHRED, considerando como aceptables aquellas con valores ≥ 30 , eso quiere decir que la probabilidad de que una base sea mal incorporada es de 1 por cada 1000, se consolidaron los reportes con MultiQC v1.15 (Ewels et al., 2016) para asegurar la calidad del conjunto depurado. Para eliminar lecturas duplicadas generadas durante la preparación de bibliotecas, se empleó Fastp v1.0.1 (Li & Godzik, 2006) con un umbral de identidad del 100%.

7.8.1 Eliminación de secuencias del hospedero y mapeo inicial

Con el fin de eliminar secuencias derivadas del hospedero, se realizó una depleción *in silico* mediante el alineamiento de las lecturas contra el genoma de referencia de *Chlorocebus sabaeus* (mono verde africano; GCA_023783515.1) u *Homo Sapiens* (Humano; GCF_000001405.26) según corresponda el caso. Para ello se construyó un índice del genoma de referencia utilizando Bowtie2 v2.5.4 (Langmead & Salzberg, 2012) con el siguiente comando:

```
bowtie2-build <genome_reference.fasta> <genome_index_prefix>
```

Posteriormente, las lecturas pareadas preprocesadas fueron alineadas contra dicho índice utilizando el modo *very-sensitive-local* para maximizar la detección de coincidencias:

```
bowtie2 --very-sensitive-local -x <genome_index_prefix> \
-1 <sample_R1.fastq> -2 <sample_R2.fastq> -S <output.sam>
```

El archivo SAM obtenido fue convertido a formato BAM ya que es un formato más compacto:

```
samtools view -b <input.sam> > <output.bam>
```

Las lecturas alineadas al genoma de *Chlorocebus sabaeus* fueron filtradas para su eliminación, conservando únicamente aquellas lecturas no mapeadas:

```
samtools view -b -f 12 <input.bam> > <unmapped.bam>
```

Posteriormente, el archivo BAM resultante fue ordenado por nombre de lectura para garantizar la correcta separación de pares:

```
samtools sort -n <unmapped.bam> -o <unmapped_sorted.bam>
```

Finalmente, las lecturas no mapeadas fueron convertidas nuevamente a formato FASTQ para su uso en ensamblaje *de novo*:

```
samtools fastq -@ <threads> \
-1 <output_R1.fastq> -2 <output_R2.fastq> \
```

```
-0 /dev/null -s /dev/null -n <unmapped_sorted.bam>
```

7.8.2 Ensamblaje *de novo* y validación

Las lecturas virales previamente depuradas fueron sometidas a un ensamblaje *de novo* utilizando metaSPAdes v3.15.5 (Nurk et al., 2017), configurado para aprovechar la capacidad de múltiples hilos de procesamiento y empleando la modalidad diseñada para muestras metagenómicas con el fin de maximizar la recuperación de contigs virales puesto que se exploró la posibilidad de recuperar más de un genoma o contig de buen tamaño en cada muestra. La herramienta se ejecutó con el siguiente comando:

```
metaspades.py -1 <unmapped_R1.fastq> -2 <unmapped_R2.fastq> \
-o <output_directory> -t <threads> -m <memory_in_GB>
```

Como resultado, se generaron archivos en formato FASTA que contienen los contigs ensamblados para cada muestra, junto con información asociada como la cobertura promedio.

7.8.3 Anotación e identificación taxonómica

Para evaluar la calidad, completitud e identidad de los contigs obtenidos, así como para realizar su identificación taxonómica preliminar, las secuencias obtenidas se analizaron mediante tBLASTx utilizando el paquete BLAST (Stephen F. Altschul et al., 1997; Camacho et al., 2009). Los contigs se compararon contra la base de datos de referencia construida en el laboratorio, empleando un valor umbral de e-value $\leq 1e-5$ y un máximo de 10 secuencias reportadas por consulta. Este análisis permitió confirmar el origen viral de los contigs, detectar posibles ensamblajes inespecíficos o contaminaciones y determinar la identidad preliminar de los virus presentes en las muestras.

7.9 Genotipificación

La genotipificación y el control de calidad de secuencias consenso se realizaron con Nextclade v3.17.0 (Nextstrain) mediante la interfaz web disponible en: <https://clades.nextstrain.org/dataset> (acceso: 20 de septiembre de 2025).

7.10 Análisis filodinámicos

Con el objetivo de determinar la relación evolutiva de las secuencias obtenidas con las

reportadas en las bases de datos, se realizaron análisis filodinámicos empleando IQ-TREE v2.2.2.6 (Minh et al., 2020), con el modelo de sustitución seleccionado, de acuerdo con los resultados de ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) (integrado en IQ-TREE). Las filogenias fueron calibradas temporalmente en función de la fecha de colecta de cada muestra usando LSD2 (To et al., 2016) y se realizaron 1000 réplicas de bootstrap ultrarrápidas (Hoang et al., 2018) para evaluar la robustez de los clados.

Los árboles resultantes se visualizaron en R v4.3.2 (R Core Team, 2023) con el paquete ggtree v3.10.0 (Yu et al., 2017), coloreando las ramas y hojas de acuerdo con el país de origen de las secuencias.

7.11 Redes de haplotipos

Para representar las relaciones genéticas a nivel intraespecífico, se construyeron redes de haplotipos a partir de los alineamientos. Este análisis se llevó a cabo en PopART v1.7 (Leigh & Bryant, 2015) utilizando el algoritmo TCS (Clement et al., 2000). Los nodos fueron coloreados según el país de colecta y el tamaño de cada nodo se escaló proporcionalmente al número de secuencias que representaba.

Previo a la construcción de la red, los archivos FASTA se convirtieron a formato PHYLIP, tomando en cuenta la restricción en la longitud de los nombres de secuencia de este formato. Para ello, se utilizó un script en Python (Anexo I) desarrollado para este proyecto, el cual renombra de forma automatizada las secuencias y genera un archivo de correspondencia entre el identificador corto y el nombre original.

8. Resultados

8.1 Diseño y estandarización de la amplificación por RT-PCR de los iniciadores para Orthoflavivirus, Alphavirus y OROV

Los iniciadores para la detección de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* y OROV fueron diseñados a partir de alineamientos múltiples construidos con secuencias recuperadas de la base de datos NCBI Virus, siguiendo los criterios mencionados en la sección de metodología. Para el diseño de los iniciadores de *Orthoflavivirus* se consideraron secuencias de DENV, ZIKV, WNV, YFV y SLEV, mientras que para *Alphavirus* se utilizaron secuencias de EEEV, WEEV y VEEV en este caso debido a la variabilidad genética observada con este grupo viral y con el objetivo de mejorar el desempeño y especificidad de la RT-PCR, no se incluyeron otros arbovirus. En el caso de OROV, el diseño se realizó utilizando secuencias correspondientes al segmento S del genoma viral. Los iniciadores diseñados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Iniciadores diseñados para cada grupo viral.

Nombre	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Tamaño del Amplicón (pb)
Panflavivirus PF	ATGAYACWGCYGGMTGGGACAC	CVAGCATGTCHTCWGTKGTCATCCA	848
Alphavirus PF	AATTGCAAYGTYACBCAAATG	CTTTTATCAAAMGAMGCDATGTC	517
OROV PF	CAAAAGAAGGCCAARGATGTC	TGGCGCAAGAAGTCTCTT	542

*Las bases degeneradas utilizadas en las secuencias permiten abarcar variantes genéticas, donde R=A/G, W=A/T, Y=C/T, B=C/G/T, K=G/T, S=G/C, H=A/C/T, D=A/G/T, V=A/C/G, y N=A/C/G/T (cualquier base).

Para estandarizar la temperatura de alineamiento (T_m) a utilizar en la RT-PCR en punto final de los tres sets de iniciadores se evaluó un gradiente de T_m , posteriormente se seleccionó la condición que ofreció una mayor intensidad de la banda específica, además de la ausencia de productos inespecíficos y por último reproducibilidad entre corridas, tal como se aprecia en la Figura 21.

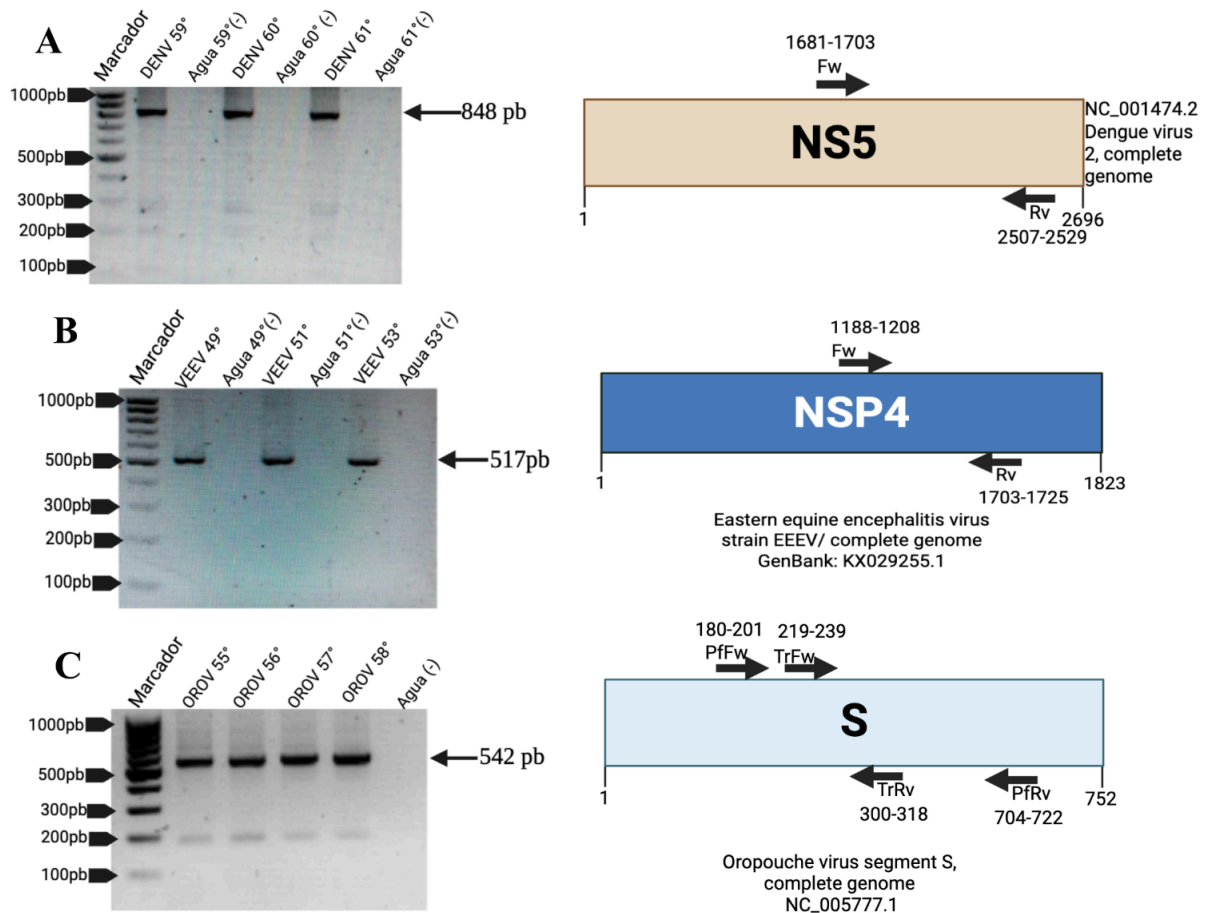


Figura 21. Detección de RNA de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* y OROV mediante RT-PCR en punto final. A) Los productos de RT-PCR obtenidos usando los iniciadores de Panflavivirus PF (A), Alphavirus PF (B) y OROV PF (C) en presencia de 80 ng del RNA de diferentes virus u 80 ng del plásmido TOPO-OROV, los productos de la reacción se separaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. En el primer carril de los geles se cargó el marcador de tamaño molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Las flechas señalan la banda cuyo tamaño coincide con el amplicón esperado.

Los iniciadores diseñados para la detección de Panflavivirus PF, Alphavirus PFy OROV PF han demostrado una alta especificidad y eficiencia al amplificar los fragmentos de interés en estos ensayos de RT-PCR en punto final (Figura. 21A-C). En todos los casos, se obtuvieron bandas definidas que corresponden a los tamaños esperados (517 pb, 848 pb y 542 pb, respectivamente). Además, los iniciadores funcionaron correctamente en un rango amplio de TMs. Las temperaturas de alineamiento seleccionadas para llevar a cabo los ensayos de detección son las siguientes: Panflavivirus a 60°C, Alphavirus a 51°C y OROV a 58°C.

Para verificar que cada set de iniciadores amplificara exclusivamente el género viral para el cual fue diseñado y no presenta reactividad cruzada con otros géneros incluidos en este estudio, se realizó un ensayo de especificidad utilizando 80 ng de RNA total por reacción.

Para ello, se empleó RNA obtenido de sobrenadantes de cultivos celulares infectados con DENV, ZIKV, WNV, YFV, USUV, CHIKV y VEEV para los ensayos de *Orthoflavivirus* y *Alphavirus*, mientras que para OROV se utilizó como control positivo el plásmido TOPO-OROV portador del segmento S viral. La evaluación de los iniciadores para *Orthoflavivirus* (Figura 22A), *Alphavirus* (Figura 22B) y OROV (Figura 22C) se llevó a cabo mediante RT-PCR en punto final, visualizando los fragmentos amplificados correspondientes en geles de agarosa como se ve en la figura 22.

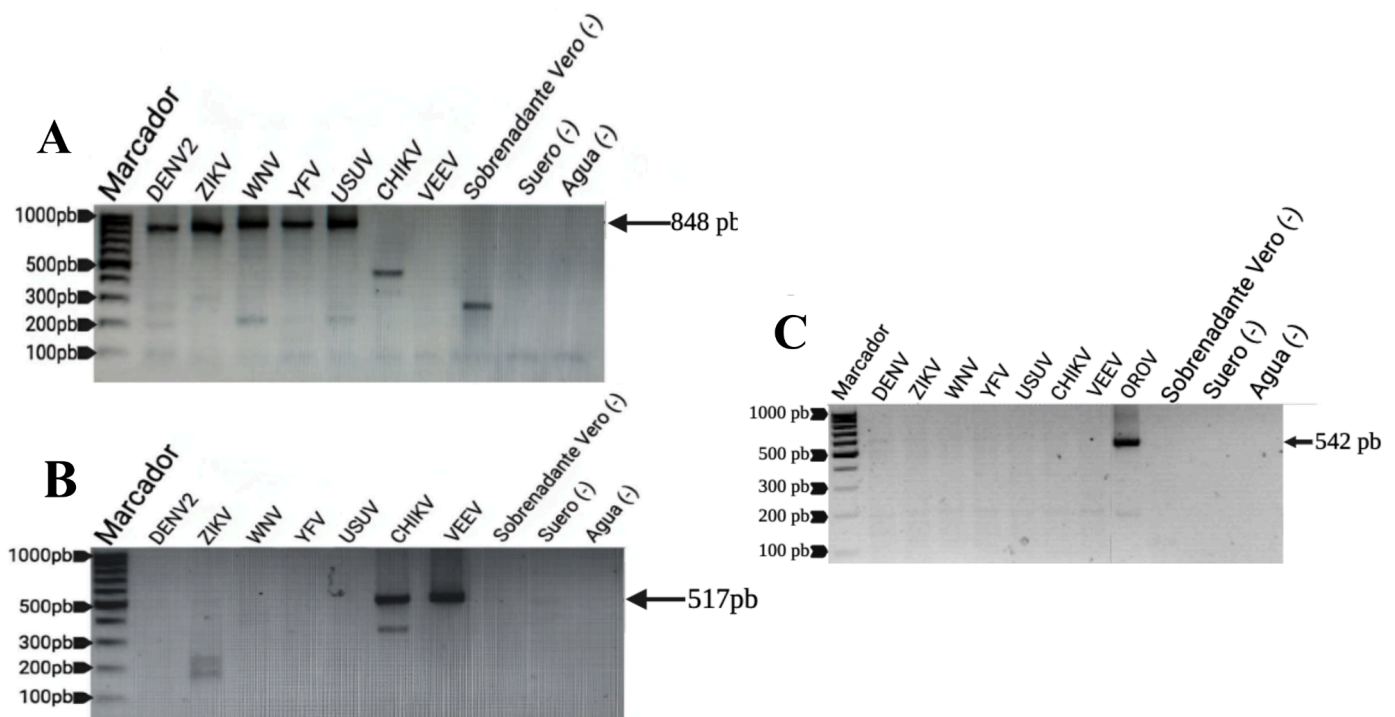


Figura 22. Detección de RNA de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* y OROV mediante RT-PCR en punto final. A) Los productos de RT-PCR obtenidos usando los iniciadores de Panflavivirus PF en presencia de 80 ng del RNA de diferentes virus se separaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. B) Los productos de RT-PCR obtenidos usando los iniciadores de Alphavirus PF en presencia de 80 ng del RNA de diferentes virus se separaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. C) Los productos de RT-PCR obtenidos usando los iniciadores de OROV PF en presencia de 80 ng del plásmido TOPO-OROV portador del segmento S viral., se separaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. En el primer carril de los geles se cargó el marcador de tamaño molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Las flechas señalan la banda cuyo tamaño coincide con el amplicón esperado.

Como se puede observar en la figura 22, cada juego de iniciadores amplificó exclusivamente a su género diana en el tamaño esperado, aunque en algunos ensayos tenemos bandas inespecíficas de menor tamaño, estas no interfirieron con la identificación del amplicón

esperado. Con el set de iniciadores de Panflavivirus PF dirigido a la región codificante de NS5, se obtuvieron bandas únicas del tamaño esperado cuando el molde correspondió a *Orthoflavivirus* (excepto en WNV que obtuvo una banda extra de un tamaño menor). Sin embargo, se observaron bandas inespecíficas de menor tamaño en algunas muestras, particularmente en WNV, CHIKV y en el sobrenadante de células Vero. Debido a que estas bandas son de un tamaño inferior al esperado, se consideraron como productos de amplificación inespecífica, los cuales pueden ser por alineamientos parciales de los iniciadores degenerados con secuencias no blanco. Es importante recalcar que en estos ensayos se contó con virus provenientes de cultivos celulares, los cuales pueden contar con múltiples moléculas de RNA celulares con los que se pudieron generar interacciones inespecíficas. A pesar de ello, no se detectaron bandas en el tamaño esperado para *Alphavirus*, lo que respalda la especificidad general del ensayo. Con el set de iniciadores de Alphavirus PF dirigido a la región codificante de NSP4, se observó amplificación específica con CHIKV y VEEV, aunque se detectaron bandas adicionales éstas eran de menor tamaño. Estas bandas probablemente corresponden de igual manera a productos inespecíficos derivados de los iniciadores degenerados de la misma manera previamente descrita con los iniciadores de *Orthoflavivirus*. No obstante, las bandas correspondientes al tamaño esperado fueron claramente distinguibles y permitieron confirmar la amplificación específica del género *Alphavirus*. No se observaron bandas en los controles negativos. Finalmente, el set de iniciadores dirigidos al segmento S de OROV, se obtuvo la banda esperada exclusivamente con RNA de OROV, sin observarse amplificación con RNA de *Orthoflavivirus* o *Alphavirus*, ni en los controles negativos. Todos los productos se resolvieron en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio, utilizando 80 ng de RNA por reacción. Los resultados obtenidos indican que los iniciadores diseñados se pueden usar para el tamizaje diferencial de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* y OROV en muestras de pacientes y sobrenadantes de cultivo para el aislamiento viral.

8.2 Procesamiento y aislamiento viral a partir de los sueros de pacientes

Los sueros de 106 pacientes con sospecha clínica de arbovirosis se utilizaron para realizar ensayos de aislamiento viral en células Vero (mono) y C6/36 (mosquito) y a la par que se llevó a cabo la extracción de RNA en estas muestras.

Los metadatos de las 106 muestras se muestran en la figura 23.

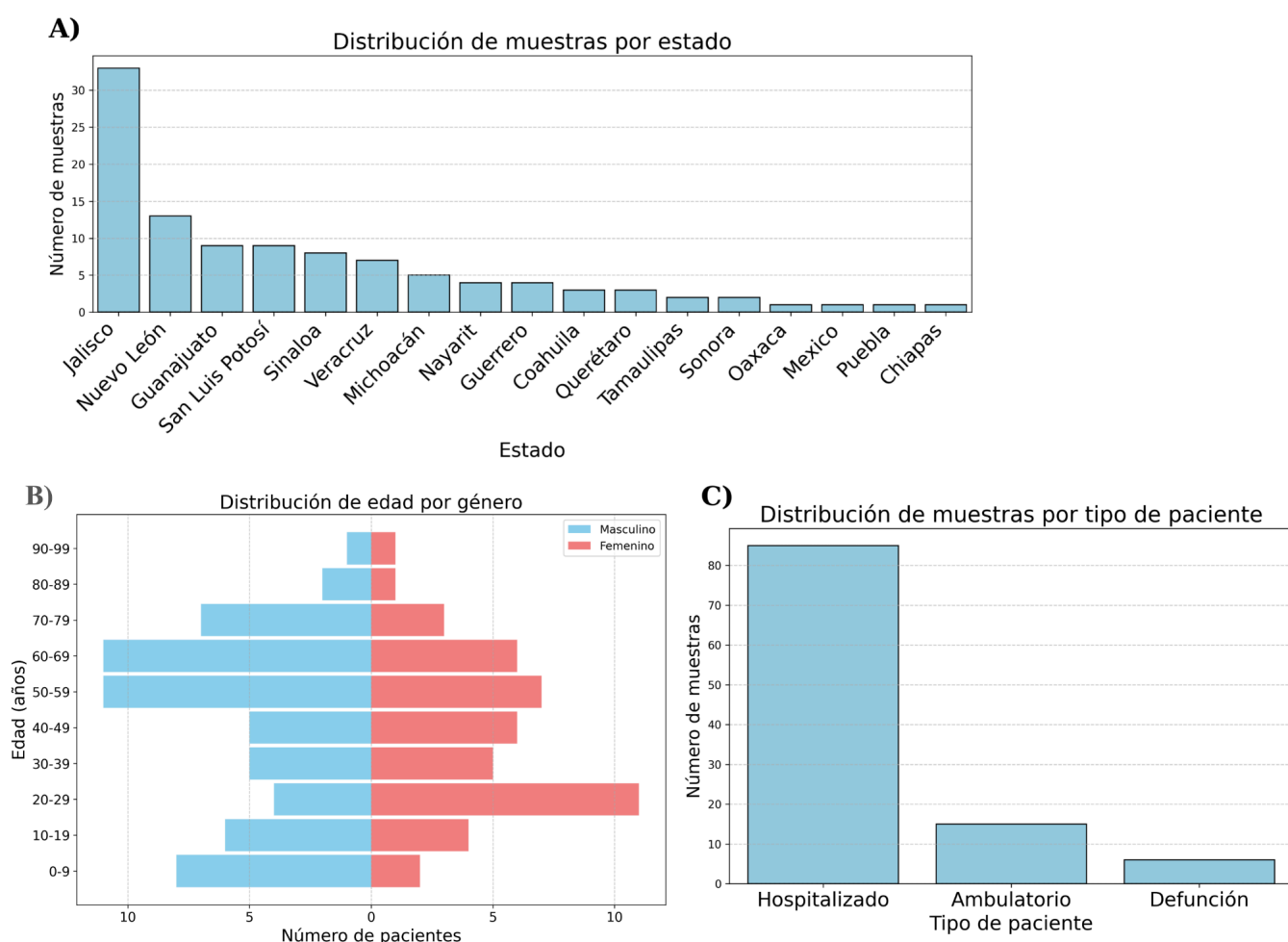


Figura 23. Distribución de las muestras de suero analizadas. A) Distribución de muestras por estado. Se muestra el número total de muestras recolectadas en cada entidad federativa. B) Distribución de edad por género. Se presentan los rangos de edad agrupados en intervalos de diez años y separados por género, indicando el número de pacientes por grupo. C) Cantidad de muestras por tipo de paciente. Se representa el número de muestras correspondientes a pacientes ambulatorios, hospitalizados y casos de defunción.

En la Figura 23A, se muestra la distribución de las muestras por estado de origen, como podemos observar existe mayor concentración de muestras provenientes de los estados de Jalisco, Nuevo León y San Luis Potosí. En el Panel B se muestra la distribución de los pacientes de acuerdo con el rango de edad y el género, donde podemos ver que la mayoría de las muestras corresponden a pacientes masculinos ($N=54$), seguido por los femeninos ($N=46$). Los grupos con mayor representación se ubicaron principalmente entre los 20–29 años y 60–69 años. Por último, en el Panel C observamos la distribución de las muestras de acuerdo con el tipo de paciente es decir la condición en la que se encontraba el paciente al momento de la toma de la muestra y la mayor proporción correspondió a pacientes hospitalizados, seguidos por ambulatorios y por último los casos de defunción.

Los extractos de RNA viral de las muestras de suero se realizaron en el laboratorio y, como se puede observar en la figura 24, éstos mostraron una concentración promedio de 145.83 ng/μL y una mediana de 137.4 ng/μL (rango aproximado: 50–300 ng/μL), los cuales son niveles adecuados para los ensayos moleculares posteriores.

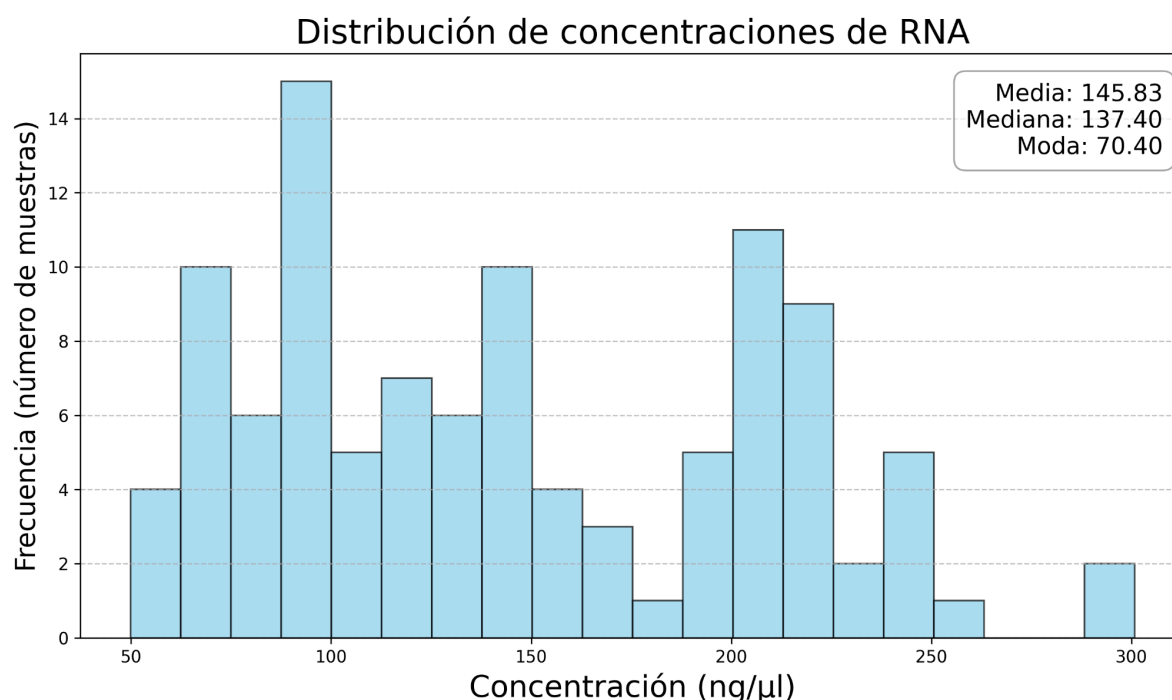


Figura 24. Distribución de concentraciones de RNA extraído de las muestras de pacientes.

Una alícuota de los sueros de los 106 pacientes fue inoculada en células Vero y C6/36 y posteriormente se realizó inspección microscópica diaria de dichos cultivos. Después de 7 días de observación en tres pases consecutivos, se identificaron cuatro cultivos con ECP: 55, 63, 69 y 97. La Figura 25 muestra los cambios representativos del primer pase para las muestras 55, 69 y 97, donde el ECP es mucho más visible en células Vero. En estas imágenes se observan redondeamiento y agregación celular, vacuolización, disminución de la confluencia y retracción de la monocapa, compatibles con los cambios que ocasiona una infección viral. En la Muestra 55 se observan focos definidos de ECP con redondeamiento, retracción celular, vacuolización y disrupción de la monocapa, compatibles con infección activa. La muestra 63 presentó un patrón similar, aunque menos marcado. En la muestra 69 presenta ECP marcado con condiciones similares a la 55 pero con la diferencia que presentó fusión celular con formación de sincitios. Por último, en la muestra 97 se observa redondeamiento de las células y agregación de las mismas. Los controles inoculados

solamente con medio de cultivo fresco mantuvieron morfología y confluencia normales, sin evidencia de ECP. Por todo lo anterior, se seleccionaron los sobrenadantes de los cultivos de las muestras 55, 63, 69 y 97 en células Vero con evidencia de ECP para llevar a cabo secuenciación masiva con el fin de identificar el agente responsable de este daño en el cultivo celular y corroborar los resultados obtenidos en las pruebas de detección molecular por RT-PCR. La elección de los sobrenadantes de las células Vero para llevar a cabo la secuenciación masiva se realizó debido a que éstas presentaron un efecto citopático más marcado.

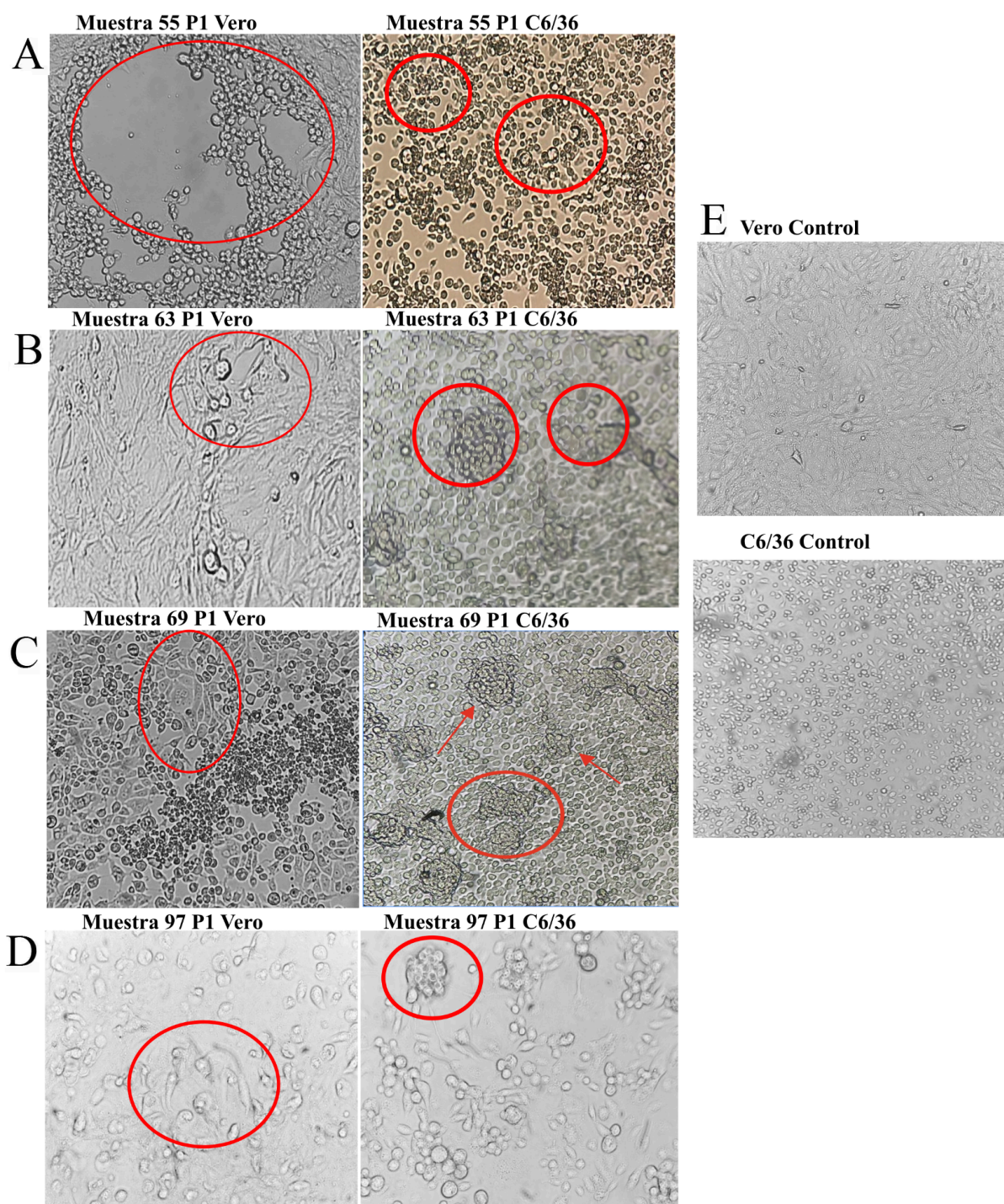


Figura 25. Microscopía de campo claro de las células Vero y C6/36 inoculadas con el suero de pacientes con sintomatología febril. Las células se inocularon con el suero de los pacientes incluidos en el estudio y se incubaron por 7 días, período en el cual se registraron los cambios en la morfología celular para determinar la existencia de efecto citopático como un indicador de infección viral. En los paneles A, B, C y D se muestra el efecto citopático encontrado células C6/36 y Vero inoculadas directamente con suero proveniente del paciente 55, 69 y 97, respectivamente. En el lado derecho, en el panel E, se incluyen las micrografías de las células C6/36 y Vero falsamente inoculadas.

8.3 Detección molecular de arbovirus en muestras clínicas mediante PCR

Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de RT-PCR para la detección de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* y OROV, en los 106 sueros de pacientes y de los 106 sobrenadantes de cultivos Vero y C6/36, empleando los tres sets de iniciadores estandarizados. Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de RT-PCR para la detección de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* y OROV, en los 106 sueros de pacientes y de los 106 sobrenadantes de cultivos Vero y C6/36, empleando los tres sets de iniciadores estandarizados. En todas las reacciones se incluyó la amplificación de GAPDH como control interno de calidad del RNA y ausencia de inhibidores de la reacción de RT-PCR; como se puede observar GAPDH se amplificó consistentemente, en la Figura 26D se muestra una imagen representativa de estos resultados. Para la detección de *Orthoflavivirus* se empleó el par de iniciadores Panflavivirus PF y bajo estas condiciones, todas las muestras resultaron negativas excepto la muestra 97, que mostró una banda única del tamaño esperado de manera concordante en suero, sobrenadante de Vero y sobrenadante de C6/36 (Fig. 26A–C). Los controles sin molde (agua) y los controles negativos (p. ej., suero control, buffer AVE y sobrenadantes de células no inoculadas) permanecieron sin amplificación en todas las corridas, lo que respalda la especificidad del ensayo.

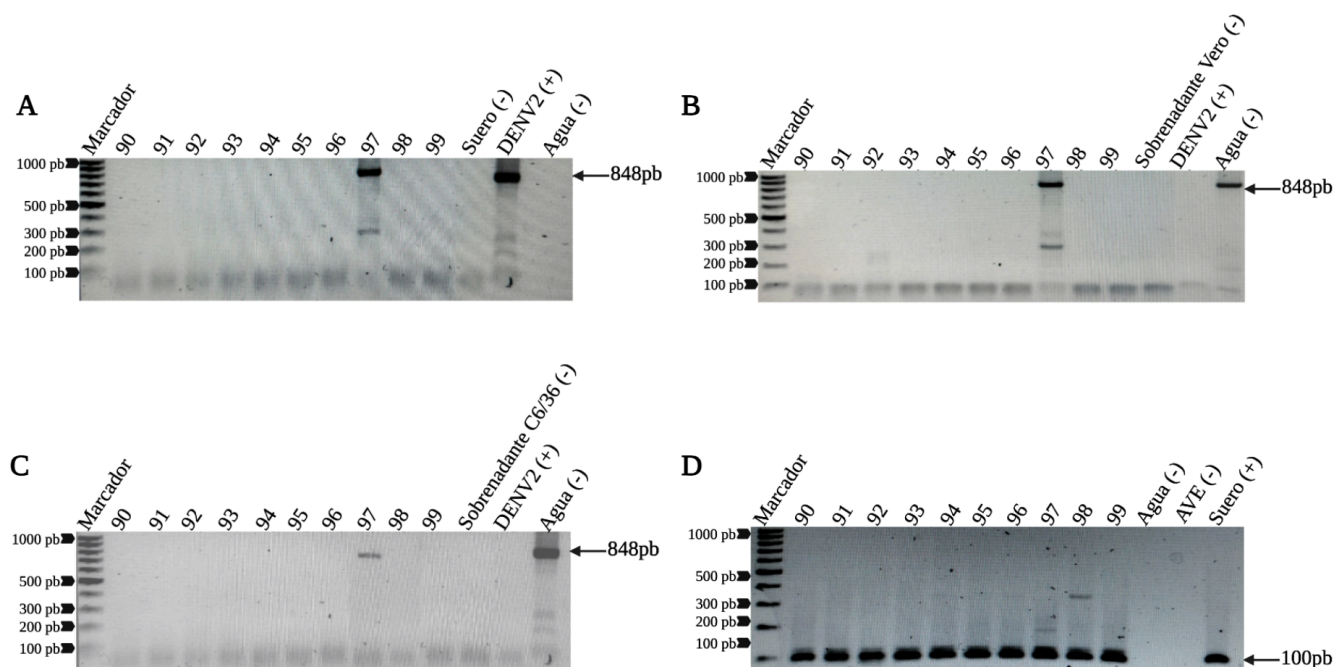


Figura 26. Detección de *Orthoflavivirus* por RT-PCR en punto final en las muestras 90–99. El RNA total de las muestras de A) Suero, B) Sobrenadantes de células Vero, C) Sobrenadantes de células C6/36 se utilizó para realizar RT-PCR de punto final utilizando los iniciadores Panflvivirus PF. En los tres paneles se observa amplificación específica únicamente en la muestra 97. D) Amplificación de GAPDH como control interno en las

mismas matrices. Los productos se separaron en agarosa 1.5% teñida con bromuro de etidio; el primer carril corresponde al GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher). Las flechas señalan la banda del amplicón esperado.

En resumen, los resultados de las pruebas de RT-PCR fueron negativos en general excepto para la muestra 97 en la reacción con los iniciadores de Panflavivirus en el suero y los sobrenadantes de cultivo. Por otro lado, aunque las muestras 55, 63, 69 no produjeron amplificación con los tres juegos de iniciadores se consideraron para la secuenciación masiva debido al consistente ECP producido especialmente en células Vero. En este último caso se enviaron los RNAs obtenidos del sobrenadante de células Vero en el pase 3 y en el caso de la muestra 97 se envió

8.4 Limpieza de lecturas y ensamblaje *de novo*

La secuenciación de genoma completo de las muestras positivas se realizó en el Core Lab de Genomics del Tecnológico de Monterrey. Los resultados se recibieron en archivos que contenían las lecturas sin adaptadores ni lecturas de baja calidad. A partir de estos archivos fastq se filtraron las lecturas del hospedero y se ensamblaron contigs con el fin de identificar los genomas virales presentes. En la Tabla 8 se resumen los resultados del preprocesamiento.

Tabla 8. Resultados del preprocesamiento de lecturas y depleción de lecturas derivadas del hospedero de las bibliotecas utilizadas para el ensamblaje *de novo*.

Muestra	Lecturas iniciales (pares)	Lecturas totales	Lecturas duplicadas	Lecturas virales
69vp3	37,145,256 ×2	74,290,512	9,943,506	27,201,750
63vp3	30,954,318 ×2	61,908,636	8,805,497	22,198,821
55vp3	22,817,008 ×2	45,634,016	6,221,781	16,595,227
97P1v	14,866,623 ×2	29,733,246	2,114,896	12,751,727

Después de realizar la depleción de secuencias correspondientes al genoma del hospedero (mono verde), las lecturas no eliminadas fueron utilizadas para el ensamblaje *de novo*, obteniéndose los contigs por cada muestra esta información general del ensamblaje se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Registro del ensamblaje *de novo* de los contigs obtenidos tras la depleción del hospedero.

Muestra	Número de contigs	Longitud del contig viral mayor (nt)	Longitud promedio (nt)	Longitud total ensamblada (nt)
55vp3	15,483	53,558	369.59	5,722,393
63vp3	19,018	53,557	318.03	6,048,341
69vp3	24,677	53,557	336.21	8,296,562
97P1v	11,167	10,697	295.57	3,300,610

En conjunto, el ensamblaje *de novo* permitió recuperar múltiples contigs de longitudes variables para cada muestra, los cuales fueron utilizados posteriormente para su identificación taxonómica mediante búsquedas de similitud en bases de datos virales.

8.5 Anotación e identificación taxonómica

Los contigs $\geq 5,000$ pb obtenidos del ensamblaje *de novo* se compararon mediante BLAST contra la base de datos construida en el laboratorio, utilizando un umbral de significancia de $e\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$. Los resultados completos de los contigs analizados se presentan en la Tabla suplementaria S1.

En la Tabla 10 se muestra, para cada muestra, el contig viral de mayor tamaño y su mejor alineamiento por BLAST, definido como la coincidencia con mayor porcentaje de identidad y cobertura del “*query*” que cumplía con el umbral de significancia establecido. Para cada alineamiento se registraron la accesión de referencia, el organismo identificado, el porcentaje de identidad, el *e-value* y la cobertura del *query*.

Tabla 10. Top-1 tBLASTx/BLASTx por muestra.

Muestra	No. de acceso	Organismo	% de identidad	“ <i>E-Value</i> ”	“ <i>Query coverage</i> ” (%)
55	JX112561.1	Human alphaherpesvirus 2	99.763	9.35e-75	100
63	JX112561.1	Human alphaherpesvirus 2	99.759	2.64e-73	100
69	JX112561.1	Human alphaherpesvirus 2	99.761	4.51e-75	100

97	OQ132878.1	dengue virus type 3	99.403	0.0	99.89
----	------------	---------------------	--------	-----	-------

En las muestras 55, 63 y 69, el mejor alineamiento de BLAST (top hit por el conting más representativo, definidos como los alineamientos con mayor porcentaje de identidad, el Query Coverage y $e\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$) corresponden a Human alphaherpesvirus 2 (HSV-2). En contraste, en la muestra 97 el contig viral representativo seleccionado para el reporte taxonómico presentó el mejor alineamiento con secuencias de dengue virus tipo 3 (DENV-3), con 99.738% de identidad, 99.89% de cobertura del query y E-value = 0.0.

Una vez identificadas las secuencias virales presentes en cada muestra, las lecturas depuradas fueron mapeadas contra los genomas de referencia correspondientes a Human herpesvirus 2 strain HG52 (NCBI RefSeq accession no. NC_001798.2) para las muestras 55, 63 y 69, y dengue virus 3 (NCBI RefSeq accession no. NC_001475.2) para la muestra 97. A partir de estos alineamientos se construyeron secuencias consenso, lo que permitió obtener genomas virales prácticamente completos para las cuatro muestras analizadas. Los valores de profundidad media de lectura y porcentaje de cobertura se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Profundidad media de lectura, cobertura de los genomas consenso e identidad obtenidos tras la depleción del hospedero y el ensamblaje *de novo*.

Muestra	Profundidad media ×	Cobertura %	Identidad %
55	2,376.76	99.70	99.77
63	4,143.42	99.67	99.71
69	4,799.05	99.82	99.75
97	4,947.87	99.90	99.78

En general, los consensos presentaron coberturas superiores al 99% (rango: 99.67–99.90%) y profundidades medias en el orden de miles de lecturas por posición (rango: $2,376.76 \times - 4,947.87 \times$). Además, los genomas consenso reconstruidos mostraron identidades elevadas frente a las secuencias de referencia de mejor alineamiento por BLASTn, con valores entre 99.71% y 99.78%, lo que indica una recuperación robusta del material genómico viral. En conjunto, estos valores respaldan que los genomas reconstruidos cuentan

con calidad suficiente para los análisis posteriores de genotipificación, filodinámica y redes de haplotipos.

Una vez obtenidos los genomas consenso prácticamente completos de HSV-2 se procedió a evaluar si las secuencias 55, 63 y 69 podían corresponder a un mismo genoma que se hubiese detectado en otras muestras por contaminación cruzada. Para este propósito se realizó la comparación de los alineamientos completos de cada genoma consenso frente a la secuencia de referencia de HSV-2 (longitud del alineamiento: 154,792 nt). El análisis se restringió a sitios sin ambigüedades, ni gaps, y para cada par de muestras se calculó el número de cambios (SNPs), el porcentaje de divergencia (SNPs/sitios comparables $\times$ 100) y el porcentaje de identidad (Tabla 12). Las tres comparaciones pareadas (55 vs 63, 55 vs 69 y 63 vs 69) mostraron entre 31 y 60 SNPs distribuidos sobre aproximadamente 153,000 sitios comparables, con identidades de 99.96–99.98%. Aunque estas identidades son elevadas, el número de SNPs observado es mayor al esperado para réplicas técnicas o contaminación derivada del mismo aislamiento viral, donde se esperarían secuencias idénticas o casi idénticas, con identidades más cercanas al 100%. Debido a que no existe un criterio establecido para HSV-2 que permita definir contaminación cruzada con base en SNPs, se tomó como referencia operativa lo reportado en estudios de epidemiología genómica de *Mycobacterium tuberculosis*, donde diferencias de aproximadamente 0–5 SNPs se han utilizado para identificar aislamientos altamente relacionados o provenientes de una fuente común (Walker et al., 2013; Hatherell et al., 2016). Este criterio se usó como una referencia comparativa. Teniendo esto en cuenta nuestras muestras analizadas presentaron 31–60 SNPs entre sí, por lo que las diferencias observadas son más consistentes con variación biológica real entre muestras distintas que con replicados idénticos o contaminación cruzada.

Tabla 12. Diferencias por pares (sitios A/C/G/T comparables).

Par	Sitios comparables	SNPs	% Divergencia	% Identidad
55 vs 63	153,226	56	0.036547	99.963453
55 vs 69	153,683	31	0.020171	99.979829
63 vs 69	153,231	60	0.039157	99.960843

8.6 Detección del genoma de HSV-2 en las muestras de suero

Para corroborar la presencia de HSV-2 en las muestras 55, 63 y 69, y que su identificación por secuenciación masiva en los sobrenadantes de cultivo no fue una contaminación durante el procedimiento de aislamiento viral, se realizó una extracción de DNA a partir del suero de los pacientes y los sobrenadantes de células Vero. El DNA obtenido se utilizó para amplificar por RT-PCR usando dos pares de iniciadores: UL30-1, dirigido al gen de la DNA polimerasa viral (UL30), el cual amplifica una región conservada presente en HSV-1 y HSV-2, y otro par de iniciadores llamados gG2/US4, dirigidos a la región de la glicoproteína G2, específica de HSV-2. La amplificación del fragmento esperado para UL30 (127 pb) permitió confirmar la presencia de DNA de herpes, mientras que la amplificación del blanco gG2/US4 (118 pb) permitió corroborar específicamente la presencia de HSV-2 en las en los sueros de los tres pacientes en cuestión (Figura 27).

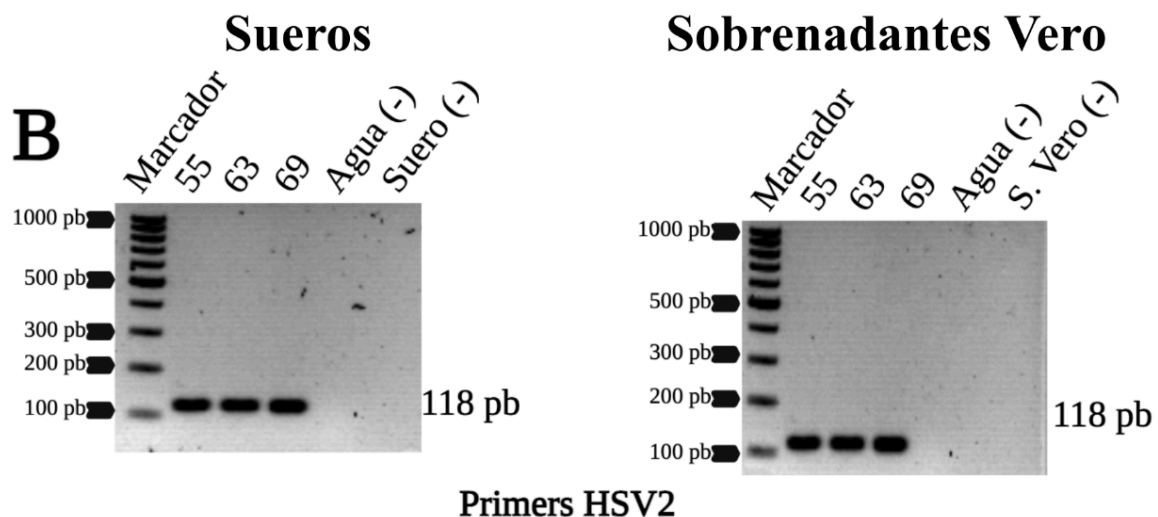
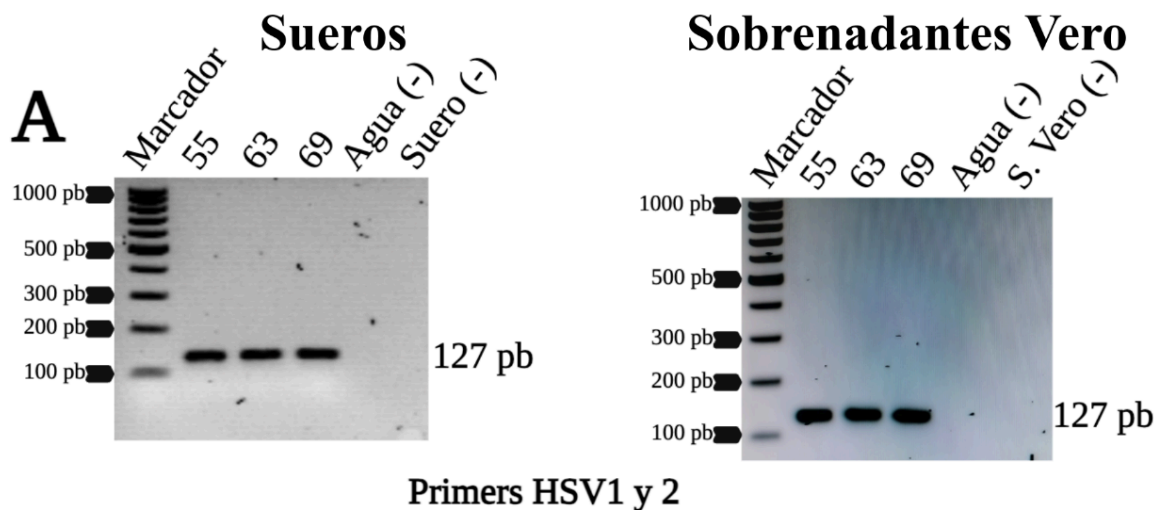


Figura 27. Detección del genoma de HSV-2 en las muestras de suero 55, 63 y 69 por PCR de punto final. Se utilizaron 200 ng de DNA extraído de sueros de los pacientes 55, 63 y 69, así como de sus respectivos sobrenadantes de cultivo en células Vero. (A) Productos de amplificación obtenidos mediante iniciadores genéricos para HSV-1 y 2, exhibiendo un amplicón del tamaño de 127 pb. (B) Productos de PCR empleando iniciadores específicos para HSV-2, mostrando un amplicón de un tamaño de 118 pb. Los amplicones fueron separados en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. En la parte superior de cada panel se indica el número de muestra correspondiente a cada carril. El marcador de tamaño molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher) se cargó en el primer carril. Los controles negativos corresponden a agua libre de nucleasas (Agua -), suero de individuo sano (Suero -) y sobrenadante celular no infectado (S. Vero -). Las etiquetas laterales señalan el tamaño de los fragmentos obtenidos.

En las tres muestras analizadas (pacientes 55, 63 y 69) se observó la amplificación de fragmentos del tamaño esperado para ambos blancos moleculares. Específicamente, en el Panel A, correspondiente a la amplificación con iniciadores para HSV-1 y 2, se evidenció una banda única de 127 pb, tanto en las matrices directas de suero como en los sobrenadantes de cultivo celular. De forma consistente, en el Panel B se corroboró esta señal mediante la obtención reproducible de un amplicón de 118 pb utilizando iniciadores específicos para HSV-2 en las mismas muestras y condiciones. En contraste, en los controles negativos empleados en ambos ensayos no hubo productos de amplificación, con lo cual se constata la especificidad del ensayo y descarta la existencia de contaminación. Estos resultados confirman la presencia de DNA de HSV-2 en estas muestras desde las muestras de suero y su posterior replicación en los cultivos de las células Vero.

8.7 Análisis filogenético y genotípico

Para las muestras 55, 63 y 69, la caracterización filogenética se realizó con base en su posición dentro del árbol de máxima verosimilitud, construido a partir de genomas completos de HSV-2. A diferencia de otros virus, HSV-2 presenta una baja diversidad genética global ($\approx 0.02\text{--}0.4\%$) de divergencia máxima entre cepas y una alta conservación a lo largo de su genoma, además de múltiples eventos de recombinación descritos tanto entre variantes de HSV-2 como entre HSV-2 y HSV-1, lo que puede generar genomas mosaico y afectar la resolución de análisis basados en regiones parciales del genoma.

A pesar de ello, distintos estudios han demostrado que los análisis filogenéticos basados en el genoma completo continúan siendo útiles para explorar patrones generales de agrupamiento y diversidad genética dentro de HSV-2, lo que permite identificar linajes principales y relaciones evolutivas entre aislamientos virales (Kolb et al., 2015; Burrell et al., 2022). En

particular, se ha descrito la existencia de dos agrupamientos filogenéticos principales: un grupo predominantemente africano y otro de distribución mundial (“*worldwide lineage*” o Clado Global) (Burrell et al., 2017; 2022).

Con lo mencionado anteriormente se decidió construir los conjuntos de referencia de HSV-2, los cuales se descargaron de bases de datos públicas como NCBI Virus, de los cuales se consideraron únicamente genomas completos que cumplieran criterios estrictos de calidad y anotación: (a) que contaran con la anotación completa de los genes UL23, UL27, UL30, US4 y US6; (b) que correspondieran a secuencias aisladas de humano; y (c) que incluyeran de manera explícita la fecha de toma de muestra y el país de origen, en un intervalo temporal entre 2005 y 2025. El conjunto final estuvo formado por 74 genomas de HSV-2 procedentes de cinco continentes (América, Europa, África, Asia y Oceanía), con el objetivo de capturar una diversidad geográfica amplia en los análisis comparativos.

En el árbol filogenético de genoma completo (Figura 28), las secuencias 55, 63 y 69 se agruparon estrechamente entre sí, formando un grupo bien definido con ramas cortas, lo que indica una alta similitud genética entre las tres muestras analizadas. Los valores de soporte de los nodos internos fueron evaluados mediante 1000 réplicas de ultrafast bootstrap en IQ-TREE2; en la figura 28 se muestran únicamente los valores ≥ 90 para facilitar la visualización del árbol. Algo que debemos observar es que el árbol no muestra la existencia de una estructura geográfica de la población viral, aunque nuestras secuencias mexicanas mostraron una posición diferenciada respecto a gran parte de las secuencias de referencia incluidas en el análisis.

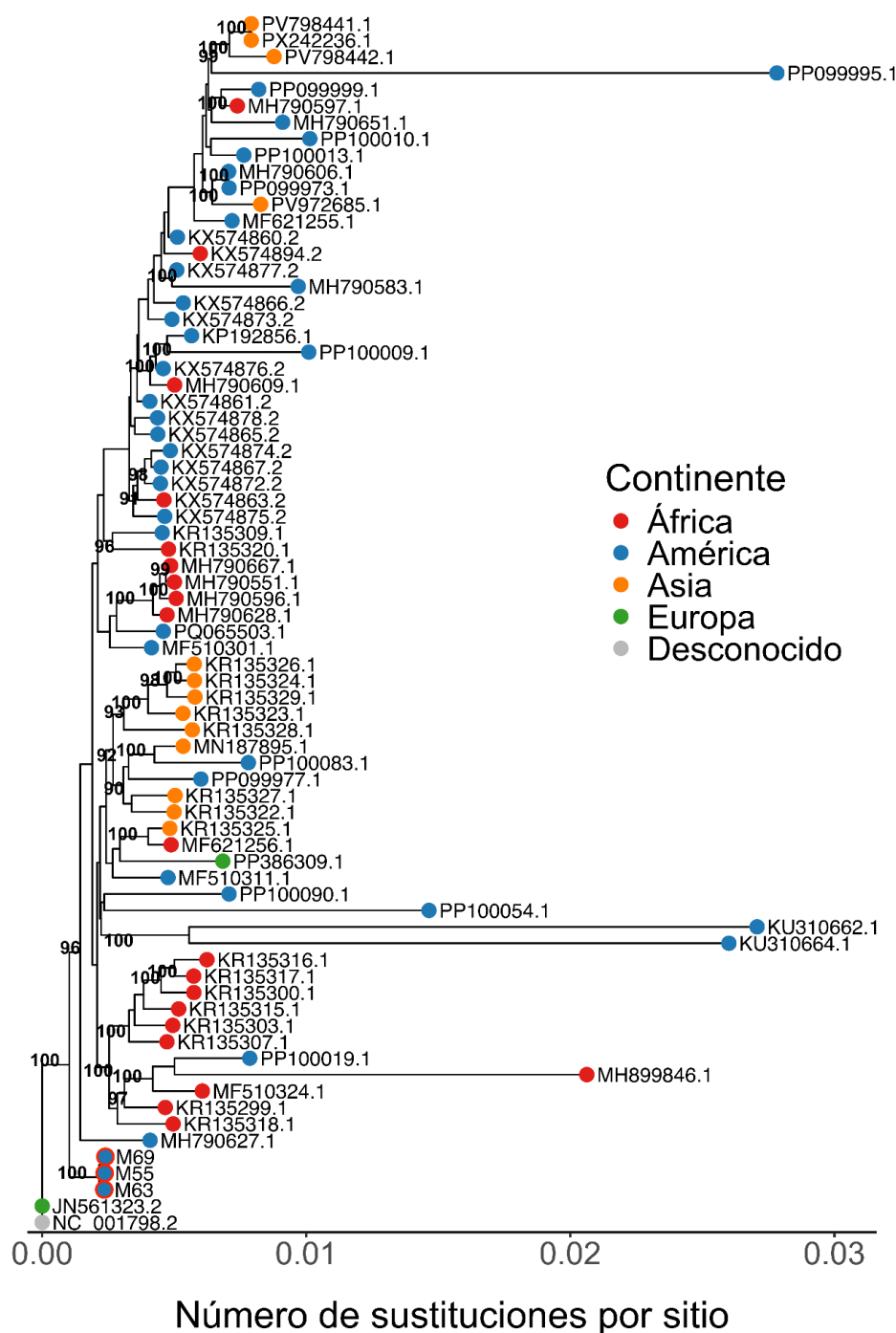


Figura 28. Filogenia de genoma completo del virus herpes simple tipo 2 (HSV-2) inferida mediante el método de máxima verosimilitud. El árbol se construyó a partir de secuencias completas del genoma viral, incluyendo 74 genomas de referencia obtenidos de bases de datos públicas y las muestras analizadas en este estudio (M55, M63 y M69). Los círculos en las puntas de las ramas indican el origen geográfico de cada secuencia, agrupado por continente: África = rojo, América = azul, Asia = naranja, Europa = verde y Desconocido = gris. Las muestras generadas en este estudio se destacan mediante un contorno rojo. La longitud de las ramas está expresada en número de sustituciones por sitio. Los valores mostrados en los nodos internos corresponden al soporte obtenido mediante 1000 réplicas de ultrafast bootstrap.

La muestra 97 fue analizada con Nextclade utilizando el esquema de linajes recientemente propuesto para DENV-3. La secuencia 97 fue clasificada como DENV-3 genotipo III, linaje 3III_B.3.2 (Figura 29). Este conjunto de datos se basa en el sistema de linaje del virus del dengue de Hill V, Cleemput S, Pereira JS, et al., 2024 y es adecuado para el análisis de secuencias virales de DENV-3.

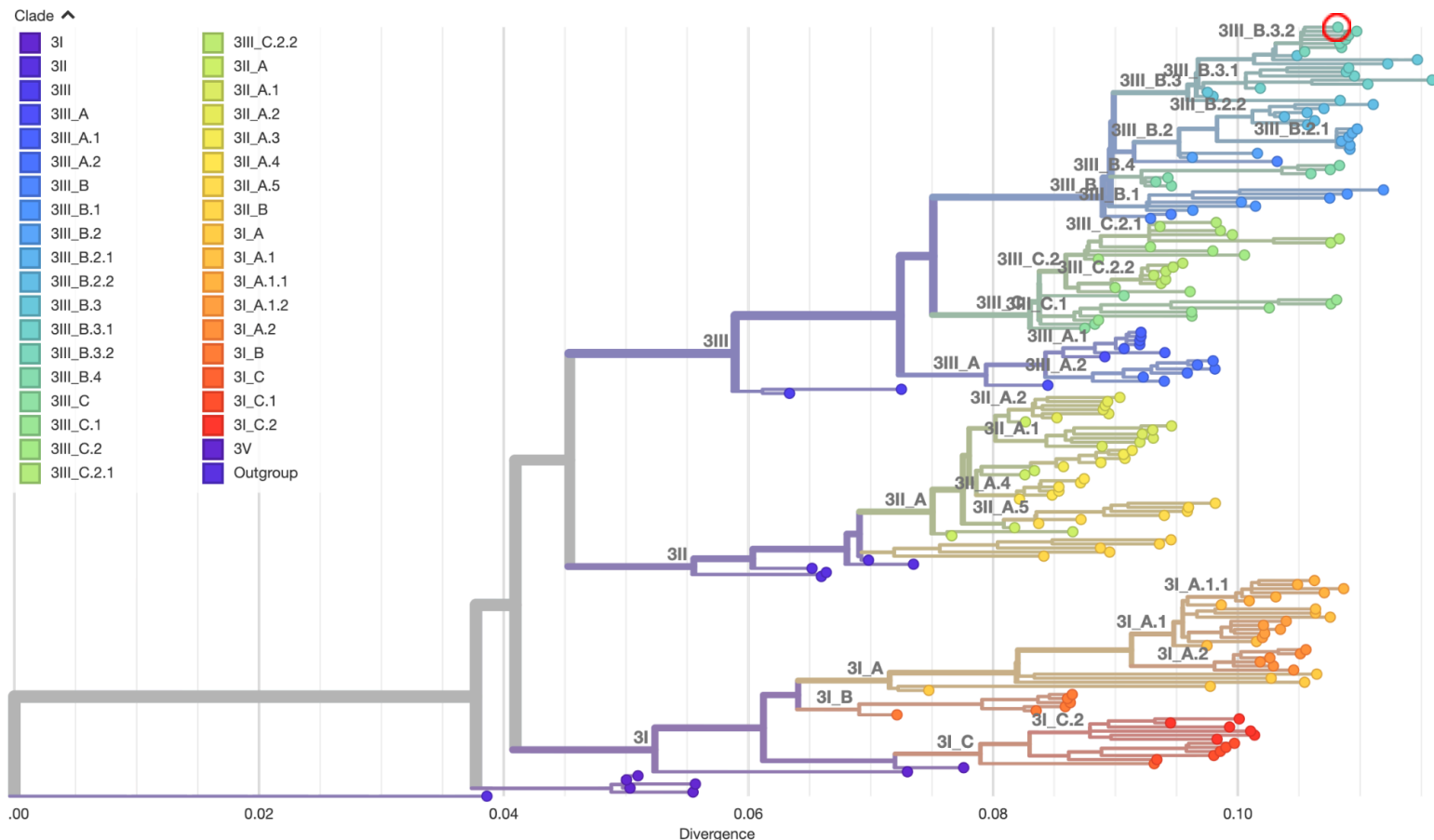


Figura 29. Árbol de máxima verosimilitud del virus del dengue serotipo 3 (DENV-3) generado con Nextclade a partir de genomas de referencia de distintas regiones del mundo. La secuencia obtenida en este estudio, correspondiente a la muestra 97 (indicada con un círculo resaltado), se localiza dentro del sublinaje del genotipo 3III_B.3.2.

8.8 Análisis filodinámico de HSV-2 y DENV-3

Dado el tamaño del genoma y los reportes de recombinación en HSV-2, se seleccionaron cinco genes como marcadores: UL23, UL27, UL30, US4 y US6 (Tabla 13). Estos genes se eligieron porque (i) están presentes y bien anotados en la mayoría de los genomas de HSV-2 disponibles en la base de datos, lo que facilita la recuperación homogénea de cada gen; (ii)

están bien representados en los genomas completos; y (iii) el uso de varios marcadores independientes permite evaluar la concordancia entre genes y comprobar que las inferencias filogenéticas y temporales son robustas y coherentes con los patrones de agrupamiento observados en el análisis filogenético basado en genoma completo. Obteniendo los árboles filogenéticos escalados en el tiempo para estos cinco marcadores (Figura 30) (Los árboles completos se encuentran en el Anexo II).

Tabla 13. Genes de HSV-2 que se usaron como marcadores filodinámicos.

Gen	Proteína codificada	Función / relevancia principal
UL23	Timidina cinasa (TK)	Fosforila nucleósidos y análogos; diana clásica de antivirales.
UL27	Glicoproteína B (gB)	Glicoproteína de fusión; esencial para la entrada y diseminación viral.
UL30	DNA polimerasa (Pol)	Enzima central de replicación del genoma; blanco de fármacos antivirales.
US4	Glicoproteína G (gG)	Glicoproteína de envoltura involucrada en modulación de la respuesta inmune.
US6	Glicoproteína D (gD)	Glicoproteína de entrada; se une a receptores celulares y define tropismo.

En los cinco árboles escalados en el tiempo (Figura 30) se observa un patrón consistente. En todos los genes analizados UL23 (Figura 30A), UL27 (Figura 30B), UL30 (Figura 30C), US4 (Figura 30D) y US6 (Figura 30E) las secuencias mexicanas M55, M63 y M69 muestran proximidad filogenética entre sí, aunque la resolución interna de los árboles presenta politomías y relaciones no completamente resueltas. Esta variación fue evaluada mediante los valores de soporte bootstrap, los cuales permiten estimar la confiabilidad de los nodos internos.

La mezcla de colores en las ramas cercanas a las muestras mexicanas indica que comparten ancestros recientes con virus de diferentes continentes y que no forman un clado geográficamente restringido. La posición que ocupan M55, M63 y M69 a lo largo del eje temporal también es congruente entre los genes. En UL23 y UL27, el subclado que contiene las muestras de nuestro estudio se localizó en la región más reciente del timetree, con ramas terminales cortas entre sí, lo que sugiere una divergencia temporalmente reciente. Sin embargo, en UL23 el soporte bootstrap de los nodos cercanos fue bajo, por lo que la posición

exacta de las muestras debe interpretarse con cautela ya que genera cierta incertidumbre.

En UL27, UL30, US4 y US6, las muestras M55, M63 y M69 también se observaron próximas entre sí. En particular, UL30 y US6 mostraron soportes bootstrap altos en los nodos asociados a la agrupación de las muestras mexicanas, lo que aporta mayor confianza a la relación filogenética observada en estos genes. US4 y UL27 también apoyan esta proximidad, aunque presentan algunos nodos internos con soporte bajo o moderado, lo que indica incertidumbre en ciertas relaciones internas del árbol. Por lo tanto, estos árboles se consideran evidencia complementaria, pero no deben interpretarse de forma aislada para establecer relaciones evolutivas profundas.

En conjunto, los árboles escalados en el tiempo obtenidos para UL23, UL27, UL30, US4 y US6 muestran que las secuencias mexicanas M55, M63 y M69 mantienen una relación filogenética cercana entre sí en los distintos análisis realizados. Sin embargo, el respaldo de esta agrupación no fue uniforme entre los genes analizados. Los árboles de UL30 y US6 proporcionaron el soporte más confiable, mientras que UL27 y US4 mostraron soporte diverso y UL23 presentó la menor resolución en la región donde se ubican las muestras mexicanas. Esta variabilidad puede estar relacionada con el menor número de sitios informativos en los genes individuales. Estos resultados sugieren que las secuencias obtenidas en este estudio forman parte de la diversidad global conocida de HSV-2, no muestran evidencia de constituir un grupo geográficamente restringido y presentan una relación cercana entre sí, especialmente respaldada por los análisis de genoma completo y por los genes UL30 y US6.

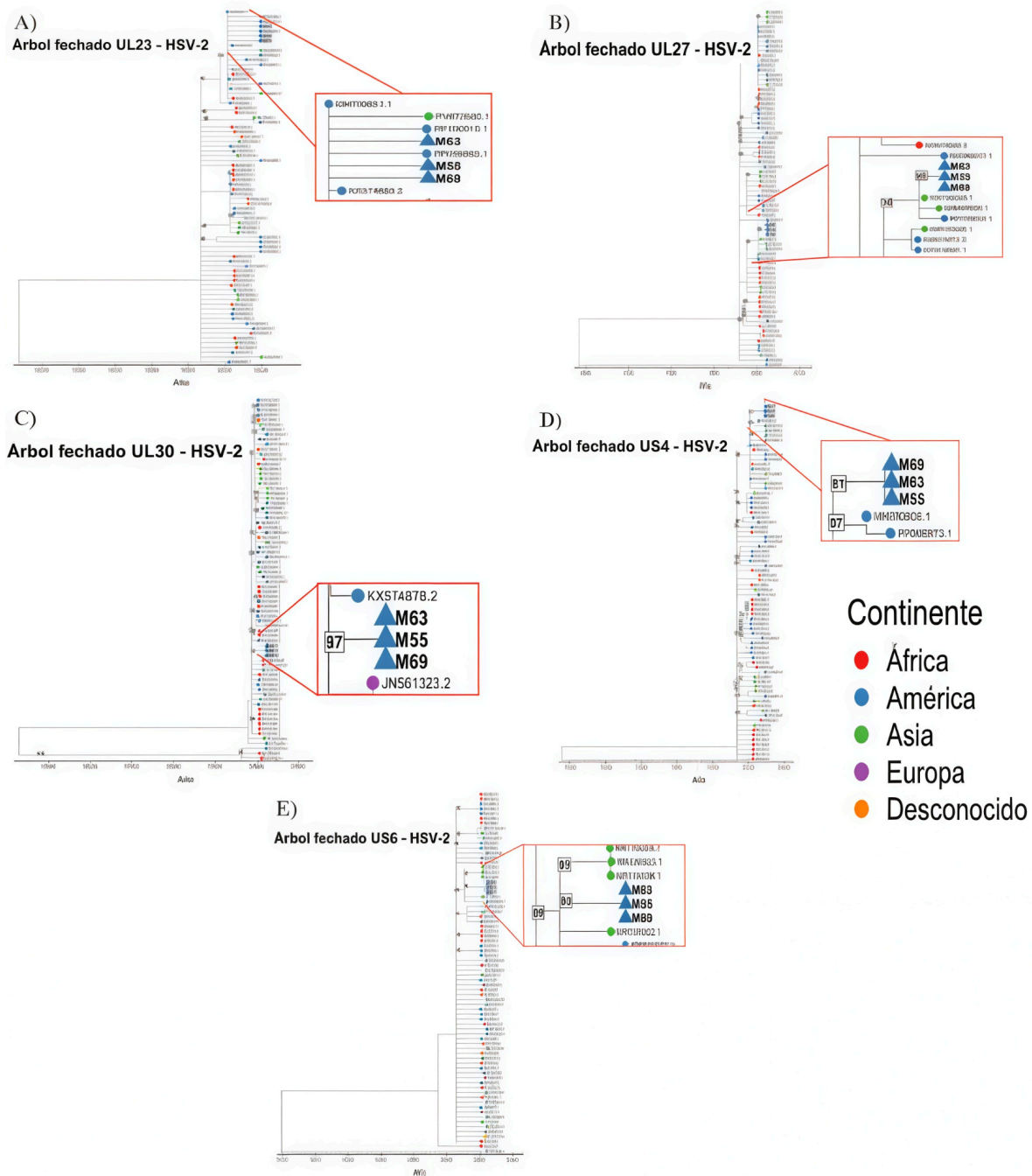


Figura 30. Árboles filogenéticos escalados en el tiempo de HSV-2 construidos a partir de cinco genes marcadores. Árboles filogenéticos temporales obtenidos a partir de los genes UL23 (A), UL27 (B), UL30 (C), US4 (D) y US6 (E) de HSV-2, construidos con las tres secuencias mexicanas de este estudio (M55, M63 y M69) y 74 secuencias de referencia provenientes de genomas completos humanos de distintos continentes. En cada panel se muestra una ampliación de la región del árbol donde se localizan las secuencias mexicanas; los árboles completos correspondientes se presentan en el Anexo II. Las ramas se encuentran escaladas en años y las puntas están coloreadas según el continente de origen de cada secuencia (África = rojo, América = azul, Asia = verde, Europa = morado y origen desconocido = naranja). Los valores mostrados en los nodos internos corresponden al soporte obtenido mediante 1000 réplicas de ultrafast bootstrap.

Para construir el árbol escalado de DENV-3 de la muestra 97, se descendieron de bases de datos públicas internacionales, como NCBI Virus, se consideraron únicamente genomas completos que cumplieran criterios estrictos de calidad y anotación: (a) que tuvieran longitud compatible con el genoma completo de DENV-3; (b) que correspondieran a secuencias aisladas de hospedero humano (host = Homo sapiens); (c) que contaran con fecha de toma de muestra y país de origen claramente reportados y en un intervalo temporal de al menos 20 años antes del 2025. De los cuales se obtuvo un total de 387 secuencias de DENV-3, con representación de los cinco continentes. El árbol de DENV-3 (Figura 31) mostró que la mayoría de los linajes incluidos en el análisis corresponden a aislamientos de Asia y América, mientras que las secuencias de África y Europa fueron menos frecuentes. Los clados más basales del timetree estuvieron dominados por secuencias asiáticas, lo que sugiere un origen asiático de los linajes ancestrales presentes en este conjunto. A partir de estos linajes se observaron múltiples eventos de dispersión hacia América, con la formación de varios subclados regionales.

DENV-3 timetree

Muestra97 dentro del contexto global

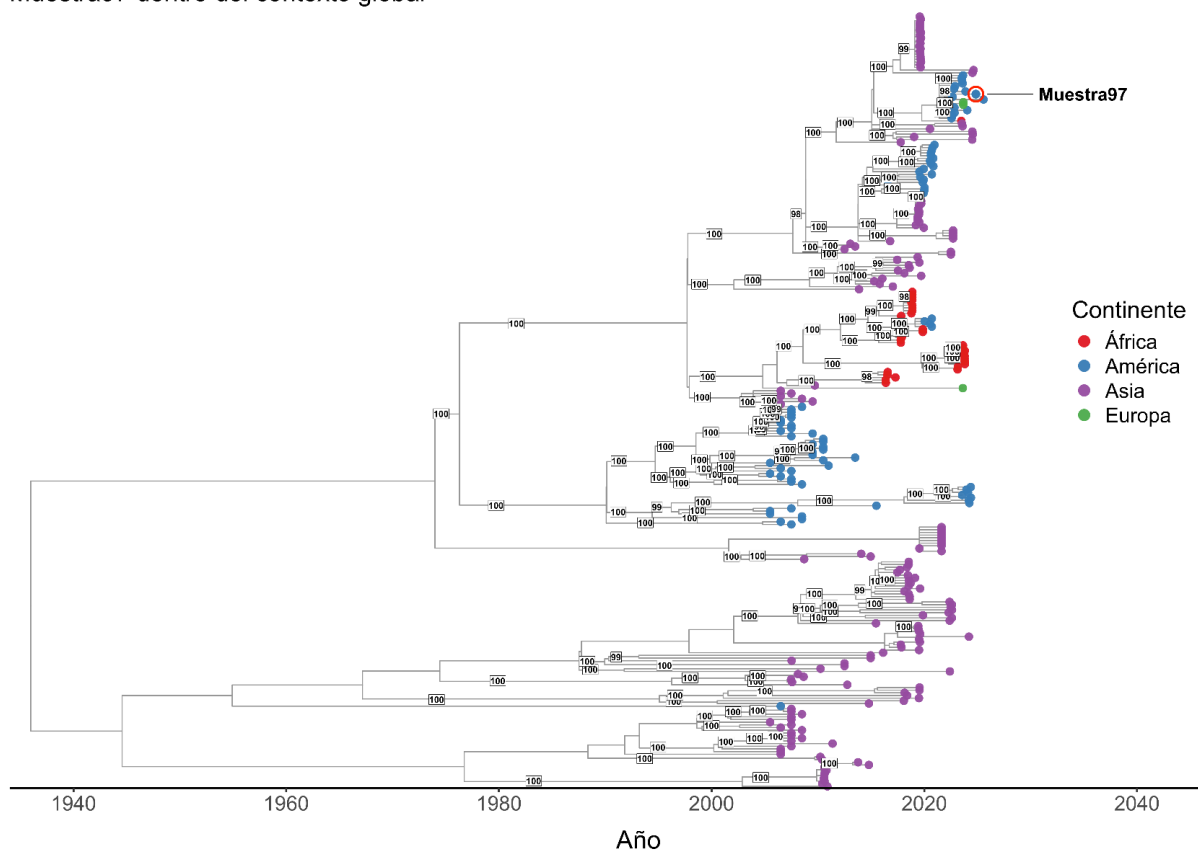


Figura 31. Árbol filodinámico de DENV-3 escalado en el tiempo. Árbol inferido con TreeTime a partir de genomas completos de DENV-3 obtenidos de NCBI Virus y secuencias de referencia globales. La longitud de las ramas corresponde al tiempo en años (eje X). Las puntas están coloreadas según el continente de origen de cada

aislamiento (África = rojo, América = azul, Asia = morado, Europa = verde). La muestra de este estudio (Muestra97), obtenida en Sinaloa, México, se resalta con un círculo rojo y su identificador a la derecha,

En este contexto global, la muestra 97 se ubicó dentro de un agrupamiento terminal situado hacia el extremo más reciente del timetree, compuesto principalmente por secuencias muestreadas entre 2022 y 2025. La muestra 97 se agrupó cercana a secuencias de Guayana Francesa y Cuba; el subgrupo formado por las secuencias de Guayana Francesa y Cuba presentó un soporte bootstrap alto de 98, mientras que el nodo que incorpora a la muestra 97 dentro de este agrupamiento presentó un soporte bootstrap de 92. Estos valores indican que la posición filogenética de la muestra 97 dentro de esta región terminal del árbol se encuentra bien respaldada. Este agrupamiento corresponde al genotipo III de DENV-3, un linaje cuya reemergencia reciente en América se ha asociado con una introducción desde Asia, seguida de su diversificación y dispersión en distintos países del continente. La posición de la muestra 97 dentro de este clado reciente es consistente con este patrón de circulación.

8.9 Red de haplotipos de HSV-2 y DENV-3

En las redes de haplotipos construidas para los cinco marcadores de HSV-2 (Figura 32), las tres secuencias mexicanas M55, M63 y M69 (resaltadas con un círculo rojo en cada panel) se integran en la diversidad global del virus y no forman un linaje exclusivo de México. Los marcadores considerados en este estudio fueron UL23, UL27, UL30, US4 y US6, debido a que corresponden a genes ampliamente anotados en los genomas de referencia de HSV-2, se encuentran disponibles en la mayoría de las secuencias analizadas y representan regiones con distinto grado de conservación y variabilidad, lo que hace que sean utilizados para este análisis de este tipo. En los cinco genes analizados, M55, M63 y M69 comparten haplotipos o se ubican próximas a haplotipos que incluyen aislamientos provenientes de otros continentes, lo que indica que pertenecen a variantes ya ampliamente circulantes y no a un grupo restringido geográficamente.

En el caso de UL23 (Figura 32A), las secuencias de este estudio se ubican en uno de los haplotipos más grandes y cercanos al centro de la red, compuesto principalmente por secuencias de América, pero también con contribuciones de África, Asia y Europa. Un patrón muy similar se observa para US4 y US6 (Figura 32D y E), donde M55, M63 y M69 se agrupan en haplotipos de alta frecuencia, con una composición de colores mixta. Esto sugiere que estos genes son relativamente conservados y que los haplotipos predominantes se han

difundido ampliamente entre regiones geográficas. En estos tres marcadores, las secuencias M55, M63 y M69 no se separan en un nodo periférico, sino que se insertan en el núcleo de la red, compatible con variantes compartidas entre distintas regiones.

Para UL27 (Figura 32B), la red muestra una estructura algo más ramificada y las tres secuencias se localizan en un haplotipo de tamaño intermedio, mayoritariamente constituido por secuencias de América y con menor representación de otros continentes. Este haplotipo ocupa una posición más periférica respecto al núcleo de la red, lo que sugiere que UL27 presenta mayor variabilidad que UL23, US4 y US6, y que las variantes detectadas en México podrían corresponder a derivados dentro de un linaje americano más amplio.

El caso más contrastante corresponde a UL30 (Figura 32C). En este gen, el haplotipo donde se encuentran M55, M63 y M69 es pequeño y está compuesto exclusivamente por secuencias de América, separado por varios pasos mutacionales de otros haplotipos de la red. Esto indica un mayor grado de diferenciación para UL30 y sugiere que este marcador ofrece una resolución filogeográfica superior. En este caso, las secuencias analizadas ocupan un haplotipo específico dentro del componente americano de la red, en lugar de integrarse en un haplotipo cosmopolita.

En conjunto, los cinco marcadores muestran que, aunque M55, M63 y M69 se insertan dentro de la diversidad global de HSV-2, genes como UL30 y, en menor medida, UL27 proporcionan una señal más clara para discriminar linajes regionales, mientras que UL23, US4 (panel D) y US6 reflejan haplotipos muy difundidos entre continentes.

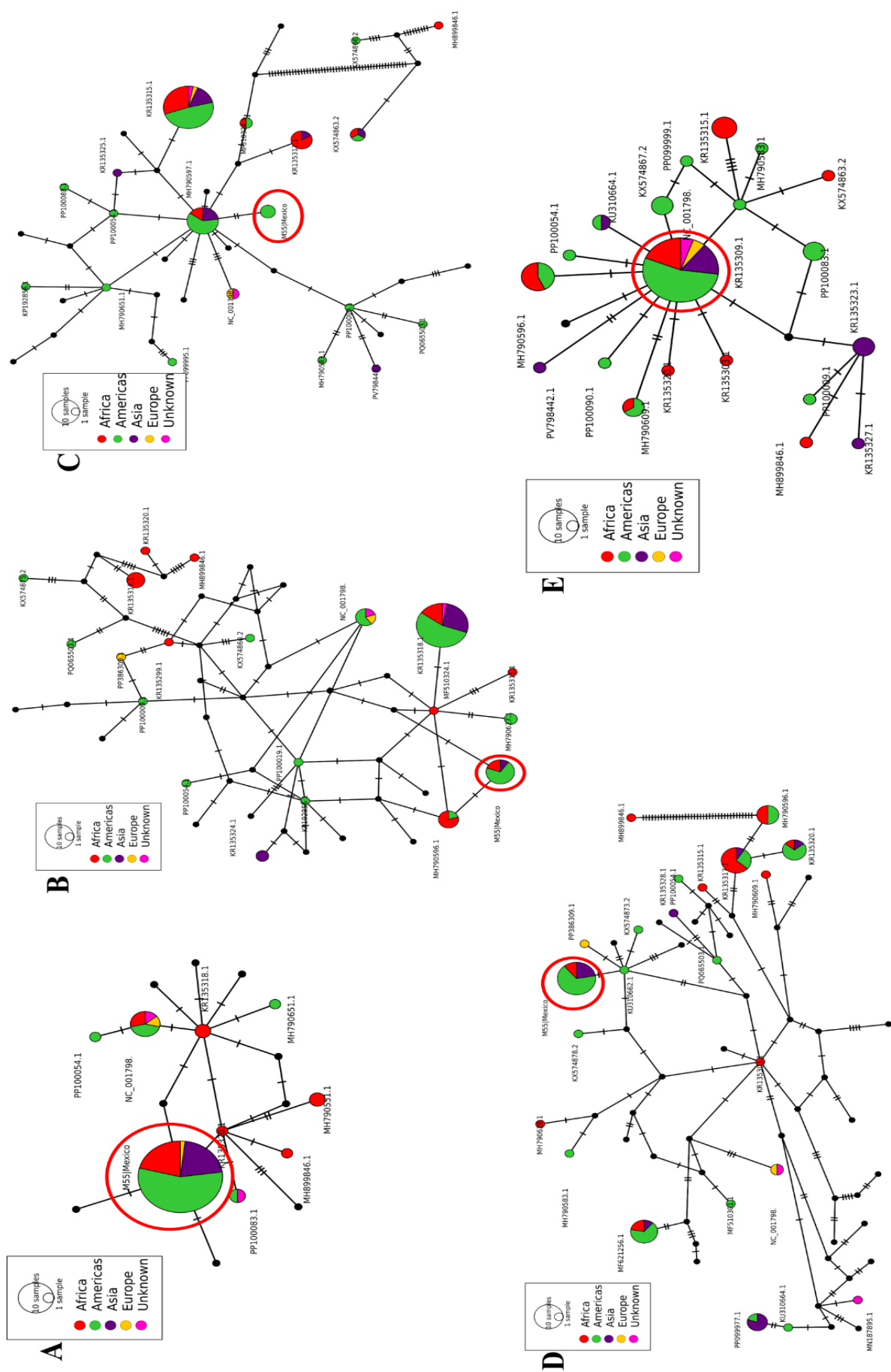


Figura 32. Redes de haplotipos de HSV-2 para los genes UL23 (A), UL27 (B), UL30 (C), US4 (D) y US6 (E), construidas en PopART a partir de secuencias de referencia globales. Cada nodo representa un haplotipo y su tamaño es proporcional al número de secuencias que lo comparten; los colores indican el continente de origen y las marcas perpendiculares en las ramas corresponden a cambios mutacionales. Los círculos rojos señalan el haplotipo donde se agrupan las secuencias mexicanas de este estudio (M55, M63 y M69).

En la red de haplotipos construida con los genomas completos de DENV-3 (Figura 33), cada nodo representa un haplotipo y su tamaño es proporcional al número de secuencias que lo comparten, mientras que los colores indican el país de origen. En el recuadro rojo se muestra el clúster donde se ubica la muestra 97, y el círculo rojo destaca específicamente su posición dentro de la red.

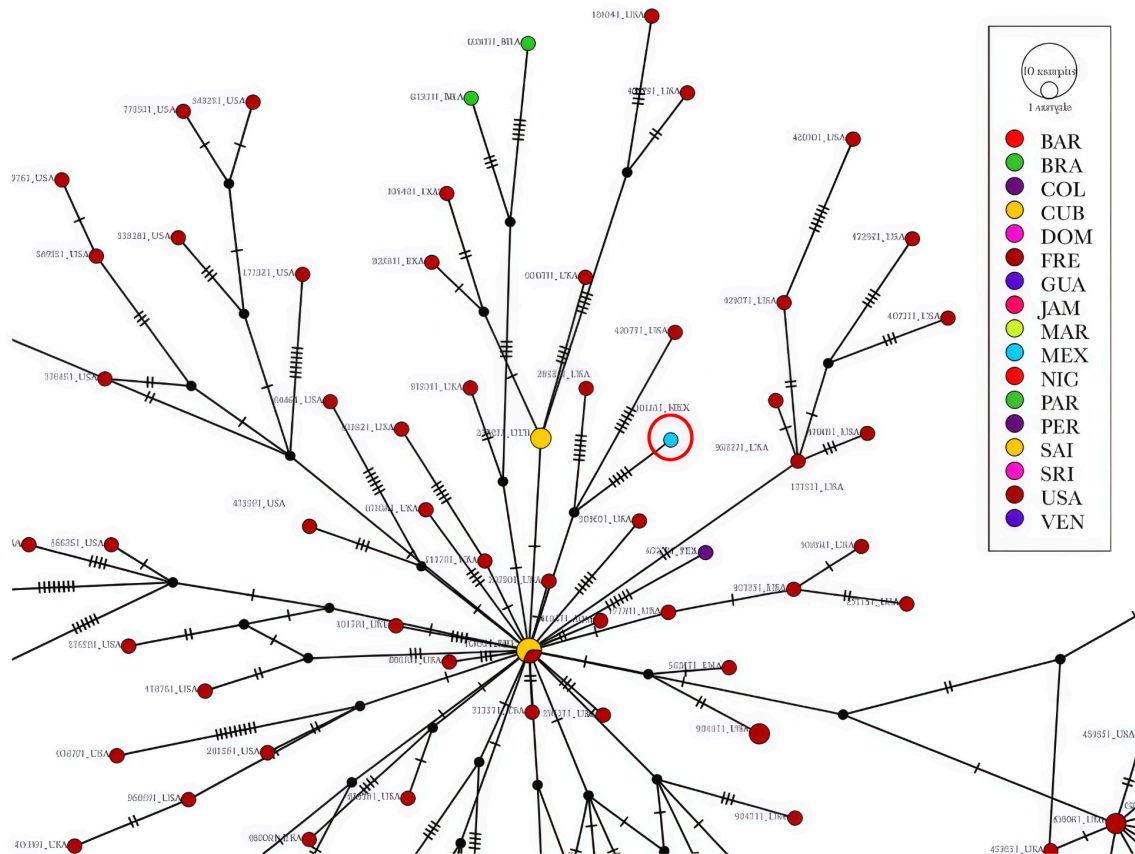


Figura 33. Red de haplotipos de DENV-3 construida a partir de genomas completos. Cada nodo representa un haplotipo y su tamaño es proporcional al número de secuencias que lo comparten; los colores indican el país de origen y las líneas con marcas perpendiculares corresponden a cambios mutacionales únicos. En esta figura se presenta un recorte con ampliación (zoom) de la región de la red donde se ubica la muestra 97; la red de haplotipos completa se muestra en el Anexo III. El círculo rojo señala específicamente la posición de la muestra 97 dentro de la red.

La muestra 97 no forma un haplotipo exclusivo ni aislado, sino que se inserta en uno de los conglomerados principales de la red, compartiendo nodo (o separado por muy pocos pasos mutacionales) con secuencias de otros países. Esto indica que el virus detectado en la muestra 97 pertenece a un linaje que ya circula ampliamente en varias regiones y no a una variante

singular restringida a México. La baja distancia mutacional de este haplotipo respecto a los nodos vecinos sugiere además que la secuencia mexicana está integrada dentro del linaje epidémico contemporáneo de DENV-3, en concordancia con el árbol filogenético basado en genoma completo, donde la muestra 97 también se agrupa dentro de uno de los clados predominantes de este serotipo.

9. Discusión

El objetivo de este estudio fue identificar arbovirus de baja prevalencia en muestras de pacientes con sospecha de arbovirosis mediante RT-PCR, cultivo celular y secuenciación masiva. Sin embargo, no se detectaron estos agentes en las muestras seleccionadas. En su lugar, se identificó un caso de DENV-3, un arbovirus de alta circulación, y de forma adicional se detectó HSV-2 en tres muestras. La ausencia de otros arbovirus de interés puede deberse a factores epidemiológicos, ya sea por su ausencia en la población muestreada, porque su frecuencia fuese demasiado baja para ser captada, o porque el tamaño de muestra no haya sido lo suficientemente amplio para detectar virus de circulación focal o esporádica (Weaver & Reisen, 2010; Ali et al., 2023).

Uno de los factores que pudo haber influido en estos resultados fue el criterio de selección de las muestras para secuenciación, ya que únicamente se analizaron aquellas que presentaron efecto citopático (ECP) en cultivo celular. Este enfoque favoreció la recuperación de material genético viral al priorizar muestras con virus viables; sin embargo, también pudo excluir virus presentes en bajas cargas, con limitada capacidad de replicación o que no producen ECP en las líneas celulares utilizadas. En este estudio, el ECP fue más evidente en células Vero que en C6/36, lo que sugiere una mayor susceptibilidad de esta línea para el aislamiento de algunos virus. En consecuencia, la ausencia de ECP no debe interpretarse como evidencia de ausencia de infección viral, ya que el aislamiento depende del tropismo viral, de la viabilidad de las partículas infecciosas y del momento en que se obtiene y procesa la muestra (Leland & Ginocchio, 2007).

Además de las limitaciones asociadas al aislamiento viral, la selección de los pacientes pudo influir en la ausencia de detección de arbovirus poco frecuentes. Las cuatro muestras analizadas mediante secuenciación correspondieron a pacientes hospitalizados, tres clasificados clínicamente como dengue grave y una como dengue con signos de alarma. Este criterio favoreció el análisis de cuadros clínicos severos, cuando diversos arbovirus emergentes suelen manifestarse como fiebre aguda indiferenciada o enfermedad tipo dengue sin evolucionar necesariamente a formas graves. En regiones endémicas, esta similitud clínica favorece que otros arbovirus permanezcan sin identificar cuando el diagnóstico se orienta principalmente hacia DENV, ZIKV y CHIKV mediante pruebas dirigidas (Aguilar et al., 2011; Ali et al., 2023).

Otro aspecto a considerar es la dinámica de co-circulación de arbovirus en regiones endémicas. La circulación de estos virus depende de factores como la distribución de los

vectores, la estacionalidad, la inmunidad poblacional y la introducción de nuevos linajes virales, por lo que ciertos patógenos exhiben fluctuaciones temporales o geográficas mientras DENV predomina en determinados periodos. En consecuencia, la ausencia de detección de arbovirus poco frecuentes en este estudio no implica necesariamente su ausencia en la población, sino que también puede reflejar estas variables epidemiológicas y las limitantes metodológicas previamente mencionadas (Weaver & Reisen, 2010; Gubler, 2011; Pollett et al., 2018).

Finalmente, el momento de la toma de muestra respecto al inicio de los síntomas también pudo influir en la detección viral. La sensibilidad de las pruebas moleculares disminuye conforme desciende la viremia durante la evolución clínica, por lo que muestras obtenidas fuera de la fase aguda pueden reducir la probabilidad de identificar arbovirus mediante RT-PCR o secuenciación (Waggoner et al., 2016; PAHO, 2022). En conjunto, estos factores metodológicos, clínicos y epidemiológicos ofrecen una explicación más probable para la ausencia de arbovirus poco frecuentes que la simple ausencia de circulación de estos virus en la población estudiada.

La detección de DENV-3 en la muestra 97 debe interpretarse considerando que, tras una revisión de los registros de laboratorio, se confirmó que esta muestra había sido previamente identificada como positiva mediante el panel PCR-Triplex y que su inclusión dentro del grupo analizado correspondió a un error durante la conformación de la cohorte de muestras negativas. En consecuencia, este hallazgo no representa la identificación inesperada de DENV-3, sino la confirmación de un resultado previamente obtenido mediante una estrategia independiente. Asimismo, la recuperación del genoma viral y su correcta asignación filogenética respaldan el desempeño del flujo de trabajo empleado, al demostrar concordancia entre el diagnóstico molecular inicial y los análisis realizados mediante secuenciación masiva.

La detección de HSV-2 en tres muestras constituye uno de los hallazgos más relevantes de este estudio, ya que este virus no formaba parte del algoritmo diagnóstico inicial dirigido a DENV, ZIKV y CHIKV. A nivel epidemiológico, HSV-2 es una infección frecuente, con una proporción importante de infecciones asintomáticas o no reconocidas, lo que puede favorecer el subregistro cuando la vigilancia depende principalmente de casos clínicamente evidentes (World Health Organization, 2025b). En México, estudios seroepidemiológicos han mostrado prevalencias variables de infección por HSV-2 en distintos grupos poblacionales, lo que

indica que su circulación puede ser mayor a la reflejada por los casos clínicos notificados (Conde-González et al., 2003).

La detección de HSV-2 en sangre debe interpretarse con cautela. Este virus establece latencia de por vida en los ganglios sensoriales y puede reactivarse en respuesta a diversos estímulos, entre ellos procesos infecciosos sistémicos, inflamación, estrés fisiológico o alteraciones del estado inmunológico (Berger & Houff, 2008; Gupta et al., 2007). En consecuencia, la presencia de DNA viral en suero no implica necesariamente que HSV-2 haya sido el agente etiológico responsable del cuadro febril observado. Con la información disponible no fue posible establecer si los pacientes presentaban una infección primaria por HSV-2 o una reactivación desencadenada por otro proceso infeccioso. Para esclarecer esta posibilidad se solicitó información clínica adicional, incluyendo antecedentes de infección herpética, manifestaciones clínicas compatibles y evolución del paciente; sin embargo, estos datos no estuvieron disponibles durante el desarrollo del estudio.

Una limitación importante para la interpretación de estos hallazgos fue la disponibilidad limitada de metadatos clínico-epidemiológicos asociados a las muestras. Aunque los registros permitieron conocer variables generales como edad, sexo, región geográfica, condición de hospitalización y clasificación dentro del sistema de vigilancia, no se contó con información clínica suficiente para diferenciar con precisión entre cuadros compatibles con arbovirosis, manifestaciones asociadas a HSV-2 en primoinfección o en reactivación viral u otras etiologías. Datos como la presencia de lesiones vesiculares, antecedentes de infección herpética, estado inmunológico, manifestaciones neurológicas, resultados serológicos o evaluación de líquido cefalorraquídeo habrían permitido interpretar con mayor claridad el significado clínico de la detección de HSV-2 en estas muestras (Berger & Houff, 2008; Gupta et al., 2007; Centers for Disease Control and Prevention, 2021). Independientemente de su papel etiológico, la identificación de HSV-2 pone de manifiesto que pacientes con sospecha clínica de arbovirosis pueden presentar etiologías virales alternativas o concomitantes que no serían detectadas mediante algoritmos diagnósticos enfocados exclusivamente en DENV, ZIKV y CHIKV. En este contexto, la combinación de aislamiento viral y secuenciación masiva permitió recuperar y caracterizar virus viables presentes en las muestras, demostrando el valor de integrar enfoques no dirigidos como complemento de las estrategias diagnósticas convencionales (Chiu & Miller, 2019; Gu et al., 2019).

La identificación de HSV-2 fue corroborada mediante PCR específica tras su detección por secuenciación masiva, fortaleciendo la confiabilidad del hallazgo. En este estudio, las muestras 55, 63 y 69 correspondieron a pacientes masculinos hospitalizados, clasificados como dengue grave, pero procedentes de regiones registradas diferentes: Jalisco, Veracruz Norte y San Luis Potosí. Además, los pacientes pertenecían a grupos etarios distintos, con edades de 0, 27 y 69 años. Las comparaciones genómicas entre las tres secuencias mostraron diferencias de 31 a 60 SNPs entre pares, sobre aproximadamente 153,000 sitios comparables, lo que indica que los genomas recuperados fueron cercanos, pero presentaron variación nucleotídica entre sí. Esta baja divergencia es compatible con estudios previos que describen a HSV-2 como un virus genéticamente conservado, con diversidad global reducida y señal geográfica limitada, por lo que aislamientos de distintas regiones pueden agruparse de manera cercana en análisis filogenéticos (Kolb et al., 2015; Newman et al., 2015; Johnston et al., 2017; Burrell et al., 2017). De manera complementaria, los análisis filogenéticos y las redes de haplotipos mostraron que las secuencias no formaron un grupo exclusivo de México, sino que se integraron dentro de la diversidad global conocida de HSV-2. Sin embargo, debido al número reducido de muestras analizadas, no es posible establecer asociaciones entre la variación observada y la región geográfica, edad o sexo de los pacientes. Por ello, estos resultados deben interpretarse como una descripción exploratoria de la cercanía genética entre los aislamientos recuperados, y no como una caracterización suficiente de la circulación regional de HSV-2.

El soporte de la agrupación de las secuencias de HSV-2 varió entre los genes analizados, ya que los árboles de UL30 y US6 mostraron mayor soporte bootstrap para la proximidad entre las muestras 55, 63 y 69, mientras que en el árbol de UL23 el nodo que agrupa a estas secuencias presentó un soporte menor. Esto indica que, para UL23, la relación filogenética entre las muestras del estudio tuvo menor respaldo estadístico; es decir, el agrupamiento de estas secuencias presenta mayor incertidumbre y debe interpretarse con más cautela que en los árboles de UL30 y US6. Esta diferencia de soporte entre los genes no invalida el análisis, sino que indica que la señal filogenética no fue igualmente informativa en todas las regiones evaluadas. Estudios previos han utilizado genes como UL23 y UL30 para evaluar variación genética y relaciones filogenéticas en HSV-2 (Hyun et al., 2023), mientras que Burrell et al. (2015) emplearon un conjunto de genes que incluye UL23, UL27, UL30, US4 y US6 para caracterizar la diversidad genética y las relaciones evolutivas entre aislamientos de HSV-2. Además, Casto et al. (2020) mostraron que regiones como UL27 pueden verse afectadas por

eventos de recombinación entre HSV-1 y HSV-2. Por ello, en este trabajo los árboles por gen se utilizaron como una aproximación complementaria para evaluar si la ubicación de las muestras era consistente en distintas regiones genómicas, pero no como la única evidencia para definir su relación evolutiva.

Con todo lo discutido anteriormente, este estudio demuestra que la ausencia de detección de arbovirus poco frecuentes no implica necesariamente su ausencia en la población, sino que puede estar influenciada tanto por factores epidemiológicos como por limitaciones metodológicas. Asimismo, el trabajo muestra que incorporar enfoques no dirigidos, en combinación con aislamiento viral, permite identificar virus recuperados mediante cultivo que no fueron considerados inicialmente, lo que contribuye a una mejor comprensión de la diversidad viral en muestras clínicas. Los resultados obtenidos plantean la necesidad de optimizar las estrategias diagnósticas actuales mediante la integración de paneles moleculares más amplios, aislamiento viral, secuenciación genómica y criterios de diagnóstico diferencial que consideren un mayor número de especies virales, más allá de los arbovirus endémicos o de mayor incidencia. Esto permitiría mejorar la identificación de agentes no considerados inicialmente, reducir la omisión o el subdiagnóstico de infecciones virales alternativas y fortalecer la vigilancia epidemiológica en regiones donde los síndromes febriles suelen atribuirse principalmente al dengue u otros arbovirus de alta circulación.

Como perspectiva de este trabajo, y con el fin de delimitar los alcances futuros de forma clara, se propone la implementación de estrategias alternativas para identificar estas infecciones arbovirales, donde los futuros estudios deberían orientarse hacia un muestreo dirigido en aquellas regiones del país que históricamente registran la mayor prevalencia y endemicidad de estos virus. El muestrear directamente en estos puntos geográficos estratégicos permitirá optimizar la búsqueda de patógenos poco frecuentes que quedan sin un diagnóstico claro. Al mismo tiempo, para superar las limitaciones del aislamiento viral, es crucial proponer e incorporar otras metodologías diagnósticas. Entre éstas se sugiere la secuenciación masiva metagenómica directa (mNGS) a partir de muestras clínicas (evitando el filtro del cultivo celular), el uso de paneles de PCR multiplex sindrómicos de espectro ampliado, y la implementación de herramientas serológicas avanzadas, como los ensayos de neutralización por reducción de placas (PRNT), indispensables para mapear con precisión la inmunidad poblacional frente a múltiples virus circulantes.

10. Conclusiones

La estrategia integrada de aislamiento viral en cultivo celular, secuenciación masiva y análisis bioinformático permitió recuperar genomas virales de alta calidad a partir de muestras clínicas inicialmente negativas al diagnóstico molecular para DENV, ZIKV y CHIKV, cumpliendo el objetivo de implementar un flujo de trabajo para la caracterización genómica de virus presentes en pacientes con sospecha de arbovirosis.

La caracterización metagenómica confirmó la presencia de HSV-2 en tres muestras y de DENV-3 en una muestra, demostrando que pacientes con un cuadro clínico compatible con arbovirosis pueden estar infectados por virus que no son detectados mediante pruebas moleculares dirigidas.

No se detectaron arbovirus poco frecuentes en las muestras analizadas. Esto sugiere que, al menos en el conjunto de muestras estudiadas, estos virus no constituyeron una causa detectable de los cuadros febriles evaluados. Aunque el número de muestras y el tipo de pacientes podrían no ser los adecuados para aislar a este tipo de virus, por lo que no se puede descartar su circulación en nuestro país.

Los análisis filogenéticos y de redes de haplotipos mostraron que las secuencias mexicanas se integran dentro de la diversidad genética global descrita. En particular, la secuencia de DENV-3 se integra con otros virus de América, vinculándose específicamente con el clado de reciente introducción al continente. Por su parte, HSV-2 mostró distintas topologías en los árboles filogenéticos por gen, evidenciando eventos de recombinación, sin que se demostrara la presencia de linajes exclusivos o geográficamente restringidos.

En conjunto, los resultados respaldan el uso de enfoques metagenómicos no dirigidos como una herramienta complementaria para la vigilancia viral, ya que permiten ampliar el diagnóstico, identificar agentes no considerados inicialmente y generar información genómica útil para la comprensión de la diversidad viral en pacientes con síndromes febriles.

11. Referencias

1. Aguilar, P. V., Estrada-Franco, J. G., Navarro-Lopez, R., Ferro, C., Haddow, A. D., & Weaver, S. C. (2011). Endemic Venezuelan equine encephalitis in the Americas: Hidden under the dengue umbrella. *Future Virology*, 6(6), 721–740. <https://doi.org/10.2217/fvl.11.50>
2. Ali, I., Alarcón-Elbal, P. M., Mundle, M., Noble, S. A. A., Oura, C. A. L., Anzinger, J. J., & Sandiford, S. L. (2023). The others: A systematic review of the lesser-known arboviruses of the Insular Caribbean. *Viruses*, 15(4), 843. <https://doi.org/10.3390/v15040843>
3. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
4. Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus en Latinoamérica. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0186-23912016000200111&script=sci_arttext
5. Blitvich, B. J., & Firth, A. E. (2015). Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses*, 7(4), 1927–1959. <https://doi.org/10.3390/v7041927>
6. Briese, T., Calisher, C. H., & Higgs, S. (2013). Viruses of the family *Bunyaviridae*: Are all available isolates reassortants? *Virology*, 446(1–2), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.030>
7. Brodin, J., Krishnamoorthy, M., Athreya, G., & Leitner, T. (2013). PrimerDesign-M: A multiple-alignment-based primer design tool for genetically highly variable targets. *BMC Bioinformatics*, 14, 255. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-255>
8. Brustolin, M., Talavera, S., Núñez, A., Santamaría, C., Rivas, R., Pujol, N., Valle, M., Verdún, M., Brun, A., Pagès, N., & Busquets, N. (2017). Rift Valley fever virus and European mosquitoes: Vector competence of *Culex pipiens* and *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*). *Medical and Veterinary Entomology*, 31(4), 365–372. <https://doi.org/10.1111/mve.12254>
9. Burrel, S., Ait-Arzanadi, I., Boyer, A., & L'Honneur, A. S. (2022). Molecular epidemiology of herpes simplex virus type 2: A global perspective. *Reviews in Medical Virology*, 32(4), e2322. <https://doi.org/10.1002/rmv.2322>
10. Burrel, S., Wildschutte, J. H., Dessau, M., & Szpara, M. L. (2017). Ancient recombination events between human herpes simplex viruses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(7), 1707–1721. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx113>
11. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
12. Cardoso, B. F., Serra, O. P., Heinen, L. B. S., Zuchi, N., Souza, V. C., Naveca, F. G., Santos, M. A. M., & Slhessarenko, R. D. (2015). Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(6), 745–754. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150123>
13. Carrera, J. P., et al. (2022). Vigilancia molecular integrada de arbovirus en Perú. *Memorias del Instituto*

de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt", 42(1), 15–23.

14. Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Arboviruses*. <https://www.cdc.gov>
15. Centers for Disease Control and Prevention. (2021). *Arboviral diseases*. <https://www.cdc.gov/arboviral/>
16. Centers for Disease Control and Prevention. (2023). *West Nile virus: Statistics and maps*. <https://www.cdc.gov/west-nile-virus/data-maps/index.html>
17. Centers for Disease Control and Prevention. (2024). *St. Louis encephalitis*. <https://www.cdc.gov/sle/>
18. Chauhan, R. P., et al. (2022). Manifestaciones clínicas en arbovirosis humanas: Una revisión sistemática. *Tropical Medicine & International Health*, 27(9), 867–878.
19. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
20. Chiu, C. Y., & Miller, S. A. (2019). Clinical metagenomics. *Nature Reviews Genetics*, 20(6), 341–355. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0113-7>
21. Cintra, L. S., et al. (2025). High-resolution melting RT-qPCR para distinguir arbovirus de cinco géneros. *Journal of Virological Methods*, 335, 114456. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2024.114456>
22. Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2000). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657–1659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
23. Damasceno-Caldeira, R., Nunes-Neto, J. P., Aragão, C. F., Freitas, M. N. O., Ferreira, M. S., Castro, P. H. G., Dias, D. D., Araújo, P. A. S., Brandão, R. C. F., & Cruz, A. C. R. (2023). Vector competence of *Aedes albopictus* for Yellow Fever Virus: Risk of reemergence of urban yellow fever in Brazil. *Viruses*, 15(4), 1019. <https://doi.org/10.3390/v15041019>
24. Da Rosa, J. F. T., et al. (2017). Oropouche virus: Clinical, epidemiological, and molecular aspects of a neglected orthobunyavirus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 1617–1626. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0167>
25. Daude, N. N., et al. (2024). Coinfección por DENV y CHIKV en Brasil: Un estudio multicéntrico. *Emerging Infectious Diseases*, 30(4), 600–607.
26. Davis, C. T., Ebel, G. D., Lanciotti, R. S., Brault, A. C., Guzman, H., Siirin, M., Lambert, A., Parsons, R. E., Beasley, D. W. C., Novak, R. J., Elizondo-Quiroga, D., Green, E. N., Young, D. S., Stark, L. M., Drebot, M. A., Artsob, H., Tesh, R. B., Kramer, L. D., & Barrett, A. D. T. (2005). Phylogenetic analysis of North American West Nile virus isolates, 2001–2004: Evidence for the emergence of a dominant genotype. *Virology*, 342(2), 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.07.022>
27. De Salud. (s. f.). *Lineamientos vigentes, Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública*. Secretaría de Salud de México. <https://www.gob.mx/salud/documentos/lineamientos-vigentes-red-nacional-de-laboratorios-de-salud-publica>
28. Díaz, A., Ré, V., Almirón, W. R., Farías, A., Vázquez, A., Sanchez-Seco, M. P., Aguilar, J., Spinsanti, L., & Contigiani, M. (2018). Reemergence of St. Louis encephalitis virus in the Americas. *Emerging Infectious Diseases*, 24(12), 2150–2157. <https://doi.org/10.3201/eid2412.181408>
29. Díaz, F. J., et al. (2022). Impacto del cambio climático en la transmisión de arbovirus. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 46, e123.
30. Díaz-Badillo, A., Bolling, B. G., Pérez-Ramírez, G., Moore, C. G., Martínez-Muñoz, J. P.,

- Padilla-Viveros, A. A., Camacho-Nuez, M., Díaz-Pérez, A., Beaty, B. J., & Muñoz, M. L. (2011). The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City. *Parasites & Vectors*, 4, 70. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-70>
31. Dietzgen, R. G., Calisher, C. H., Kurath, G., Kuzmin, I. V., Rodriguez, L. L., Stone, D. M., Tesh, R. B., Tordo, N., Walker, P. J., Wetzel, T., & Whitfield, A. E. (2011). Family *Rhabdoviridae*. En A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, & E. J. Lefkowitz (Eds.), *Virus taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 686–714). Elsevier Academic Press.
 32. dos Santos, C. R., Santos, C. G. M. d., Couto-Lima, D., Souza, B. S., Rahman, R. U., Dornelas Ribeiro, M., Lima, J. B. P., & Martins, A. J. (2025). Evaluation of Yellow Fever Virus infection in *Aedes aegypti* mosquitoes from Pakistan with distinct knockdown resistance genotypes. *Insects*, 16(1), 33. <https://doi.org/10.3390/insects16010033>
 33. Elizondo-Quiroga, D., Davis, C. T., Fernández-Salas, I., Escobar-López, R., Velasco Olmos, D., Soto Gastalum, L. C., Avilés Acosta, M., Elizondo-Quiroga, A., González-Rojas, J. I., Contreras-Cordero, J. F., Guzmán, H., Travassos da Rosa, A. P. A., Blitvich, B. J., Barrett, A. D. T., Beaty, B. J., & Tesh, R. B. (2005). West Nile virus isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 11(9), 1449–1452. <https://doi.org/10.3201/eid1109.050121>
 34. Elliott, R. M. (2014). Orthobunyaviruses and phleboviruses. En D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (6.^a ed., pp. 1244–1275). Lippincott Williams & Wilkins.
 35. Esposito, D. L. A., & Fonseca, B. A. L. (2015). Diversificación genética y caracterización del virus Mayaro. *Virology Journal*, 12, 84. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0311-y>
 36. Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
 37. Faria, N. R., et al. (2017). Coinfección por arbovirus en brote de Zika: Un estudio genómico metagenómico. *Nature Communications*, 8, 15201. <https://doi.org/10.1038/ncomms15201>
 38. Fernandes-Matano, L., Monroy-Muñoz, I. E., Pardavé-Alejandre, H. D., Uribe-Noguez, L. A., Hernández-Cueto, M. de los A., Rojas-Mendoza, T., Santacruz-Tinoco, C. E., Grajales-Muñiz, C., & Muñoz-Medina, J. E. (2021). Impact of the introduction of chikungunya and zika viruses on the incidence of dengue in endemic zones of Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(12), e0009922. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009922>
 39. Foy, B. D., et al. (2011). Probable transmisión no vectorial del virus Zika, Colorado, EE. UU. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 880–882. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101939>
 40. Garcia-Oliveira, G. F., Guimarães, A. C. D. S., Moreira, G. D., Costa, T. A., Arruda, M. S., de Mello, É. M., Silva, M. C., de Almeida, M. G., Hanley, K. A., Vasilakis, N., & Drumond, B. P. (2024). YELLOW ALERT: Persistent Yellow Fever Virus circulation among non-human primates in urban areas of Minas Gerais State, Brazil (2021–2023). *Viruses*, 16(1), 31. <https://doi.org/10.3390/v16010031>
 41. Gerrard, S. R., Li, L., Barrett, A. D., & Nichol, S. T. (2007). Ngari virus is a reassortant virus associated with hemorrhagic fever in Africa. *Journal of Virology*, 81(16), 8922–8926. <https://doi.org/10.1128/JVI.00109-07>

42. Gould, E. A., & Solomon, T. (2008). Pathogenic flaviviruses. *The Lancet*, 371(9611), 500–509. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60238-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60238-X)
43. Grubaugh, N. D., et al. (2019). Tracking virus outbreaks in real time with Nextstrain. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 10–18. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0008-9>
44. Gu, W., Miller, S., & Chiu, C. Y. (2019). Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14, 319–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751>
45. Gubler, D. J. (2011). Dengue, urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21st century. *Tropical Medicine and Health*, 39(4 Suppl), 3–11. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S05>
46. Guerrero, D., Cantaert, T., & Missé, D. (2020). *Aedes* mosquito salivary components and their effect on the immune response to arboviruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 407. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00407>
47. Hall-Mendelin, S., Allcock, R., Kresoje, N., van den Hurk, A. F., & Warrilow, D. (2013). Detection of arboviruses and other micro-organisms in experimentally infected mosquitoes using massively parallel sequencing. *PLOS ONE*, 8(2), e58026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058026>
48. Hatherell, H.-A., Colijn, C., Stagg, H. R., Jackson, C., Winter, J. R., & Abubakar, I. (2016). Interpreting whole genome sequencing for investigating tuberculosis transmission: A systematic review. *BMC Medicine*, 14, 21. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0566-x>
49. Heath, C. J., Grossi-Soyster, E. N., Ndenga, B. A., Mutuku, F. M., Sahoo, M. K., Ngugi, H. N., et al. (2020). Evidencia de transmisión transovárica de DNV y CHIKV en mosquitos capturados en campo en Kenia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(6), e0008362. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008362>
50. Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
51. Hubálek, Z., & Rudolf, I. (2012). Mosquito-borne viruses in Europe. *Microbes and Infection*, 14(6), 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.12.003>
52. Hughes, H. R., Adkins, S., Alkhovskiy, S., Beer, M., Blair, C. D., Calisher, C. H., Drebot, M., Lambert, A. J., de Souza, W. M., Marklewitz, M., Nunes, M. R. T., Shi, X., & ICTV Report Consortium. (2020). ICTV virus taxonomy profile: *Peribunyaviridae*. *Journal of General Virology*, 101(1), 1–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001365>
53. Hyun, J., Lee, S. K., Kim, J. H., Cho, E.-J., Kim, H.-S., Kim, J.-S., Song, W., & Kim, H. S. (2023). Variant analysis of the thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus in Korea: Frequency of acyclovir resistance mutations. *Viruses*, 15(8), 1709. <https://doi.org/10.3390/v15081709>
54. Ikegami, T., & Makino, S. (2011). The pathogenesis of Rift Valley fever. *Viruses*, 3(5), 493–519. <https://doi.org/10.3390/v3050493>
55. International Committee on Taxonomy of Viruses. (2019). *Family: Togaviridae*. ICTV. <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae>
56. International Committee on Taxonomy of Viruses. (2024). *Genus: Orthoflavivirus*. ICTV. <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus>

57. Johnston, C., Magaret, A., Roychoudhury, P., Greninger, A. L., Cheng, A., Diem, K., Fitzgibbon, M. P., Huang, M.-L., Selke, S., Lingappa, J. R., Celum, C., Jerome, K. R., Wald, A., & Koelle, D. M. (2017). Highly conserved intragenic HSV-2 sequences: Results from next-generation sequencing of HSV-2 UL and US regions from genital swabs collected from 3 continents. *Virology*, 510, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.06.031>
58. José, J., Snyder, J. E., & Kuhn, R. J. (2015). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology*, 10(9), 1553–1567. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.20>
59. Kalyanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
60. Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
61. Kingwara, L., Odeny, L., Onwonga, V., Madada, R., Mbeneka, M., Okonji, J., Mwende, V., Rombo, C., Akasa, S., Ndia, M., Ouma, F., Ayagah, I., Roba, A., & Kimenye, K. (2025). Assessment of a multiplex arbovirus PCR detection test in an area endemic for chikungunya, zika, and dengue viruses: An evaluation of kit performance characteristics in line with Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) Standards. *PLOS ONE*, 20(6), e0309626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309626>
62. Kolb, A. W., Ané, C., & Brandt, C. R. (2015). Genomic variation among global isolates of herpes simplex virus 2. *Journal of Virology*, 89(12), 6407–6419. <https://doi.org/10.1128/JVI.00443-15>
63. Kopp, A., Gillespie, T. R., Hobelsberger, D., Estrada, A., Harper, J. M., Miller, R. A., Eckerle, I., Müller, M. A., Podsiadlowski, L., Leendertz, F. H., & Drosten, C. (2013). Provenance and geographic spread of St. Louis encephalitis virus. *Journal of Virology*, 87(9), 4798–4804. <https://doi.org/10.1128/JVI.00002-13>
64. Kraemer, M. U. G., et al. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *eLife*, 4, e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
65. Kuno, G., & Chang, G.-J. J. (2005). Biological transmission of arboviruses: Re-examined and reassessed. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 5(2), 151–161. <https://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.151>
66. Kuraku, S., Zmasek, C. M., Nishimura, O., & Katoh, K. (2013). aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W22–W28. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt389>
67. Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
68. Larsson, A. (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
69. Leal, M. C., et al. (2024). Primera evidencia de detección del Usutu virus en América Latina. *Emerging Infectious Diseases*, 30(5), 1034–1037.
70. Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). popart: Full-feature software for haplotype network construction.

- Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12410>
71. Leland, D. S., & Ginocchio, C. C. (2007). Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 49–78. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-06>
 72. Lemey, P., et al. (2009). Phylogeography takes a relaxed random walk in space and time. *Molecular Biology and Evolution*, 27(8), 1877–1885. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp064>
 73. Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
 74. Lieveeld, A., van der Kuyl, A. C., Berkhout, B., & de Jong, M. D. (2017). Molecular diagnosis of herpes simplex virus infections: Comparison of the automated BD Max HSV 1/2 assay with a manual in-house real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, 248, 178–181. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.07.012>
 75. Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, 59, 23–61. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)59002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59002-7)
 76. Liu, X., Yan, R., Long, B., & Zhang, Y. (2017). A novel SYBR Green I-based real-time PCR for the detection of herpes simplex virus type 2. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(6), 5664–5670. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5255>
 77. López-Vélez, R., & Molina, R. (2022). Variabilidad clínica en arbovirosis humanas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 40(4), 207–215.
 78. Martínez-Romero, M. A., Corona-Gómez, J. A., & Luria-Pérez, R. (2019). Zika Surveillance in Mexico: Infected Mosquitoes and Human Cases. *Journal of Vector Borne Diseases*, 56(4), 312–318. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7006740/>
 79. Menzel, P., Ng, K. L., & Krogh, A. (2016). Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 7, 11257. <https://doi.org/10.1038/ncomms11257>
 80. Mertens, P. P. C., & Attoui, H. (2003). Orbiviruses and bluetongue virus. *eLS*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001010.pub2>
 81. Mosquito Alert. (2020, 25 de noviembre). *Enfermedades que transmiten*. <https://www.mosquitoalert.com/enfermedades-que-transmiten/>
 82. Moureau, G., Temmam, S., Gonzalez, J. P., Charrel, R. N., Grard, G., & de Lamballerie, X. (2007). A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(4), 467–477. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0206>
 83. Mourão, M. P. G., et al. (2012). Genotipos del virus Mayaro en Sudamérica. *Virus Research*, 169(2), 296–306. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.05.015>
 84. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1066>
 85. Nayfach, S., et al. (2021). CheckV assesses the quality and completeness of metagenome-assembled viral genomes. *Nature Biotechnology*, 39(5), 578–585. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-00774-7>
 86. Newman, R. M., Lamers, S. L., Weiner, B., Ray, S. C., Colgrove, R. C., Diaz, F., Jing, L., Wang, K., Saif, S., Young, S., Henn, M., Laeyendecker, O., Tobian, A. A. R., Cohen, J. I., Koelle, D. M., Quinn, T. C., & Knipe, D. M. (2015). Genome sequencing and analysis of geographically diverse clinical

- isolates of herpes simplex virus 2. *Journal of Virology*, 89(16), 8219–8232. <https://doi.org/10.1128/JVI.01303-15>
87. Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a web browser. *BMC Bioinformatics*, 12, 385. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>
 88. Organización Mundial de la Salud. (2022). *Vector-borne diseases*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
 89. Organización Panamericana de la Salud. (2019). *Mayaro fever*. <https://www.paho.org>
 90. Organización Panamericana de la Salud. (2021). *Zika: Data and analysis*. OPS/OMS. <https://www.paho.org/en/arbo-portal/zika-data-and-analysis>
 91. Organización Panamericana de la Salud. (2023). *Epidemiological alerts and updates*. <https://www.paho.org>
 92. Organización Panamericana de la Salud. (2024). *Dengue cases*. <https://www.paho.org>
 93. Organización Panamericana de la Salud. (2025, 11 de febrero). *Epidemiological update: Oropouche in the Americas Region – 11 February 2025*. OPS/OMS. <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-oropouche-americas-region-11-february-2025>
 94. Organización Panamericana de la Salud. (2025, 31 de mayo). *Epidemiological alert: Yellow fever in the Americas Region – 31 May 2025*. OPS/OMS. <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-alert-yellow-fever-americas-region-31-may-2025>
 95. Organización Panamericana de la Salud. (2025, 13 de agosto). *Epidemiological update: Oropouche in the Region of the Americas – 13 August 2025*. OPS/OMS. <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-oropouche-region-americas-13-august-2025>
 96. Patel, P., Landt, O., Kaiser, M., Faye, O., Koppe, T., Lass, U., Sall, A. A., & Niedrig, M. (2013). Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virology Journal*, 10, 58. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-58>
 97. Peinado, R. dos S., Eberle, R. J., Arni, R. K., & Coronado, M. A. (2022). A review of omics studies on arboviruses: Alphavirus, Orthobunyavirus and Phlebovirus. *Viruses*, 14(10), 2194. <https://doi.org/10.3390/v14102194>
 98. Pessoa, R., et al. (2016). PCR multiplex para detección de arbovirus. *Journal of Clinical Virology*, 78, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.02.013>
 99. Petersen, L. R., Foley, D. H., & Powers, A. M. (2013). Taking a bite out of the arbovirus threat. *Current Opinion in Virology*, 3(3), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.05.008>
 100. Petersen, L. R., et al. (2016). Risk of Rift Valley fever virus infection among livestock and humans. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), 907–910. <https://doi.org/10.3201/eid2205.150787>
 101. Pollett, S., Melendrez, M. C., Maljkovic Berry, I., Duchêne, S., Salje, H., Cummings, D. A. T., & Jarman, R. G. (2018). Understanding dengue virus evolution to support epidemic surveillance and counter-measure development. *Infection, Genetics and Evolution*, 62, 279–295. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.032>
 102. Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W., Strauss, J. H., & Weaver, S. C.

- (2001). Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *Journal of Virology*, 75(21), 10118–10131. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.21.10118-10131.2001>
103. R Core Team. (2023). *R: A language and environment for statistical computing* (Version 4.3.2) [Computer software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
104. Ribeiro, J. M. C., Martin-Martin, I., Arcà, B., & Calvo, E. (2016). A deep insight into the sialome of male and female *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLOS ONE*, 11(3), e0151400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151400>
105. Rocklöv, J., & Dubrow, R. (2020). Climate change: A major threat to global health. *New England Journal of Medicine*, 382(13), 1268–1270. <https://doi.org/10.1056/NEJMp2005200>
106. Salazar, M. I., Richardson, J. H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E., & Beaty, B. J. (2007). Dengue virus type 2: Replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*, 7, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-9>
107. Schneider, B. S., & Higgs, S. (2008). The enhancement of arbovirus transmission by mosquito saliva. *Future Microbiology*, 3(5), 663–672. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.5.663>
108. Smith, D. W., et al. (2021). Pan-Alphavirus environmental detection assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(1), e01422-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01422-20>
109. Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*, 58(3), 491–562. <https://doi.org/10.1128/MR.58.3.491-562.1994>
110. Swiss Institute of Bioinformatics. (s. f.). *Orbivirus*. ViralZone. https://viralzone.expasy.org/106?outline=all_by_species
111. Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. En *Lectures on mathematics in the life sciences* (Vol. 17, pp. 57–86).
112. Thangamani, S., Huang, J., Hart, C. E., Guzman, H., & Tesh, R. B. (2016). Vertical transmission of virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(5), 1169–1173. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0418>
113. To, T.-H., Jung, M., Lycett, S., & Gascuel, O. (2016). Fast dating using least-squares criteria and algorithms. *Systematic Biology*, 65(1), 82–97. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syv068>
114. Torres, J. R., et al. (2020). First reported human case of Mayaro virus in Colombia. *Emerging Infectious Diseases*, 26(9), 2306–2309. <https://doi.org/10.3201/eid2609.191711>
115. Turell, M. J., O'Guinn, M. L., Dohm, D. J., & Jones, J. W. (2001). Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *Journal of Medical Entomology*, 38(2), 130–134. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.2.130>
116. Turell, M. J., O'Guinn, M. L., Dohm, D. J., Webb, J. P., Jr., & Sardelis, M. R. (2002). Vector competence of *Culex tarsalis* from Orange County, California, for West Nile virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2(3), 193–196. <https://doi.org/10.1089/15303660260464600>
117. Vasconcelos, P. F. C., et al. (2001). Yellow fever outbreak in Manicoré, Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(5), 711–714. <https://doi.org/10.1086/318953>
118. Vilibić-Čavlek, T., Stevanović, V., Križanović, S., Barbarić, A., Capak, K., Pem-Novosel, I., Cvetko Krajinović, L., & Savini, G. (2025). Re-emergence of Usutu virus and spreading of West Nile virus neuroinvasive infections during the 2024 transmission season in Croatia. *Viruses*, 17(6), 846.

<https://doi.org/10.3390/v17060846>

119. Vina-Rodriguez, A., Sachse, K., Ziegler, U., Chaintoutis, S. C., Keller, M., Groschup, M. H., & Eiden, M. (2017). A novel pan-Flavivirus detection and identification assay based on RT-qPCR and microarray. *BioMed Research International*, 2017, 4248756. <https://doi.org/10.1155/2017/4248756>
120. Waggoner, J. J., Gresh, L., Mohamed-Hadley, A., Ballesteros, G., Davila, M. J. V., Tellez, Y., Sahoo, M. K., Balmaseda, A., Harris, E., & Pinsky, B. A. (2016). Single-reaction multiplex reverse transcription PCR for detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1295–1297. <https://doi.org/10.3201/eid2207.160326>
121. Walker, P. J., Blasdel, K. R., Calisher, C. H., Dietzgen, R. G., Kondo, H., Kurath, G., Longdon, B., Stone, D. M., Tesh, R. B., Tordo, N., Vasilakis, N., Whitfield, A. E., & ICTV Report Consortium. (2018). ICTV virus taxonomy profile: *Rhabdoviridae*. *Journal of General Virology*, 99(4), 447–448. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001020>
122. Walker, T. M., Ip, C. L. C., Harrell, R. H., Evans, J. T., Kapatai, G., Dedicoat, M. J., Eyre, D. W., Wilson, D. J., Hawkey, P. M., Crook, D. W., Parkhill, J., Harris, D., Walker, A. S., Bowden, R., Monk, P., Smith, E. G., & Peto, T. E. A. (2013). Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: A retrospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(2), 137–146. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70277-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70277-3)
123. Weaver, S. C., & Barrett, A. D. T. (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 789–801. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1006>
124. Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20, 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
125. World Health Organization. (1967). *Arboviruses and human disease: Report of a WHO scientific group*. World Health Organization.
126. Wu, P., Yu, X., Wang, P., & Cheng, G. (2019). Arbovirus lifecycle in mosquito: Acquisition, propagation and transmission. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 21, e1. <https://doi.org/10.1017/erm.2018.6>
127. Xu, G., et al. (2007). Ambisense genome organization of phlebovirus S segment. *Journal of General Virology*, 88(6), 1601–1612. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82863-0>
128. Xu, G., et al. (2022). Multiplex RT-PCR for arbovirus detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 60(2), e01522-21. <https://doi.org/10.1128/JCM.01522-21>
129. Yap, G., Mailepessov, D., Lim, X. F., Chan, S., How, C. B., Humaidi, M. B., Yeo, G., Chong, C. S., Lam-Phua, S. G., Lee, R., Okumura, C., & Vythilingam, I. (2020). Detection of Japanese encephalitis virus in *Culex* mosquitoes in Singapore. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(3), 1234–1240. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0377>
130. Yu, G., et al. (2017). ggtree: An R package for visualization and annotation of phylogenetic trees. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(1), 28–36. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12628>
131. Zhang, Y.-Z., et al. (2024). Oropouche virus: A neglected global arboviral threat. *Virus Research*, 341, 199318. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2024.199318>

12. Anexos.

Anexo I. Script de Fasta a phylip para PopArt.

```
import os

genes = ["UL30", "UL27", "UL23", "US6", "US4"]

def read_fasta(file):
    seqs = []
    with open(file) as f:
        header = None
        seq = []
        for line in f:
            line = line.strip()
            if line.startswith(">"):
                if header:
                    seqs.append((header, "".join(seq)))
                header = line[1:]
                seq = []
            else:
                seq.append(line)
                if header:
                    seqs.append((header, "".join(seq)))
        return seqs

def get_country(header):
    parts = header.split("|")
    if len(parts) >= 2:
        return parts[1][:3].upper()
    return "UNK"

for gene in genes:
    fasta_file = f"HSV2v3{gene}.fasta"

    if not os.path.exists(fasta_file):
        print(f"[ERROR] No existe {fasta_file}")
        continue

    phylip_file = f"{gene}.phy"
    map_file = f"{gene}_id_map.tsv"

    records = read_fasta(fasta_file)

    short_ids = {}
    mapping = []

    for header, seq in records:
```

```

base_id = header[:6].replace("|", "").replace(">", "")
country = get_country(header)
short_id = f"{base_id}_{country}"

short_ids[header] = short_id
mapping.append((short_id, header))

with open(phylip_file, "w") as out:
    out.write(f"{len(records)} {len(records[0][1])}\n")
    for header, seq in records:
        sid = short_ids[header]
        out.write(f"{sid:<10} {seq}\n")

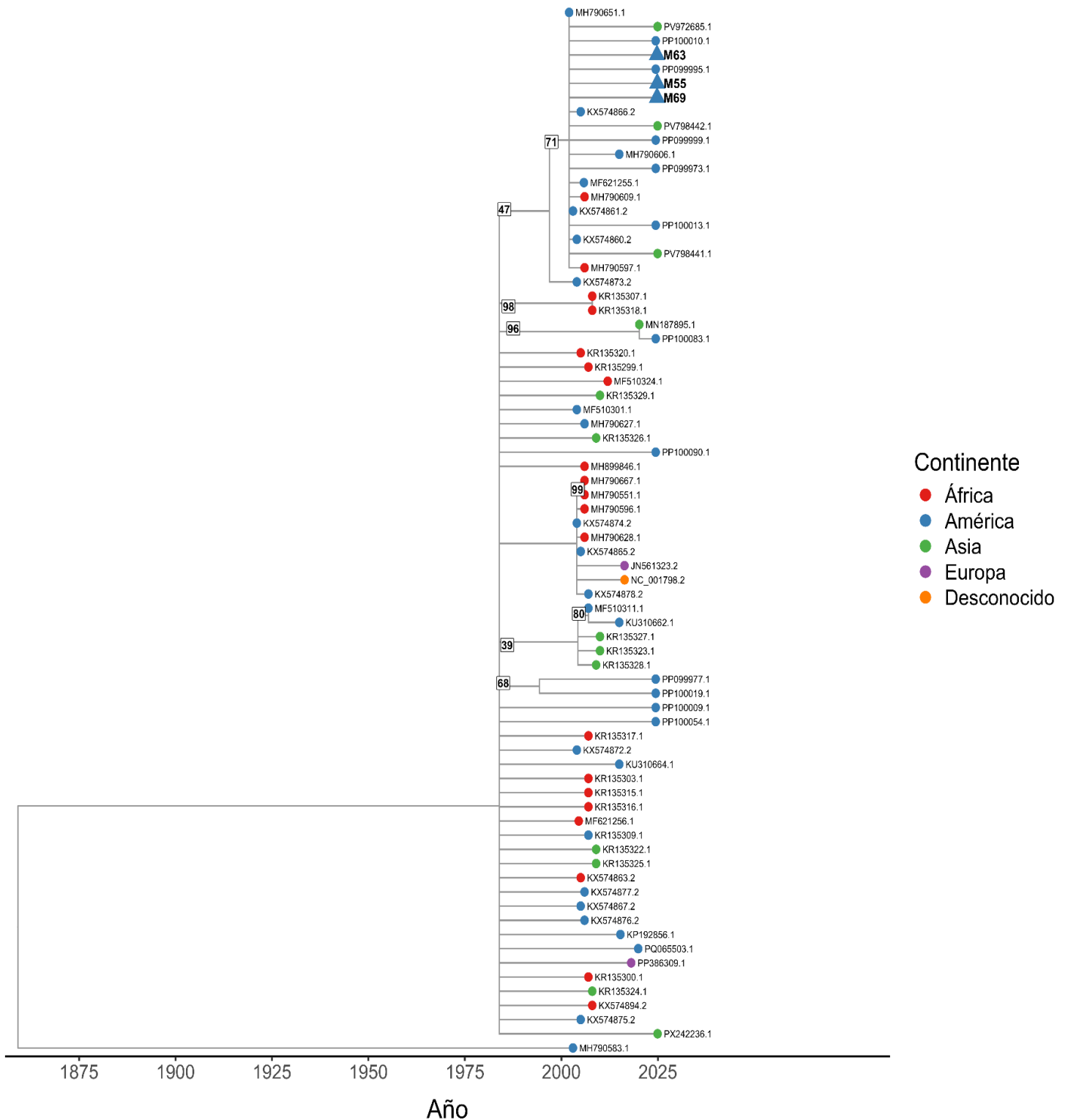
with open(map_file, "w") as out:
    out.write("short_id\toriginal_header\n")
    for sid, header in mapping:
        out.write(f"{sid}\t{header}\n")

print(f"[OK] {gene}")

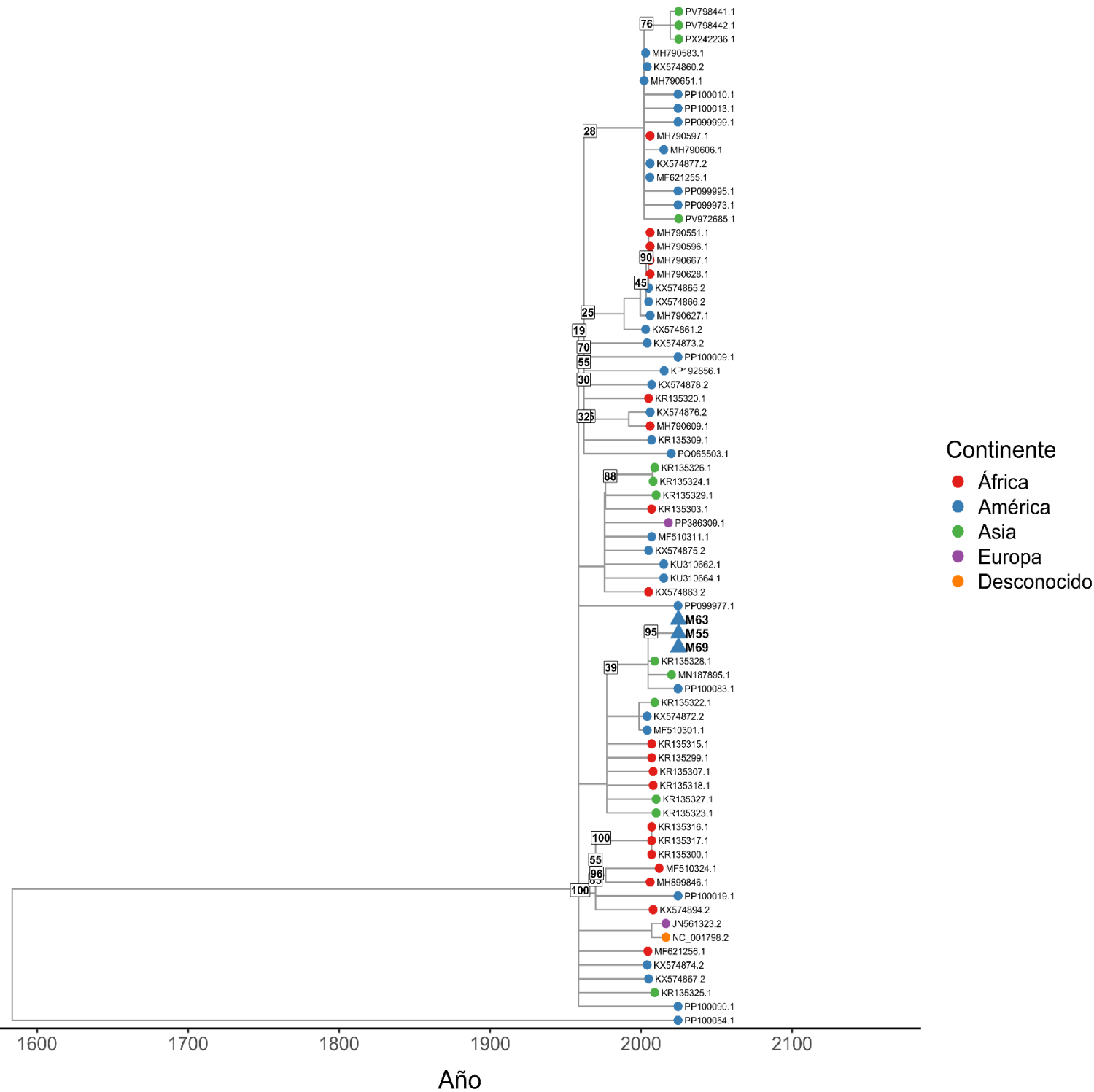
```

Anexo II. Árboles de Máxima Verosimilitud de los genes pertenecientes a HSV-2.

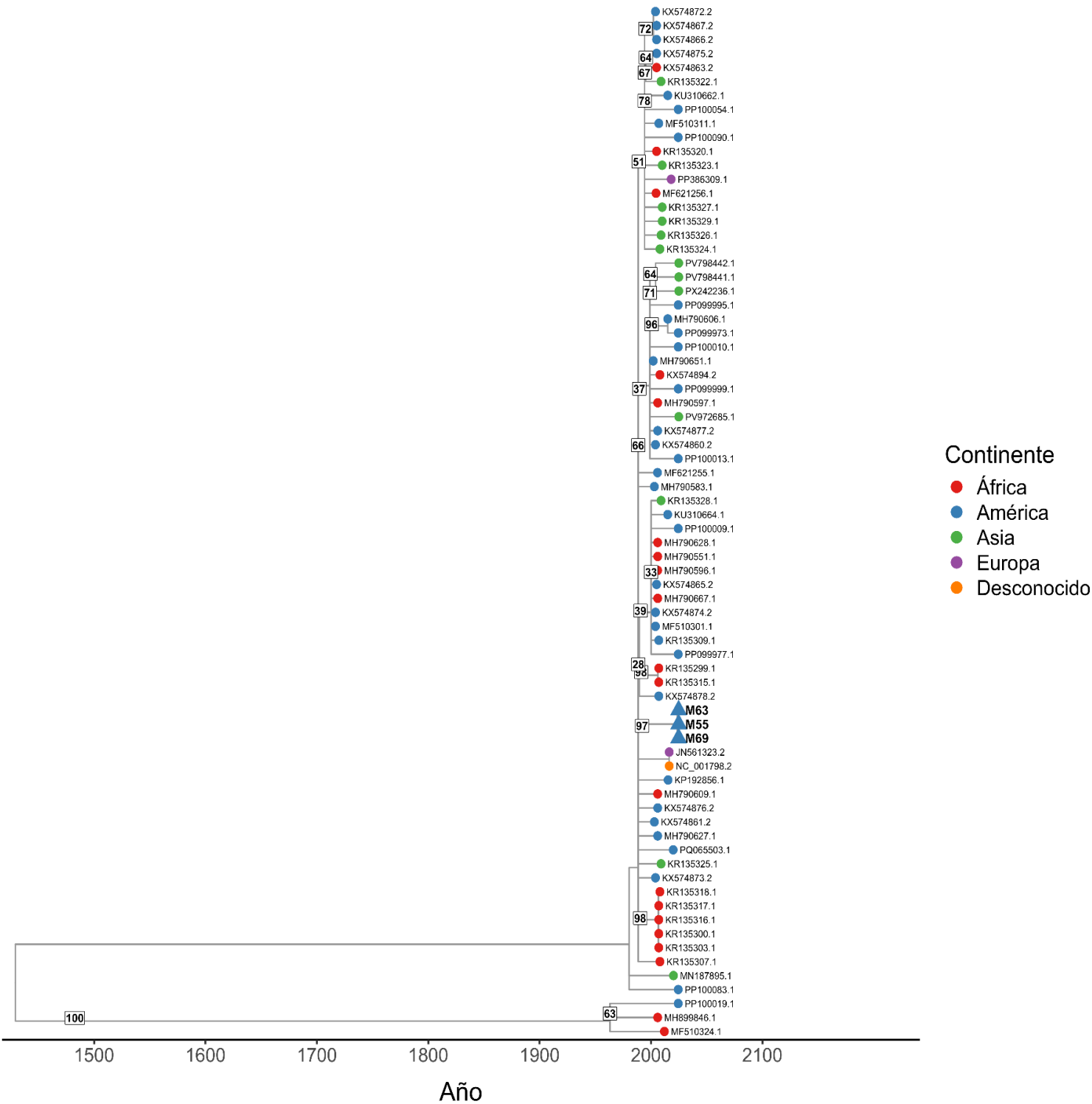
Árbol fechado UL23 - HSV-2



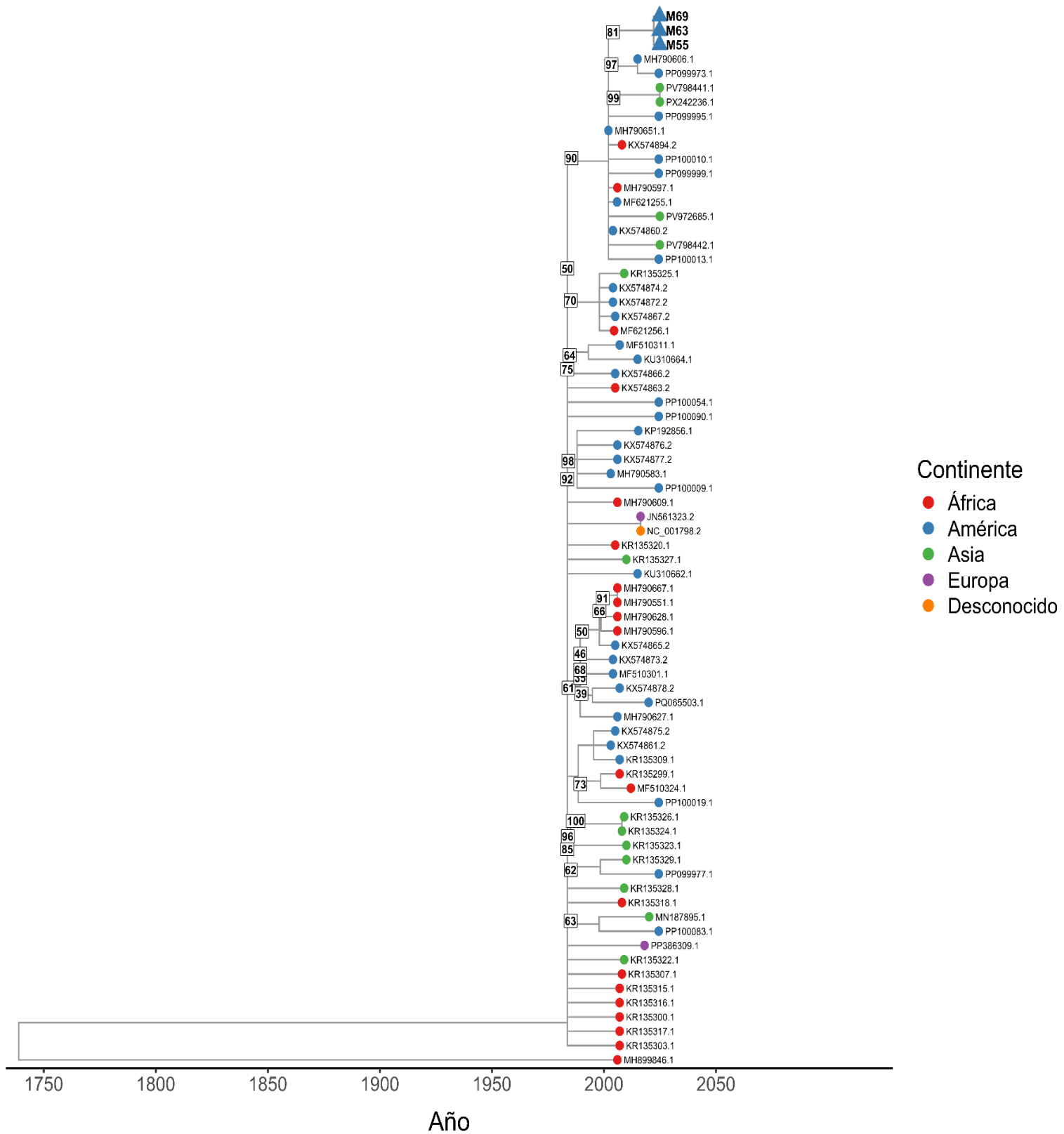
Árbol fechado UL27 - HSV-2



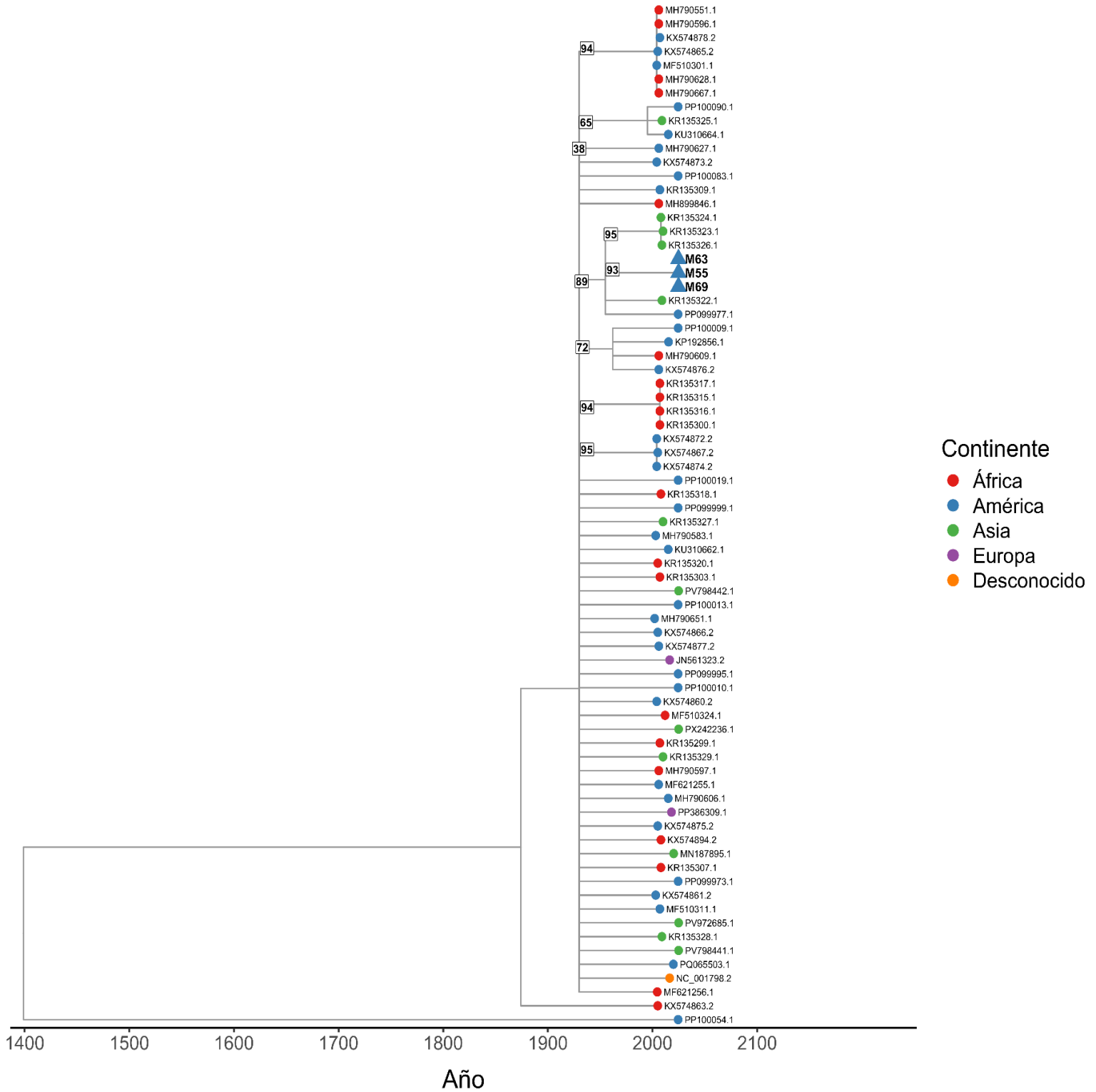
Árbol fechado UL30 - HSV-2



Árbol fechado US4 - HSV-2



Árbol fechado US6 - HSV-2



Anexo III Red de haplotipos de DENV-3.

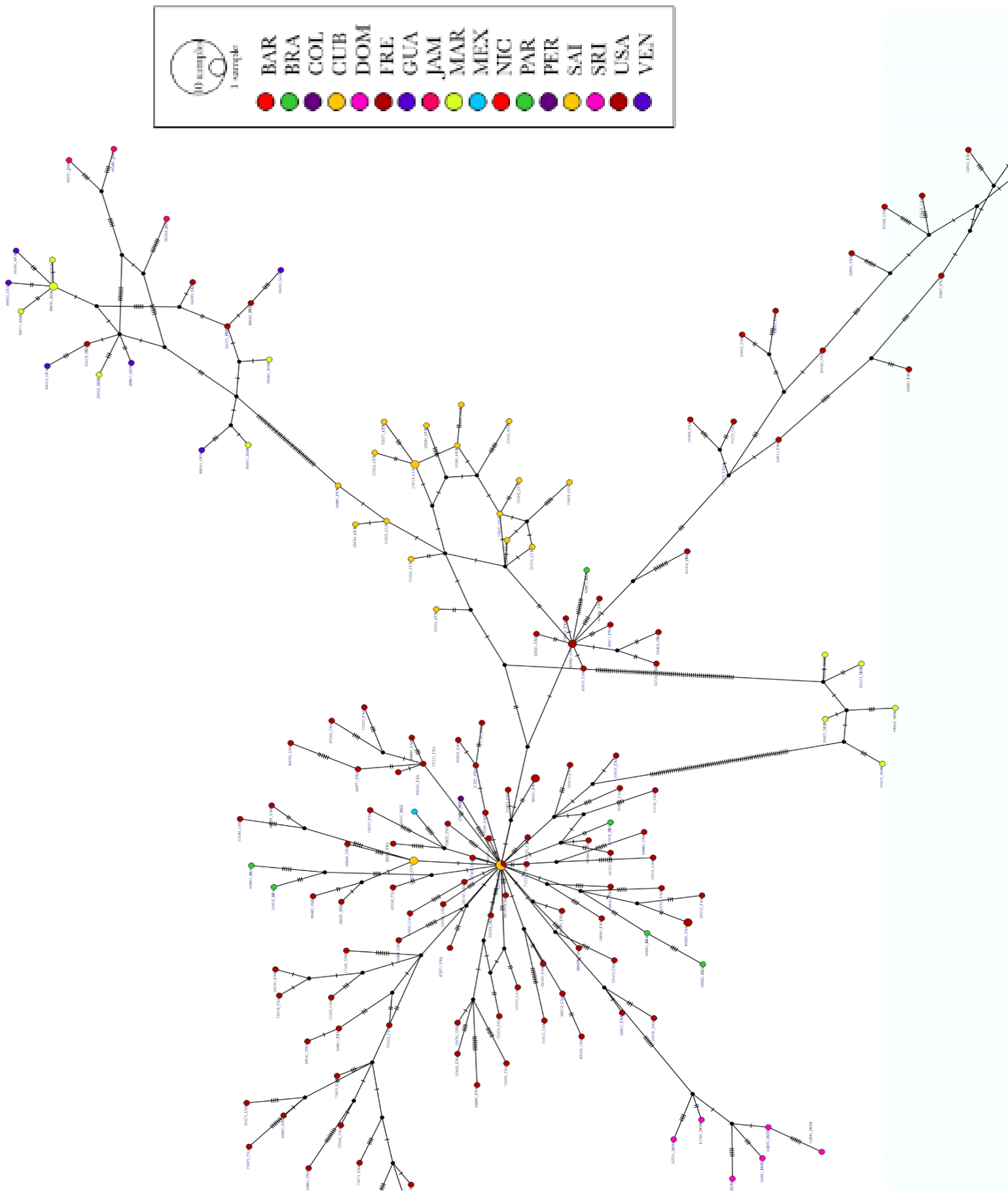


Tabla Suplementaria S1. Resultados de BLAST para los contigs $\geq 5,000$ nt obtenidos del ensamblaje *de novo* tras la depleción de secuencias derivadas del hospedero.

Muestra	Longitud del contig (nt)	Accesión	Organismo	% identidad	Query coverage (%)	E-value
55vp3	61,584	OP484858.1	Sinorhizobium phage NV1.1.1	80.031	1.04	1.41e-128
55vp3	53,558	KX574860.2	Human alphaherpesvirus 2	99.763	100.00	0.0
55vp3	39,803	BK049444.1	Siphoviridae sp.	99.798	80.93	0.0
55vp3	33,903	MH790602.1	Human alphaherpesvirus 2	99.785	100.00	0.0
63vp3	61,587	OP484858.1	Sinorhizobium phage NV1.1.1	80.031	1.04	1.41e-128
63vp3	53,557	KX574860.2	Human alphaherpesvirus 2	99.763	100.00	0.0
63vp3	45,864	KY922723.1	Human alphaherpesvirus 2	99.792	98.70	0.0
63vp3	14,328	MH790575.1	Human alphaherpesvirus 2	99.763	100.00	0.0
63vp3	9,146	MK105996.1	Human alphaherpesvirus 2	99.902	100.00	0.0
63vp3	8,680	LS480640.1	Human alphaherpesvirus 2	97.793	96.38	0.0
69vp3	61,866	OP484858.1	Sinorhizobium phage NV1.1.1	80.031	1.04	1.41e-128

69vp3	53,557	KX574860.2	Human alphaherpesvirus 2	99.763	100.00	0.0
69vp3	33,880	MH790597.1	Human alphaherpesvirus 2	99.793	99.89	0.0
69vp3	14,328	MH790575.1	Human alphaherpesvirus 2	99.763	100.00	0.0
69vp3	11,919	OM370995.1	Human alphaherpesvirus 2	99.857	99.77	0.0
97o	61,636	MN988502.1	Rhizobium phage RHph_Y3_56_1	81	10.70	0.0
97o	12,260	BK041479.1	Caudoviricetes sp.	76	13.26	5e-147
97o	10,702	OQ132878.1	dengue virus type 3	99	98.72	0.0
97o	7,607	BK019402.1	Caudoviricetes sp.	53	21.69	1e-158
97o	5,296	BK049444.1	Caudoviricetes sp.	99	48.70	0.0
97P1v	10,697	OQ132878.1	dengue virus type 3	99	98.70	0.0