Bogotá D.C., 18 de octubre de 2020

Profesor
Edgar Palacios Ortega
Secretario Académico
Facultad de Ciencias
Universidad El Bosque

Asunto: Informe de Actividades

Apreciado profesor Palacios, reciba un cordial saludo.

En calidad de tutora, me permito informar que el estudiante Oscar Leonardo Vanegas Moncada identificado con cédula de ciudadanía Nº 1032494908 del Programa de Biología, ha venido trabajando en las actividades acordadas para desarrollar durante este semestre. El estudiante realizó la revisión bibliográfica de dos temas específicos relacionados con su trabajo de grado:

-Virus Dengue (DENV): generalidades como estructura, ciclo de replicación y epidemiología.

-Signos - Síntomas y Métodos de Diagnóstico de DENV.

Luego de la revisión escribió la primera versión del proyecto de trabajo de grado, en el que demostró su capacidad para revisar artículos científicos, extraer información y plasmarla en un documento escrito. Mi calificación para este corte es de 4.0; teniendo en cuenta el trabajo juicioso y autónomo que ha realizado el estudiante en estos meses y que, a este primer documento, aún le falta un poco más de trabajo y deber ser modificado y actualizado, durante el segundo corte académico para que cumpla con los requisitos de calidad (precisión de la información y claridad en la estructura) necesarios para ser presentado como proyecto ante la facultad.

Cordialmente,

Eliana Patricia Calvo T. PhD
Profesor Titular
Grupo de Virología

Bogotá D.C., 11 de diciembre de 2020

Profesor
Edgar Palacios Ortega
Secretario Académico
Facultad de Ciencias
Universidad El Bosque

Asunto: Informe de Actividades

Apreciado profesor Palacios, reciba un cordial saludo.

En calidad de tutora, me permito informar que el estudiante Oscar Leonardo Vanegas Moncada identificado con cédula de ciudadanía Nº 1032494908 del Programa de Biología, ha venido trabajando en las actividades acordadas para desarrollar durante este semestre.

Mi calificación para este corte es de 3.0; teniendo en cuenta el trabajo que ha realizado el estudiante en estos meses; el documento que se entrega fue enviado hasta anoche, le falta trabajo, deber ser modificado, actualizado y reestructurado para que cumpla con los requisitos de calidad necesarios para ser presentado como proyecto ante la facultad.

No he aceptado el presente documento como proyecto final del estudiante.

Cordialmente,
Eliana Calvo T
Eliana Patricia Calvo T. PhD

Profesor Titular

Grupo de Virología

Implementación de un protocolo para la detección de virus dengue por RT-qPCR en muestras biológicas.

Vanegas Moncada Oscar Leonardo

Directora: Calvo Tapiero Eliana Patricia

Grupo de Virología.

Vicerrectoría de investigaciones

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias.

Programa de Biología

Bogotá D.C. junio de 2022

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN **6**
ABSTRACT **7**
MARCO DE REFERENCIA **8**
Epidemiología 8
El Virus Dengue 9
Diagnóstico 10
Pruebas Moleculares 11
Dengue en Colombia 11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA **13**
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN **14**
OBJETIVOS **14**
Objetivo General 14
Objetivos Específicos 14
MATERIALES Y METODOS **15**
Área de Estudio 15
Muestras 15
Procedimientos 15
-Extracción de ARN Viral a partir de muestras líquidas 15
-Extracción de ARN de mosquitos 16
-Cuantificación de ARN 17
-Detección de DENV por RT-PCR anidada. 17
-Detección de DENV por RT-qPCR 18
-Controles de ARN 20
-Controles de ADN Plasmídico 20
-Construcción de las curvas de calibración 21
RESULTADOS **22**
Estandarizar tres protocolos para la detección específica de ARN viral de DENV por RT-qPCR multiplex 22
..... **27**
Determinar la eficiencia y sensibilidad de cada protocolo para detectar los cuatro serotipos de virus dengue. **28**

Determinación de la sensibilidad analítica del protocolo de RT-PCR semianidado..... 36

Evaluar la utilidad del protocolo de RT-qPCR para detectar virus dengue en muestras biológicas. 38

-Se estandarizaron tres protocolos para la detección de virus dengue por RT-PCR en tiempo real. El protocolo que incluye el gen de Cápside así como el que incluye el fragmento 3´UTR permiten detectar el virus pero sin distinción de serotipo; mientras que el protocolo múltiplex permite tanto la detección como la serotipificación. 45

REFERENCIAS..... 46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 . Métodos virológicos y serológicos para confirmar infección por virus Dengue. 10
Figura 2 Casos reportados de DENV en los últimos 10 años..... 12
Figura 3 Mapa de plantillas: para los plásmidos CDZ y DENV 1-4..... 21
Figura 4 Representación esquemática del genoma de DENV..... 23
Figura 5 Definición de la concentración óptima de oligos y sonda para el reconocimiento del gen C..... 23
Figura 6 . Definición de la concentración óptima de oligos y sonda para el reconocimiento de la región UTR. 24
Figura 7 Dteccion del gen C y el fragmento UTR en ARN obtenido de los cuatro seritpos de DENV en las condiciones establecidad 25
Figura 8 Definición de la concentración óptima de oligos y sonda para el reconomiento específico de cada serotipo..... 26
Figura 9 Detección del gen NS1,E y M en ARN obtenido de los cuatro serotipos del DENV 27
Figura 10 Detección simultánea de los cuatro serotipos de DENV. 27
Figura 11 Curva de Calibración para DENV C. 28
Figura 12 Curvas de Calibración específica de serotipo. 30
Figura 13 Detección de DNEV 1 con los tres protcolos de RT-Qpcr utilizando diluciones seriadas de ARN viral..... 32
Figura 14 Detección de DENV2 con los tres protocolos de RT-qPCR utilizando diluciones seriadas de ARN viral. 33
Figura 15 Dtección de DENV3 con los tres protcolos de RT-qPCR utilizando diluciones seriadas de ARN viral..... 34
Figura 16 Detección de DENV4 con los tres protocolos de RT-qPCR utilizando diluciones seriadas de ARN viral..... 35
Figura 17 Detección de DENV por RT-PCR semianidada 38
Figura 18 .A Detección de DENV por RT-qPCR en muestras de donantes de sangre. 39
Figura 19 Detección de DENV por RT-qPCR anidada en muestras de mosquitos..... 40
Figura 20 Detección de DENV por RT-PCR anidada en mosquitos..... 41

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Secuencias de primers para detección de arbovirus por RT-PCR anidada 18
Tabla 2 Secuencias de primers y sondas para detección de DENV por RT-qPCR 19
Tabla 3 Construcción de curva de calibración 22
Tabla 4 Resultados obtenidos de la curva de calibración 29
Tabla 5 Comparación de los valores de Ct obtenidos con los tres métodos de detección de DENV para cada serotipo 36

RESUMEN

El dengue es una enfermedad tropical causada por un virus perteneciente a la familia Flaviviridae, es transmitido principalmente por artrópodos hematófagos especialmente por la picadura de mosquitos hembra de la especie *Aedes aegypti;* este virus presenta cuatro serotipos que causan desde una enfermedad asintomática, síntomas similares a una gripe, hasta hemorragias, falla sistémica y muerte. En Colombia, el principal método de detección molecular del virus en muestras biológicas es la PCR convencional o semianidada; dado que el país en la actualidad tiene una mayor capacidad en infraestructura y personal calificado para realizar pruebas de PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR) en este estudio se evaluó el desempeño de tres protocolos reportados de RT-qPCR en la literatura. Uno tiene como blanco de detección el gen de cápside, otro el extremo 3´no traducible y el tercero un fragmento específico de cada serotipo. Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación para cada protocolo, se estableció la eficiencia de la reacción y la sensibilidad analítica de cada ensayo. Los resultados demostraron que el protocolo multiplex, que permite la serotipificación, es el que presenta mayor sensibilidad y por tanto fue utilizado para la detección del virus en muestras provenientes de donantes de sangre y mosquitos *Ae. aegypti* recolectados en campo. La comparación de los resultados obtenidos con RT-qPCR contra el método tradicional de RT-PCR anidada, nos permite sugerir que este último permite identificar muestras con cargas virales más bajas, por lo cual sería el indicado para definir infección infección por virus dengue.

Palabras clave: Dengue, serotipo, RT-qPCR, detección.

ABSTRACT

Dengue is a tropical disease caused by the dengue virus belonging to the Flaviviridae family. It is transmitted mainly by hematophagous arthropods, especially by the bite of female mosquitoes of the *Aedes aegypti* species. The four serotypes cause since asymptomatic disease, flu-like symptoms, to hemorrhages, systemic failure, and death. In Colombia, the main method of molecular detection of the virus in biological samples is conventional or semi-nested PCR; given that the country currently has a greater capacity in infrastructure and qualified personnel to perform quantitative or real-time PCR (qPCR) tests, this study evaluated the performance of three reported RT-qPCR protocols.

In the first one, the target is the capsid gene; in the second one, the 3' non-translated end and in the third a specific fragment for each serotype. Once the amplification conditions for each protocol were standardized, the reaction efficiency and analytical sensitivity were established. The results showed that the multiplex protocol, which allows serotyping, is the one with the greatest sensitivity and was therefore used for viral detection in samples from blood donors and mosquitoes collected in the field. The comparison between RT-qPCR results and nested RT-PCR results showed that the latter identify samples with lower viral loads, so it would be indicated to define infection by dengue virus.

Keywords: Dengue, serotype, RT-qPCR, detection

MARCO DE REFERENCIA

La fiebre del dengue es considerada actualmente, como la infección de origen viral más importante transmitida por insectos. El virus dengue (DENV) es el agente etiológico del dengue y es transmitido por la picadura de mosquitos del género *Aedes aegypti* principalmente (Wilder *et al.* 2016). La infección puede cursar de forma asintomática subclínica o inaparente hasta en el 75% de los casos, mientras que el cuadro clínico varía desde leve denominado también dengue sin signos de alarma (DSSA), caracterizado por fiebre, dolor muscular de intensidad moderada náuseas, vómito, erupciones cutáneas. Dengue con signos de alarma (DCSA) como sangrado de mucosas, intenso dolor abdominal, vómito persistente y trombocitopenia entre otras; hasta Dengue grave (DG) caracterizado por hemorragias severas y falla sistémica que puede desencadenar en la muerte (World Health Organization, 2009).

Epidemiología

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO), se estima que ocurren entre 100 y 400 millones de infecciones de dengue cada año; de los cuales unos 500.000 evolucionan a dengue grave y 20.000 llegan a ser fatales (WHO). En 2010, 2013, 2016 y 2019 los casos de dengue reportados en las Américas mostraron un aumento alarmante pasando de 1.648.569 casos en 2010 a 3.190.778 en 2019. Los países más afectados del continente fueron Brasil, México, Nicaragua, Honduras y Colombia con 2 248 570, 268.450, 186.173 y 132.143 casos reportados y 1773 muertes asociadas a la infección. Hasta el primero de diciembre de 2021 se han reportado 1.130.661 casos en las Américas; Colombia, luego de Brasil y Perú es el tercer país con mayor número de notificaciones (PLISA; OPS; OMS 2021).

Durante 2019 se reportó el mayor número casos de toda la historia a nivel mundial; siendo el Sudeste Asiático y las Américas las regiones con mayor afectación. En Asia, Filipinas y Viet Nam, presentaron los mayores reportes con 420 000 y 320 000 casos respectivamente (PAHO 2019).

El Virus Dengue

ES un flavivirus de la familia Flaviviridae, presenta cuatro serotipos DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4 antigénicamente diferentes que pueden co-circular y causar infecciones con diversos grados de severidad (Kurane, I., & Takasaki, T. 2001).

Es un virus envuelto de aproximadamente 40-50 nm, está compuesto por una membrana lipídica que se obtiene de las células del huésped en donde se insertan las proteínas de membrana (M) y envoltura (E). En el interior contiene un complejo riboprotéico constituido por proteínas de cápside (C) y por el genoma viral que consiste en una hebra de ARN de sentido positivo. El genoma codifica un único polipéptido que comprende de proteínas estructurales (C, prM y E) y las proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A y NS5) estas últimas encargadas de la replicación del ARN viral (Velandia M. L., & Castellanos J. E. 2011).

El genoma de los cuatro serotipos presenta una similaridad de 65–70 % y una identidad del 40% a nivel de nucleótidos

Diagnóstico

La infección por DENV se confirma mediante métodos virológicos como la detección de la proteína no estructural 1 (NS1) que es secretada al plasma, detección del ARN viral, o por aislamiento del virus en células susceptibles a la infección. Pruebas que se deben realizar en la fase febril, virémica o aguda de la infección (Figura 1). O por métodos serológicos, que detectan una respuesta inmunológica específica como anticuerpos IgM en la fase aguda y anticuerpos IgG en la fase convaleciente. (Castellanos JE; Coronel-Ruiz C.2013).

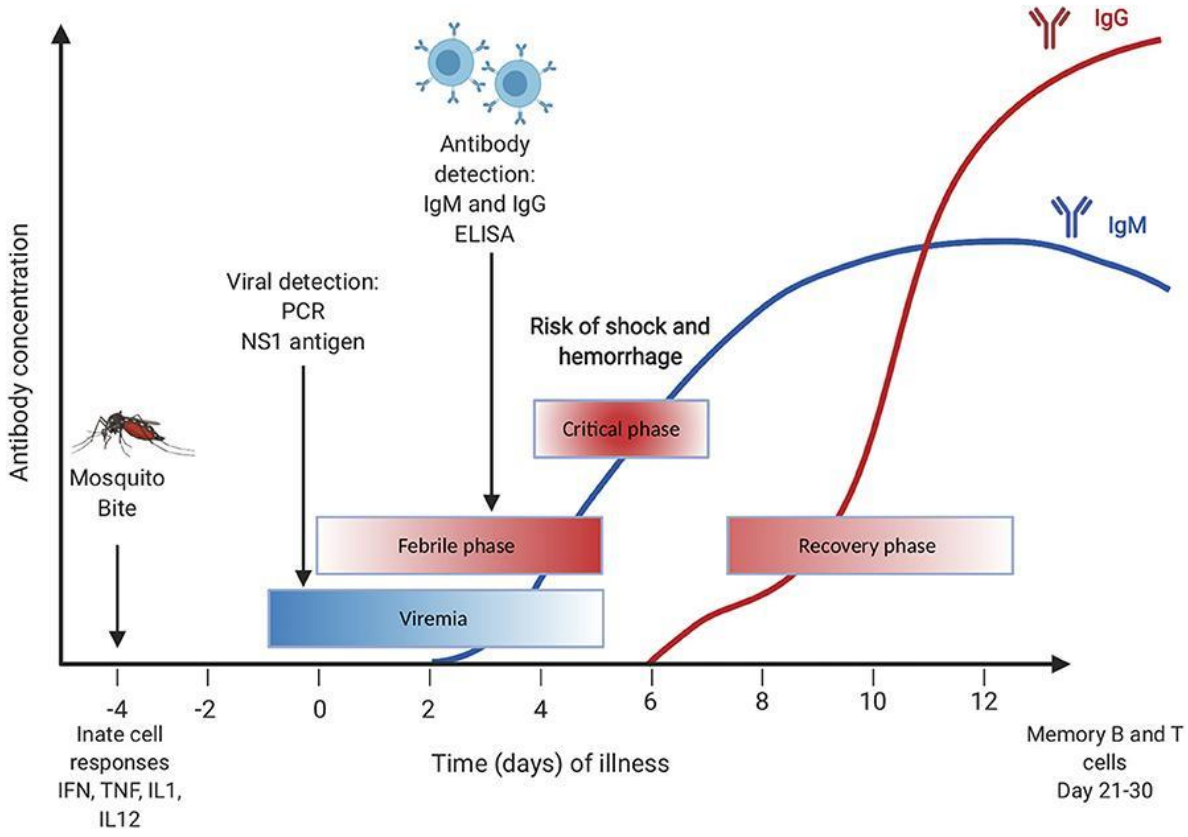

Figura 1 . Métodos virológicos y serológicos para confirmar infección por virus Dengue.

Pruebas Moleculares

Las pruebas moleculares se han aplicado con éxito en el diagnóstico de enfermedades infecciosas como las provocadas por SARS CoV2 ya que presentan ventajas como una mayor sensibilidad y especificidad frente a las pruebas serológicas. Para DENV se llevan a cabo a partir ARN obtenido de muestras de sangre, suero, plasma o tejidos, consisten en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un blanco específico en el genoma, luego de la síntesis de ADN complementario (ADNc) por acción de una transcriptasa reversa (RT). El protocolo de uso más frecuente en Colombia fue descrito por Lanciotti y colaboradores (1992) y modificado por Chien y colaboradores (2006), que consiste en una primera ronda de RT-PCR con oligos que reconocen la región C-PreM de cualquier serotipo de DENV y amplifican un fragmento de 511 pb. Seguida por una segunda ronda de PCR utilizando el amplicon de 511 pb como plantilla y primers específicos para cada uno de los serotipos. Cada serotipo da lugar a un producto de tamaño específico que permite diferenciarlos luego de electroforesis en gel de agarosa.

Aunque se han publicado varios protocolos de detección por RT-qPCR o PCR cuantitativo o en tiempo real (Usme-Ciro. Et al, 2012; Santiago GA et al, 2013; CDC, 2013), su uso en Colombia ha sido limitado, dado que requiere de equipamiento y personal especializado; lo que aumenta los costos y limita su uso a laboratorios en las grandes ciudades.

Dengue en Colombia

Colombia es uno de los países más afectados a nivel latinoamericano, desde el primer caso reportado en 1971, diversos factores como el crecimiento demográfico, variaciones ambientales presentes en las temporadas que presenta el país y la falta de control de los vectores *Aedes aegypti* y *Aedes albopictu*, A partir de 1970 los casos de contagio aumentaron

gradualmente presentando reportes que oscilan entre los 6.760 hasta los 36.825 casos, en los últimos 20 años se reportaron brotes importantes como en el 2010 del cual ha sido el mayor pico de contagios reportados pasando de 44.412 a 147,670 casos. Estos contagios de Dengue leve o Dengue clásico según SIVIGILA se presentaron en el grupo de edades de 15 a 45 años.

El 90% de la población infectada con el virus no presentan síntomas; en cuanto a la letalidad del virus en Colombia en los últimos reportes no representa más del 1% por año, en el 2010 un 0,141% que equivalen a 223 muertes, en el 2013 un 0,28% con 352 muertes y para el 2019 se reportaron 261 muertes las cuales representan el 0,204%.

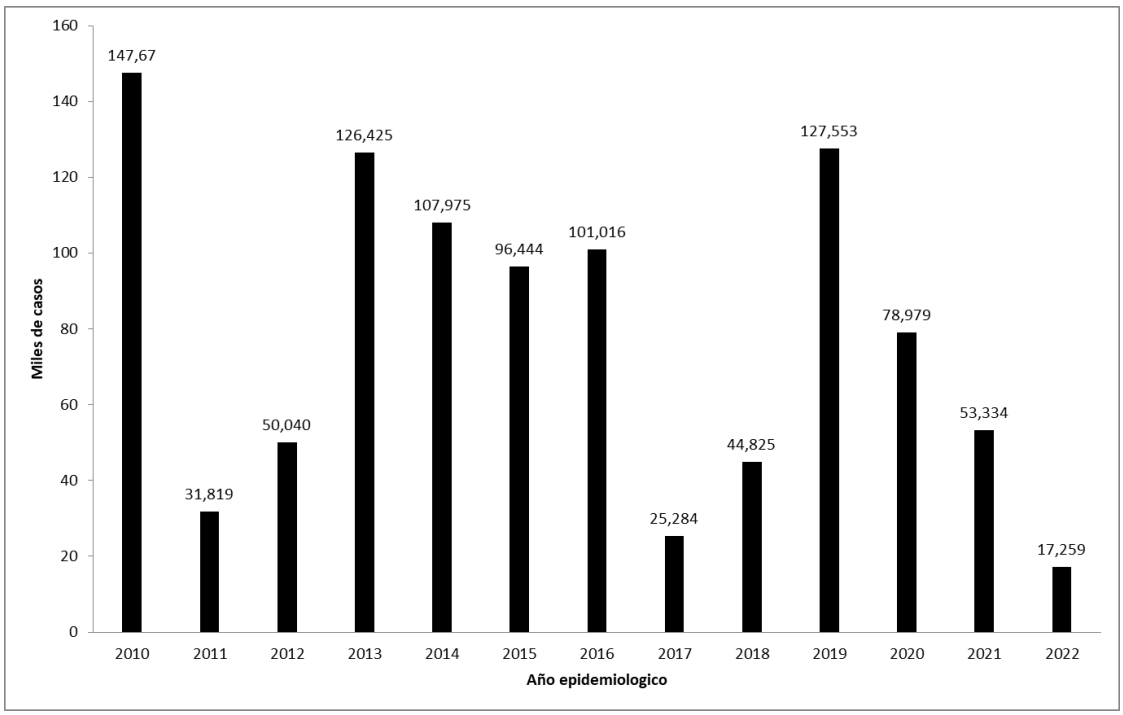

Figura 2 Casos reportados de DENV en los últimos 10 años

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los arbovirus son virus transmitidos por artrópodos hematófagos los cuales causan infecciones con cuadros febriles inespecíficos que constituyen uno de los principales problemas de salud pública en las regiones tropicales y subtropicales del planeta. En América y el Caribe, el virus dengue (DENV) que circula desde los años 80 y los virus chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV) introducidos en 2013 y 2014 respectivamente, han sido los arbovirus de mayor impacto en la salud en la última década (Bhatt S, et al, 2013).

Los tres son transmitidos por la picadura de mosquitos del género *Aedes aegypti y Ae. albopictus* principalmente, lo que hace posible su co-circulación y por ende la infección con más de un arbovirus (PAHO, 2020). Los síntomas típicos de la infección en la fase aguda incluyen fiebre, dolor de cabeza, dolor muscular, articular y erupciones cutáneas, entre otras, razón por la cual no es posible distinguir entre una y otra únicamente mediante la evaluación clínica. Dado que el curso de la enfermedad es diferente, siendo la infección por DENV la que puede causar cuadros clínicos más graves que pueden ocasionar la muerte; que la infección con CHIKV puede desencadenar en un síndrome de reumatismo crónico post CHIKV; y que la infección con ZIKV puede producir complicaciones neurológicas y anomalías congénitas como microcefalia (PAHO, 2020), se requieren de métodos de detección que permitan establecer de forma precisa y oportuna el agente causante de la infección.

Dado que en los últimos dos años la detección de genoma viral mediante RT-qPCR (cuantitativa o en tiempo real) se ha establecido como la prueba gold estándar para el diagnóstico de SARS CoV2, y que gracias a ello el país hoy en día cuenta con una mejor infraestructura y capacidad operativa para realizar pruebas de detección molecular de ese tipo

y que el virus dengue sigue siendo el de mayor tasa de incidencia en Colombia ; en el presente trabajo se implementaron tres protocolos de detección DENV por RT-qPCR. Esto con el fin de establecer (a corto plazo) un protocolo de detección simultánea de DENV; CHIKV y ZIKV que sea transferible a laboratorios de ciudades en zonas endémicas, y contribuya a mejorar 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.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál de los tres protocolos implementados para la detección de Virus Dengue es el más eficaz y podría ser utilizado en formato multiplex, para la detección simultánea de este junto con los virus de chikungunya y zika?

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer un protocolo para la detección de virus dengue por RT-qPCR en muestras biológicas.

Objetivos Específicos

1. Estandarizar tres protocolos para la detección específica de ARN viral de DENV por RT-qPCR multiplex
2. Determinar características operativas de las pruebas de RT-qPCR como eficiencia, sensibilidad y rango lineal.
3. Determinar la sensibilidad de la RT-PCR semi-anidada para cada uno de los cuatro serotipos

4. Evaluar la utilidad del protocolo de RT-qPCR para detectar virus dengue en muestras biológicas.

MATERIALES Y METODOS

Área de Estudio

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

Muestras

-Sueros provenientes 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.

-Mosquitos *Aedes aegipty* o *Ae. albopictus* colectados en el marco del proyecto "Evaluación entomológica de los vectores de fiebre amarilla y su infección natural en zona urbana y rural del municipio de la Macarena (Meta)" PCI-2018-10153.

Procedimientos

-Extracción de ARN Viral a partir de muestras líquidas

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 micro centrifuga 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 adicionó 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.

-Extracción de ARN de mosquitos

Cada pool o grupo de mosquitos fue macerado con pistilos en 500µl de Trizol (Invitrogen) y homogenizando con vortex, se añadieron 100µl de cloroformo se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 15 minutos a 4°C por 12000 rpm con el fin de separar dos fases: la acuosa que contiene el ARN, una interfase de proteínas de color blanco y la fase orgánica de color rosado. Luego de transferir la fase acuosa a un tubo nuevo se añadió 250µl de isopropanol, se homogenizó e incubo por 15 min para permitir la precipitación del ARN. Luego de centrifugación a 12000 rpm a 4°C durante 10 minutos, el sobrenadante fue eliminado y el ARN en el precipitado se lavó con 500µl de etanol al 75%, se recuperó por centrifugación 7500 rpm a 4°C durante 6 minutos, se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos para eliminar restos de etanol, y finalmente se resuspendió en 30µl de agua libre de nucleasas (ADNasas y ARNasas). El ARN obtenido se cuantificó y procesó inmediatamente para RT-qPCR, finalmente se almacenó a -80°C.

-Cuantificación de ARN

La calidad y concentración del ARN obtenido de los mosquitos fueron evaluadas con un nanoespectrofotometro de referencia IMPLEN, utilizando 2µl de la muestra y las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. Las muestras se normalizaron a 80ng/ml aplicando la fórmula de C1*V1=C2*V2 antes de proceder con el RT-PCR, reacción donde se utilizan 5 microL de RNA o lo equivalente a 400 ng como plantilla.

-Detección de DENV por RT-PCR anidada.

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

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, especificados en la tabla 1. Bajo el siguiente perfil de amplificación: 15 min a 55°C; 3 min a 95°C y 30 ciclos de desnaturación 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 -Serotipificación se llevó a cabo en 15 microL de reacción con el sistema sistema GoTaq (Promega), 2 microL del amplicón como plantilla, 2mM de MgCl2, 0.2mM de dNTPs y 0.2 mM de oligos específicos para cada serotipo, especificados en tabla 1. 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 1 Secuencias de primers para detección de arbovirus por RT-PCR anidada

	RT-PCR Primera Ronda Detección	**Amplicon (pb)**
DENV	D_1 AGTTGTTAGTCTRYGTGGACCG AC	511
	D_2 TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	
	PCR Segunda Ronda – Serotipificación	
DENV	D1 AGTTGTTAGTCTRYGTGGACCGAC	
	TS1 CCCGTAACACTTTGATCGC	211
	TS2 CGCCACAAGGGCCATGAACAGTTT	119
	TS3 TAACATCATCATGAGACAGAGC	288
	TS4 TTCTCCCGTTCAGGATGTTC	266

-Detección de DENV por RT-qPCR

Se estandarizaron las condiciones de amplificación para tres protocolos de detección por RT-PCR en tiempo real en el formato múltiplex

La detección de un fragmento en el gen de Cápside (C) y la detección de un fragmento en la región 3´ no traducida o 3´UTR (Warrilow et al., 2002) permiten detectar cualquier serotipo del virus en una reacción múltiplex con otros arbovirus como CHIKV o ZIKV o un gen control de origen humano. El tercer protocolo permite la detección únicamente de virus dengue, pero con la discriminación del serotipo presente en la muestra (Santiago et al 2013). El conjunto de oligos y sondas utilizadas en este estudio se encuentra en la tabla 2.

En todos los casos, la reacción de RT-qPCR se realizó en un volumen final de 20 microL con el sistema Luna Probe One-Step RT-qPCR – NEB, con 5 microL de ARN y la concentración de oligos y sondas definidos, las cuales estuvieron entre 0.2mM y 0.4 mM. Bajo el siguiente protocolo: retro transcripción a 55°C por 15 min; denaturación inicial a 95°C por 3 min y 40 ciclos de amplificación así 95°C por 15 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 30 seg.

La línea base se ajustó a 200 RFU (Relative Fluorescence Units) para todos los canales (Fluoróforos) utilizados y se estableció como positivo, toda amplificación con un valor de Ct (Cycle threshold) menor a 38.

Tabla 2 Secuencias de primers y sondas para detección de DENV por RT-qPCR

Gen	**Secuencia**	**Canal**	**Amplicon (pb)**
DENV C	F TAGAGAGCAGATCTCTGR	Quasar705	212
	R CCTGCTGTTGGKGGDAT		
	P CAATATGCTGAAACGCGWGAGAA		
DENV UTR	F AAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCC	Cy5	108-200
	R CGTTCTGTGCCTGGAATGATG		
	P AACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGA		
DENV1 NS1	F CAAAAGGAAGTCGYGCAATA	FAM	112
	R CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC		
	P CATGTGGYTGGGAGCRCGC		
DENV2 E	F CAGGCTATGGCACYGTCACGAT	HEX	78
	R CCATYTGCAGCARCACCATCTC		
	P CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTTCAA		
DENV3 M	F GGACTRGACACACGCACCCA	Texas Red	74
	R CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT		

	P ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG		
DENV4 M	F TTGTCCTAATGATGCTRGTCG	Cy5	89
	R TCCACCYGAGACTCCTTCCA		
	P TYCCTACYCCTACGCATCGCATTCCG		
Control Interno Humano	F TGGTAATTCTAGAGCTAATACATG	HEX	190
	R CCATGATTAAGAGGGAC		
	P TTGACTCTAGATAACCTCG		

-Controles de ARN

Como control positivo para DENV se utilizó ARN extraído de cosechas virales de cada uno de los 4 serotipos obtenidas en células de *Aedes albopictus* C6/36.

DENV1: Cepa 33; Origen Huila-2012; Título $1.2X10^5$ PFU/ml

DENV2: Cepa 28; Origen Cundinamarca-2014. Título $1.2X10^6$ PFU/ml

DENV3: Cepa 07 Origen Cundinamarca-2014. Título $1.4X10^4$ PFU/ml

DENV4: Cepa 32 Origen Cundinamarca-2014. Título $1.6X10^6$ PFU/ml

-Controles de ADN Plasmídico

Los plásmidos son moléculas de DNA circular de origen bacteriano que se auto replican, contienen un bajo número de genes por lo general que le confieren ventajas de crecimiento, como genes de resistencia antibióticos, éstos pueden ser modificados para transportar un ADN foráneo. Para este estudio se solicitó la síntesis del plásmido control en MACROGEN Korea, DENV C-1-4 contiene el fragmento C y un fragmento correspondiente a cada uno de

los cuatro serotipos; por lo tanto sirve como plantilla para la amplificación de cuatro fragmentos correspondientes a los 4 serotipos (Figura 3).

Figura 3 Mapa del plásmido control DENVC 1-4

-Construcción de las curvas de calibración

Para la cuantificación del número de copias genómicas presentes en muestras biológicas como suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, o en el sobrenadante de células infectadas por PCR cuantitativo (qPCR) se utiliza un método de cuantificación absoluta; para lo cual es necesario construir una curva de calibración generada a partir del valor de Ct (ciclo en el cual la muestra se diferencia del background) obtenido con una serie estándares de ADN de concentración conocida. Normalmente, la curva estándar en qPCR es una gráfica del Ct Vs el logaritmo de la concentración o cantidad de ADN, expresado en número de copias. La ecuación de la recta que relaciona las dos variables se utiliza para calcular la cantidad de ADN plantilla en las muestras; mientras que la pendiente de la recta permite calcular la eficiencia de la reacción de PCR.

En este caso, las preparaciones del plásmido DENVC-1-4 se cuantificaron por espectrofotometría, se calculó el número de copias presente y se prepararon diluciones seriadas en base 10, las cuales fueron utilizadas como plantilla en una reacción de RT-qPCR con los primers específicos de serotipo. El valor de Ct de cada uno de los estándares y el logaritmo del Número de copias correspondiente, se utilizaron como variables en la construcción de la curva de calibración.

Tabla 3 Construcción de curva de calibración

	CDZ	DENV C-1-4
Dil -1	3 $X10^8$ cg/rx	3.5 $X10^8$ cg
Dil -2	3 $X10^7$	3.5 $X10^7$
Dil -3	3 $X10^6$	3.5 $X10^6$
Dil -4	3 $X10^5$	3.5 $X10^5$
Dil -5	3 $X10^4$	3.5 $X10^4$
Dil -6	3 $X10^3$	3.5 $X10^3$
Dil -7	3 $X10^2$	3.5 $X10^2$
Dil -8	3 $X10^1$	3.5 $X10^1$

RESULTADOS

Estandarizar tres protocolos para la detección específica de ARN viral de DENV por RT-qPCR multiplex

Los oligos DENV CF y DENV CR reconocen una región de 212 pb ubicados en el extremo 5´del gen C, que corresponde al inicio de la región codificante de la poliproteína (Fig 4).

Para definir las concentraciones adecuadas de oligos y de sonda a utilizar en la reacción de RT-qPCR, se realizaron amplificaciones utilizando como plantilla con 3 $X10^4$ copias del plásmido control y tres concentraciones diferentes de oligos y sonda; como se observa en la figura 5. Las tres combinaciones funcionan de manera adecuada, se generan las curvas de amplificación típicas, pero la señal de fluorescencia va aumentando a medida que aumenta

la concentración, alcanzando las 2500 RFUs (unidades de fluorescencia) con una concentración de 400 nM de primers y sondas. En la figura 5 se presenta el producto de la amplificación de 212pb aproximadamente, obtenido al realizar la detección utilizando las condiciones establecidas

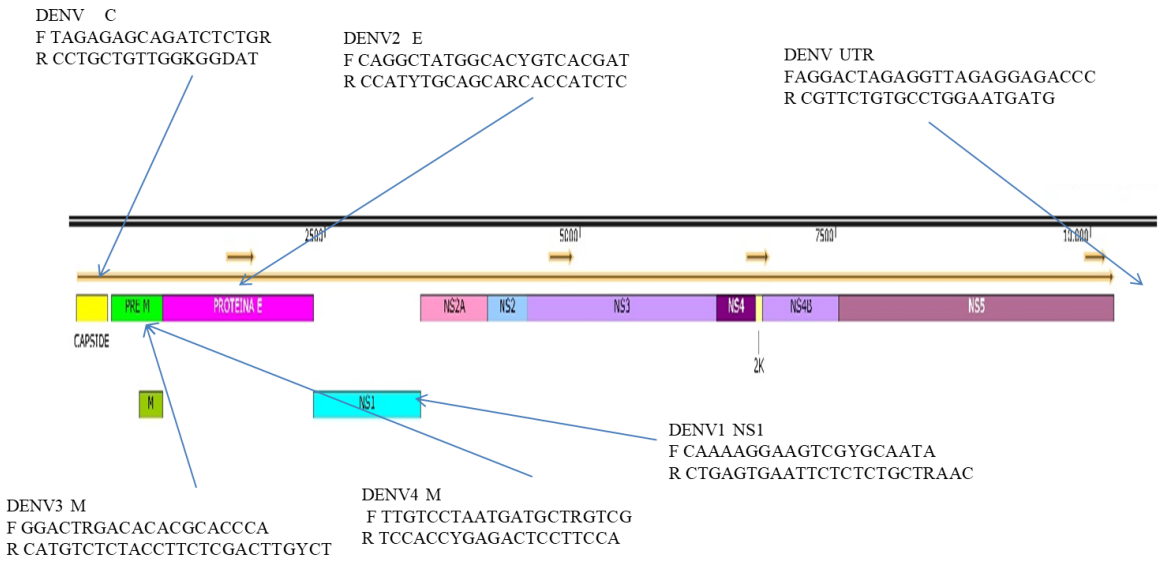

Figura 4 Representación esquemática del genoma de DENV

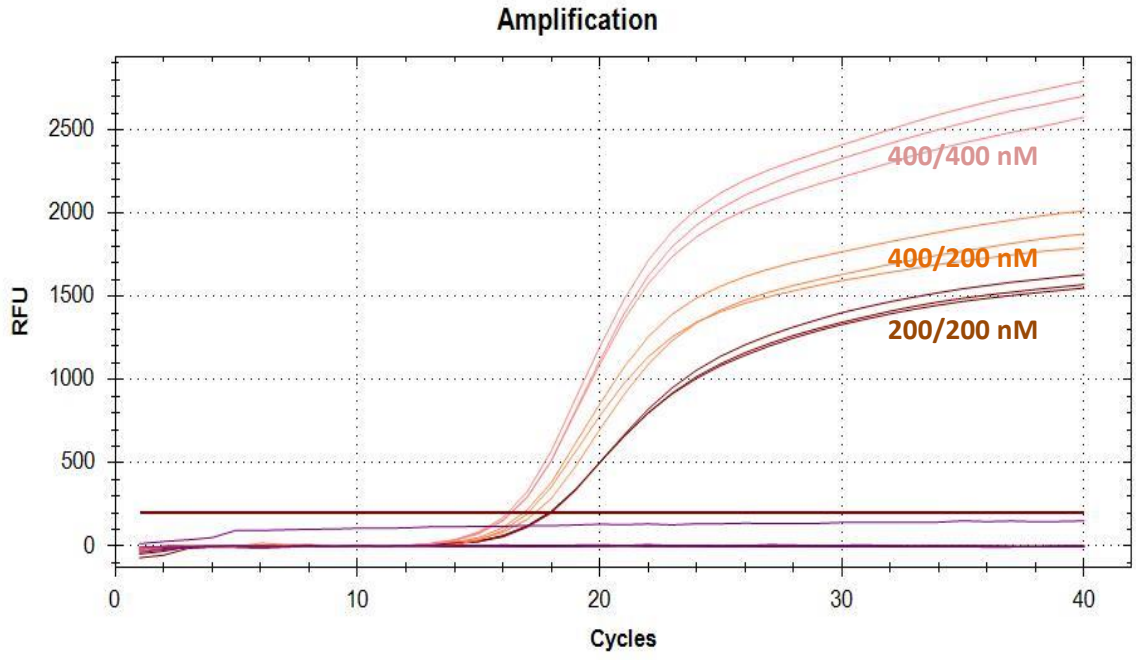

Figura 5 Definición de la concentración óptima de oligos y sonda para el reconocimiento del gen C

Los oligos DENV UTR F y R reconocen una región de longitud variable entre 100 y 200 pb ubicados en el extremo 3´del genoma (Fig 4). Al llevar a cabo la reacción de amplificación con la misma plantilla (3 $X10^4$ copias) y diferentes concentraciones de oligo y sonda encontramos un resultado similar al anterior, aumento de la señal de fluorescencia a medida que se aumenta la concentración, sin modificación en el valor de Ct (Fig 6). La concentración óptima se definió en 400 nM de primers y 200 nM de sonda. En la figura 7 se presentan los productos de la amplificación obtenidos de 100 y 200 pb aproximadamente, al realizar la detección en las condiciones establecidas.

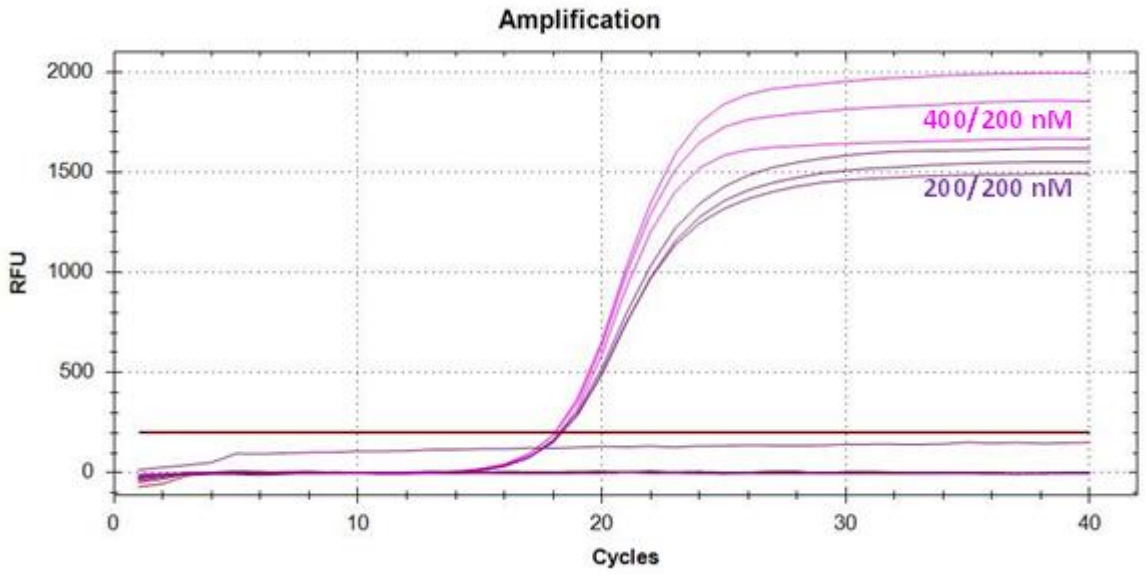

Figura 6 . Definición de la concentración óptima de oligos y sonda para el reconocimiento de la región UTR.

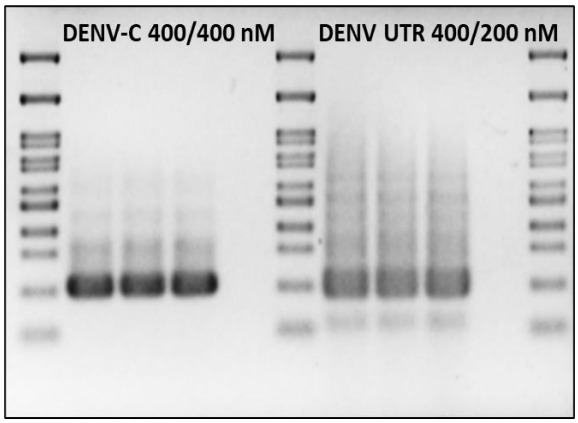

Figura 7 Detección del gen C y el fragmento UTR en las condiciones establecidas

Los oligos específicos de cada serotipo reconocen diferentes regiones en el genoma, al llevar a cabo la reacción de amplificación con 3 $X10^4$ copias de ADNp y diferentes concentraciones de oligo y sonda en la reacción monoplex, encontramos que para DENV 1, DENV3 y DENV4 se obtienen lecturas de fluorescencia cercanas a 2000 RFUs (Unidades relativas de fluorescencia) utilizando 400nM de primer y 200 nM de sonda; mientras que para DENV 2 sólo se alcanzaron lecturas cercanas a los 1000 RFUs, con la concentración más alta utilizada (Figura 8).

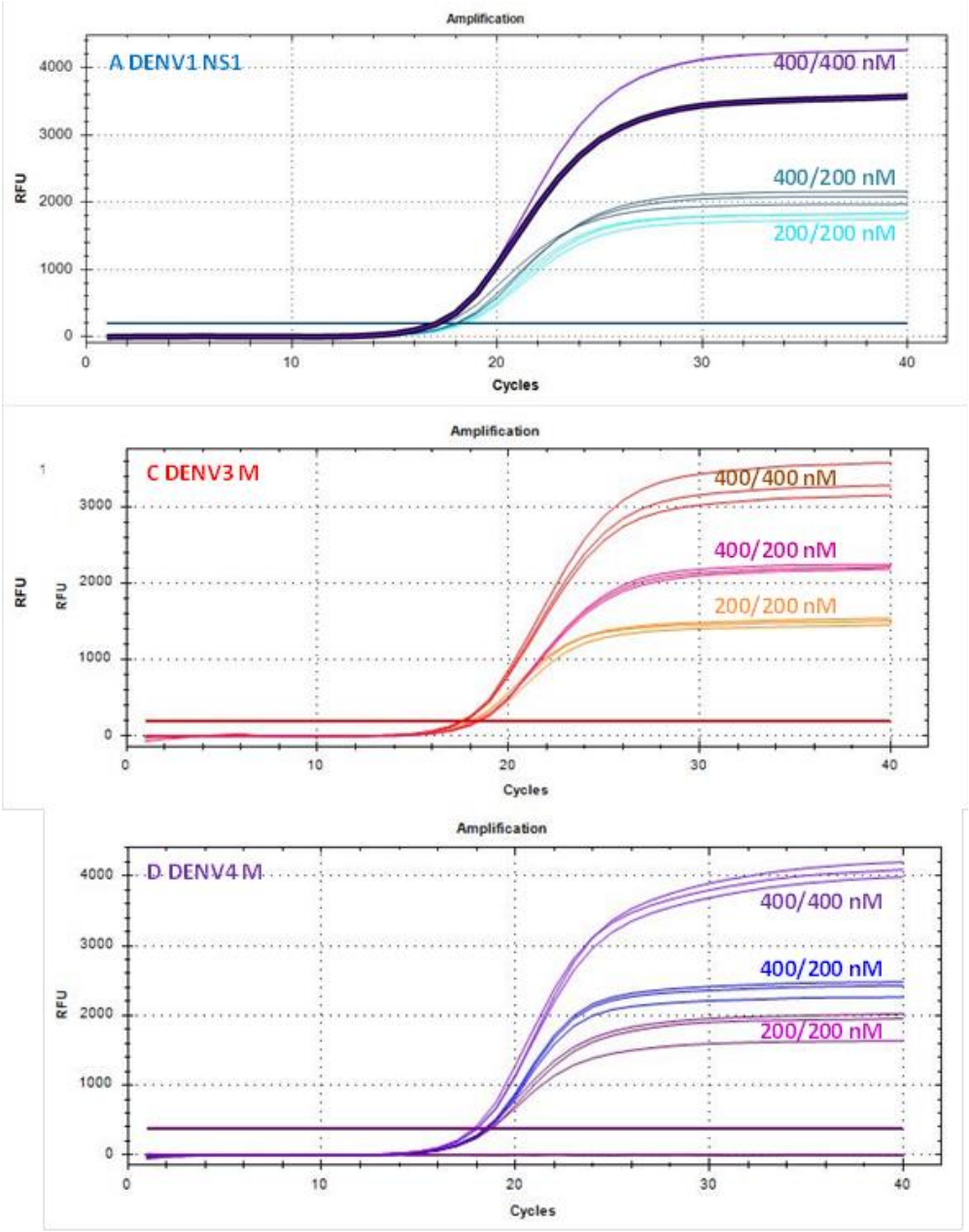

Figura 8 Definición de la concentración óptima de oligos y sonda para el reconocimiento específico de cada serotipo

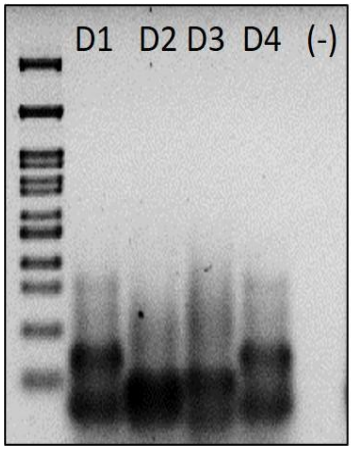

Figura 9 Detección del gen NS1, E y M en ARN obtenido de los cuatro serotipos del DENV

Una vez establecidas las concentraciones óptimas de uso, se llevó a cabo la reacción en formato multiplex, es decir, la detección simultánea de los cuatro serotipos en un mismo tubo de reacción utilizando ARN como plantilla y así comprobar que en la reacción múltiplex es posible detectar los 4 serotipos en las condiciones de amplificación determinadas (Figura 10).

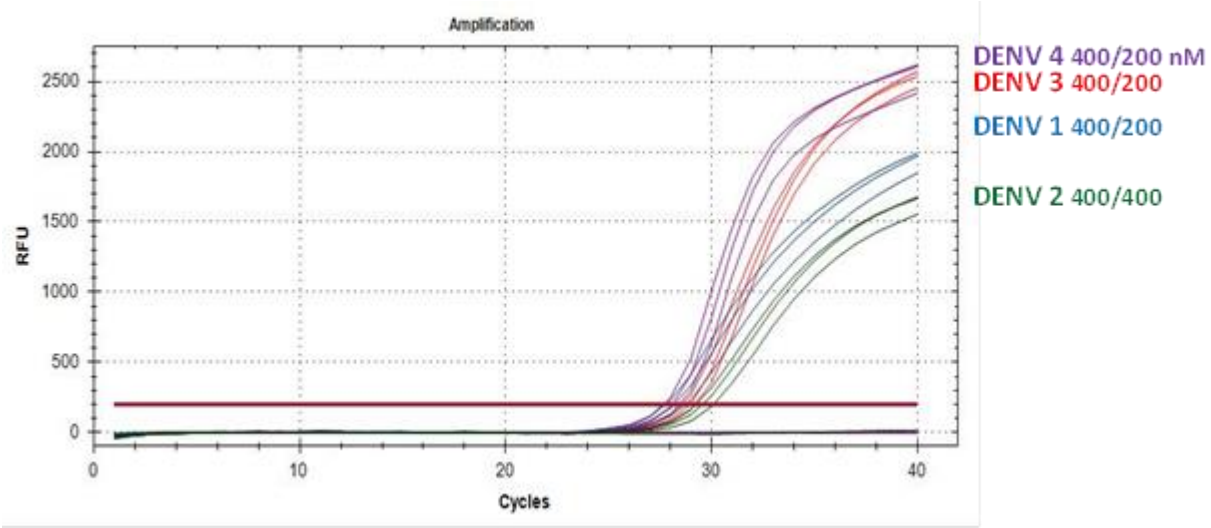

Figura 10 Detección simultánea de los cuatro serotipos de DENV.

Determinar la eficiencia y sensibilidad de cada protocolo para detectar los cuatro serotipos de virus dengue.

Se prepararon diluciones seriadas del plásmido control y se realizó la reacción de RT-qPCR con las concentraciones de primers y sondas establecidas previamente. Esto con el fin de determinar la eficiencia de la reacción, así como el rango de linealidad, es decir el rango en el que hay una relación lineal entre el valor de Ct y el logaritmo de la cantidad de plantilla inicial (SQ) y por tanto es posible utilizar el valor de Ct para calcular la cantidad plantilla presente en una muestra. En la figura 11. se observa la curva de calibración para detectar el fragmento C; se indica el valor de R^2, o "medida" de la linealidad, el cual debe ser superior a 0.99, la eficiencia de la reacción, que idealmente debe ser de 100% o presentar valores entre 90-110%. En este caso, la eficiencia fue de 90.5%, el R^2 0.997.

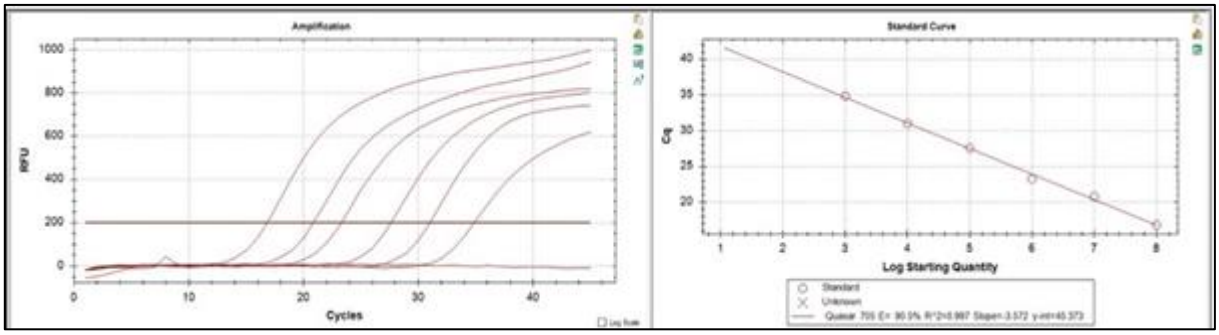

Figura 11 Curva de Calibración para DENV C.

En la figura 12 se muestran las curvas de calibración obtenidas para cada serotipo utilizando como plantilla diluciones seriadas del plásmido DENVC1-4 (contiene un fragmento específico de cada serotipo). Todas las curvas de calibración presentaron una muy buena correlación lineal con valores de R^2 superiores a 0.99 y eficiencias por encima del 90%; en la tabla 7 se condensan los resultados obtenidos.

Tabla 4 Resultados obtenidos de la curva de calibración

	EFICIENCIA	**R^2**	**LINEARIDAD**
DENV C	90.5%	0.997	10^8 - 10^2
DENV 1	93.9%	0.999	10^8 – 10^2
DENV 2	112%	0.996	10^7 – 10^2
DENV 3	93.1%	0.995	10^8 - 10^2
DENV 4	105%	0.999	10^8 – 10^2

Una vez se tuvo las curvas estándar, se procedió a cuantificar el número de copias genómicas presentes en los ARN aislados de cosechas virales, las cuales son sobrenadantes de células infectadas con cada serotipo. Con la ecuación de la recta y el valor de Ct arrojado utilizando el ARN obtenido de cada cosecha se calculó que la cepa de DENV1 tiene $1.2x10^7$ cg; DENV2 $1.5x10^7$; DENV3 $1.5x10^6$ y DENV4 3.8 $x10^{6.}$

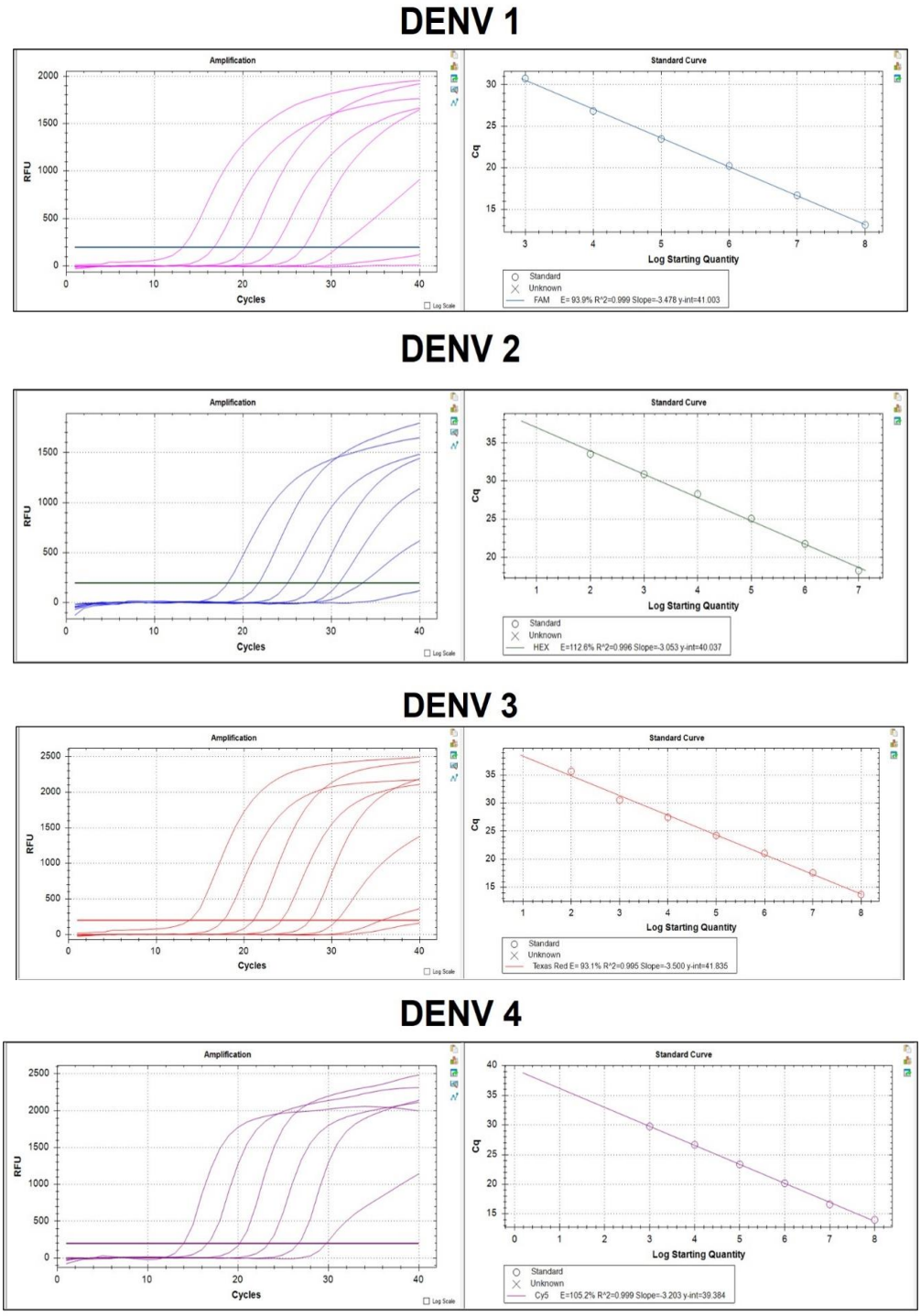

Figura 12 Curvas de Calibración específica de serotipo.

2.1 Evaluar la capacidad de cada protocolo para detectar los cuatro serotipos de virus dengue

Los tres protocolos de detección de DENV se corrieron de manera simultánea con diluciones seriadas de ARN viral de cada serotipo, con el fin de determinar cuál de los tres protocolos permite detectar el menor número de copias genómicas, es decir cual presenta mayor sensibilidad analítica; como se puede observar en las figuras 13 a 16 y en la tabla 5, el protocolo con el que se detecta el menor número de copias es el que utiliza primers específicos del serotipo o múltiplex DENV1-4 con el cual se detectan 10^1 copias por reacción para DENV4 y 10^2 para los demás serotipos. El protocolo que ofrece menor sensibilidad es la detección del fragmento UTR; para el serotipo 2 y 3 sólo alcanza a detectar cerca de 10^3 copias. Con todos los serotipos se observó una diferencia de casi 5 ciclos entre los valores de Ct obtenidos en estos dos protocolos (Tabla 5). En cuanto a la detección del gen C, el protocolo funciona de manera apropiada para los serotipos 3 y 4, con valores de Ct cercanos a los obtenidos con los primers específicos del serotipo. Mientras que para DENV1 y DENV2 la diferencia en los valores de Ct es cercano a 6.

En conjunto estos resultados indican que muestras biológicas con cargas virales muy bajas serían catalogadas como negativas al utilizar el protocolo de detección DENV UTR, o DENV C si la infección ocurre con los serotipos 1 y 2. El protocolo de RT-qPCR con el cual es posible detectar cargas virales bajas de cualquier serotipo es el multiplex DENV1-4.

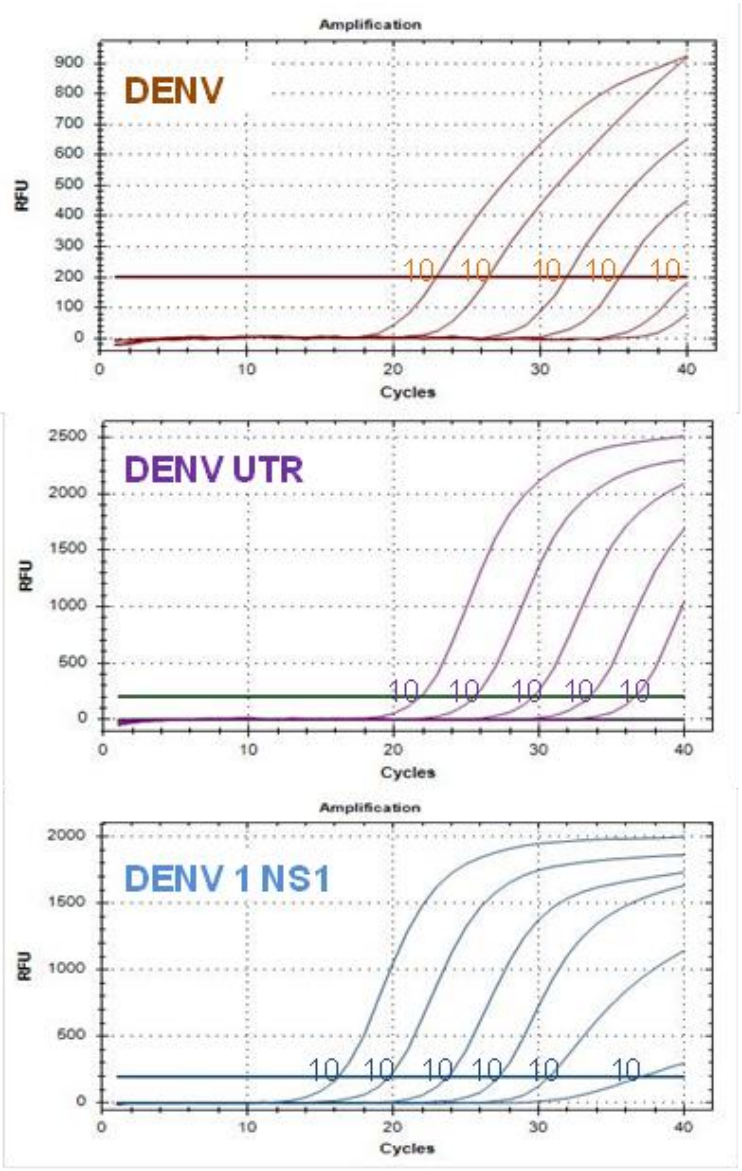

Figura 13 Detección de DENV1 con los tres protocolos de RT-qPCR utilizando diluciones seriadas de ARN viral

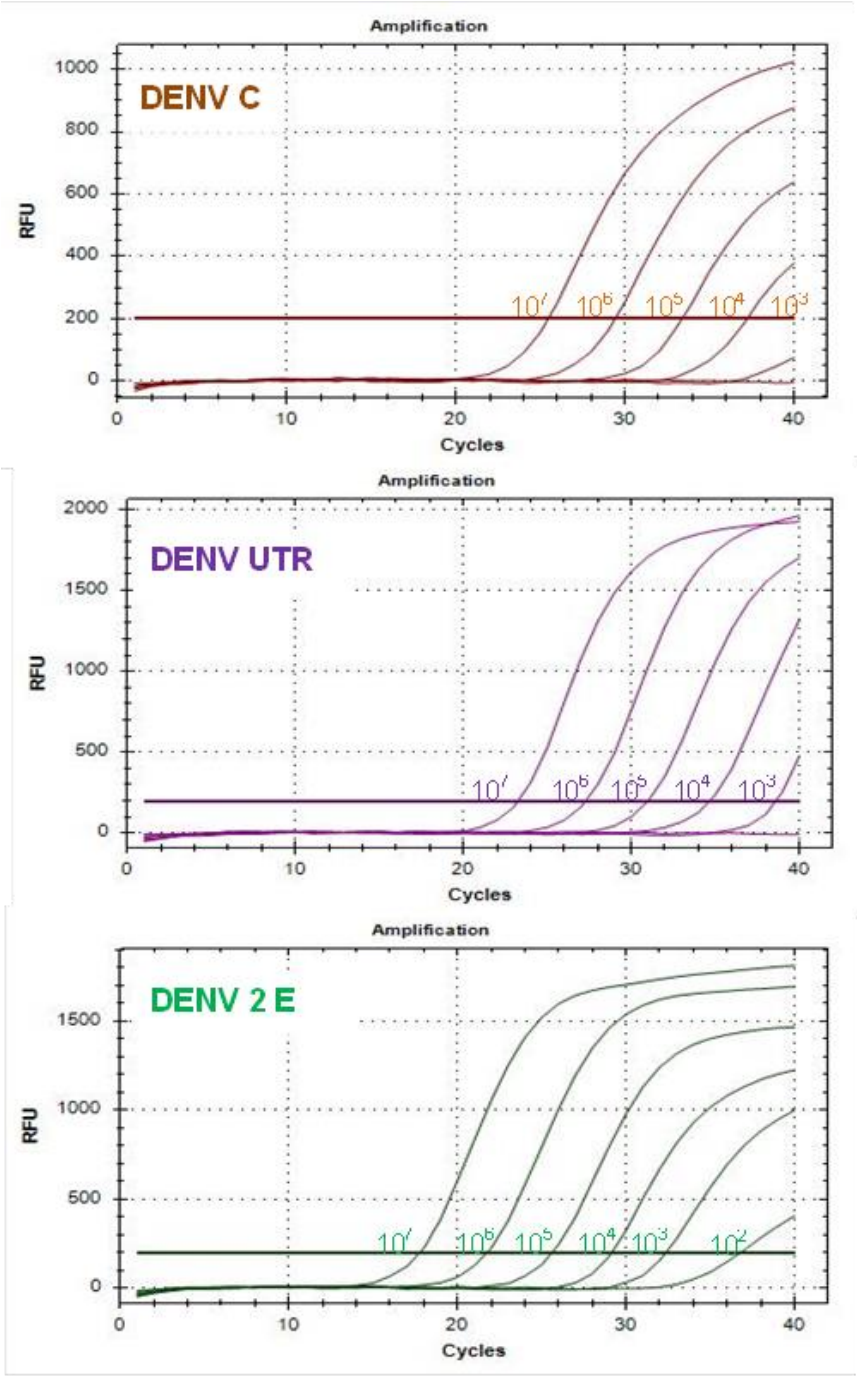

Figura 14 Detección de DENV2 con los tres protocolos de RT-qPCR utilizando diluciones seriadas de ARN viral.

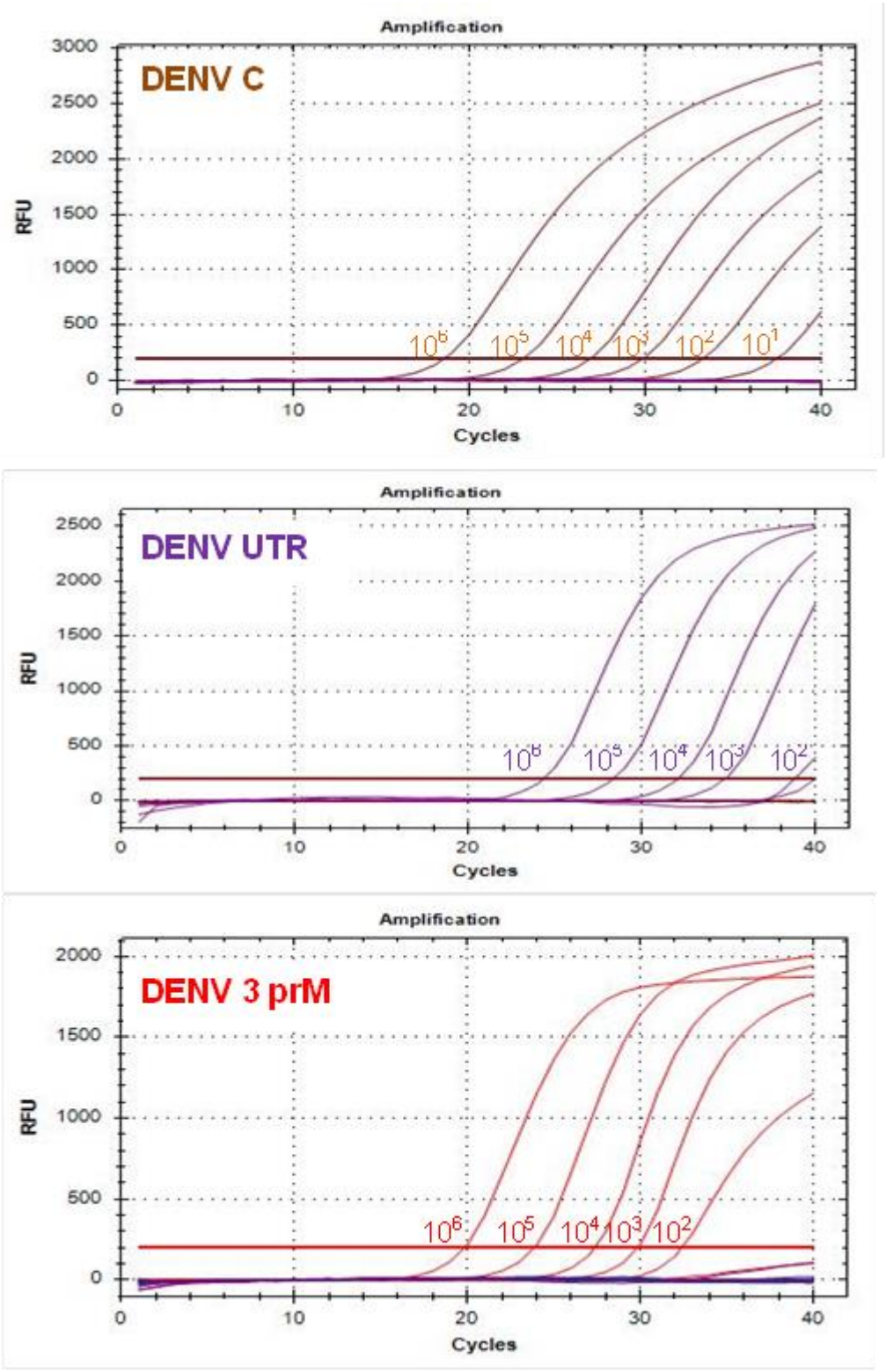

Figura 15 Detección de DENV3 con los tres protocolos de RT-qPCR utilizando diluciones seriadas de ARN viral

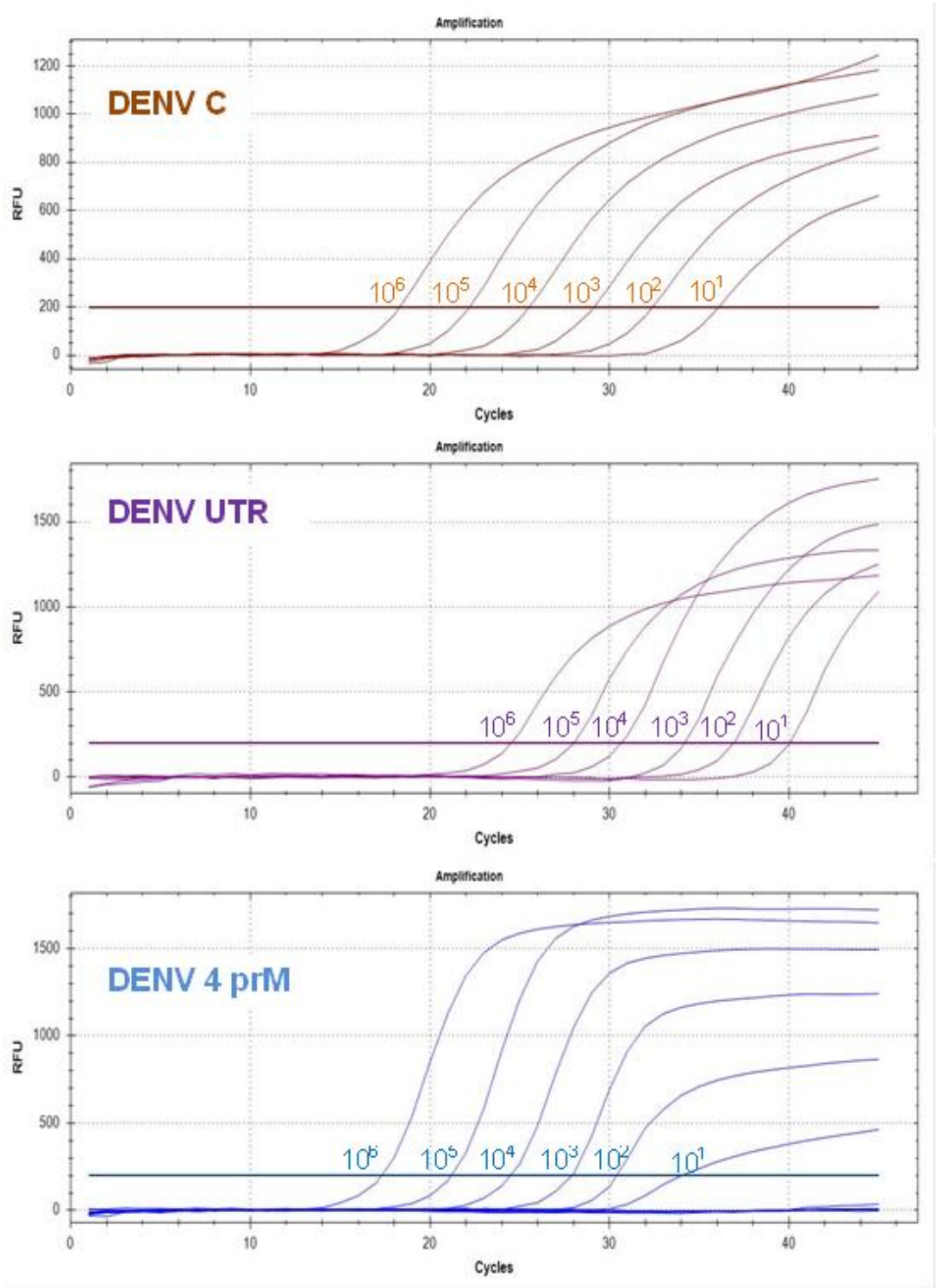

Figura 16 Detección de DENV4 con los tres protocolos de RT-qPCR utilizando diluciones seriadas de ARN viral

Tabla 5 Comparación de los valores de Ct obtenidos con los tres métodos de detección de DENV para cada serotipo

Copias/Rx	**C (Ct)**	**UTR (Ct)**	**DENV 1 (Ct)**
1,00E+01	N.A.	N.A.	N.A.
1,00E+02	N.A.	N.A.	37,13
1,00E+03	N.A.	36,57	30,73
1,00E+04	35,38	33,39	27,26
1,00E+05	31,76	29,55	23,76
1,00E+06	26,43	25,49	19,71
1,00E+07	22,88	21,81	16,24

Copias/Rx	**C**	**UTR**	**DENV 2**
1,00E+01	N.A.	N.A.	N.A.
1,00E+02	N.A.	N.A.	36,8
1,00E+03	N.A.	38,6	32,36
1,00E+04	37,23	34,66	29,15
1,00E+05	33,38	31	25,6
1,00E+06	29,42	27,28	21,75
1,00E+07	25,46	23,26	17,77

Copias/Rx	**C**	**UTR**	**DENV 3**
1,00E+01	37,47	N.A	N.A
1,00E+02	33,28	38,82	32,40
1,00E+03	29,90	34,78	29,84
1,00E+04	26,91	32,09	27,35
1,00E+05	23,08	28,31	23,87
1,00E+06	18,57	24,32	19,84

Copias/Rx	**C**	**UTR**	**DENV 4**
1,00E+01	34,24	40,08	36,03
1,00E+02	30,46	36,99	32,32
1,00E+03	28,01	34,22	29,09
1,00E+04	24,55	30,70	25,47
1,00E+05	21,27	28,07	22,14
1,00E+06	17,41	24,58	18,25

Determinación de la sensibilidad analítica del protocolo de RT-PCR semianidado

El protocolo para la detección y serotipificación de DENV por RT-PCR semianidado publicado previamente por el grupo de investigación se ha venido utilizando desde entonces para la detección no sólo de DENV sino de CHIKV y ZIKV en diferentes tipos de muestras

biológicas como sueros de habitantes de zonas endémicas sin síntomas aparentes (Calvo et al., 2016); sueros de individuos con síndrome febril no especificado (Castellanos et al., 2020), muestras de donantes de sangre (Cáceres et al., 2020) y mosquitos colectados en zonas endémicas; razón por la cual fue necesario determinar la sensibilidad de ese protocolo con el fin de establecer si el ensayo de RT-qPCR DENV 1-4 presenta una sensibilidad igual o mejor. Para ello, se utilizaron las mismas diluciones seriadas de ARN viral de cada uno de los serotipos utilizadas en el segmento anterior y la primera ronda de amplificación múltiplex se corrió de forma simultánea con los ensayos de RT-qPCR. Aunque en la figura 17 se presentan los resultados obtenidos en la segunda ronda de amplificación, se observa el producto de 511pb correspondiente al producto amplificado durante el RT-PCR, además de la banda correspondiente al producto esperado 211pb para DENV1; 119 pb para DENV2, 288 pb para DENV3 y 266 pb para DENV4.

Con la PCR semi-anidada se detectaron 10^1 copias por reacción para DENV4 y 10^2 copias para los demás serotipos. Para los serotipos 1 y 2 con 10^2 copias aún se observa banda de intensidad moderada lo que nos indica que es necesario realizar el ensayo con 10 y 1 copia por reacción para establecer de manera más precisa el límite de detección. Con el serotipo 3 no hubo amplicón utilizando 10 copias y con el 4 fue muy tenue, lo cual indica que una muestra biológica se podría definir como positiva con este ensayo y presenta entre 10 a 100 copias genómicas.

En conjunto estos resultados indican que la RT-PCR semianidada presenta una sensibilidad similar al protocolo de detección y serotipificación por RT-qPCR.

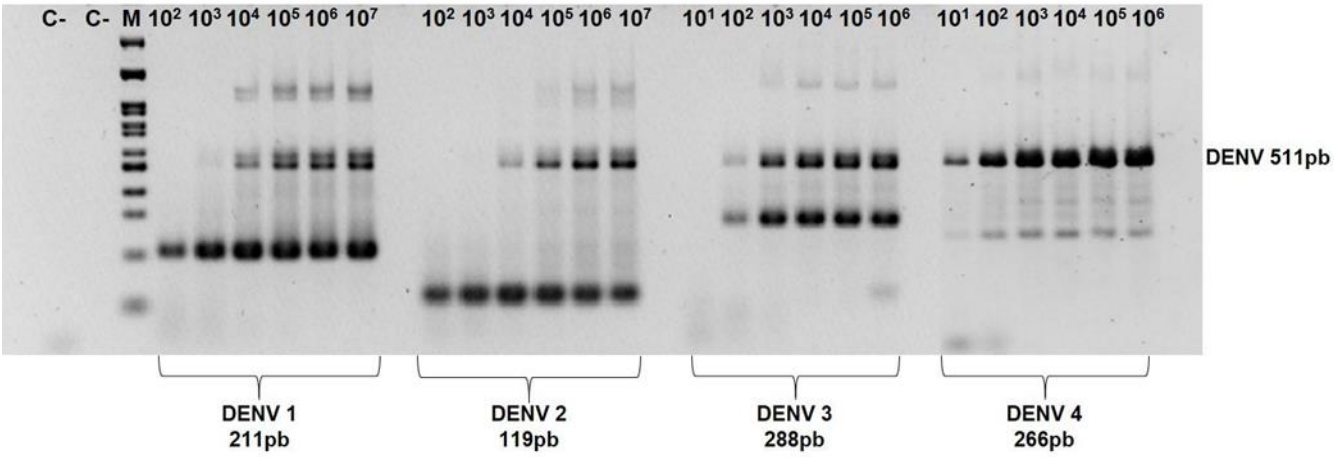

Figura 17 Detección de DENV por RT-PCR semianidada

Evaluar la utilidad del protocolo de RT-qPCR para detectar virus dengue en muestras biológicas.

El protocolo de detección y serotipificación de DENV por RT-qPCR fue probado con El ARN extraído de sueros provenientes donantes de sangre colectados por la Cruz Roja durante la semana última semana de octubre y la primera de noviembre de 2021 en Bogotá (10); Cali (16); Cartagena (8); Manizales (10) y Medellín (16). En un total de 60 muestras procesadas, no se encontró señal positiva para virus dengue en ninguna de ellas; en la figura 18A, sólo se observa la señal de amplificación para un control positivo de ARN, el cual contiene todos los serotipos virales.

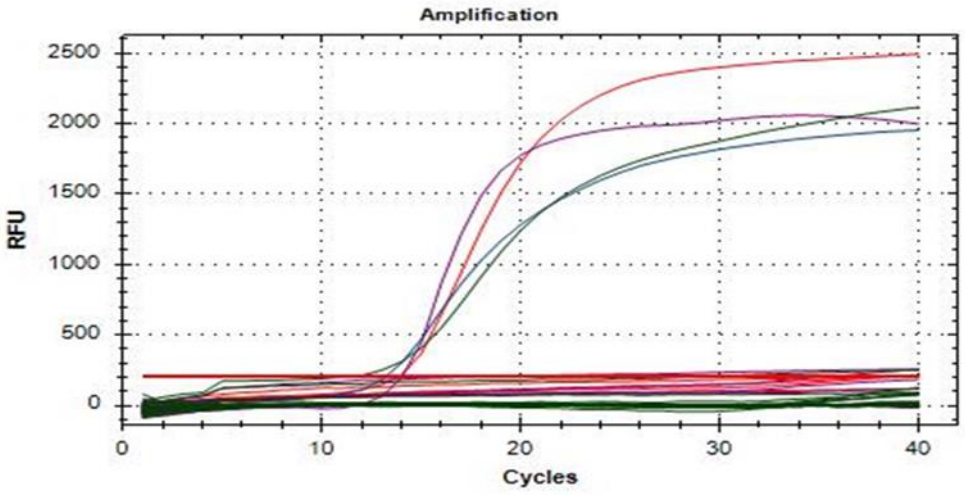

Figura 18 .A Detección de DENV por RT-qPCR en muestras de donantes de sangre.

Para confirmar que la muestra contiene material genético en cantidad y calidad suficiente para ser amplificado, 20 de las muestras colectadas en octubre y 20 de las colectadas en noviembre se probaron en una reacción de amplificación para DENV C y para el ARN ribosomal 18s, control de origen humano que debe ser detectado en todas las muestras, si el proceso de transporte, almacenamiento y extracción se lleva a cabo en óptimas condiciones. En las figuras 17 B se observa la señal de amplificación para 18S (verde) en todas muestras ensayadas y el control positivo para la detección de ARN viral.

En conjunto estos resultados nos permitieron establecer que las muestras analizadas no presentan DENV o al menos no en cantidad necesaria para ser detectado por este sistema, aunque si contienen material genético humano susceptible de ser amplificado.

Como método confirmatorio, las muestras se evaluaron por la RT-PCR semi-anidada, de las 60 muestras encontramos señal positiva para DENV 2 en cuatro de ellas y para DENV 1 en

una (figura 19). Estos resultados sugieren que el protocolo basado en PCR convencional permite discriminar mejor las muestras infectadas que el protocolo basado en RT-qPCR.

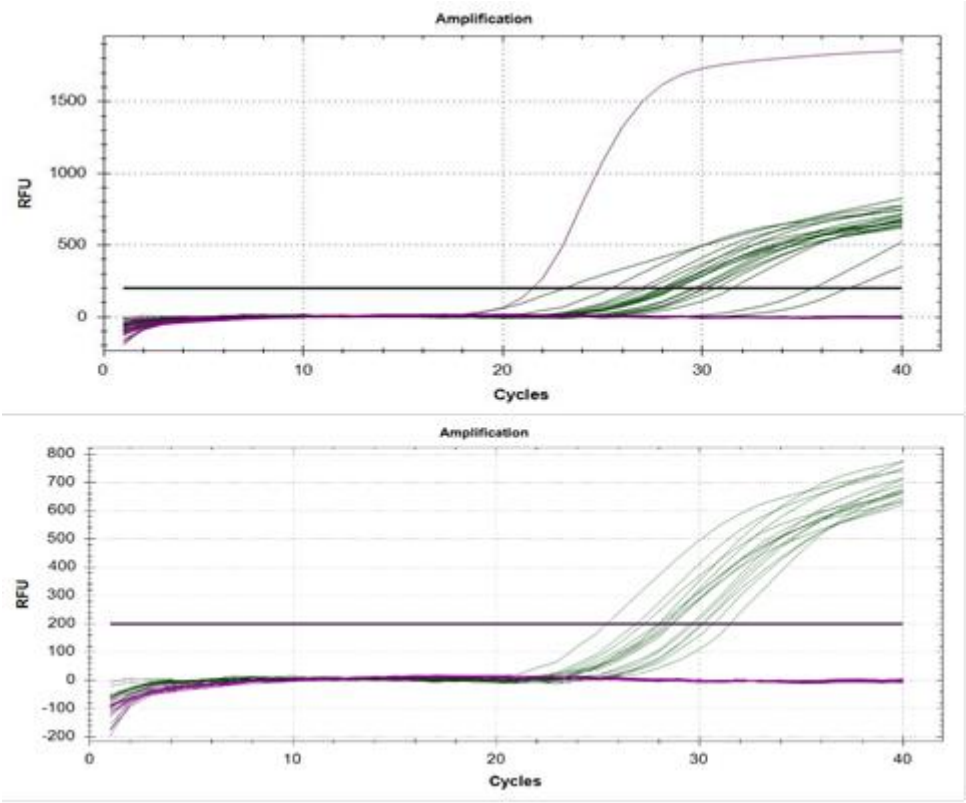

Figura 18 B. Detección de ARN 18s por RT-qPCR en muestras de donantes de sangre

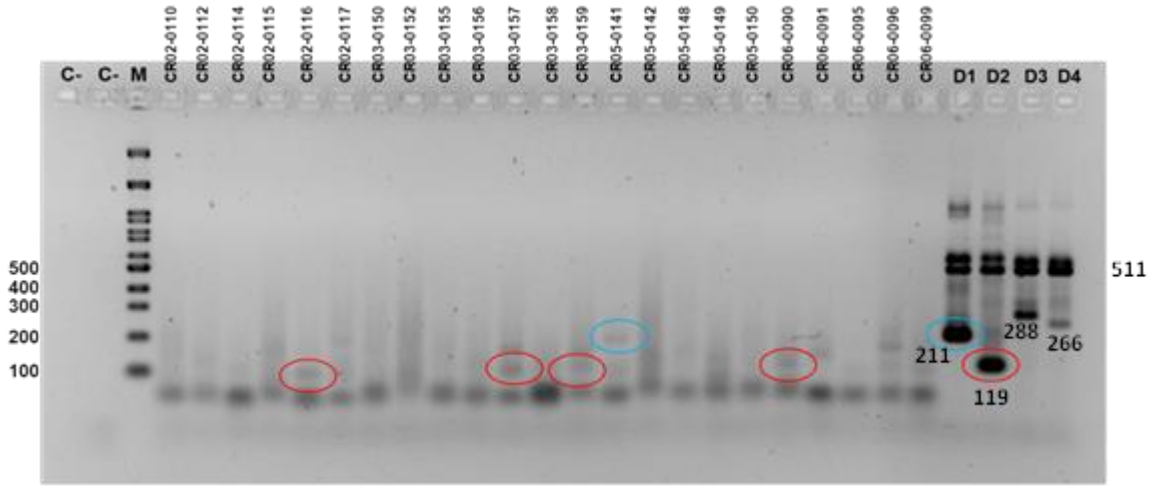

Figura 19 Detección de DENV por RT-qPCR anidada en muestras de donantes de sangre

Finalmente, quisimos evaluar la RT-qPCR DENV 1-4 con muestras de mosquitos capturados en el área de la macarena, el ARN extraído de 30 pools o grupos de mosquitos recién extraído fue evaluado simultáneamente por RT-qPCR y RT-PCR anidada. Nuevamente, con el protocolo de PCR en tiempo real no se obtuvo señal de amplificación en ninguna de las muestras mientras que con el convencional fueron detectadas 7 muestras infectadas con DENV2 (Figura 20) .

Estos resultados sugieren que el protocolo utilizado hasta el momento para definir infección por DENV podría ser más sensible que los métodos de RT-qPCR analizados en este estudio

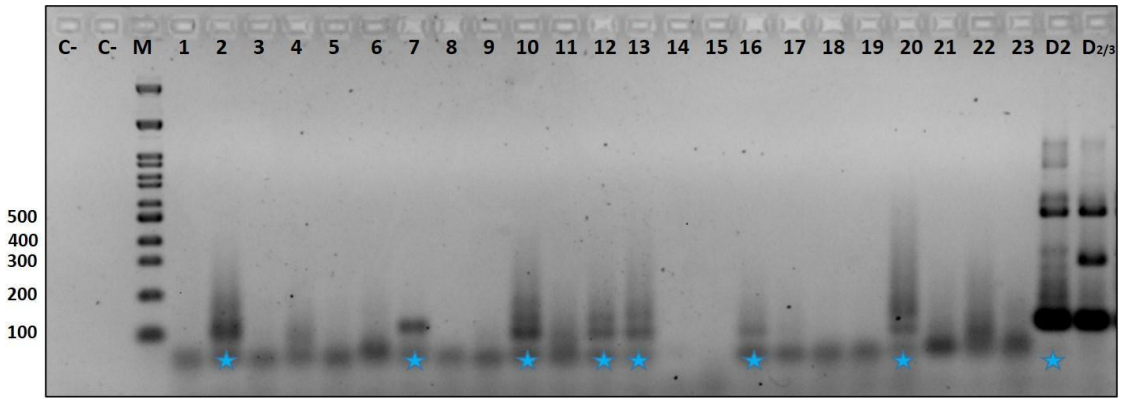

Figura 20 Detección de DENV por RT-PCR anidada en mosquitos

DISCUSIÓN

La infección por dengue sigue siendo la enfermedad viral más importante transmitida por mosquitos en términos de morbi-mortalidad alrededor del mundo (Bhatt et al 2013). En Colombia para 2021 se reportó un total de 53.334 casos, que comparado con el pico epidemico de 2019 mostró una disminución del 30%. En ese año, la incidencia de dengue a nivel nacional fue de 472 casos por 100.000 habitantes en riesgo, mientras que en 2021

fue de 172,9 (BES 2022). Lejos de ser una enfermedad controlada y que tiende a disminuir como se interpretaría de los reportes oficiales citados anteriormente, el número real de casos de infección por dengue podría estar muy por encima. El problema es el subregistro por fallas en el sistema de salud debido en parte, a la ausencia de métodos de detección que permitan un diagnóstico rápido, oportuno y accesible. En Colombia el diagnóstico de dengue se hace principalmente mediante pruebas serológicas, el uso de técnicas moleculares está aun restrigido a la vigilancia e investigación, aunque han mostrado una mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas serológicas.

Debido a la contingencia por SARS COV2, en la actualidad el país cuenta con una red de laboratorios dotados con la infraestructura, los equipos y el personal calificado para realizar pruebas de PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR) no sólo en las grandes ciudades como Cali, Medellin o Bucaramanga, sino en ciudades pequeñas o intermedias ubicadas en zonas endémicas para el virus como Cartagena, Villavicencio, Leticia, entre otras, que podrían implementar métodos de diagnóstico molecular de la enfermedad a muy corto plazo. Por esta razón, en este trabajo se evaluó el desempeño de tres protocolos de detección de DENV por RT-qPCR. El primero tiene como único blanco de detección el gen de cápside (C), el segundo, el extremo 3´no traducible (3´UTR) y el tercero incluye un fragmento específico de cada serotipo como blanco de detección (DENV1-4), por lo cual es una reacción en la que es posible detectar NS1 para DENV1, E para DENV2 y M para DENV3 y DENV4 (Santiago et al., 2013; Waggoner et al., 2013, Warrilow et al., 2002). Como primera medida se estandarizaron las condiciones de amplificación para cada protocolo (figuras 5-10) y luego se estableció la eficiencia de la reacción de PCR, encontrando que los tres protocolos presentan eficiencias similares y acordes con lo reportado en la literatura

entre el 90 al 105%. Sin embargo, al evaluar la sensibilidad analítica, es decir, el número más bajo de copias genómicas que pueden ser detectadas por cada protocolo para cada serotipo si se observaron diferencias notables (figuras 13-16, tabla 5). Es así como los serotipos 3 y 4, se detectaron muy bien con el protocolo DENV C alcanzándose a detectar 10 copias virales por reacción (Fig 15,16); mientras que el mismo protocolo solo alcanzó a a detectar 10.000 copias de los serotipos 1 y 2. El protocolo DENV1-4 fue el que mejor para detectar los cuatro serotipos detectando 100 copias de DENV1, 2 y 3; y 10 copias de DEV4.

Estos resultados ponen de manifiesto un factor muy importante a considerar al momento de seleccionar los bancos de detección para un sistema de detección y es que no todos los segmentos del genoma van a ser reconocidos con la misma eficacia y sensibilidad en la reacción de PCR. Por lo general cada estudio hace un análisis muy exhaustivo de su set de primers y sondas pero pocos hacen una comparación entre métodos y serotipos como el que hemos realizado aquí, asumiendo que un método va a reconocer cualquiera de los 4 serotipos de la misma manera. Según nuestros resultados, un sistema más sensible de detección debería incluir la detección del gen NS1 de DENV1, E de DENV2, y C para DENV3 y 4.

Dado que el protocolo multiplex DENV1-4 fue el que presentó el mejor desempeño con los 4 serotipos, fue utilizado para la detección del virus en muestras provenientes de donantes de sangre y mosquitos *Ae. aegypti* recolectados en campo, no obstante, no se logró la detección de muestras positivas en ninguno de los grupos. Dado que el grupo de virología

ha venido utilizando un protocolo para la detección y serotipificación de DENV por RT-PCR semianidado (Calvo et al., 2016), 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 mosquitos colectados en zonas endémicas; el panel de muestras evaluadas por RT-qPCR se analizó por RT-PCR semianidado, encontrando muestras positivas para DENV2, tanto en donantes como en mosquitos. Lo que nos permite sugerir que la RT-PCR anidada, sería el método indicado para definir infección por virus dengue, aunque sea un método más dispendioso , largo y de mayor atención, debido a la necesidad de dos rondas de amplificación , la evaluación del resultado por electroforesis en gel de agarosa y una alta probabilidad de falsos positivos.

La RT-qPCR es una técnica que ha mostrado ser de fácil aplicación y manejo para la obtención rápida de resultados, en este estudio demostró tener una baja sensibilidad en muestras biológicas donde se esperan bajas cargas virales como en personas asintomáticas y en el mosquito vector.

CONCLUSIONES

-Se estandarizaron tres protocolos para la detección de virus dengue por RT-PCR en tiempo real. El protocolo que incluye el gen de Cápside así como el que incluye el fragmento 3´UTR permiten detectar el virus pero sin distinción de serotipo; mientras que el protocolo múltiplex permite tanto la detección como la serotipificación.

-Se determinó que los tres protocolos presentan valores óptimos de eficiencia (entre el 90-110%) y un rango lineal semejante, es decir, que los tres permitirían la cuantificación de carga viral en una muestra, en un rango de $10^8 – 10^2$ copias genómicas.

-Se estableció que el protocolo de detección por RT-qPCR que presenta una mayor sensibilidad analítica, es el multiplex o DENV1-4, dado que permite detectar de manera confiable hasta 100 copias virales por reacción. Por lo tanto, de los tres protocolos implementados este permitiría detectar cargas virales bajas en muestras biológicas infectadas con cualquiera de los cuatro serotipos de virus dengue.

-El protocolo de detección por RT-PCR semianidada presenta una mayor sensibilidad que el protocolo de detección y serotipificación por RT-qPCR; con este protocolo fue posible detectar los serotipos 1 y 2 en muestras provenientes de banco de sangre y el serotipo 2 en mosquitos *Aedes aegipty*, muestras en las que el resultado de la RT-qPCR fue negativo.

REFERENCIAS

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. Nature; 496, pp. 504–507. doi: 10.1038/nature12060

BES Boletin Epidemiologico Semanal. (2022). Retrieved 9 May 2022, from https://www.ins.gov.co/buscador-eventos /BoletinEpidemiologico/ 2022_Bolet%C3% ADn_epidemiologico_semana_17.pdf

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.

Camacho, D. E., Ferrer, E., Triana-Alonso, J. L., Ferreras, A. C., Graterol, H., Comach, G., & Triana-Alonso, F. (2012). Amplificación de la región 5 UTR-C del genoma de los cuatro serotipos de Virus Dengue. Salus, 16(3), 40-44.

Castellanos JE; Coronel-Ruiz C.2013. Dengue disease diagnosis: A puzzle to be solved. Rev. Fac. Med. 2014 Vol. 62 No. 4: 455-464 DOI: http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v62n4.45593

Castellanos JE, Coronel-Ruiz C, Parra-Alvarez S, Castilla MG, Calvo EP, Arévalo-Herrera, M, et al. (2016) Description of high rates of unapparent and simultaneous multiple dengue virus infection in a Colombian jungle settlement . Tropical Biomedicine; 33(2): 375–382

Castellanos JE, Jaimes N, Coronel-Ruiza C, Rojas JP, Mejía LF, Villarreal VH, Maya LE, Claros LM, Orjuela C, Calvo E, Muñoz MV, Velandia-Romero ML. Dengue-chikungunya coinfection outbreak in children from Cali, Colombia in 2018-2019. (2021) Int J Infect Dis. 102:97-102.

CDC. (2019). Cuadro clínico | Dengue | CDC. Retrieved 8 November 2021, from https://www.cdc.gov/dengue/es/healthcare-providers/clinical-presentation.html.

CDC. (2019). Guía para la realización de pruebas | Dengue | CDC. Retrieved 8 November 2021, from https://www.cdc.gov/dengue/es/healthcare-providers/testing/testing-guidance.html

Celis, F. P., Perilla, P., Salgado, D. M., & Narváez, C. F. (2014). Detección y cuantificación de virus dengue 2 en lisado celular y plasma de niños por qPCR en tiempo real usando un estuche comercial y el equipo EcoTM System-Illumina. RFS Revista Facultad de Salud, 6(1), 40-47.

Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC. Puerto Rico: Centers for Disease Control and Prevention, 56.

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.

Chiu, W. W., Kinney, R. M., & Dreher, T. W. (2005). Control of translation by the 5′-and 3′-terminal regions of the dengue virus genome. Journal of virology, 79(13), 8303-8315.

Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. Clinical microbiology reviews, 13(4), 559-570.

Gutierrez-Barbosa, H., Medina-Moreno, S., Zapata, J. C., & Chua, J. V. (2020). Dengue infections in Colombia: Epidemiological trends of a hyperendemic Country. Tropical Medicine and Infectious Disease, 5(4), 156.

Kurane, I., & Takasaki, T. (2001). Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. Reviews in medical virology, 11(5), 301-311.

MinSalud (2021). Colombia, en alerta por repunte de dengue. Retrieved 6 December 2021, from https://www.eltiempo.com/salud/situacion-de-dengue-en-colombia-alerta-por-aumento-de-casos-633502

Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, et al. (2013) Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. PLoS Negl Trop Dis 7(7): e2311. doi:10.1371/journal.pntd.0002311

OPS (2021). Arbovirosis en el contexto de COVID-19 2 de julio de 2021. Retrieved 21 November 2021, from 2021-julio-02-phe-actualizacion-epi%20-arbovirosis-COVID-19-SP.pdf.

OPS, OMS, PLISA [Internet]. Casos reportados de Dengue en las Américas por subregiones, datos y estadísticas de OPS/OMS, Incidencia de Dengue, 2017. [citado Dic 2021]. Disponible en: http://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-regional/506-reg-dengue-incidence-es.html

PAHO. (2019). Dengue - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. Retrieved 8 November 2021, from https://www.paho.org/es/temas/dengue

Usme-Ciro, J. A., Gómez-Castañeda, A. M., & Gallego-Gómez, J. C. (2012). Detección molecular y tipificación del virus dengue por RT-PCR y PCR anidada usando oligonucleótidos mejorados. Salud Uninorte, 28(1), 1-15.

Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. Infectio, 15(1), 33-43.

Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y,Gonzalez K, et al. (2013). Development of an internally controlled real-time reverse transcriptase PCR assay for pan-dengue virus detection and comparison of four molecular dengue virus detection assays. J Clin Microbiol. 51:2172–81.

Waggoner, J. J., Gresh, L., Mohamed-Hadley, A., Ballesteros, G., Davila, M., Tellez, Y....Pinsky, B. A. (2016). Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. Emerging Infectious Diseases, 22(7), 1295-1297. https://doi.org/10.3201/eid2207.160326.

Warrilow D,NorthillJA, PykeA, SmithGA. Single rapid TaqMan fluorogenic probe based PCR assay that detects all four dengue serotypes. J Med Virol. 2002; 66(4):524±8.

WHO. (2020). Dengue y dengue grave. Retrieved 8 November 2021, from https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue

WHO. Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Ginebra. 2009. p. 10–2

WHO Notas descriptivas disponible en http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/».

Wilder-Smith A, Byass, P. The elusive global burden of dengue. *Lancet Infect Dis* 2016; 16(6): 629–631.

ANEXO 1

Detección de ARN 18S en muestras de donantes de Sangre

Se presentan los valores de Ct obtenidos para cada muestra

MUESTRA	DENV UTR	HIC	RESULTADO
CR02-0109	N.A	21,72	NEGATIVO
CR02-0117	N.A	29,96	NEGATIVO
CR03-1569	N.A	10,82	NEGATIVO
CR05-148	N.A	30,83	NEGATIVO
CR06-0096	N.A	28,97	NEGATIVO
CR02-0110	N.A	36,70	NEGATIVO
CR03-150	N.A	36,89	NEGATIVO
CR05-141	N.A	23,58	NEGATIVO
CR05-149	N.A	25,53	NEGATIVO
CR06-0097	N.A	30,81	NEGATIVO
CR02-0111	N.A	31,31	NEGATIVO
CR03-152	N.A	38,59	NEGATIVO
CR05-142	N.A	35,79	NEGATIVO
CR05-150	N.A	29,15	NEGATIVO
CR06-0098	N.A	27,61	NEGATIVO
CR02-0112	N.A	13,52	NEGATIVO
CR03-154	N.A	16,08	NEGATIVO
CR05-143	N.A	21,04	NEGATIVO
CR06-0090	N.A	12,62	NEGATIVO
CR06-0099	N.A	10,99	NEGATIVO
CR02-01113	N.A	18,64	NEGATIVO
CR03-155	N.A	25,58	NEGATIVO
CR05-144	N.A	18,00	NEGATIVO
CR06-0091	N.A	34,31	NEGATIVO
CR06-0100	N.A	18,36	NEGATIVO
CR02-0114	N.A	36,73	NEGATIVO
CR03-156	N.A	22,68	NEGATIVO
CR05-145	N.A	26,61	NEGATIVO
CR06-0092	N.A	15,92	NEGATIVO
CR06-0101	N.A	30,14	NEGATIVO
CR02-0115	N.A	26,32	NEGATIVO
CR03-157	N.A	19,87	NEGATIVO
CR05-146	N.A	27,99	NEGATIVO
CR06-0094	N.A	21,78	NEGATIVO
CR02-0116	N.A	16,08	NEGATIVO
CR03-158	N.A	21,04	NEGATIVO
CR05-147	N.A	12,62	NEGATIVO
CR06-0095	N.A	10,99	NEGATIVO
CONTROL NEGATIVO	N.A	N.A	NEGATIVO
CONTROL POSITIVO	**20,49**	**30,80**	**POSITIVO**

Muestra	HIC	DENV UTR	RESULTADO
06-93	N/A	N/A	NEGATIVO
06-0102	33,66	N/A	NEGATIVO
06-0103	27,45	N/A	NEGATIVO
06-0104	30,26	N/A	NEGATIVO
06-0105	32,89	N/A	NEGATIVO
06-0106	30,48	N/A	NEGATIVO
06-0107	29,23	N/A	NEGATIVO
06-0108	28,91	N/A	NEGATIVO
06-0109	33,55	N/A	NEGATIVO
06-0110	35,94	N/A	NEGATIVO
06-0111	30,23	N/A	NEGATIVO
06-0112	28,27	N/A	NEGATIVO
04-0025	34,99	N/A	NEGATIVO
04-0026	34,13	N/A	NEGATIVO
04-0027	30,22	N/A	NEGATIVO
04-0028	28,75	N/A	NEGATIVO
05-0151	35,51	N/A	NEGATIVO
05-0152	27,79	N/A	NEGATIVO
05-0153	32,54	N/A	NEGATIVO
05-0154	36,00	N/A	NEGATIVO
05-0155	27,59	N/A	NEGATIVO
05-0156	30,78	N/A	NEGATIVO
05-0157	31,98	N/A	NEGATIVO
05-0158	28,01	N/A	NEGATIVO
02-0120	29,44	N/A	NEGATIVO
02--0126	32,65	N/A	NEGATIVO
02--0127	27,17	N/A	NEGATIVO
02--0128	31,08	N/A	NEGATIVO
CONTROL -	N/A	N/A	NEGATIVO
CONTROL -	N/A	N/A	NEGATIVO
CONTROL +	**33,87**	**25,30**	**POSITIVO**

UNIVERSIDAD
EL BOSQUE

EN ATENCIÓN A QUE:

OSCAR LEONARDO VANEGAS MONCADA

CÉDULA DE CIUDADANÍA No. 1.032.494.908 EXPEDIDA EN BOGOTA D.C.

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

BIÓLOGO

DADO EN BOGOTÁ D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA, EL DÍA 12 DE OCTUBRE DE 2022

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.

31552

THOMAS GREG & SONS

Registro 31710 Folio 1915 Vigilada Mineducación

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

Por una cultura de la vida, su calidad y su sentido

Vigilada Mineducación

EL SUSCRITO SECRETARIO ACADÉMICO DE LA FACULTA DE CIENCIAS

CERTIFICA QUE:

Eliana Patricia Calvo identificada con C.C. 52.178.336 ofició como directora del trabajo titulado "**Protocolo para la detección de virus dengue por RT-qPCR en muestras biológicas**", realizado por el estudiante del programa de Biología Oscar Vanegas Moncada para optar al título de Biólogo.

Fecha de sustentación y aprobación: 14 de junio de 2022

El presente certificado se expide a solicitud de la interesada a los 28 días del mes de julio de 2022.

Atentamente,

EDGAR PALACIOS ORTEGA
Secretario Académico
Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARÍA ACADÉMICA