Universidad el Bosque
Programa de Biología
Trabajo de Grado II

Tesis: Implementación del protocolo del ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa (RT-LAMP) para la detección de los arbovirus Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV) en muestras biológicas

Informe de Avances

Ana María Carreño Pineda
Director: PhD. Eliana Patricia Calvo Tapiero
2022-1

A lo largo del semestre académico se han desarrollado las siguientes actividades

1. Se han realizado reuniones presenciales con el docente director del proyecto de investigación con el fin de monitorear los resultados obtenidos cada mes.
2. Extracción de RNA viral de muestras de pacientes de banco de sangre y mosquitos.
3. Determinación de las curvas control de DENV,ZIKV y CHIKV por medio de RT-qPCR.
4. Se realizó el protocolo LAMP primeramente con controles de los 4 serotipos de DENV, CHIKV y ZIKV.
5. Detección de DENV,CHIK y ZIKV por medio de RT-qPCR.
6. Detección de DENV,CHIK y ZIKV por medio de Nested PCR.

UNIVERSIDAD
EL BOSQUE
INSTITUTO DE VIROLOGIA

Bogotá, 8 de Abril 2022

Señores

Grupo de Investigación en Biología
Programa de Biología
Universidad El Bosque

Estimados señores, reciban un cordial saludo.

Por este medio, pretendo informar que como directora de tesis del proyecto titulado "Implementación del protocolo del ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa (RT-LAMP) para la detección de los arbovirus Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV) en muestras biológicas", que actualmente está siendo desempeñado por la estudiante ANA MARIA CARREÑO PINEDA con C.C 1000718013, le comunico la nota del desempeño de la estudiante durante este primer periodo entre febrero y abril correspondiente a trabajo de grado II.

Por su desempeño y el desarrollo en el proyecto, la nota correspondiente es de 4.5

Cordialmente,

Eliana Calvo

Eliana Patricia Calvo Tapiero
Investigadora Principal
Grupo de virologia
Universidad El Bosque

Introducción

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

RT-LAMP
(RT- acoplado a Amplificación isotérmica mediada por bucle)

Transcriptasa reversa
ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra *Bst (Bacillus stearothermophilus)*
Colorante sensible al pH como el rojo fenol
Fluorescencia
Turbidez

- Especificidad : Emplea de 4 a 6 primers
- No requiere un método de análisis post amplificación
- Fácil visualización del resultado final
- Reacción isotérmica un bloque o baño serologico (Bajo costo de equipamiento)
- Tiempo incubación corto 30-60 min (tiempo de entrega de resultados más rápido)
- Produce un elevado número de copias en poco tiempo

(Calvert et al. 2017)

UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA

Campus **Santa Marta**

Certificado de Ponencia

El Comité Organizador del **X Simposio Colombiano & VI Congreso Latinoamericano de Virología,** certifica que:

Ana María Carreño

Participó en calidad de **PONENTE** en modalidad **oral**, del trabajo titulado:

Implementación de un protocolo de RT-LAMP para detección de los virus dengue y chikungunya en muestras biológicas

Ana María Carreño*, Eliana Patricia Calvo, Jaime Eduardo Castellanos

El evento se llevó a cabo en la ciudad de Santa Marta, entre el 29 de noviembre y 1 de diciembre de 2023.

Salín Ramón Touchie Meza
Decano, Facultad de Medicina
Universidad Cooperativa de Colombia

José Aldemar Usme Ciro
Comité Organizador
Simposio ACV 2023

Jaime Eduardo Castellanos Parra
Presidente, 2021-2023
Asociación Colombiana de Virología

X Simposio Colombiano & VI Congreso Latinoamericano de Virología

Instituto Nacional de Salud · Alianza Bioversity & CIAT · Asociación Colombiana de Virología

UNIVERSIDAD
EL BOSQUE

EN ATENCIÓN A QUE:

ANA MARIA CARREÑO PINEDA

CÉDULA DE CIUDADANÍA No. 1.000.718.013 EXPEDIDA EN BOGOTA D.C

CUMPLIÓ CON LOS REQUISITOS LEGALES Y ACADÉMICOS EXIGIDOS POR LA INSTITUCIÓN,
LE CONFIERE EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

DADO EN BOGOTÁ D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA, EL DÍA 28 DE JUNIO DE 2023

RECTORA

PRESIDENTE DEL CONSEJO DIRECTIVO

DECANO

SECRETARIA GENERAL

Personería Jurídica Resolución No. 11153 del 4 de agosto de 1978 expedida por el Ministerio de Educación Nacional.

33743

Registro 33834 Folio 2056 Vigilada Mineducación

IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA Y ZIKA POR RT-LAMP EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Carreño Pineda Ana María

Director

Eliana Patricia Calvo Tapiero Ph.D.

Grupo de Virología

Vicerrectoría de investigaciones

Facultad de Ciencias

Programa de Biología

Bogotá D.C.

2023

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por darme confianza, paciencia e inspiración para la realización del proyecto.

A mi familia por confiar en mí, acompañarme y darme amor e inspiración en todo el proceso. Especialmente a mi madre, a mi padre Álvaro Gámez y a mis hermanos por ser vitalmente mi fuente de inspiración, amor y confianza en momentos complicados durante todo el proceso de la carrera.

A mi directora Eliana Calvo por la confianza, acompañamiento, enseñanza y sobre todo paciencia para la realización del proyecto.Por todo el crecimiento académico y personal que realizó en mí y por todo el cariño y respeto que tuvo hacia mí, comportándose como una segunda madre.

A Alison Aguirre por todo el apoyo y acompañamiento para la realización total del proyecto y durante toda la carrera, por brindarme inspiración, risas, crecimiento personal y sobre todo confianza demostrando que existen personas maravillosas con las que puedo contar.

A Lady, Sebastian, Alejandro por el asesoramiento y ayuda con el desarrollo del trabajo, gracias por la confianza, las risas y los buenos momentos.

RESUMEN

Los arbovirus dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y zika (ZIKV) son virus transmitidos por artrópodos que comparten un vector común, el mosquito *Aedes aegypti.* Estos tienen la características de causar síntomas similares e inespecíficos, sin embargo, los desenlaces y el manejo clínico de estas enfermedades son diferentes, por lo que es necesaria la identificación temprana y precisa del virus. Para ello se han desarrollo diferentes ensayos basados en la transcripción reversa (RT) acoplada a la amplificación en cadena de la polimerasa tanto de punto final como en tiempo real, aunque estas pruebas son sensibles y específicas presentan desventajas en cuanto al tiempo necesario para la detección y el alto costo debido a los insumos y equipos requeridos. En este estudio se evaluó el desempeño de un ensayo RT-LAMP para la detección de los virus dengue, chikungunya y zika en muestras biológicas, dado que el LAMP es un método de fácil implementación, tiempo de respuesta más rápido y más económico que los métodos moleculares. Para ello se diseñó un conjunto de primers para cada uno de los serotipos de DENV y para dos genes de CHIKV, se determinó la sensibilidad analítica de cada ensayo así como la sensibilidad y especificidad clinica en muestras biológicas. Los resultados obtenidos demostraron que RT-LAMP permite la detección de los genes E y C para CHIKV y tres serotipos de DENV en una misma reacción, presentando una sensibilidad analítica similar a la RT-PCR nested y RT-qPCR. De igual manera se demostró que RT-LAMP combinada con la electroforesis horizontal, presenta una sensibilidad y especificidad superior al 80% por lo cual podría ser una prueba diagnóstica para arbovirus, en pacientes con sospecha de infección.

Palabras clave: DENV, CHIKV, ZIKV, RT-LAMP, detección.

ABSTRACT

Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) arboviruses are arthropod-borne viruses that share a common vector, the Aedes aegypti mosquito. They share the characteristic of causing similar and non-specific symptoms, but the outcome and clinical management of these diseases are different, so early and accurate identification of the virus is necessary. Although these tests are sensitive and specific, they have disadvantages in terms of the time required for detection and the high cost of consumables and equipment. This study evaluated the performance of an RT-LAMP assay for the detection of dengue, chikungunya and zika viruses in biological samples, given that LAMP is a method that is easy to implement, has a faster turnaround time and is less expensive than molecular methods. A set of primers was designed for each of the DENV serotypes and for two CHIKV genes, and the analytical sensitivity of each assay was determined, as well as the sensitivity and clinical specificity in biological samples. The results obtained showed that RT-LAMP allows the detection of the E and C genes for CHIKV and three serotypes of DENV in the same reaction, with an analytical sensitivity similar to that of nested RT-PCR and RT-qPCR. Similarly, RT-LAMP combined with horizontal electrophoresis was shown to have a sensitivity and specificity of over 80%, providing analytical sensitivity similar to nested RT-PCR and RT-qPCR.

It was also shown that RT-LAMP combined with horizontal electrophoresis has a sensitivity and specificity of more than 80% and could therefore be a diagnostic test for arboviruses in patients with suspected infection.

Key words: Arboviruses, DENV, CHIKV, ZIKV, RT-LAMP, detection.

TABLA DE CONTENIDO

1. 9

2. 10

2.1 10

2.2 13

2.3 16

3. 21

4. 22

5. 22

6. **¡Error! Marcador no definido.**

6.1 23

6.2 23

6.3 24

6.4 24

6.4.1 Extracción de ARN Viral a partir de muestras líquidas (Cosechas y sueros humanos) 24

6.4.2 Detección de CHIKV, DENV y ZIKV por RT-LAMP 25

6.4.3 Detección de CHIKV, DENV y ZIKV por RT-PCR anidada 28

6.4.4 31

7. Resultados ***30***

7.1 Evaluar un conjunto de primers reportados previamente para la detección de dengue, chikungunya y zika por RT-LAMP. 30

7.1.1 Detección de DENV con oligos Pan-Dengue 31

7.2. Implementar un ensayo de RT-LAMP para cada uno de los cuatro serotipos de virus dengue y para dos blancos de detección de CHIKV 36

7.3. Evaluar la sensibilidad analítica del ensayo RT-LAMP en formato multiplex en comparación con otros métodos de detección molecular estandarizados previamente en el laboratorio 40

7.4 Evaluar la utilidad del ensayo de RT-LAMP para detectar virus dengue y chikungunya en muestras biológicas 44

8. 50

9. Conclusiones ***49***

10. 55

11. **¡Error! Marcador no definido.**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Casos notificados en Colombia en el periodo 2014-2023 18

Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de LAMP 22

Figura 4. Detección del genoma viral mediante RT-LAMP 23

Figura 5. Representación del ensayo RT-LAMP 29

Figura 6. Detección de DENV en RNA proveniente de cosechas virales por RT-LAMP 35

Figura 7. Detección de DENV 36

Figura 8. Detección de CHIKV y ZIKV en RNA proveniente de cosechas virales por RT-LAMP 37

Figura 9. Detección de CHIKV 38

Figura 10. Detección de ZIKV 39

Figura 11. Representación esquemática de la localización de los primers diseñados en este estudio para la detección de cada uno de los serotipos de DENV. 40

Figura 12. Detección de DENV en RNA proveniente de cosechas virales por RT-LAMP 41

Figura 13. Detección de CHIKV por RT-LAMP. 42

Figura 14. Detección de DENV por RT-LAMP en formato multiplex.. 44

Figura 15. Detección de CHIKV por RT-LAMP en formato multiplex 45

Figura 16 . Detección de los cuatro serotipos de DENV por diferentes métodos…….46

Figura 17. Detección de CHIKV por diferentes métodos 46

Figura 18. Detección de muestras biológicas por RT-LAMP.. 47

Figura 19. Detección de muestras asintomáticas positivas para DENV por diferentes métodos especifico para serotipo.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas diagnósticas y su principio. 18

Tabla 2. Conjuntos de oligonucleótidos para detección de CHIKV por RT-LAMP 27

Tabla 3. Conjunto de oligonucleótidos para detección de DENV por RT-LAMP 28

Tabla 4. Conjunto de oligonucleótidos para detección de ZIKV por RT-LAMP 29

Tabla 5. Conjunto de oligonucleótidos externos e internos usados en la detección de DENV, CHIKV Y ZIKV mediante RT-PCR semi anidada. 30

Tabla 6. Conjunto de oligonucleótidos y sondas para detección de DENV, CHIKV, y ZIKV por RT-qPCR 31

Tabla 7. Consolidado de la detección de DENV y CHIKV mediante distintas pruebas moleculares 46

Tabla 8. Desempeño del ensayo RT-LAMP para los virus dengue y chikungunya. 46

1. Introducción

Las infecciones causadas por los virus dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) y zika (ZIKV) son transmitidas por el mismo vector, mosquitos del género *Aedes* especies *aegypti y albopictus*, principalmente (Beltrán-Silva et al., 2018). Causan síntomas similares e inespecíficos como fiebre, rash, artralgias, mialgias y cefalea (Alvis-Guzmán et al., 2017). El dengue es el más frecuente y peligroso de estos tres arbovirus (Ramos-Castañeda et al., 2017). Tanto dengue como zika son endémicos de zonas tropicales y subtropicales que afecta a más de 100 países de África, América y Asia; para el caso de dengue causa cerca de 390 millones de nuevas infecciones por año, de las cuales el 75% son asintomáticas (Alvis-Guzmán et al., 2017; Bhatt et al., 2013). Para el año 2022 la tasa de letalidad por dengue en Latino América fue de 0,038 %, mientras que para el acumulado de las semanas 52 en Colombia alcanzó el 0,22 %, casi seis veces más (Instituto Nacional de Salud, 2022).

La infección por CHIKV genera fuerte dolor en las articulaciones durante la fase aguda, dolor que puede persistir durante meses o años y causar síntomas reumáticos persistentes (Rico-Mendoza et al., 2019). Es importante resaltar que el porcentaje de infecciones asintomáticas están entre el 3% y el 28% (Maldonado et al., 2015). Los síntomas de la infección por zika son autolimitados y la mayoría de los pacientes son asintomáticos (Mayer et al., 2017). A pesar de su baja morbilidad, su asociación con casos de microcefalia, síndrome de Guillain-Barré y otras manifestaciones de tipo neurológico preocupa a las autoridades sanitarias de los países con transmisión activa (Beltrán-Silva et al., 2018).

Para la detección de estos tres virus se han desarrollado métodos tanto serológicos como la ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), usado para detectar anticuerpos en la sangre y virológicos

como el aislamiento viral (Alera et al., 2015) y la detección de genoma por métodos moleculares como la transcripción reversa seguida de amplificación en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Calvo et al., 2016). Sin embargo, cada uno de estos métodos presenta desventajas tales como baja sensibilidad (ELISA), alta complejidad y tiempo prolongado (aislamiento viral), o costos elevados (RT-PCR) (Waggoner & Pinsky, 2016). Además de requerir condiciones especiales de laboratorio, dificultando su utilidad en la mayoría de las regiones donde hay circulación de los mosquitos y transmisión de los virus. Por tanto, es necesario la búsqueda de otras alternativas de diagnóstico que permitan su aplicación en centros de salud o laboratorios clínicos de menor complejidad (en el punto de atención), para ampliar la cobertura del diagnóstico y que permitan discriminar de manera rápida, sencilla y precisa el agente causal de la enfermedad.

El presente trabajo plantea implementar un método de amplificación isotérmica RT (Reverse Transcription)- LAMP (loop-mediated isothermal amplification / amplificación isotérmica mediada por un bucle) de para la detección de cada uno de los tres arbovirus y probar su utilidad en muestras biológicas.

2. Marco de referencia

2.1 Los virus chikunguya, dengue y zika

Los arbovirus son virus transmitidos por artrópodos, que se infectan cuando se alimentan de sangre de un vertebrado infectado, el artrópodo al picar nuevamente a un individuo sano le transmite el virus y propaga la enfermedad (García-Sastre & Endy, 2009). Este término agrupa varias familias de virus como: Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae y Reoviridae (Davis et al., 2008), que a su vez se clasifican según sus características morfológicas y biológicas en géneros (Negroni & Gonzales, 2017). Dentro de estos podemos encontrar virus como chikungunya (CHIKV), dengue

(DENV) y zika (ZIKV), estos tres virus son transmitidos a los seres humanos por la picadura de mosquitos del género Aedes (*Ae. Aegypti y Ae. Albopictus*) (dos Reis et al., 2019). Cada uno de estos virus posee características distintivas en la estructura del virión y en la patogénesis que desarrolla un individuo al momento de infectarse con uno o más de los tres virus (Calvo et al., 2016; Negroni & Gonzales, 2017). Estos representan una de las preocupaciones de salud pública más importantes en áreas tropicales y subtropicales del mundo y son actualmente los arbovirus más prevalentes en las Américas.

La fiebre del chikungunya fue descrita por primera vez en Tanzania, su nombre deriva de la palabra en lengua makonde traducida como "encorvado, doblado" (Her et al., 2009). Pertenece a la familia Togaviridae, género *Alphavirus* (Organización Panamericana de la Salud, 2011). Su genoma es un ARN de cadena sencilla de sentido positivo de 11.8 kb que codifica para siete proteínas estructurales (Cápside, E1, E2, E3, 6K y TF) y cuatro proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4) (Cervantes-Acosta & Homero-Sanjuán, 2016). Después de la picadura de un mosquito infectado con CHIKV, la mayoría de los individuos presentarán síntomas tras un período de incubación de 3 a 7 días (rango: 1−12 días) (Organización Panamericana de la Salud, 2011). Sin embargo, no todos los individuos infectados desarrollarán síntomas. Los síntomas más característicos de esta infección son fiebre repentina acompañada de erupciones cutáneas y dolor en las articulaciones, otros signos y síntomas pueden incluir cefalea, dolor de espalda difuso, mialgias, náuseas, vómitos, poliartritis, rash y conjuntivitis (S. Beltrán-Silva et al., 2018). La viremia desaparece después de dos semanas y, con ella, la mayoría de los síntomas; sin embargo, algunos individuos desarrollan la forma crónica de la enfermedad, caracterizada por artralgias prolongadas.

El dengue pertenece a la familia Flaviviridae, género *Flavivirus* (Ramos-Castañeda et al., 2017) este presenta cuatro serotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 los cuales se encuentran agrupados en un mismo serocomplejo (Velandia & Castellanos, 2011). Los serotipos son antigénicamente similares, aunque lo suficientemente diferentes como para no conferir protección cruzada a largo plazo. La infección con un serotipo de dengue confiere inmunidad de por vida contra ese serotipo (Chaudhry, 2019; Restrepo et al., 2020). El genoma viral es un ARN de sentido positivo de aproximadamente 11 kb que codifica para tres proteínas estructurales y siete no estructurales; en cuanto a las proteínas estructurales encontramos: la proteína estructural (E), la proteína precursora de membrana (prM) y la cápside (C), mientras que las proteínas NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5 constituyen las proteínas no estructurales (Velandia & Castellanos, 2011).

Después de la picadura del mosquito infectado con DENV, la mayoría de los individuos empiezan a presentar síntomas a los 3 a 5 días. Cuando la persona presenta fiebre se considera el día 1 de la enfermedad (Castellanos & Coronel-Ruiz, 2014). Esta etapa es la frecuente en la mayoría de los pacientes, aunque algunos continúan hacia una etapa crítica, en la que hay un riesgo alto de muerte si no se trata a tiempo, y otros presentan formas atípicas o graves de dengue dirigidas a la lesión de un órgano específico como encéfalo, miocardio, riñón o hígado (Chaudhry, 2019).

El virus Zika fue descubierto en primates en 1947, su nombre viene de una selva llamada Zika en Uganda. Al igual que DENV, ZIKV pertenece a la familia Flaviviridae, género *Flavivirus*, por ende, presenta la misma organización genómica que DENV, 3 proteínas estructurales (C, prM, E) y 7 no estructurales (NS) (Waggoner & Pinsky, 2016). Igual que la infección por DENV puede o no presentar síntomas, aunque para ZIKV normalmente las personas infectadas son asintomáticas (Aubry et al., 2017). El periodo de incubación es de 3 a 14 días y los signos que acompañan a una

presentación clásica de la infección son fiebre, fotofobia, dolor muscular, rash cutáneo (Cabezas & García, 2017). Así mismo, se ha demostrado la asociación de ZIKV con el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré y la presentación de microcefalia en neonatos de madres infectadas durante el periodo de gestación (en especial los primeros 3 meses) (Thuy et al., 2020). Este síndrome comprende características como la microcefalia grave, las cicatrices maculares y las contracturas congénitas; que le otorgan un sello claro y distintivo de otras infecciones congénitas (Miner et al., 2016).

2.2 Dengue, Chikunguya y Zika en Colombia

Desde la introducción del virus del dengue en las Américas específicamente en Colombia este ha sido la infección viral transmitida por un vector con más incidencia de casos (Padilla et al., 2017). Se estima que aproximadamente 4.000 millones de personas en todo el mundo residen en áreas donde el virus es endémico (Bhatt et al., 2013). Según la organización mundial de la salud, se producen alrededor de 390 millones de casos de dengue cada año. Entre estos casos, se diagnostica un número máximo de 1.000.000 como dengue grave, alrededor de 20.000 de ellos (principalmente niños) resultan en desenlaces fatales debido a la infección (OMS, 2020).

En los últimos años en Colombia se han presentado 4 picos de contagio de DENV importantes los cuales fueron en los años 2010, 2014, 2016 y 2019, donde se notificaron más de 110.000 casos. Para el año 2019, Colombia reportó un aumento de este evento en salud del 284.5% en relación al 2018, con un total de 127.553 casos de DENV entre los cuales 64.716 presentaron signos de alarma y solo el 1.1% de estos terminó en dengue grave (INS, 2019). En lo corrido del 2023 (semana epidemiológica 17, corte 29 de abril), se han registrado en el Sistema Nacional de Vigilancia, un

total de 32. 206 casos de dengue y 439 casos de dengue grave, mostrando un aumento superior al 100 % con respecto al mismo periodo de los años 2021 y 2022 (INS, 2023).

El virus chikungunya está ampliamente distribuido en el mundo y se caracteriza por presentar episodios epidémicos explosivos con períodos libres de la enfermedad de varios años o incluso décadas; en África y Asia se describen con períodos entre 7 a 20 años para pequeñas epidemias y de 4 a 5 décadas para grandes epidemias (Acosta, Navarro y Martines, 2015). Para el caso de Colombia, este fue uno de los países más afectados del continente desde finales de 2013 hasta el 2015 donde tuvo el mayor pico de contagios con un total de 359.728 casos. En el año 2019, se registraron 535 casos confirmados de CHIKV (INS, 2019). Sin embargo, únicamente 48 de estos casos fueron confirmados mediante pruebas de laboratorio. Además se podría considerar que la cifra real de eventos podría estar subestimada, ya que como se mencionó anteriormente los tres arbovirus presentan síntomas clínicos muy similares. Según el INS desde 2017 la cantidad de casos ha disminuido en casi un 95% en comparación al 2015. No obstante, según Calvo et al., en los años 2018 a 2019 se recolectaron muestras de pacientes con síndrome febril sospechoso de infección por dengue en Cali, Villavicencio y Cartagena. Se realizaron pruebas serológicas para detectar anticuerpos IgM contra los virus del dengue (DENV), Zika (ZIKV) y chikungunya (CHIKV), así como la detección del genoma viral por RT-PCR múltiple. En Cali, se evaluaron 345 pacientes pediátricos, de los cuales se confirmaron infecciones por CHIKV en 270 casos. Durante todo el 2018, se reportaron solo 63 casos de CHIKV en el departamento del Valle del Cauca, mientras que el laboratorio confirmó la presencia del virus en 170 niños en el mismo período. En Villavicencio, se evaluaron 154 pacientes en el 2019, y se detectaron casos de CHIKV, DENV y ZIKV, así como coinfecciones. En Cartagena, se evaluaron 181 pacientes pediátricos hospitalizados con diagnóstico de dengue, y se detectó ARN viral de DENV y CHIKV en un porcentaje significativo

de ellos. En general, se observó un mayor número de casos detectados en el estudio en comparación con los casos notificados al sistema nacional de vigilancia, lo que indica un subregistro de casos en estos lugares.

Durante el año 2022, se observaron aumentos significativos en el número de casos (271.176) y defunciones por chikungunya en la región de las Américas, superando los registros de años anteriores. Esta tendencia continuó en las primeras semanas del 2023, evidenciando un incremento aún mayor en los casos y defunciones (OPS, 2023)

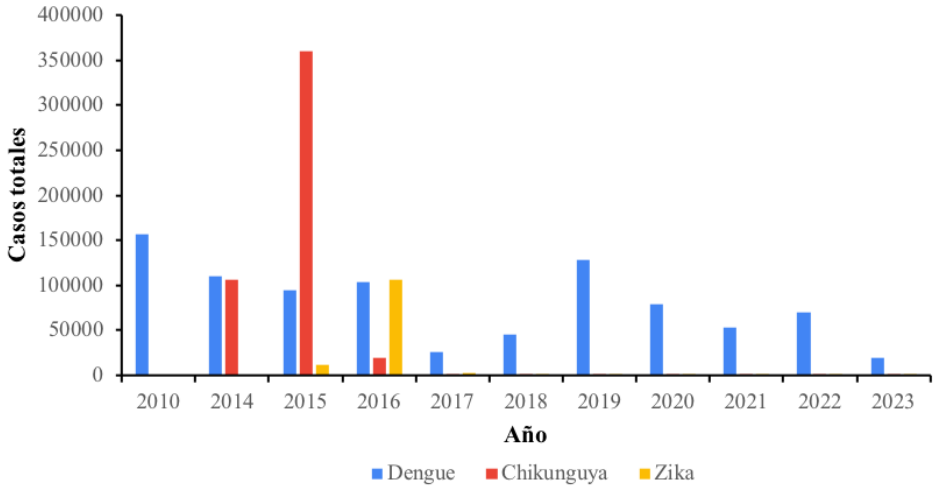


Figura 1. Casos notificados en Colombia en el periodo 2014-2023. Se revisaron los boletines epidemiológicos correspondientes a la semana epidemiológica 52 de cada año desde el 2014 hasta el 2022. Los datos del 2023 se tomaron del boletín epidemiológico número 13.

En cuanto a Zika el primer caso registrado fue en el 2015 y su pico de mayor incidencia en el país fue en 2016 con 106.659 casos. Actualmente disminuyó drásticamente, con 65 casos para la semana

de 10 del 2023 (Instituto Nacional de Salud, 2023). Colombia, fue el segundo país más afectado hasta el momento, se confirmaron los primeros casos en octubre de 2015, y cinco meses después el número acumulado de casos sintomáticos registrados superó los 50.000 (Cucunubá, 2016). Sin embargo en la Región de las Americas 15 de los paises que lo componen, notificaron para la semana 52 de 2022, un total de 36.340 casos de Zika, Estas cifras son mayores a las observadas en el mismo periodo del 2021 (OPS,2023).

2.3 Pruebas de Diagnóstico

Dentro de los métodos virológicos encontramos el ensayo ELISA para la detección de NS1, prueba rápida inmunocromatográfica para NS1 y detección de ARN viral en suero. Dentro de las pruebas serológicas más relevantes encontramos la ELISA para IgM e IgG, y las pruebas rápidas inmunocromatográficas IgM e IgG (Tabla 1).

Las pruebas de detección y amplificación de genoma viral se basan en su mayoría, en la PCR, dentro de estas encontramos la PCR múltiple anidada y RT-qPCR, en cuanto a la PCR múltiple anidada, consiste en emplear diversas parejas de primers, cada una de ellas específica para un virus distinto. Así se pueden detectar en la misma reacción varios patógenos diferentes, en este se usan dos parejas de primers, una externa y otra interna a la primera (específicas para cada virus) (Acevedo & Perera, 2018). Una característica de esta técnica es que tras la primera ronda de amplificación por RT-PCR el producto es utilizado pasa una segunda ronda de PCR aumentando a un gran número de copias el fragmento del genoma presente la muestra original en escaso número. La RT-qPCR o en tiempo real se refiere a que la detección y visualización (monitoreo) de la

amplificación sucede en cada ciclo de la reacción y no requiere de un método de análisis posterior. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de plantilla original en la muestra (Tamay de Dios, Ibarra & Velasquillo, 2013). Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb

Tabla 1. Pruebas diagnósticas y su principio.

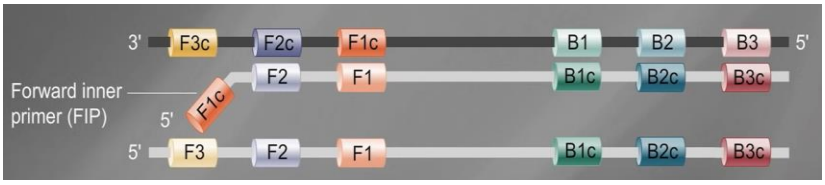
Muestra	Prueba	Principio
Muestras obtenidas dentro de los días 1 a 5 desde el inicio de los síntomas		
Suero	Prueba rápida para la detección de NS1	El antígeno viral NS1 presente en el suero se une a complejos marcados. El inmunocomplejo es capturado por un agente anti-NS1 inmovilizado, creando una línea visible.
Suero	NS1 ELISA	Detección del antígeno viral NS1 haciendo uso de una placa con la cual se recubre con un agente anti-NS1.
Suero, plasma, tejidos	Detección de ARN viral (RT-qPCR, RT-PCR nested, RT-LAMP)	Amplificación del ARN utilizando primers específicos
Suero, plasma, tejidos	Aislamiento viral	Inoculación del suero en células de mosquito C6/36, Huh,Vero.
Muestras después de los 5 días de enfermedad		
Suero	Prueba rápida de inmunocromatografía IgM/IgG*	Los anticuerpos IgM e IgG del paciente capturan antígenos acoplados, haciendo que aparezca una línea rosa visible
Suero	IgM ELISA	Detección de estudios IgM mediante el uso de una placa con estudios anti-IgM adheridos a ella. Utiliza DENV después de la segunda incubación.
Suero	IgG ELISA	Los anticuerpos IgG presentes en el suero reaccionan con los anticuerpos anti-IgG presentes en la placa. Utiliza antígenos DENV en la segunda incubación.

Tomado de: (Castellanos & Coronel-Ruiz, 2014)

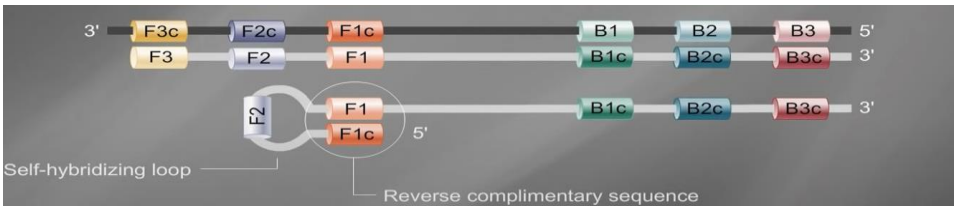
El ensayo RT-LAMP detecta la presencia de una secuencia blanco en el genoma viral en una reacción de un solo paso mediante el uso de cuatro a seis oligos específicos, una transcriptasa reversa y una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra (BST) a una temperatura constante. Durante la amplificación, se libera un protón con cada dNTP que se incorpora a la cadena de ADN en crecimiento; en presencia de una solución ligeramente tamponada, esto conduce a una disminución del pH de 2-3 unidades, lo que se atribuye a la gran cantidad de ADN producido. La incorporación de un indicador de pH directamente en la mezcla de reacción permite la detección visual de la amplificación lo que elimina la necesidad de métodos de detección especializados, como la electroforesis en gel. Cuando un colorante sensible al pH como el rojo fenol se incluye en la reacción, se produce un cambio de color de rojo a amarillo, ocasionado por la disminución del pH. La reacción es rápida (30-45 minutos) y ocurre a una temperatura constante de 65°C por lo que puede realizarse en un baño de agua, bloque de calentamiento o incubadora, lo que lo convierte en una alternativa de bajo costo. Además, la sensibilidad de la RT-LAMP en algunas ocasiones supera la de la RT-PCR convencional o de punto final (Calvert et al. 2017).

La utilidad de esta prueba para la detección de arbovirus en muestras de mosquitos y sangre humana ha sido reportada previamente para zika, chikungunya, dengue, virus de la encefalitis japonesa y virus del Nilo Occidental (da Silva SJ et al 2020; Li et al., 2011; López et al., 2018; Saechue et al., 2020; Calvert et al., 2017; Teoh et al., 2013)

Este método se compone por dos etapas: no cíclica y cíclica. En la primera etapa, el cebador interno directo (FIP) se hibrida con la región complementaria F2c en el ADN blanco e inicia la síntesis de la cadena desplazando la hebra complementaria (Fig. 2a).

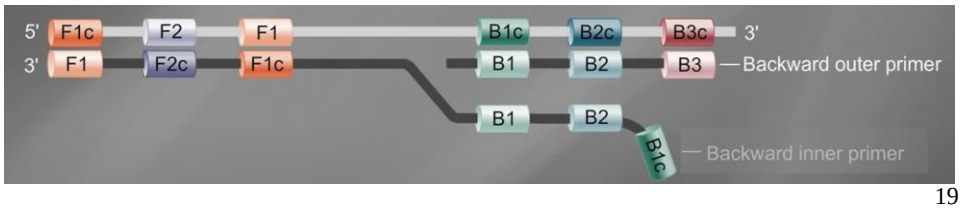


El cebador externo F3 se hibrida con F3c en el ADN blanco e inicia la síntesis de ADN con desplazamiento de cadena, liberando la cadena complementaria iniciada por FIP, que forma una estructura en bucle



en un extremo (Fig.2b).

Este ADN monocatenario sirve como plantilla para la síntesis de ADN iniciada por el primer interno reverso (BIP) y la posterior síntesis de ADN iniciada por B3 (Fig.2c),



lo que conduce a la generación de un bucle en el otro extremo de la cadena dando lugar a una estructura en forma de campana que se convierte rápidamente en plantilla con múltiples sitios de inicio de polimerización (Fig.2d). para la fase cíclica de la reacción (New England BioLabs, 2022; Sánchez et al., 2014).

Los productos amplificados presentan una estructura repetida de distintos tamaños que pueden ser detectadas en un gel de agarosa (Notomi et al., 2000) (Fig. 3)

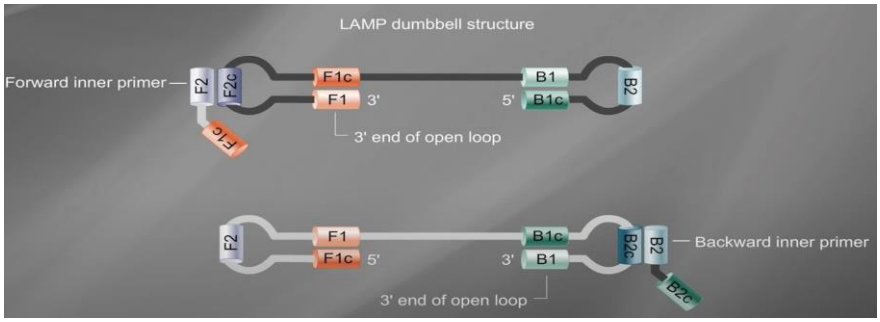


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de LAMP (Tomado de: New England Biolabs, 2023)

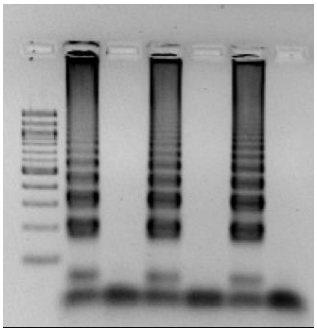


Figura 4. Detección del genoma viral mediante RT-LAMP

3. Justificación

La introducción en los últimos diez años de dos arbovirus (chikungunya y zika) en Colombia que causan enfermedades febriles similares al dengue y son transmitidas por el mismo vector, lo que hace posible su co-circulación y por ende la infección con más de un arbovirus, ha evidenciado la necesidad de pruebas de laboratorio que permitan determinar con precisión el virus causante de la infección (Parida et al., 2007). No obstante, los laboratorios de salud pública en América Latina y Colombia procesan con frecuencia muestras para confirmar los casos de dengue mediante ELISA, pero las muestras de pacientes febriles no se procesan para confirmación de caso de chikungunya o Zika por laboratorio (Rico-Mendoza et al., 2019).

Con el fin de detectar y distinguir esto tres virus se han desarrollado diferentes ensayos basados en la transcripción reversa (RT) acoplada a la amplificación en cadena de la polimerasa tanto de punto final como en tiempo real las cuales han sido ampliamente utilizadas para la detección de genoma viral durante la fase aguda de la enfermedad pero con fines de investigación y/o vigilancia más que como método diagnóstico (Calvo et al., 2016; Lanciotti et al., 1992). Debido en parte, al alto costo y al requerimiento de equipo y personal especializado. El RT-PCR nested, requiere de dos rondas de amplificación y análisis mediante electroforesis en gel de agarosa, lo que puede conducir a contaminación cruzada y lleva un tiempo de análisis más largo. Mientras que en la RT-qPCR el tiempo de análisis se reduce, pero el costo debido a los insumos y equipos se eleva.

Teniendo en cuenta lo anterior, es evidente la necesidad de desarrollar pruebas que permitan la detección rápida, eficiente, específica, económica y de fácil aplicación, de manera que sea asequible a la población en zonas endémicas (Shoushtari et al., 2021). Dado que la amplificación isotérmica RT-LAMP para la detección de infecciones causadas por SARS COV mostró ser una

buena alternativa diagnóstica durante la pandemia por Covid 19 al cumplir con esta especificaciones, consideramos que es posible implementar un protocolo que permita la detección temprana de estos arbovirus y por ende a un mejor manejo tanto del paciente como de individuos asintomáticos que contribuyen a la transmisión de la enfermedad.

4. Pregunta de investigación

¿El ensayo de RT-LAMP podría ser útil para la detección de dengue, chikungunya y zika en muestras de individuos con signos y/o síntomas de infección?

5. Objetivos

Objetivo General

Evaluar el desempeño de un ensayo RT-LAMP para la detección de los virus dengue, chikungunya y zika en muestras biológicas.

Objetivos Específicos

1. Evaluar un conjunto de primers reportados previamente para la detección de dengue, chikungunya y zika por RT-LAMP.
2. Implementar un ensayo de RT-LAMP para cada uno de los cuatro serotipos del virus dengue.

3. Evaluar la sensibilidad analítica del ensayo RT-LAMP en comparación con otros métodos de detección molecular estandarizados previamente en el laboratorio.
4. Evaluar la utilidad del ensayo de RT-LAMP para detectar virus dengue y chikungunya en muestras biológicas.

5. Métodos

5.1 Área de Estudio

El proyecto se realizó en el laboratorio de virología de la Universidad El Bosque

5.2 Muestras

- Sueros provenientes de pacientes febriles del Hospital Napoleón Franco Cartagena-Colombia. Proyecto: “Identificación Molecular de Co-infección por Arbovirus en pacientes con Dengue Grave”
- Sueros provenientes de pacientes febriles de la Clìnica Club Noel Cali-Colombia. Proyecto: “Síndrome febril por arbovirus en niños de Cali Colombia, diagnóstico integrado y herramientas para la clasificación de la severidad”
- Sueros provenientes de donantes de sangre colectados en Bogotá, Cali, Manizales y Medellín en el marco del proyecto: Detección de virus dengue y otros arbovirus en donantes de sangre en Colombia: prevalencia de la infección y caracterización genómica de cepas virales aisladas.

5.3 Controles

Para DENV se utilizó ARN extraído de cosechas virales obtenidas a partir de células C6/36 (*Aedes albopictus)* infectadas con cada serotipo.

DENV1: Cepa 116 Título 1.2X 10^5 PFU/ml ; **DENV2:** Cepa 216 Título 1.2X 10^6 PFU/ml; **DENV3:** Cepa 308 Título 1.4X 10^4 PFU/ml ; **DENV4:** Cepa 432 Título 1.6X 10^6 PFU/ml.

Para CHIKV y ZIKV se utilizó ARN extraído de cosechas virales obtenidas a partir células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde) infectadas.

CHIKV: Cepa 9213 Título 2.5X106 PFU/ml; **ZIKV:** Cepa 11541 Título 1.2X 105 PFU/ml

5.4 Procedimientos

6.4.1 Extracción de ARN Viral a partir de muestras líquidas (Cosechas y sueros humanos)

El ARN viral se extrajo con el estuche comercial Viral Nucleic Acid Extraction Kit (IBI Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a partir de 200µl de muestra.

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml se adicionaron 200µl de muestra y 400µl de Buffer de Lisis (VB), se mezcló con vortex y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se añadieron 450µl de Buffer de unión (AD), el cual permite la unión del ARN a la columna o matriz sólida. Esta solución, se transfirió a la columna y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto, luego de eliminar el eluido se agregó 400µl de Buffer de lavado 1 (W1) y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 segundos. Se descartó el eluido y se añadió 600µl de Buffer de lavado 2, se centrifugó nuevamente a 14000 rpm durante 30 segundos y luego de descartar el residuo, se centrifugó nuevamente a una velocidad de 14000 rpm durante 3 minutos, para eliminar todos los

residuos del buffer de lavado. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml y se adiciona 50µl de agua libre de RNasas (pre-calentada a 70°C) en el centro de la membrana, se incubó por 3 minutos y se centrifugó a 14000 rpm durante un minuto para eluir el ARN, el cual se procesó inmediatamente para RT-qPCR y luego se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.4.2 Detección de CHIKV, DENV y ZIKV por RT-LAMP

Para el ensayo de RT-LAMP se diseñaron seis cebadores específicos contra las regiones conservadas de los genes que codifican la proteína de la matriz (M) y nucleocápside (C) de dengue y chikungunya. Se utilizaron secuencias de aislados colombianos reportados en la base de datos de Genbank. Para el alineamiento se utilizó la herramienta Clustal W contenido en el programa MEGA, versión 6. Una vez alineadas las secuencias conservadas, se diseñaron los cebadores para LAMP con la herramienta NEB LAMP Primer Design Tool disponible en https://lamp.neb.com/#!/ versión 1.3.1 en el cual se generó un juego de seis cebadores para DENV y CHIKV, en los cuales se encuentran dos cebadores externos, sentido y antisentido (F3 y B3), dos cebadores internos (FIP y BIP), y dos cebadores de tipo loop o bucle (LF y LB) (Tabla x).

En todos los ensayos de RT-LAMP se utilizó el sistema comercial WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG (NEB, New England Biolabs) y un volumen final de 20 ul de reacción. A la mezcla de reacción que contiene el buffer (Tris-HCl pH 8.8@25°C, (NH4)2SO4, KCl, MgSO4, Tween® 20), las enzimas WarmStart® RT con actividad de transcriptas a inversa y *Bst* 2.0 con actividad polimerasa y dNTPs se adicionó 1 uL de la mezcla de primers en concentración 20X (FIP/BIP 20 pmol, F3/B3 2,5 pmol y LF/LB 5,0 pmol) y 5 mL de ARN plantilla.

La amplificación se realizó a 63 °C durante 30 minutos según las instrucciones del fabricante en un termociclador T100 (BioRad). La prueba se consideró positiva cuando hubo un cambio de color de rojo a amarillo similar a la del control positivo (fig. 4). Además, los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 2 % y se visualizaron por medio de la tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV con el equipo GEL DOC (BioRad), para verificar la amplificación.

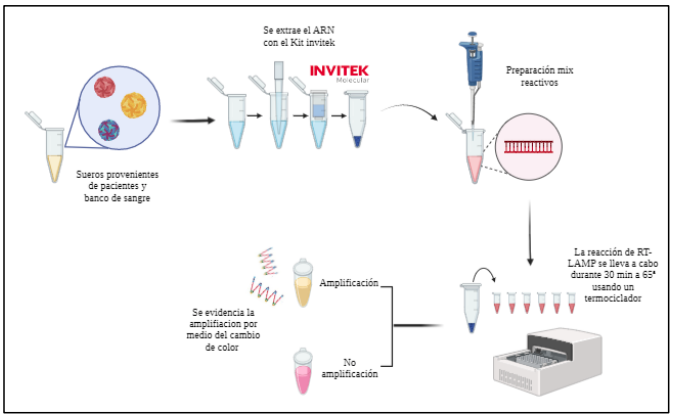


Figura 5. Representación del ensayo RT-LAMP

Tabla 2. Conjuntos de oligonucleótidos para detección de CHIKV por RT-LAMP

Virus	Gen	Cebador	Secuencia
	C (Saechue et al., 2020)	F3	CACACTGTGAGCGCGTAC
		B3	GACGGTTTTGTATTCGCACG
		FIP	AGCCCGGTCTGTTGACTAGAGTTTTTACA CGTAACAGTGATCCCGA
		BIP	ACAGCCCCATGGTACTGGAGATTTTTCAA GCGATAGCGTTGGC
		LF	ACGGTACTCCCACCGTGT

		LB	GGAGCTACTGTCAGTCACTTTG
CHIKV	E (Diseñados en este estudio)	F3	CCGACGCTTCGAAGTTCA
		B3	GCTGTACGGGCTCCTTCA
		FIP	ATGGTGAATCGGCCTCCTGAGTCATGAGA AACCGGAGGGGTA
		BIP	GCGGGCAAACCAGGGGATAGGCGCCTCC TAAAACTATGGC
		LF	ACTGTACTGCTCCGTGGT
		LB	TGGTAGACCGATCTTCGACAA
	C (Diseñados en este estudio)	F3	CATCAGCATACAGGGCTCAT
		B3	GGCGGGTAGTCCATGTTG
		FIP	CCGTTTGCATAAGCAGCCACAGCGCATCC GCATCAGCTAA
		BIP	TAGTGGGGCCAATGTCTTCAGCACGTCGC CTTTGTACACC
		LF	TTGGTAAAGGACGCGGAG
		LB	CTGGACACCTTTCGACAATAAA

Tabla 3. Conjunto de oligonucleótidos para detección de DENV por RT-LAMP

Virus	Gen	Cebador	Secuencia 5`- 3`
Pan Dengue (Teoh et al., 2013)	NS5	F3/134	CAAACCGTGCTGCCTGT
		F3/2	TGAGTAAACTATGCAGCCTGT
		B3/123	ACCTGTTGATTCAACAGCACC
		B3/4	GAGGCGGAACCAGATGACGTTGCGCCGGTTTGAGAACACG
		FIP/123	CACATAACTCTCCCAAGTCCA
		FIP/4	CTGCTGGTGCAACGCCA

		BIP/123	ACAGCATATTGACGCTGGGARAGACGTTCTGTGCCTGGAATGATGCTG
		BIP/4	ACAGCATATTGACGCTGGGARAGACGCTCTGTGCCTGGATTGATGTTG
		BLP/1234	CAGAGATCCTGCTGTCTC
DENV1 (Diseñados en este estudio)	E	F3	AGACCTCTGCAGGTGTCAAT
		B3	AACGTTTGTCTCGTCGGTG
		FIP	CCGGGGGCATTTGTAGGTCATTATGTGCACTCTCATTGCGA
		BIP	GAGGCGGAACCAGATGACGTTGCGCCGGTTTGAGAACACG
		LF	CACATAACTCTCCCAAGTCCA
		LB	CTGCTGGTGCAACGCCA
DENV 2 (Diseñados en este estudio)	E	F3	GAGAAACCGCGTGTCAAC
		B3	CCCTCTCAAAACATTGATAGC
		FIP	CCATGAACAGTTTTAATGGTCCACCAGCTGACAAAGAGATTCTCA
		BIP	CCTTGTGGCGTTCCTTCGTTGTTCCCCATCTTTTTAGTATCC
		LF	GTCCTTGCAGCATTCCAAG
		LB	CTGACAATCCCACCAACAGCAG
DENV 3 (Diseñados en este estudio)	E	F3	AGGCTGAACCTCCTTTTGG
		B3	GCTGTGTAAGCACTTCCGAA
		FIP	AGTGGCCTCGAACATCTTCCCATTGGAATTGGAGACAACGCC
		BIP	CATGGCCATCTTGGGAGACACATGGTGCACCATTTTGCCTAA
		LF	CCCTTCTTGTACCAGTTGATTTTCA
		LB	GGGTGGTGTTCTGAACTCA
DENV 4	E	F3	GGACATGTACCCAGAACGG
		B3	AGGCCATGAATCCTGCTAAG

(Diseñados en este estudio)	FIP	TCAGCCCTTGTTTCCAATCCCAAGAACGGAGGCGAGAGAAG
	BIP	ACATGGATGTCATCGGAAGGGGGCGAATCCTGGGTTTCTGAG
	LF	GTGTGGTGTTAAAGCTACTGAG
	LB	CTTGGAAACATGCCCAGAGAG

Tabla 4. Conjunto de oligonucleótidos para detección de ZIKV por RT-LAMP

Virus	Gen	Cebador	Secuencia
Zika	E (Calvert et al., 2017	F3	TGCTTTCGCACTTGTTCATC
		B3	CATTTCAAGTGGCCAGAGGA
		FIP	GGCATGTGCGTCCTTGAACTCTGACACCGGAACTCCACACT
		BIP	AGAAGGAGCAGTTCACACGGCCCCTTTGCACCATCCATCTC
		LF	ACCAGTGCTTCTTTGTTGTTCC
		LB	CCTTGCTGGAGCTCTGGAG

6.4.3 Detección de CHIKV, DENV y ZIKV por RT-PCR anidada

Este protocolo fue descrito anteriormente por Calvo et al., 2016, en la que se detecta simultáneamente DENV, CHIKV y ZIKV en una reacción de Transcripción reversa y amplificación.

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 microL con el sistema Luna Probe RT-PCR (New England Biolabs. NEB), 5 microL de ARN y 0.2 mM de oligos específicos para los tres virus (Tabla 5 primers externos). Bajo el siguiente perfil de amplificación: 15 min a 55°C; 3 min a 95°C y 30 ciclos de denaturación a 95°C por 30 seg, anillaje a 60°C por 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg; seguidos por una extensión final a 72°C por 5 min.

La Segunda ronda de amplificación se llevó a cabo en reacciones independientes -La serotipificación de DENV se llevó a cabo en 15 microL de reacción con el sistema GoTaq (Promega), 2 microL del amplicón como plantilla y 1.5 mM de MgCl2, 0.2mM de dNTPs y 0.2 mM de oligos internos, tabla 5. Bajo el siguiente perfil de temperaturas: Denaturación inicial a 95°C por 3 min y 25 ciclos de denaturación a 95°C por 30 seg, anillaje a 60°C por 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg; seguidos por una extensión final a 72°C por 5 min.

El análisis de los productos de PCR se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Para ello, a 5microL de cada producto se le adicionó 1microL de Buffer de carga 6X se sembró en cada pozo y se permitió la separación por 1h a 90V en buffer TBE 0.5X (Tris 89mM, Ácido Bórico 89mM, EDTA 2mM). La detección de los productos se realizó por luego de tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV con el equipo GEL DOC (BioRad).

Tabla 5. Conjunto de oligonucleótidos externos e internos usados en la detección de DENV, CHIKV Y ZIKV mediante RT-PCR semi anidada.

Virus	**Reacción**	**Secuencia 5´**	**Amplicón (pb)**	**Referencia**
CHIKV	RT-PCR	E1F10240: ACGCAATTGAGCGAAGCAC E1R10541: CCAAATTGTCCYGGTCTTCCT	301	
	PCR	E1F10240: ACGCAATTGAGCGAAGCAC E1R10444: CTGAAGACATTGGCCCCAC	204	
DENV	RT- PCR	mD1: AGTTGTTAGTCTRYGTGGACCGAC D2: TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	511	Chien.,*et al*
	PCR	TS1: CCCGTAACACTTTGATCGC TS2: CGCCACAAGGGCCATGAACAGTTT	211 119	Chien.,*et al*

		TS3: TAACATCATCATGAGACAGAGC TS4: TTCTCCCGTTCAGGATGTTC	288 266	
ZIKV	RT-PCR	MF 944: GGTCATGATACTGCTGATTGC ER 1269: CCACTAACGTTCTTTTGCAGAC	325	Calvo., *et al*
	PCR	MF 944: GGTCATGATACTGCTGATTGC ER 1241: AGTGTCTGACTGCTTGTCAAGG	297	Calvo., *et al*

6.4.4 Detección de CHIKV, DENV y ZIKV por RT-qPCR

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 microL con el sistema Luna Probe RT-PCR (New England Biolabs. NEB), 5 microL de ARN, 0.4 mM de oligos específicos para cada serotipo y 0.2 mM de sonda (Tabla 6) . Bajo el siguiente perfil de amplificación: 15 min a 55°C; 3 min a 95°C y 40 ciclos de desnaturación a 95°C por 15 seg, anillaje a 60°C por 45 seg.

Tabla 6. Conjunto de oligonucleótidos y sondas para detección de DENV, CHIKV, y ZIKV por RT-qPCR

Gen	Secuencia	Canal
CHIKV E1	F TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA	FAM
	R TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC	
	P AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG	
CHIKV NSP	F Lan 6844 TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA	Texas Red
	R Lan 6970 TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC	
	ALFA R7130 ATYTTIACTTCCATGTTCATCCA	
DENV1 NS1	F CAAAAGGAAGTCGYGCAATA	FAM
	R CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC	
	P CATGTGGYTGGGAGCRCGC	
DENV2 E	F CAGGCTATGGCACYGTCACGAT	HEX

	R CCATYTGCAGCARCACCATCTC	
	P CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTTCAA	
DENV3 M	F GGACTRGACACACGCACCCA	Texas Red
	R CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT	
	P ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	
DENV4 M	F TTGTCCTAATGATGCTRGTCG	Cy5
	R TCCACCYGAGACTCCTTCCA	
	P TYCCTACYCCTACGCATCGCATTCCG	
ZIKV E	F CCGCTGCCCAACACAAG	FAM
	R CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	
	P AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	
Control Interno Humano	F TGGTAATTCTAGAGCTAATACATG	HEX
	R CCATGATTAAGAGGGAC	
	P TTGACTCTAGATAACCTCG	

7. Resultados

7.1 Evaluar un conjunto de primers reportados previamente para la detección de dengue, chikungunya y zika por RT-LAMP.

En primera instancia se pensó en la implementación de un sistema detección múltiplex para la detección de los 3 arbovirus en un sólo tubo de reacción, esto implicaba la evaluación de un set de oligos que reconociera los 4 serotipos de dengue (6 primers) , un set de oligos que reconociera CHIKV (6 primers) y un set de oligos que reconociera ZIKV (6 primers) con una sensibilidad o

límite de detección igual o inferior al del ensayo de RT-qPCR. Y, que luego al estar en la misma reacción (18 primers) fuesen compatibles y conservarán la sensibilidad de la reacción uniplex.

7.1.1 Detección de DENV con oligos Pan-Dengue

Como primer alternativa para la implementación de RT-LAMP se evaluó el conjunto de primers reportados por Teoh et al., 2013 el cual consiste de cuatro oligos externos, cuatro internos y uno de loop que reconocen siete fragmentos en la región 3'UTR del genoma de los 4 serotipos de DENV (Figura 6), se utilizaron las concentraciones indicadas por el autor bajo las condiciones recomendadas por el fabricante para el sistema Warm RT LAMP (NEB). El ensayo se realizó utilizando como plantilla ARN control (obtenido de cosechas virales) de cada serotipo DENV1,2,3, y 4 y dos controles negativos a los cuales se les adicionó agua libre de nucleasas en lugar de ARN (figura 6. B). El cambio de color de rojo a amarillo indicó un resultado positivo para los cuatro serotipos, el cambio es ocasionado por una disminución en el pH como producto de la liberación de PPi durante la polimerización. Este resultado que fue verificado al analizar los productos de la reacción por electroforesis en gel agarosa. Como se observa en la figura 6 C, se produjeron fragmentos de diferentes tamaños simulando una escalera en aquellos tubos donde se adiciono RNA de DENV.

Para evaluar la sensibilidad de este set de primers se prepararon diluciones seriadas de RNA de cada uno de los 4 serotipos, cada dilución se utilizó como plantilla en la reacción de RT-LAMP y en RT-qPCR de forma paralela.

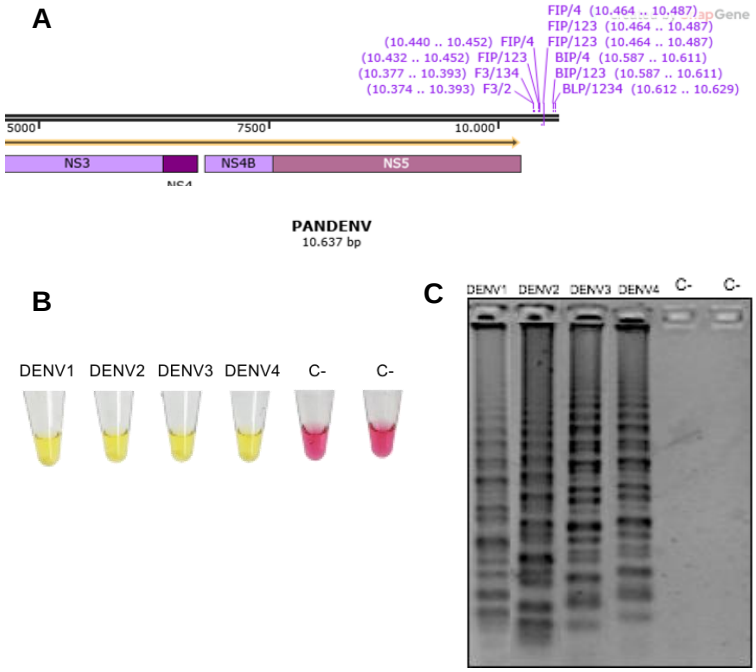


Figura 6. Detección de DENV en RNA proveniente de cosechas virales por RT-LAMP ***(A)*** *Representación esquemática del genoma de DENV en el que se señala la ubicación de los primers reportados por Teoh et al., 2013.* ***B****) Detección colorimétrica, el color amarillo indica un resultado positivo, el rojo un resultado negativo.* ***(C****) Detección por electroforesis en gel de agarosa al 2%.*

Como se observa en la figura 7 en las condiciones establecidas y con este set de primers se detectó desde un millón de copias (10^6) hasta 10.000 copias (10^4) de DENV por reacción. Al comparar el resultado de la amplificación isotérmica con el PCR cuantitativo, se evidenció que este último alcanza a detectar hasta 1000 copias (10^3) $por\ reacción,$ es decir, es más sensible, que el LAMP.

Lo que nos llevó a concluir que este set de primers no sería el más adecuado para utilizar en la reacción múltiplex y con muestras clínicas en una prueba diagnóstica.

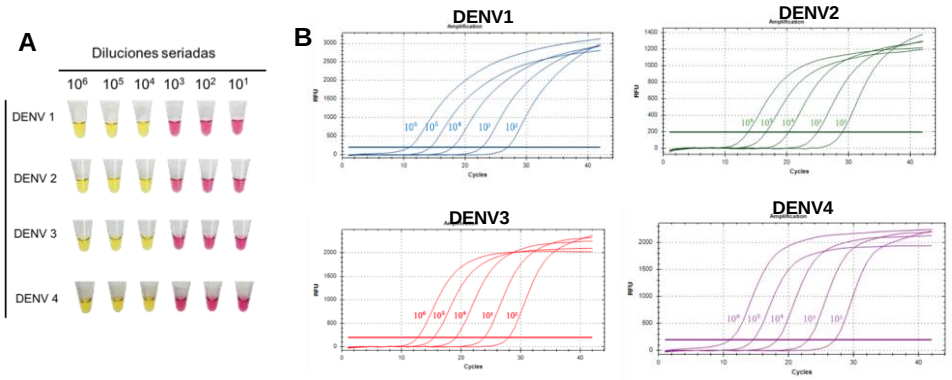


*Figura 7. Detección de DENV **A)** Detección colorimétrica de RT-LAMP. **B)**. Detección por RT-qPCR*

7.1.2 Detección de CHIKV y ZIKV con oligos reportados en la literatura

Para CHIKV se evaluó el conjunto de oligos diseñado por Saechue et al., 2020 que reconocen una región en el extremo 5´ del gen E1 y para ZIKV los oligos reportados por Calvert et al., 2017 que detectan la región del genoma que va desde el nucleótido 1626 al 1849 incluidos en el gen de la envoltura (E). Las reacciones de RT-LAMP se llevaron a cabo por duplicado y bajo las condiciones reportadas por cada uno de los autores. Como se puede observar en la figura 8, ambos sets de oligos reconocen el RNA viral correspondiente y dan origen a productos de diferentes tamaños tipo escalera, según lo esperado.

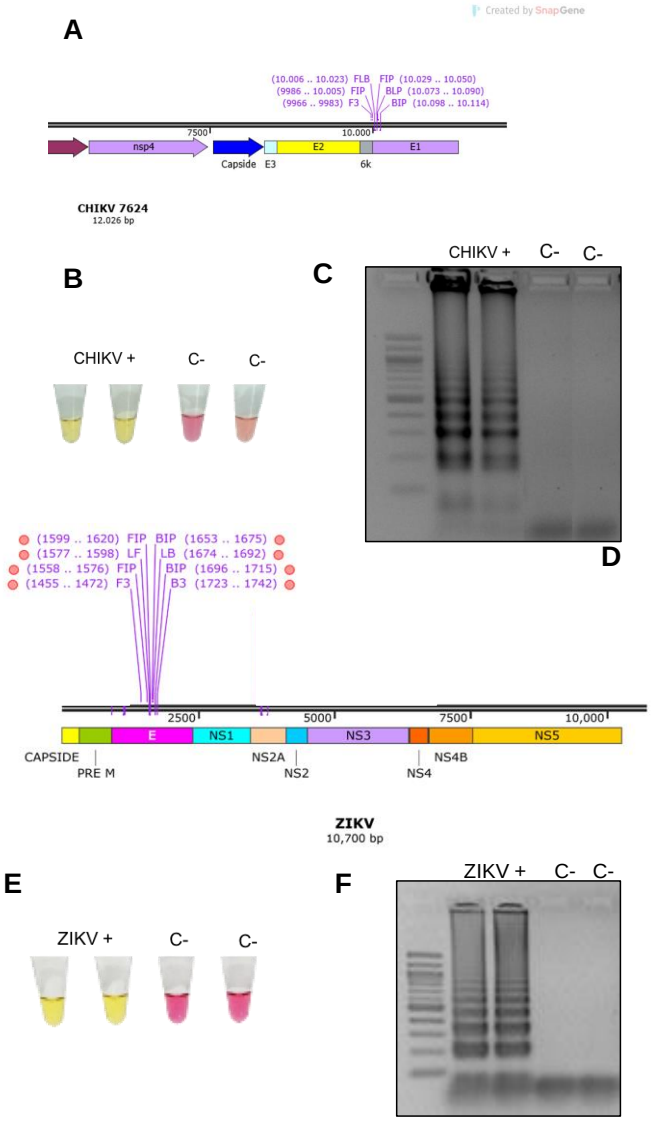


Figura 8. Detección de CHIKV y ZIKV en RNA proveniente de cosechas virales por RT-LAMP ***(A, D)*** *Representación esquemática del genoma en el que se señala la ubicación de los primers reportados por Saechue et al., 2020 y Calvert et al., 2017 respectivamente.* ***(B, E)*** *Detección*

colorimétrica, el color amarillo indica un resultado positivo, el rojo un resultado negativo. (***C, F****) Detección por electroforesis en gel de agarosa al 2%.*

Teniendo los resultados de los controles se procedió a realizar la detección con diluciones seriadas de ARN viral de CHIKV 9213; nuevamente, al comparar el resultado de la amplificación isotérmica con el RT-PCR cuantitativo, se evidenció que este último alcanza a detectar hasta 1000 copias (10^3) por reacción, es decir, es más sensible, que el LAMP. Lo que nos llevó a concluir que este set de primers no sería el más adecuado para utilizar con muestras de pacientes con sospecha de infección.

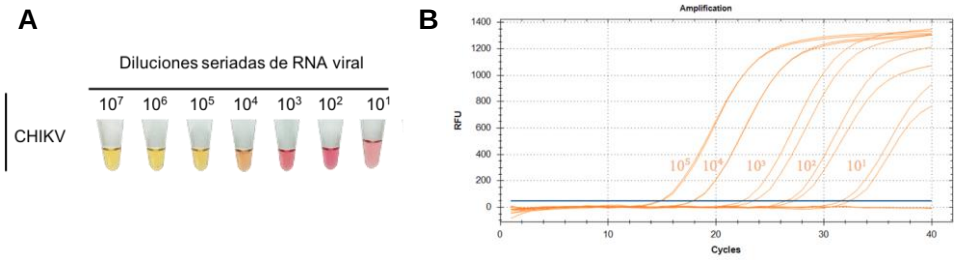


Figura 9. Detección de CHIKV A) Detección colorimétrica de RT-LAMP con primers diseñados por Saechue et al., 2020. B). Detección por RT-qPCR con primers reportados por Pastorino et al., 2005

Para ZIKV, la detección por RT LAMP se realizó con 6 diluciones seriadas RNA viral 11645, alcanzándose la detección de 100 copias/reacción, es decir un límite de detección igual al del RT-qPCR. Con lo cual concluimos que este set podría ser útil en la prueba de detección multiplex. No obstante, no fue posible comprobarlo, dada la escasa circulación del ZIKV en las ciudades en las que se ha realizado búsqueda activa de arbovirus en pacientes febriles desde el año 2018 (Cali, Cartagena y Villavicencio) que el laboratorio no cuenta continuar el análisis para ZIKV no se terminaron dado la falta de muestras clínicas para comprobar la sensibilidad de los cebadores.

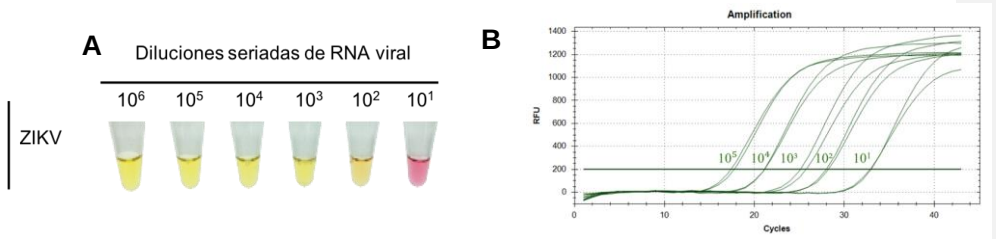


Figura 10. Detección de ZIKV A) Detección colorimétrica de RT-LAMP con primers diseñados por Saechue et al., 2020. B). Detección por RT-qPCR con primers reportados por Lanciotti et al., 2008.

7.2. Implementar un ensayo de RT-LAMP para cada uno de los cuatro serotipos de virus dengue y para dos blancos de detección de CHIKV

A partir de los resultados obtenidos en el primer objetivo donde la sensibilidad no alcanzó a ser del mismo orden del RT-qPCR se decidió diseñar un set primers específicos para cada serotipo de DENV y para CHIKV. Para dengue se diseñaron oligos en la región PreM para los serotipos 1 y 4, en el gen C para DENV2 y en el gen E para DENV3 (figura 11), una vez se confirmó que cada set reconoce el serotipo correspondiente se procedió a determinar la sensibilidad analítica con diluciones seriadas de ARN de cada unos de los serotipos (de 10^1 hasta 10^6copias/reacción)..

Para DENV1, DENV2 y DENV3 el límite de detección se estableció en 100 copias/reacción, un valor similar al obtenido en el ensayo de RT-qPCR, lo que indica una ganancia en sensibilidad con respecto a la detección con los primers Pan-Dengue; mientras que para DENV4 no se logró aumentar y se mantuvo en el orden de 10^4copias /reacción. Para confirmar los resultados de la

detección colorimétrica, los productos se analizaron en gel de agarosa al 2% donde se evidenció que el patrón de escalera esperado se obtiene en 5 de las 6 diluciones probadas y que en la última dilución no se alcanza a formar producto y por tanto no hay cambio en el color, al igual que en los controles negativos de la reacción (figura 12 B) .

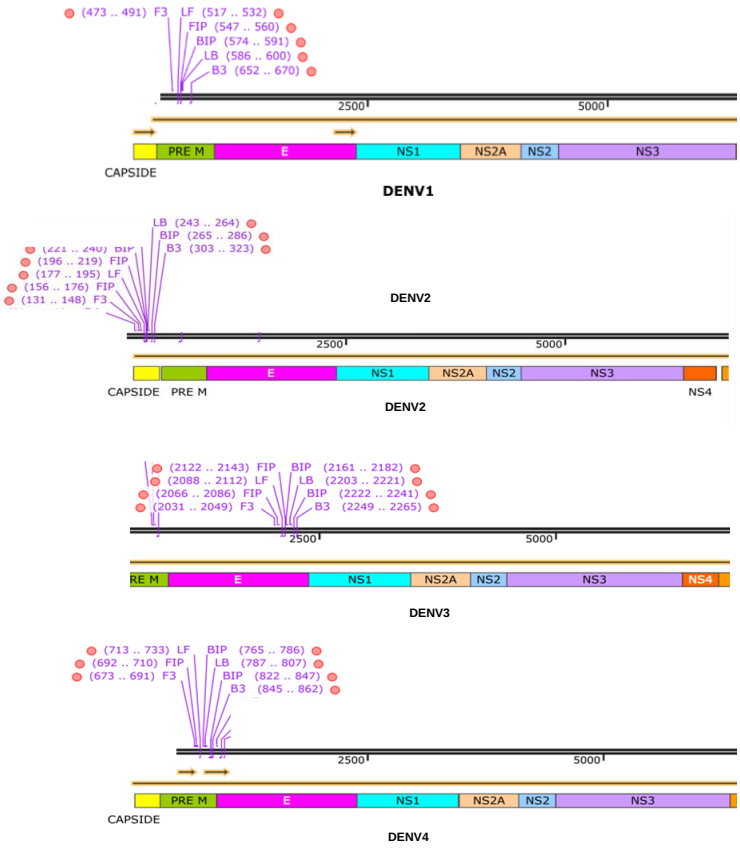


Figura 11. Representación esquemática de la localización de los primers diseñados en este estudio para la detección de cada uno de los serotipos de DENV.

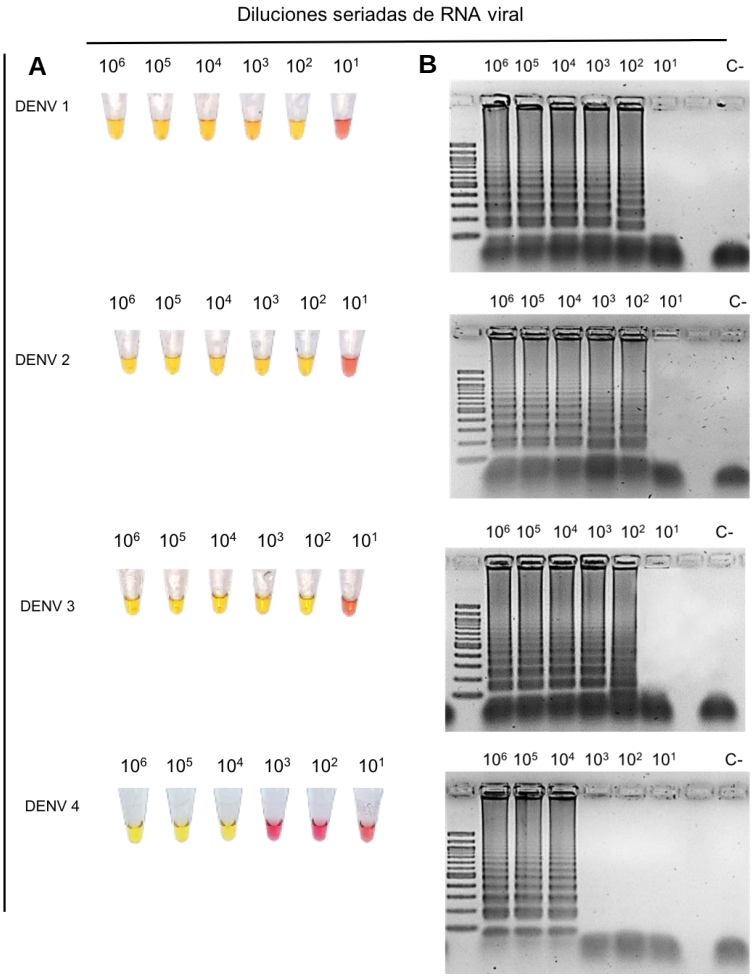


Figura 12. Deteccion de DENV en RNA proveniente de cosechas virales por RT-LAMP ***(A)****.Detección colorimétrica, el color amarillo indica un resultado positivo, el rojo un resultado negativo.* ***(B)*** *Detección por electroforesis en gel de agarosa al 2%.*

En cuanto a CHIKV, se diseñaron dos conjuntos de oligonucleótidos uno reconoce el gen E1 y el otro el de cápside (C), al llevar a cabo la amplificación el cambio de coloración se observó hasta con 100 copias/reacción para los dos genes como se muestra en la figura 13; evidenciándose un aumento en la sensibilidad de la detección al utilizar cualquiera de los dos sets.

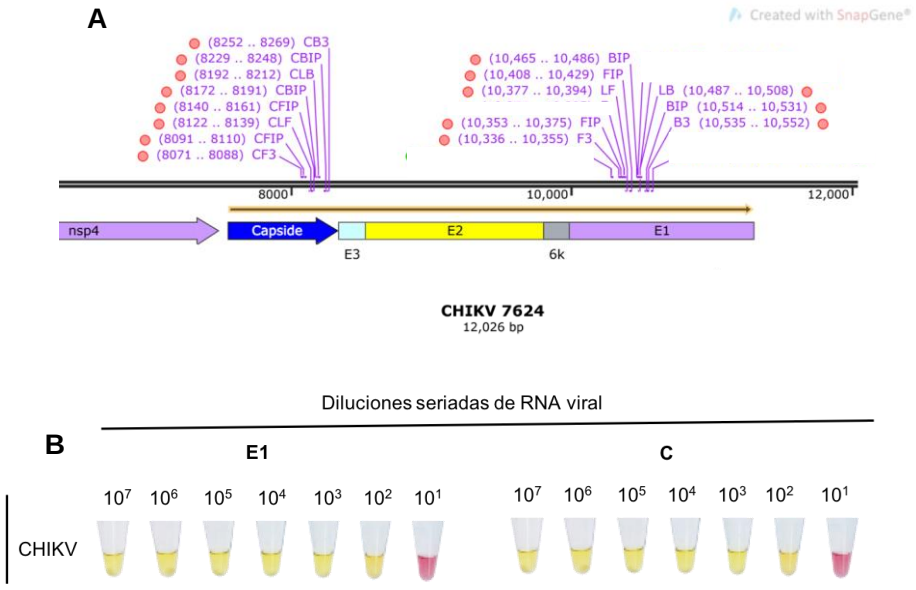


*Figura 13. Detección de CHIKV por RT-LAMP. A) Representación esquemática del genoma y localización de los primers diseñados **B)**.Detección colorimétrica, el color amarillo indica un resultado positivo, el rojo un resultado negativo.*

7.3. Evaluar la sensibilidad analítica del ensayo RT-LAMP en formato multiplex en comparación con otros métodos de detección molecular estandarizados previamente en el laboratorio

Dado que es necesario reducir el número de reacciones por cada muestra a analizar al mínimo, para disminuir costos y hacer el ensayo lo más sencillo posible para un analista, el siguiente paso fue reunir los primers de reconocimiento de cada serotipo (seis) en un sólo tubo de reacción y evaluar el efecto sobre la sensibilidad de la reacción y/o estabilidad de la coloración. Al hacer esta la mezcla, se observó que los oligos para DENV 4 generaban productos inespecíficos provocando un cambio en la coloración de rojo a naranja aun antes de adicionar la plantilla de ARN y dar inicio a la reacción. Dado que en los últimos 4 años no se ha detectado este serotipo en las muestras analizadas en nuestro laboratorio y que se confirmó su incompatibilidad con los demás sets de oligos, se decidió correr el ensayo RT-LAMP en formato multiplex solo con los primers para DENV1, 2 y 3.

Al probar mezcla de primers con 6 diluciones seriadas de ARN de cada serotipo, no se observó una pérdida de sensibilidad para ninguno de los serotipos. DENV 1,2 y 3 fueron detectados en la dilución que contenía 100 copias por reacción, tanto por un cambio en la coloración como a través del análisis de los productos amplificados en electroforesis horizontal (Figura 14 A y B).

Para confirmar el límite de detección del ensayo en el formato multiplex, se hicieron tres réplicas de la última dilución en la que se detectó amplificación y de la siguiente, como se observa en la figura 14 (C), el límite de detección de para los tres serotipos fue de 100 copias por reacción.

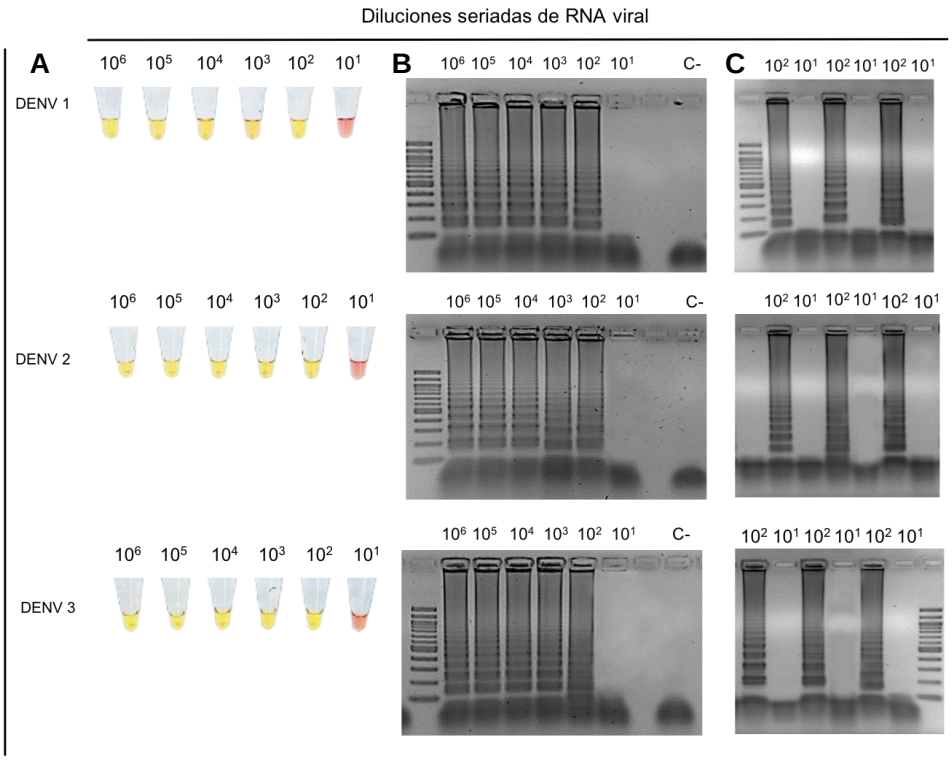


*Figura 14. Detección de DENV por RT-LAMP en formato multiplex. (**A**) Detección colorimétrica, el color amarillo indica un resultado positivo, el rojo un resultado negativo. (**B**). Detección por electroforesis en gel de agarosa al 2%. (**C**)Triplicado del límite de detección.*

De igual manera, los oligos que detectan el gen E1 y C de CHIKV se unieron en una sola reacción y se evaluó su desempeño con diluciones seriadas de ARN viral, como se observa en la figura 15, en la reacción múltiplex se detectaron hasta 100 copias/reacción, resultado que se repitió al hacer otras dos réplicas con las diluciones de 100 y 10 copias.

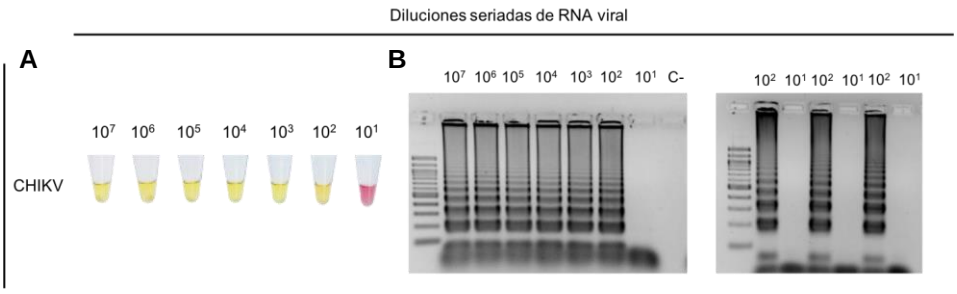


*Figura 15. Detección de CHIKV por RT-LAMP en formato multiplex (**A**) Detección colorimétrica, el color amarillo indica un resultado positivo, el rojo un resultado negativo. (**B**). Detección por electroforesis en gel de agarosa al 2%.*

Finalmente, los tres métodos de detección establecidos en el laboratorio para la detección de DENV y de CHIKV se corrieron de manera simultánea con diluciones seriadas de ARN viral de cada serotipo con el fin de determinar cuál de los tres métodos permite detectar el menor número de copias genómicas, es decir cuál presenta mayor sensibilidad analítica. Como se observa en la figura 17, por lo menos con el RNA control obtenido de cosecha viral, tanto el RT-PCR convencional. como el RT-qPCR y el RT-LAMP pueden detectar hasta 100 copias genómicas por reacción. No obstante, es necesario realizar diluciones seriadas en base 2, comenzando en 100 copias, 50, 25, 12.5, hasta 6.25 copias para establecer con precisión el límite de detección de cada uno de los tres métodos.

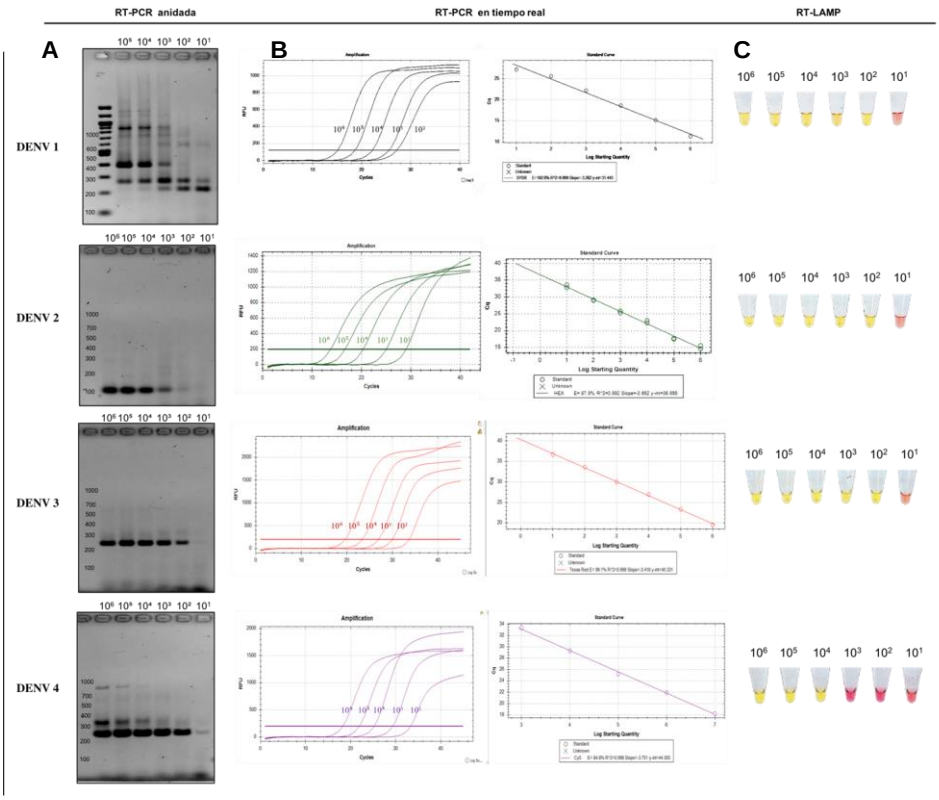


*Figura 16 . Detección de los cuatro serotipos de DENV por diferentes métodos. (**A**).RT-PCR convencional (**B**). RT-qPCR específica de serotipo (**C**).Detección por RT-LAMP colorimétrico específica de serotipo.*

Comentado [NC1]: Agranda esta figura que sea de toda la ´pagina con la leyenda

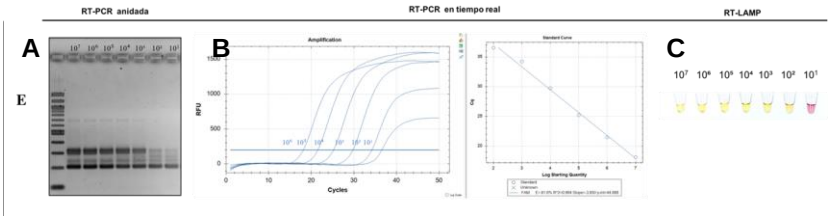


*Figura 17. Detección de CHIKV por diferentes métodos (**A**).RT-PCR convencional (**B**). RT-qPCR específica de E1 (**C**).Detección por RT-LAMP colorimétrico para los genes*

Comentado [NC2]: Agranda esto!!! No tod tiene que quedar en la misma fila A
B
C

7.4 Evaluar la utilidad del ensayo de RT-LAMP para detectar virus dengue y chikungunya en muestras biológicas

La aplicabilidad del ensayo RT-LAMP para la detección de ARN de DENV se evaluó en un total de 65 muestras de suero obtenidas de pacientes febriles con sospecha de dengue de las cuales 33 fueron clasificadas como positivas y 32 como negativas según el RT-PCR anidado, el cual es el ensayo de referencia en nuestro laboratorio. Para CHIKV se evaluaron 65 muestras de las cuales 37 fueron positivas y 28 negativas en el ensayo de RT-PCR anidado. Al realizar el ensayo de RT-LAMP con diferentes muestras observamos que en algunas de ellas el cambio de color no era tan evidente y por tanto emitir un resultado sólo a partir de la coloración no era conveniente, por esta razón el producto de la reacción se analizó también por electroforesis en gel de agarosa para poder establecer si había o no amplificación específica.

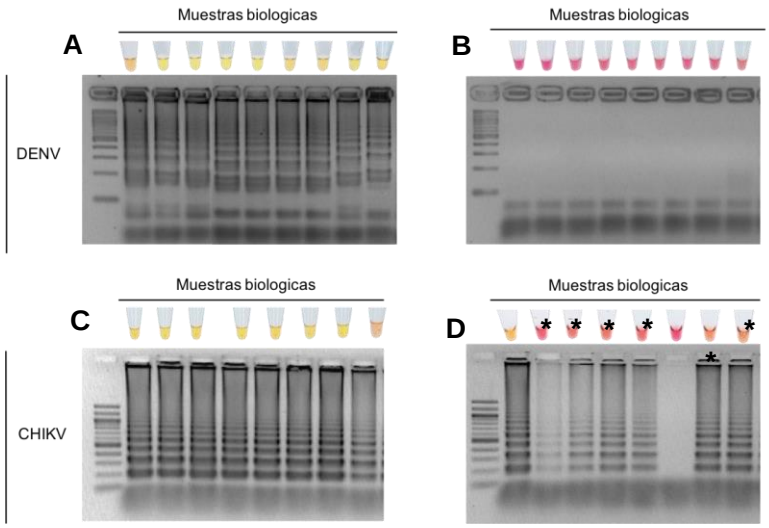


*Figura 18. Detección de muestras biológicas por RT-LAMP. (**A**) Muestras positivas para DENV (**B**) Muestras negativas para DENV. (**C**)Muestras positivas para CHIKV. (**D**) Muestras positivas y negativas para CHIKV (*) Cambio de color no evidente.*

En la figura 17 se muestran algunos ejemplos donde se confirmó amplificación específica aunque el cambio de color no fue tan evidente (marcados con *). Teniendo en cuenta estos resultados se encontró que de las 65 muestras probadas, 30 fueron positivas para DENV y CHIKV fue detectado en 39 muestras. Los resultados obtenidos para cada muestra con el ensayo de referencia, RT-qPCR y RT-LAMP se resumen en la tabla 7 y se presentan de manera completa en el anexo 1.

Tabla 7. Consolidado de la detección de DENV y CHIKV mediante distintas pruebas moleculares

	DENV		CHIKV		
Método de detección viral	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Total
RT-PCR semi anidada	33	32	37	28	65
RT-qPCR	27	38	11	54	
RT-LAMP	29	36	39	26	

Para evaluar el desempeño del ensayo RT- LAMP como prueba diagnóstica se calculó la sensibilidad (S) o la capacidad de la prueba para detectar los verdaderos positivos o muestras infectadas con el virus y la especificidad (E) o capacidad de la prueba para detectar los verdaderos negativos o muestras no infectadas, para ello construyeron tablas 2X2 y se tomó como prueba de referencia el RT-PCR nested. La prueba demostró tener un excelente desempeño tanto para la detección de DENV (S= 88%, E= 100%) como para CHIKV (S= 95%, E= 93%), lo cual indica que podría ser utilizada en lugar del RT-PCR nested y tener un resultado confiable en un menor tiempo.

Tabla 8. Desempeño del ensayo RT-LAMP para los virus dengue y chikungunya.

Comentado [NC3]: Estas son dos tablas , separalas porque están muy pequeñas..

Una tabla des DENV y CHIKV RT LAMP y la otra si es RT-qPCR

DENV			
	RT-PCR NESTED		
RT-LAMP	Positivo	Negativo	Total
Positivo	29	0	29
Negativo	4	32	36
Total	33	32	65
Sensibilidad	0,88		
Especificidad		1	
VPP	1		
VPN		0,89	

CHIKV			
	RT-PCR NESTED		
RT-LAMP	Positivo	Negativo	Total
Positivo	37	2	29
Negativo	2	26	36
Total	39	28	65
Sensibilidad	0,95		
Especificidad		0,93	
VPP	1,28		
VPN		0,72	

DENV			
	RT-PCR NESTED		
RT-qPCR	Positivo	Negativo	Total
Positivo	27	0	27
Negativo	6	32	38
Total	33	32	65
Sensibilidad	0,82		
Especificidad		1,00	
VPP	1,00		
VPN		0,84	

CHIKV			
	RT-PCR NESTED		
RT-qPCR	Positivo	Negativo	Total
Positivo	11		11
Negativo	26	28	54
Total	37	28	65
Sensibilidad	0,30		
Especificidad		1,00	
VPP	1,00		
VPN		0,52	

Finalmente, se evaluaron 15 muestras provenientes de donantes de sangre, estos individuos aparentemente sanos, no presentaban signos o síntomas de enfermedad; pero al ser habitantes de ciudades endémicas para dengue (Cali y Medellín) podrían estar infectados pero ser asintomáticos. Estas muestras fueron colectadas en 2019, periodo epidémico y se detectó DENV mediante RT-PCR nested. En 9 de las 15 muestras, se obtuvo un resultado positivo en el ensayo de RT-LAMP (fig. 19), no obstante fue indispensable el análisis en gel de agarosa dado que el cambio en el color fue muy sútil. Aunque en 14 de las 15 se observaron bandas, la amplificación inespecífica se observó sólo en 6 muestras (*).

Aunque el número de muestras analizadas es muy bajo, nos permite sugerir que el ensayo RT LAMP podría ser útil para la detección de infecciones subclínicas o inaparentes a diferencia del RT-qPCR, ensayo que fue corrido el mismo día que el LAMP, pero en la que no se detectó el virus, posiblemente debido a su baja carga viral.

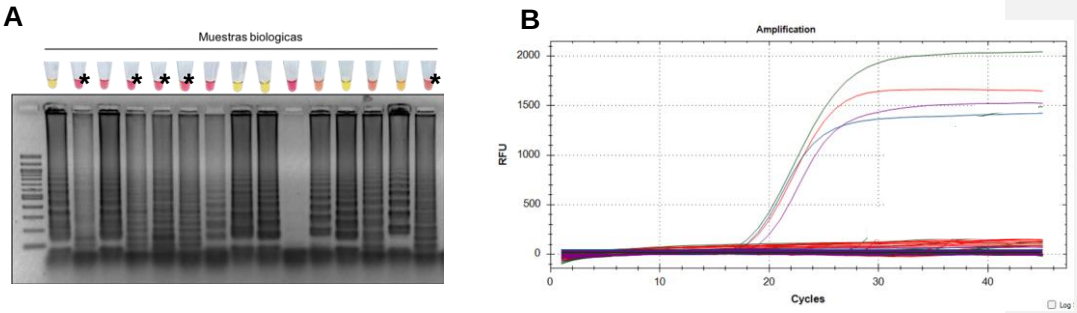


Figura 19. Detección de muestras asintomáticas positivas para DENV por diferentes métodos especifico para serotipo ***(A)****.RT-LAMP (*). Amplificación inespecífica.* ***(B)****. RT-qPCR específica de serotipo, las curvas de amplificación que se observan corresponden a los controles positivos para cada serotipo.*

8. Discusión

De las infecciones virales transmitidas por vectores, la infección por dengue sigue siendo la más importante en términos de morbi-mortalidad alrededor del mundo y en Colombia. A la semana epidemiológica 11 de 2023 (19 al 25 de marzo) se habían notificado poco más de 20.000 casos y 76 muertes asociadas a la infección, presentando un aumento significativo con respecto al mismo periodo de 2017 (207,0 %); 2018 (309,9%); 2021 (185,8 %), 2022 (109,6%) e incluso del 2019 (6%) año declarado epidémico para dengue (BES SEM 11). Para esa semana el 67,6 % , es decir 25 entidades territoriales se encontraban en situación de brote, mientras que para la semana epidemiológica 17, el 83,8 % (31) se encuentran por encima del promedio anual (BES SEM 17)

Para chikungunya al 4 de marzo de 2023 se habían notificado un total de 113 .447 casos y 51 muertes en las Américas lo que representa un aumento de cuatro veces en comparación con el mismo período de 2022. La mayor incidencia acumulada de casos de CHIKV se registró en Paraguay seguido de Brasil y Belice con 1103,4 casos, 14,2 casos y 10,4 casos por 100.000

habitantes respectivamente (OPS). En Colombia, a partir de los datos del sistema nacional de vigilancia no se evidencia esta tendencia sino una disminución del 21 % respecto al mismo periodo de 2022. A la semana epidemiológica 11, se habían notificado sólo 11 casos confirmados por clínica.

Sin embargo, es necesario notar que estas cifras corresponden a casos confirmados por clínica más no por laboratorio, que como se mencionó anteriormente no podría distinguir con exactitud entre una infección por DENV a una por CHIKV. En Colombia, sólo se hace diagnóstico de dengue y está restringido a pruebas serológicas, el uso de técnicas moleculares a pesar de presentar una mayor sensibilidad y especificidad ha estado restringido a la vigilancia e investigación. Esto debido en parte a los altos costos asociados con el personal, reactivos y equipo especializado que requieren la mayoría de pruebas moleculares.

Dentro de la búsqueda de métodos de detección que fueran rápidos, específicos, sensibles y de fácil aplicación, se encontró el sistema de amplificación isotérmica mediado por loop (LAMP), este ensayo ofrece varias ventajas como la rapidez de la reacción, lo que se traduce en cortos tiempo de entrega del resultado; facilidad de implementación, ya que solo necesita de un bloque o baño que mantenga una temperatura definida, una fácil interpretación del resultado a través del cambio de coloración o generación de una señal fluorescente. Además de su alta especificidad debido al uso de seis oligos en lugar de dos como la PCR.

Dadas la situación actual de brote por DENV para el país y de alerta por CHIKV en las Américas, este estudio planteó la implementación de un ensayo de RT-LAMP para detectar estos dos arbovirus en muestras biológicas. Dado que para los dos virus ya se habían reportado algunos protocolos con datos de sensibilidad y especificidad diferentes (Kim et al. 2018; Li et al., 2011;

López et al., 2018; Sadon et al., 2008; Saechue et al., 2020; Neeraja et al., 2015; Teoh et al., 2013; Parida et al., 2007), decidimos comenzar probando un set para cada virus, fijándonos en aquellos que habían sido probados con muestras clínicas.

Para DENV escogimos el ensayo descrito por Teoh et al., 2013, ya que con un solo set de 9 primers que reconocen la región 3´UTR del genoma se detectaron los cuatro serotipos con una sensibilidad de 100 copias/reacción mediante un ensayo RT_LAMP fluorescente. Este ensayo presentaba dos ventajas sobre otros reportados en la literatura: al ser genérico para dengue o PAN DENV sólo requería de una reacción y no de cuatro para establecer la presencia del virus y que los oligos estaban dirigidos contra una de las regiones más conservadas entre serotipos y genotipos. No obstante, en nuestro caso utilizando el sistema colorimétrico de New England Biolabs sólo se alcanzó la detección con 10000 copias/reacción. Este resultado podría ser debido a diferencias el genoma entre las cepas asiáticas y las que circulan en América, en el diseño de los oligos reportados Teo et al 2013 solo se tuvieron en cuenta 11 cepas de DENV, dentro de las cuales no estaba incluido el genotipo V de DENV1 y el genotipo asiático Americano para DENV2, genotipos que son los que han circulado en Colombia permanentemente.

Teniendo en cuenta este resultado se decidió entonces diseñar un set de primers específico para cada serotipo utilizando secuencias colombianas y las reportadas en otros países de América con los cuales se logró la detección de 100 copias/reacción para DENV 1, DENV2 y DENV 3 (Figura 14), lo que indica una ganancia en sensibilidad con respecto al ensayo reportados por Teoh et al 2013. Además, al reunir los 18 primers (6 por cada serotipo) en una misma mezcla de reacción a fin de conseguir un ensayo “pan-dengue” para reducir costos en materiales y reactivos y hacer más fácil la operación, no se perdió sensibilidad en la detección (Figura 16). La adición del set de

DENV4 no fue posible dado que causaba cambio de color inespecífico. Cabe resaltar aquí que la probabilidad de interferencias en un ensayo aumenta a medida que aumenta el número de "blancos" a detectar simultáneamente en la misma reacción (Sadon et al., 2008). Además, la amplificación puede verse afectada por un fenómeno de competencia entre los diferentes serotipos del virus cuando están presentes en la misma muestra.

Para la detección de CHIKV aunque también se han reportado varios ensayos (Lu et al., 2012; Parida et al., 2007, Goto et al. 2009) escogimos el de Saechue, et al., debido a que utilizó un método colorimétrico de detección, mientras que los demás utilizaron la detección fluorescente o por turbidez y porque el gen blanco de detección era el E1, gen en el cual están basados los métodos de detección por RT-PCR nested y el RT-qPCR. Utilizando ese set de primers con el sistema colorimétrico de NEB detectamos sólo 10.000 copias/reacción lo cual era una sensibilidad baja en comparación al RT-qPCR (fig. 9). Se decidió entonces diseñar dos conjuntos de oligos para dos genes blanco E1 y C de CHIKV basados en secuencias colombianas del virus. Con los dos sets se logró la detección de 100 copias/reacción, es decir un aumento de 100 veces con respecto a los reportados por Saechue et al.2020, además al realizar la detección de ambos genes en una sola reacción se mantuvo la sensibilidad en 100cp/r.

La utilidad de los ensayos RT-LAMP DENV 1-3 y RT-LAMP CHIKV E-C para la detección del estos virus en muestras de pacientes febril con sospecha de infección por dengue se probó con muestras colectadas en Cali y Cartagena en 2019 mostrando una sensibilidad mayor al 80% y una especificidad entre el 90 al 100%, tomando como referencia la detección por RT- PCR semianidado reportada previamente (Calvo et al., 2016), y que mostró ser más sensible que los protocolos de RT-qPCR evaluados en el laboratorio (Vanegas, 2022). El RT- PCR semianidado, ha sido probado

en diferentes tipos de muestras biológicas como sueros de habitantes de zonas endémicas sin síntomas aparentes (Castellanos et al., 2016), sueros de individuos con síndrome febril (Castellanos et al., 2021), sueros de donantes de sangre (Cáceres et al., 2020) y en diferentes especies de mosquitos como a *A. egipty y Ae albopictus* (Mantilla-Granados et al.,2022). Por su alta sensibilidad es un método de gran utilidad para detectar infecciones con baja carga viral, como muestras de donantes de sangre, en los que los protocolos de RT-qPCR fallan en detectar virus. Sin embargo, es un protocolo que lleva tiempo de procesamiento largo, dispendioso y que requiere personal debidamente entrenado y áreas de trabajo aisladas para eliminar el riesgo potencial de contaminación. Por esta razón, el ensayo de RT- LAMP implementado en este estudio puede ser una muy buena alternativa de uso, como se comprobó en muestras de individuos asintomáticos (figura 19).

Sin embargo, es importante resaltar que el cambio de coloración no es la mejor opción para detectar la amplificación dado que para algunas muestras el cambio es muy sutil, por lo cual se recomienda combinar con la electroforesis horizontal o un método cuantitativo de análisis.

9. Conclusiones

- Se estableció un ensayo de RT-LAMP con primers específicos para cada serotipo de DENV con el cual se podría serotipificar muestras confirmadas con DENV, con este protocolo se alcanza mayor sensibilidad que el que involucra primers Pan-Dengue.
- Se estableció un protocolo de RT-LAMP que permite la detección de tres serotipos de DENV en una misma reacción, con una sensibilidad analítica similar a la RT-PCR nested y RT-qPCR (100 copias/reacción).

- Se estableció un protocolo de RT-LAMP que permite la detección de los genes E y C de CHIKV en una misma reacción, con una sensibilidad analítica similar a la de otros protocolos de amplio uso para la detección de arbovirus.
- El ensayo de RT-LAMP combinado con la electroforesis horizontal, presenta una alta sensibilidad y especificidad clínica por lo cual es una prueba molecular útil para la detección de DENV y CHIKV en muestras de pacientes con sospecha de infección por dengue.
- El ensayo de RT-LAMP combinado con la electroforesis horizontal, mostró ser una buena alternativa para la detección de DENV en individuos asintomáticos.

10. Bibliografía

Alera, MT, Hermann, L., Tac-An, IA, Klungthong, C., Rutvisuttinunt, W., Manasatienkij, W., y Yoon, IK (2015). Infección por el virus Zika, Filipinas, 2012. Enfermedades infecciosas emergentes , 21 (4), 722.

Alvis-Guzmán, N., Zakzuk, J., Vargas Moranth, R., Alcocer Olaciregui, A. E., & Parra Padilla, D. (2017). Dengue, Chikungunya and Zika in Colombia 2015-2016. Rev. MVZ Córdoba 22 (Supl): 5994-6003.

Aubry, M., Teissier, A., Huart, M., Merceron, S., Van Hofwegen, J., Roche, C., Vial, A. L., Teururai, S., Sicard, S., Paulous, S., Desprès, P., Manuguerra, J. C., Mallet, H. P., Musso, D., Deparis, X., & Cao-Lormeau, V. M. (2017). Zika virus seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(4), 669-672. https://doi.org/10.3201/eid2304.161549

Beltrán-Silva, S., Chacón-Hernández, S., Moreno-Palacios, E., & Pereyra-Molina, J. (2018). Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya y Zika. *Revista Médica Del Hospital General de México, 81(3), 146–153.*

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

Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., William

Bui, T. T., Moi, M. L., Morita, K., & Hasebe, F. (2020). Development of Universal and Lineage-Specific Primer Sets for Rapid Detection of the Zika Virus (ZIKV) in Blood and Urine Samples Using One-Step Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). Japanese journal of infectious diseases, 73(2), 153–156. https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2019.073

Wint, G. R., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J., & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, *496*(7446), 504-507. https://doi.org/10.1038/nature12060

Cabezas, C., & García, P. (2017). Diagnóstico de la infección por el virus zika. *Anales de la Facultad de Medicina*, *78*(1), 89. https://doi.org/10.15381/anales.v78i1.13028

Calvert, A. E., Biggerstaff, B. J., Tanner, N. A., Lauterbach, M., & Lanciotti, R. S. (2017). Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS ONE*, *12*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185340

Calvo, E. P., Archila, E. D., López, L., & Castellanos, J. E. (2021). Reconociendo el virus del chikunguña. Biomédica, 41(2), 353-373.

Calvo, E. P., Sánchez-Quete, F., Durán, S., Sandoval, I., & Castellanos, J. E. (2016). Easy and inexpensive molecular detection of dengue, chikungunya and zika viruses in febrile patients. *Acta Tropica*, *163*, 32-37. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.07.021

Castellanos, J. E., & Coronel-Ruiz, C. (2014). Dengue disease diagnosis: A puzzle to be solved. En *Revista Facultad de Medicina* (Vol. 62, Número 4, pp. 617-629). Universidad Nacional de Colombia. https://doi.org/10.15446/revfacmed.v62n4.45593

Cervantes-Acosta, G., & Sanjuán-Vergara, H. (2016). Virus chikungunya: Características virales y evolución genética. Revista Salud Uninorte, 32(2), 292-301.

Chaudhry, M. R. A. (2019). Dengue virus infection outbreak: Comparison with other viral infection outbreak. En *Dengue Virus Disease: From Origin to Outbreak* (pp. 17-35). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818270-3.00003-5

Chien, L. J., Liao, T. L., Shu, P. Y., Huang, J. H., Gubler, D. J., & Chang, G. J. J. (2006). Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(4), 1295-1304. https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006

Cucunubá, Z. (2016). De la epidemia de Zika en Latinoamérica y la toma de decisiones bajo incertidumbre. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud, 48(2), 158-160.*

da Silva SJR, Pardee K, Pena L. 2020. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of Zika virus: A review. Viruses 12:19.

Davis, L. E., Beckham, J. D., & Tyler, K. L. (2008). North American Encephalitic Arboviruses. En *Neurologic Clinics* (Vol. 26, Número 3, pp. 727-757). https://doi.org/10.1016/j.ncl.2008.03.012

dos Reis, I. C., Gibson, G., Ayllón, T., de Medeiros Tavares, A., de Araújo, J. M. G., da Silva Monteiro, E., Rodrigues Aguiar, A., de Oliveira, J. V., de Paiva, A. A. P., Wana Bezerra Pereira, H., Dantas Monteiro, J., Sá Carvalho, M., Sabroza, P. C., & Alves Honório, N. (2019). Entomo-virological surveillance strategy for dengue, Zika and chikungunya arboviruses in field-caught Aedes mosquitoes in an endemic urban area of the Northeast of Brazil. *Acta Tropica*, *197*. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105061

García-Sastre, A., & Endy, T. (2009). Arboviruses. Encyclopedia of Microbiology . En Moselio Schaechter (Ed.), *Academic Press* (Third Edition, pp. 313-321).

Her, Z., Kam, Y. W., Lin, R. T. P., & Ng, L. F. P. (2009). Chikungunya: a bending reality. *Microbes and Infection*, *11*(14-15), 1165-1176. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.004

Instituto Nacional de Salud. (2014). *Boletín epidemiologico semana 51*. Boletin Epidemiologico Semanal. Fecha de consulta: 10 de abril de 2023. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2014 Boletin epidemiologico semana 53.pdf

Instituto Nacional de Salud. (2015). *Boletín epidemiologico semana 51*. Boletin Epidemiologico Semanal. Fecha de consulta: 10 de abril de 2023. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2015 Boletin epidemiologico Semana 52.pdf

Instituto Nacional de Salud. (2016). *Boletín epidemiologico semana 51*. Boletin Epidemiologico Semanal. Fecha de consulta: 10 de abril de 2023. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-

eventos/BoletinEpidemiologico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf

Instituto Nacional de Salud. (2017). *Boletín epidemiologico semana 51*. Boletin Epidemiologico Semanal. Fecha de consulta: 10 de abril de 2023. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2017%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052.pdf

Instituto Nacional de Salud. (2018). *Boletín epidemiologico semana 51*. Boletin Epidemiologico Semanal. Fecha de consulta: 10 de abril de 2023. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052.pdf

Instituto Nacional de Salud. (2019). *Boletín epidemiologico semana 51*. Boletín Epidemiológico Semanal. Fecha de consulta: 10 de abril de 2023. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019_Boletin_epidemiologico_semana_52.pdf

Instituto Nacional de Salud. (2021). *Boletín epidemiologico semana 51*. Boletín Epidemiológico Semanal. Fecha de consulta: 10 de abril de 2023. Disponible en:

Instituto Nacional de Salud. (2022). *Boletín epidemiologico semana 51*. Boletín Epidemiológico Semanal. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2022_Bolet%C3%ADn_epidemiologico_semana_51.pdf

Instituto Nacional de Salud. (2023). *Boletín epidemiologico semana 13*. Boletín Epidemiológico Semanal. Fecha de consulta: 10 de abril de 2023. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2023_Bolet%C3%ADn_epidemiologico_semana_13.pdf

Kuno, G. (2003). Serodiagnóstico de infecciones flavivirus y vacunas en humanos. Avances en la investigación de virus , 61 , 3-66.

Kim, J. G., Baek, S. H., Kim, S., Kim, H. I., Lee, S. W., Kailasa, S. K., & Park, T. J. (2018). Rapid discriminative detection of dengue viruses via loop mediated isothermal amplification. Talanta, 190, 391-396.

Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J., Vorndam, A.V., 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30 (3), 545–551.

Lanciotti, R.S., Kosoy, O.L., Laven, J.J., Velez, J.O., Lambert, A.J., Johnson, A.J.,Stanfield, S.M., Duffy, M.R., 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State Micronesia, 2007. Emerg. Infect. Dis. 14 (8), 1232–1239.

Li S, Fang M, Zhou B, Ni H, Shen Q, Zhang H, Han Y, Yin J, Chang W, Xu G, Cao G: Simultaneous detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4, Japanese encephalitis virus, and West Nile virus by a combined reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. Virol J 2011, 8:360.

Lopez-Jimena B, Wehner S, Harold G, Bakheit M, Frischmann S, Bekaert M, Faye O, Sall AA, Weidmann M. 2018. Development of a single-tube one-step RT LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. PLoS Negl Trop Dis 12:e0006448.

Mayer, S. v., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. En *Acta Tropica* (Vol. 166, pp. 155-163). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.020

Miner, J. J., Cao, B., Govero, J., Smith, A. M., Fernandez, E., Cabrera, O. H., Garber, C., Noll, M., Klein, R. S., Noguchi, K. K., Mysorekar, I. U., & Diamond, M. S. (2016). Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*, *165*(5), 1081-1091. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.008

Neeraja, M., Lakshmi, V., Lavanya, V., Priyanka, E. N., Parida, M. M., Dash, P. K., Sharma, S., Rao, P. V., & Reddy, G. (2015). Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by NS1 specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay in patients presenting to a tertiary care hospital in Hyderabad, India. Journal of virological methods, 211, 22–31. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.10.005

Negroni, M., & Gonzales, I. (2017). *VIRUS: GENERALIDADES Y Contenidos*. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2022.Disponible en:https://ccie.com.mx/wp-content/uploads/2020/04/97895005

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., & Amino, N. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*.

Organización Panamericana de la Salud. (2011). *Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas*. OPS. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2022. Disponible en: https://www.paho.org/es/documentos/preparacion-respuesta-ante-eventual-introduccion-virus-chikungunya-americas-2011

Organización Panamericana de la Salud. (2023). Alerta Epidemiológica: Aumento de chikunguña en la Región de las Américas. OPS. Fecha de consulta: 16 de mayo de 2023. Disponible en: https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-aumento-chikunguna-region-americas

Parida, M. M., Santhosh, S. R., Dash, P. K., Tripathi, N. K., Lakshmi, V., Mamidi, N., Shrivastva, A., Gupta, N., Saxena, P., Babu, J. P., Rao, P. V., & Morita, K. (2007). Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. Journal of clinical microbiology, 45(2), 351–357. https://doi.org/10.1128/JCM.01734-06

Pastorino, B., Bessaud, M., Grandadam, M., Murri, S., Tolou, H.J., Peyrefitte, C.N., (2005). Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. J. Virol. Methods 124 (1-2), 65–71.

Ramos-Castañeda, J., Barreto dos Santos, F., Martínez-Vega, R., Galvão de Araujo, J. M., Joint, G., & Sarti, E. (2017). Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005224

Restrepo BN, Arboleda M, Marín K, Romero P, Muñoz Al, & Bosch I. (2020). *Importancia de las características clínicas y de laboratorio en el diagnóstico de co-infección por dengue y chikungunya: reporte de caso probable*.

Rico-Mendoza, A., Alexandra, P. R., Chang, A., Encinales, L., & Lynch, R. (2019). Co-circulation of dengue, chikungunya, and Zika viruses in Colombia from 2008 to 2018. Revista Panamericana de Salud Pública, 43.

Saechue, B., Kamiyama, N., Wang, Y., Fukuda, C., Watanabe, K., Soga, Y., Goto, M., Dewayani, A., Ariki, S., Hirose, H., Ozaka, S., Sachi, N., Hidano, S., Faisal, K., Chowdhury, R., Anik Ashfaq Khan, M., Hossain, F., Ghosh, P., Shirin, T., … Kobayashi, T. (2020). Development of a portable reverse transcription loop-mediated isothermal amplification system to detect the E1 region of Chikungunya virus in a cost-effective manner. *Genes to Cells*, *25*(9), 615-625. https://doi.org/10.1111/gtc.12797

Sahni, A. K., Grover, N., Sharma, A., Khan, I. D., & Kishore, J. (2013). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for diagnosis of dengue. Medical journal, Armed Forces India, 69(3), 246–253. https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2012.07.017

fueron detectados en la dilución que contenía 100 copias por reacción,

Sánchez, E., Maritza, N., Aguirre, Arce, Mayra, Toro, Vilela, & Rodrigo. (2014). *Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nuclecios en el diagnostico clínico*.

Sadon, N., Delers, A., Jarman, RG, Klungthong, C., Nisalak, A., Gibbons, RV y Vassilev, V. (2008). Un nuevo método cuantitativo de RT-PCR para la detección sensible del virus del dengue en muestras de suero. Diario de métodos virológicos , 153 (1), 1-6.

Teoh, B. T., Sam, S. S., Tan, K. K., Johari, J., Danlami, M. B., Hooi, P. S., Md-Esa, R., & AbuBakar, S. (2013). Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *BMC Infectious Diseases*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-387

Thuy, B., Ling, M., Morita, K., & Hasebe, F. (2020). *Development of Universal and Lineage-Specific Primer Sets for Rapid Detection of the Zika Virus (ZIKV) in Blood and Urine Samples Using One-Step Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)*.

Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). *Virus del dengue: estructura y ciclo viral Dengue virus: structure and viral cycle* (Vol. 15, Número 1).

Waggoner, J. J., & Pinsky, B. A. (2016). Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat. Journal of clinical microbiology, 54(4), 860-867.*t*.

11. Anexos

DENV			
Muestra	**RT-PCR Semianidada**	**RT-qPCR (Ct)**	**RT-LAMP**
26 10594	1	24,13	1
CAR 04-2021	1	0	0
CAR 07-2021	1	0	1
CAR 109-2019	0	0	0
CAR 110-2019	0	0	0
CAR 111-2021	1	0	1
CAR 112-2019	0	0	0
CAR 114-2019	1	23,67	1
CAR 118-2019	0	0	0
CAR 120 DG	1	32,52	1
CAR 120-2019	0	0	0
CAR 125-2019	0	0	1
CAR 127-2021	1	0	1
CAR 132-2019	0	0	0
CAR 136-2019	0	0	0
CAR 138-2021	1	29,34	1
CAR 140-2019	0	0	0
CAR 142-2021	1	24,71	1
CAR 143-2019	1	28.21	1
CAR 144-2019	1	31,58	1
CAR 15-2021	1	38,6	1

CHIKV			
Muestra	**RT-PCR Semianidada**	**RT-qPCR (Ct)**	**RT-LAMP**
CLA-187	0	0	0
CLA-188	0	0	0
CLA-192	1	0	1
CLA-195	0	0	0
CLA-199	1	0	1
CLA-200	0	0	0
CLA-201	1	0	1
CLA-210	1	0	1
CLA-211	1	0	1
CLA-212	1	0	1
CLA-213	1	0	1
CLA-214	1	0	1
CLA-215	1	0	1
CLA-216	1	0	1
CLA-217	1	0	1
CLA-219	1	0	1
CLA-221	0	0	0
CLA-222	1	0	1
CLA-223	1	0	1
CLA-224	1	0	1
CLA-225	0	0	1

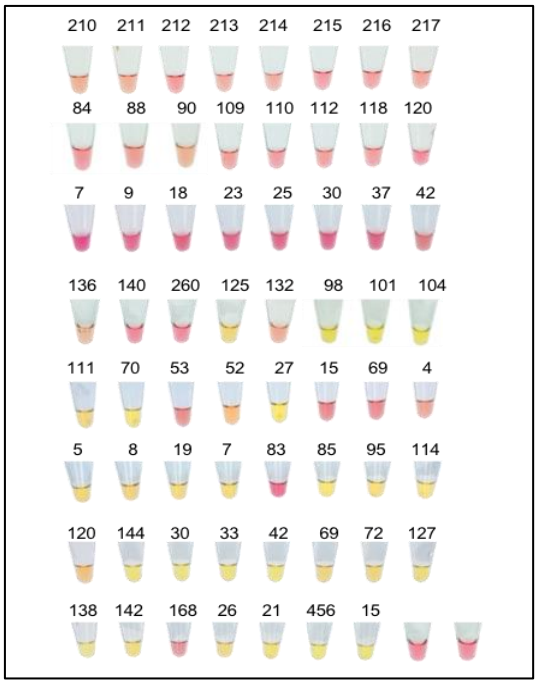
CAR 168-2021	1	32,15	0
CAR 21-2021	1	0	1
CAR 30-2021	1	0	1
CAR 33-2021	1	0	1
CAR 42-2021	1	0	1
CAR 456-2021	1	33,24	1
CAR 5-2019	1	28,37	1
CAR 57-2021	1	35,11	1
CAR 58-2021	1	34,58	1
CAR 69-2019	1	28,47	0
CAR 69-2021	1	0	1
CAR 70-2021	1	33,1	1
CAR 72-2021	1	34,11	1
CAR 8-2019	1	33,16	1
CAR 83-2019	1	31,29	0
CAR 84-2019	0	0	0
CAR 85-2019	1	26,51	1
CAR 88-2019	0	0	0
CAR 90-2019	0	0	0
CAR 95-2019	1	32,99	1
CLA-210	0	0	0
CAR 7-2019	0	0	0
CAR 9-2019	0	0	0
CAR 18-2019	0	0	0
CAR 23-2019	0	0	0
CAR 25-2019	0	0	0
CAR 30-2019	0	0	0
CAR 7-2019	0	0	0
CAR 37-2019	0	0	0

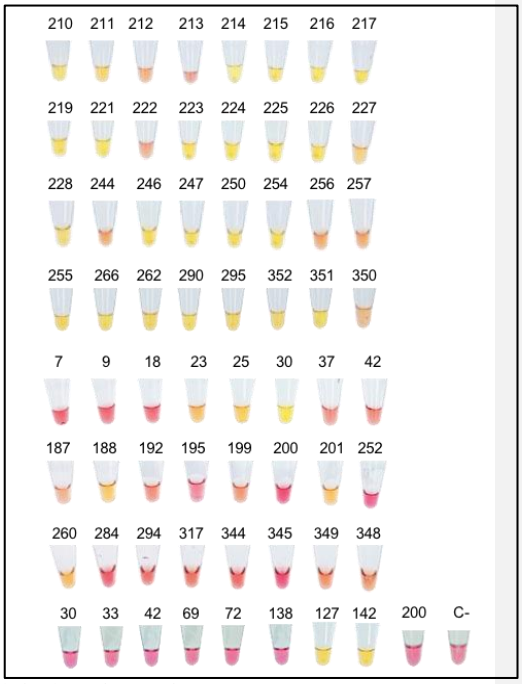
CLA-226	1	0	1
CLA-227	1	0	1
CLA-228	1	0	1
CLA-244	1	24,83	1
CLA-246	1	28,01	1
CLA-247	1	35,66	1
CLA-250	1	21,60	1
CLA-252	1	0	1
CLA-255	1	0	1
CLA-256	1	15,95	1
CLA-257	1	25,00	1
CLA-260	1	0	1
CLA-262	1	21,98	1
CLA-266	1	0	1
CLA-284	1	0	1
CLA-290	1	20,20	1
CLA-294	1	0	1
CLA-295	1	0	1
CLA-317	0	0	0
CLA-344	0	0	0
CLA-345	0	0	0
CLA-348	0	0	1
CLA-349	1	0	1
CLA-350	1	0	1
CLA-351	1	0	1
CLA-352	0	0	1
CLA-354	1	0	1
CAR 30-2021	0	0	1
CAR 33-2021	0	0	0

CAR 42-2019	0	0	0
CLA-211	0	0	0
CLA-212	0	0	0
CLA-213	0	0	0
CLA-214	0	0	0
CLA-215	0	0	0
CLA-216	0	0	0
CLA-217	0	0	0
CLA-260	0	0	0
CAR 98 2021	1	28,37	1
CAR 101 2021	1	31,52	1
CAR 2021 104	1	35,48	1
CAR 518 2021	0	0	0
CAR 536 2021	0	0	0
CAR 539- 2021	0	0	0

CAR 42-2021	0	0	0
CAR 69-2021	0	0	0
CAR 72-2021	0	34,32	0
CAR 127-2021	0	36,22	1
CAR 138-2021	0	0	0
CAR 142-2021	0	34,11	1
CAR 143-2019	0	0	0
CAR 7-2019	0	0	0
CAR 9-2019	0	0	0
CAR 18-2019	0	0	0
CAR 23-2019	0	0	1
CAR 25-2019	0	0	0
CAR 30-2019	0	0	0
CAR 37-2019	0	0	0
CAR 42-2019	0	0	0

Anexo 1. Compilado de muestras biologicas detectadas por los tres metodos usados provenientes de Cali y Cartagena. (A) Muestras detectadas para DENV. (B) Muestras detectadas para CHIKV.





Anexo 2. Compilado de muestras biológicas detectadas por RT-LAMP.