

2020

Desarrollo y evaluación de un ensayo RT-qPCR para la cuantificación y detección simultánea de los virus Chikungunya, Dengue y Zika

Emmanuel Valencia Alvarez
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>



Part of the [Biology Commons](#)

Citación recomendada

Valencia Alvarez, E. (2020). Desarrollo y evaluación de un ensayo RT-qPCR para la cuantificación y detección simultánea de los virus Chikungunya, Dengue y Zika. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/88>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.



Universidad de La Salle

Bogotá, Colombia

Agosto 2020

Proyecto de Grado para optar por el título de Biólogo.

**Desarrollo y evaluación de un ensayo RT-qPCR para la cuantificación
y detección simultánea de los virus Chikungunya, Dengue y Zika**

Emmanuel Valencia Alvarez

Desarrollo y evaluación de un ensayo RT-qPCR para la cuantificación

y detección simultanea de los virus Chikungunya, Dengue y Zika

Emmanuel Valencia Alvarez

RESUMEN

Introducción. Las manifestaciones clínicas causadas por los arbovirus Chikungunya (CHIKV), Dengue (DENV) y Zika (ZIKV) son similares, por esta razón, se requiere un diagnóstico diferencial para la identificación del agente etiológico en caso de infección. Adicionalmente, la determinación de la carga viral es importante para la evaluación de la dinámica de la replicación viral en el huésped en entornos clínicos y experimentales, así como para la evaluación de posibles tratamientos antivirales. Este estudio tuvo como objetivo diseñar y evaluar un ensayo RT-qPCR para la cuantificación y detección simultanea de los virus Chikungunya, Dengue y Zika aislados de cultivos celulares, como paso previo a su detección simultánea en muestras clínicas.

Metodología. Se diseñó el constructo Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6) para la generación *in vitro* de un fragmento quimérico de ARN que contenía los sitios de unión de los primers y sondas para la amplificación de fragmentos genómicos seleccionados de los tres virus por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en un sistema “multiplex”. Se realizaron ensayos de amplificación para verificar la integridad del constructo, la posterior eliminación del ADN molde y la estandarización de las condiciones de reacción. El límite de detección (LoD) del sistema de amplificación fue determinado en reacciones “single” y “multiplex” para cada virus con el fin de determinar el desempeño en la detección y la cuantificación absoluta de carga viral. Adicionalmente el sistema de

amplificación fue evaluado en aislados clínicos provenientes de sobrenadantes de cultivos celulares y extracciones de ARN de tejido de ratón infectado.

Resultados. A partir de 115 ng de ADN del constructo Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6) se obtuvo 11.290 ng de ARN, posterior al tratamiento con RQ1-DNAse. El LoD en singleplex fue 6.37×10^3 , 1.56×10^3 y 4.68×10^1 copias de genoma equivalente por reacción (GCE/Rxn) para CHIKV, DENV 1-4 y ZIKV respectivamente. El LoD en sistema multiplex fue 5.42×10^4 GCE/Rxn para CHIKV y ZIKV y 1.60×10^5 GCE/Rxn para DENV 1-4. Ambos, sistemas single y multiplex, permitieron la detección y la cuantificación de muestras provenientes de sobrenadante de cultivo celular y muestras de tejido de ratón infectados.

Conclusiones. La prueba Mpx-CHK_DEN_ZK diseñada en este estudio, permitió la detección y cuantificación simultánea de CHIKV, DENV y ZIKV; obteniendo mayor sensibilidad en el formato singleplex. Posterior a su validación utilizando muestras clínicas de pacientes infectados y coinfectados, este ensayo podría ser utilizado para la detección de los mencionados virus en contextos de diagnóstico, vigilancia epidemiológica e investigación

PALABRAS CLAVE

Arbovirus, Diagnóstico diferencial, Carga viral, Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR), Chikungunya, Dengue, Zika.

INTRODUCCIÓN

Chikungunya (CHIKV), Dengue (DENV) y Zika (ZIKV) son arbovirus transmitidos por la picadura de mosquitos del género *Aedes* infectados. CHIKV y ZIKV están asociados a enfermedades infecciosas emergentes en las Américas, mientras que DENV presenta la más

alta prevalencia y se prevé que aumente su incidencia a futuro a nivel mundial, por lo que se considera el arbovirus de mayor impacto en la salud pública (1). En Colombia en el año 2010, se reportó la mayor incidencia de casos de DENV de la última década con 157.000 casos y una letalidad del 2,28% (2). En 2015 se reportó la mayor incidencia para CHIKV con 359.728 casos; mientras que para ZIKV se registraron 65.729 casos entre los años 2015 y 2016 (3, 4), para este último, la infección viral fue declarada como un problema de salud pública de escala internacional debido a su asociación con problemas neurológicos severos, especialmente por el síndrome congénito ocasionado por la infección en madres gestantes (5, 6). Para el 2018, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) emitió una alerta epidemiológica por los brotes del dengue en las Américas donde a finales del 2019 se reportaron 3.139.335 casos (7, 8). Para Colombia, a finales del año 2019 se reportaron 535 casos de CHIKV, 127.553 de DENV y 429 de ZIKV (9-11). Estos reportes indican que estos arbovirus siguen siendo amenazas para los sistemas de salud a nivel mundial.

En algunos casos, las infecciones causadas por estos tres virus pueden ser asintomáticas. La proporción de casos asintomáticos de CHIKV corresponde a aproximadamente del 3% al 28% y para DENV y ZIKV aproximadamente el 80%, sin embargo, en los casos en los que se presentan síntomas, éstos son inespecíficos (fiebre, erupción cutánea, conjuntivitis, dolor retro orbital y artralgia, entre otros), y no permiten establecer el agente etiológico de la infección, por lo cual requiere confirmación de laboratorio (12-15).

Adicionalmente, es frecuente encontrar coinfecciones de CHIKV, DENV y/o ZIKV debido a que el género del mosquito vector (*Aedes*) es el mismo para los tres virus (12, 16, 17). En estos casos, el diagnóstico preciso es crucial para optimizar el manejo clínico y vigilancia epidemiológica de los pacientes (18).

Por otra parte, la distribución del vector de estos arbovirus predomina en zonas tropicales y subtropicales (12, 16) y en Colombia, su distribución es aproximadamente en el 90% del territorio nacional ubicado por debajo de 2.200 metros sobre el nivel del mar (19), esta distribución revela el alto riesgo de contagio para millones de personas en el territorio nacional, por lo que es importante desarrollar herramientas diagnósticas que faciliten la vigilancia y la investigación de estos arbovirus.

Hasta ahora, los avances en el campo de la biología molecular aplicada a la virología han permitido el desarrollo de pruebas molecular sensibles y específicas para la detección cualitativa de genomas virales de diferentes muestras (20, 21). Entre estas pruebas, la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en tiempo real (RT-qPCR) ha sido ampliamente utilizada en diferentes entornos para la detección de CHIKV, DENV y ZIKV (22-25); sin embargo, la mayor parte de estos ensayos no están dirigidos a la cuantificación de la carga viral (20), lo que limita el uso de estas pruebas en estudios de asociaciones entre los síntomas y la carga viral, la eficacia de posibles medicamentos antivirales o la dinámica de la replicación del genoma en modelos experimentales (22, 26).

Debido a estas posibles aplicaciones y teniendo en cuenta que hasta el momento no tenemos conocimiento del desarrollo de alguna metodología para la cuantificación y detección simultánea de los virus CHIKV, DENV y ZIKV, el objetivo de este estudio fue desarrollar una herramienta para la detección y cuantificación simultánea de estos arbovirus en aislados clínicos provenientes de sobrenadantes de cultivos celulares y muestras extraídas de tejido de ratón infectado, a través del diseño y evaluación de un ARN sintético con función de control positivo.

MÉTODOS

Diseño de primers, sondas y el constructo de ADN Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6).

Se utilizó el módulo PrimerSelect de la suite LaserGene®, versión 7.2.1 (DNASTAR Inc. 2007; Madison, WI, EE. UU.), para diseñar los primers y las sondas para la detección específica de CHIKV, DENV y ZIKV por RT-qPCR (Tabla 1); para el caso de DENV, los primers diseñados permitieron la detección universal de los cuatro serotipos del virus. Posteriormente, se utilizó el módulo SeqBuilder de LaserGene® versión 7.2.1 (DNASTAR Inc. 2007; Madison, WI, USA.) para el diseño *in silico* de un constructo de ADN que incluyó las regiones genómicas delimitadas para estos primers, así como los sitios de unión para los primers y sondas específicas de cada virus. Los sitios de restricción para las enzimas XbaI y BamHI se incluyeron como secuencias espaciadoras en los límites CHIKV-DENV y DENV-ZIKV respectivamente (Figura 1). Por último, las secuencias del promotor de transcripción T7 y SP6 se incluyeron en los extremos 5' y 3' respectivamente, para permitir la transcripción *in vitro* de las hebras de ARN virales de sentido positivo y negativo (Figura 1). Una vez diseñado el constructo de ADN Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6), se usó el servicio de síntesis de genes de la empresa GenScript® donde se obtuvieron 500 ng de ADN.

Tabla 1. Secuencias de primers y sondas diseñadas para la amplificación de los fragmentos virales.

VIRUS	Primer/Sonda	Secuencia de primers	Posición genómica	ID RefSeq	Tamaño del fragmento (pb)	TM (C°)
CHIKV	CHIKV-F	RAAGGAGTGCCGGAARGACAT	1261-1281 (nSP1)			56,8
	CHIKV-R	GACAACCCGGACGACCACAG	1458-1439 (nSP1)	KR559486.1	178	57,4
	CHIKV-P	HEX-GARAAGCTYYTGGGGGTCAGAGA-BHQ-1	1289-1311			56,6
DENV	DENV1-4 F	TGTACGCACGGGGTAGCAGACT	10.490-10.511 (3'UTR DBI-XRNA3)			56,1
	DENV1-4 R	TGTGCCTGGAATGATGCTGHRGAG	10.692-10.669 (UTR 3'SL)	NC_001477.1	210	58
	DENV1-4 P	Cy5-GCATATTGACGCTGGGARAGA-BHQ-2	10.686-10.706			54,3
ZIKV	ZIKV-F	CTGYGGGATCTCCTCTGTYTCAA	2651-2673 (NS1)	KJ776791.2	155	59,2

ZIKV-R	ACGGGCAATCTCTGTGGASCTCT	2806-2784 (NS1)	59,8
ZIKV-P	FAM-ACGGTCGTTGTGGGATCTGTRAAA-BHQ-0	2748-2771	58,4

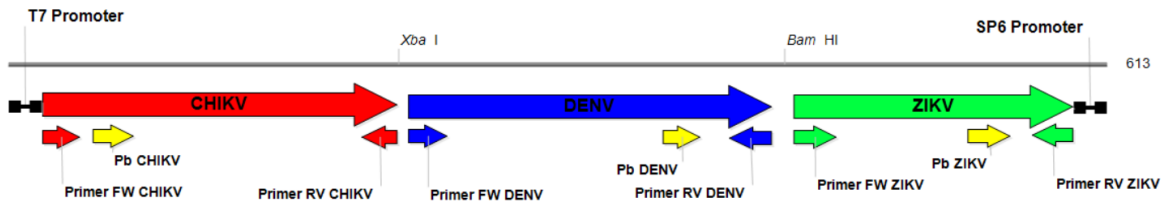


Figura. 1. Diseño *in silico* del constructo Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6). Las regiones genómicas delimitadas por los primers viro-específicos se ensamblaron en una sola hebra. Los sitios de enlace para las sondas viro-específicas se indican como flechas amarillas y las secuencias promotoras de la transcripción, como flechas grises.

Amplificación de Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6) por PCR convencional.

Se realizaron ensayos de PCR convencional con el fin de amplificar el constructo sintetizado. Se probaron 3 temperaturas de anillaje, 42°C, 45°C y 50°C. Las reacciones de PCR se configuraron en volúmenes finales de 50 µL que contenían 0.4mM de primers SP6 y T7 (5'-ATTAGGTGACACTATAG-3', 5'-TAATACGACTCACTACTAGG-3', respectivamente), 0.4 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 0.5 µL de Taq Polimerasa (5U/µL), 5 µL de Buffer de PCR 10X, 1 µL del constructo Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6) (5 ng/µL) y 35.5 µL de agua libre de nucleasas. El perfil térmico consistió en 94°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, temperaturas de anillaje a probar durante 30 segundos, 72°C durante 70 segundos; y finalmente 70°C durante 5 minutos.

Purificación de ADN de gel de agarosa.

Los amplicones con el tamaño esperado del constructo Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6) (614 pb), fueron resueltos en geles de agarosa al 2% y posteriormente extraídos y purificados utilizando el kit de extracción de gel QIAquick® (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para esto se añadieron tres volúmenes de Buffer QG a 1 volumen de la banda de gel y se incubó a 50°C durante 10 minutos. Después de añadir un volumen de isopropanol a la mezcla, se colocó en una columna QIAquick, y se centrifugó durante 1 min a 7.900 g; seguido se descartó el eluido de la columna y se agregó 0.75 ml Buffer PE y se centrifugó a 7900 g por un minuto, posteriormente se centrifugo durante 1 min adicional a 7.900 g. Finalmente, la elución del ADN se llevó a cabo añadiendo 50 µL de Buffer EB a la columna y centrifugando durante 1 min. La integridad del constructo de ADN purificado fue verificada por q-PCR en un volumen final de 10 µL que contenía 5 µL de TaqMan®, Master Mix PCR (2X), 1.5 µL del constructo Mpx-CHK_DEN_ZX(T7-SP6), 1.5 µL de los primers y sondas para CHIV, DENV1-4 o ZIKV (2 µM/0.3 µM) y 2 µL de agua libre de nucleasas. El perfil térmico fue: 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y una temperatura de anillaje/extensión de 55°C durante 45 segundos.

Transcripción *in vitro* del constructo y digestión del ADN molde.

La reacción de transcripción *in vitro* se configuró en un volumen final de 50 µL que contenía 25 µL de Buffer T7 RiboMAX™ Express 2x, 23 µL del constructo Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6) (5 ng/µL) y 2 µL de la mezcla enzimática T7 Express. La reacción se incubó durante 30 minutos a 37°C. La eliminación del ADN molde y los rNTPs residuales se llevaron a cabo mediante la adición de 2 unidades de DNase RQ1 libre de RNasa y una

incubación durante 1 hora a 37°C. El ARN transcrito llamado control Mpx-CHK_DEN_ZK, fue purificado usando el Mini Kit de ARN Viral QIAamp (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Verificación de la digestión del ADN molde.

Se llevaron a cabo ensayos RT-PCR en dos pasos en tiempo real para determinar si el ADN molde se digirió completamente durante el paso de incubación de DNase RQ1 libre de RNasa, obteniendo el ARN control transcrito. Para ello se realizaron reacciones pareadas de ADNc con retrotranscriptasa (RT+), y sin (RT-), utilizando el sistema SuperScript III First-Strand Synthesis (Thermo). Las reacciones de validación se establecieron en un volumen final de 20 µL que contenían 2 µL de los primers y sondas para CHIKV, DENV1-4 y ZIKV (10 µM cada uno), 1 µL de ARN control Mpx-CHK_DEN_ZK (0.1 ng/ µL), 0.5mM de DNtps, 4 µL de Buffer 5X, 0.01 mM de DTT, 1 µL de RNasa Out (40U/µL), 1 µL SuperScript™ III Reverse Transcriptase (200U/µL) en reacciones RT+ (agua libre de nucleasas para reacciones RT-) y 7 µL de agua libre de nucleasas.. La síntesis del ADNc en la reacción fue realizada por incubación a 42°C durante 50 min y 70°C durante 15 min. Finalmente, las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron como se describe en "Purificación del ADN del gel de agarosa". Después de validar la digestión del ADN de la plantilla, el ARN control Mpx-CHK_DEN_ZK se almacenó a -80°C para ensayos posteriores.

Estandarización del perfil térmico para los ensayos RT-qPCR usando el control Mpx-CHK_DEN_ZK.

Se probaron tres concentraciones diferentes de primers y sondas en reacciones RT-PCR en un sistema multiplex en tiempo real (CHIKV, DENV y ZIKV) con el fin de estimar las

mejores concentraciones para realizar los ensayos de estandarización del ciclo térmico así: 1) primers a 0,14 μM y sondas a 0,1 μM ; 2) primers a 0,42 μM y sondas a 0,3 μM ; 3) primers a 1 μM y sondas de 0,36 μM . Se determinó el coeficiente de variación (CV) para cada virus dividiendo la desviación estándar del Ct sobre el Ct promedio y se consideraron las condiciones óptimas usando este coeficiente.

Se probaron tres temperaturas de anillaje/extensión en ensayos RT-PCR en tiempo real utilizando cinco diluciones en serie 1:10 del control Mpx-CHK_DEN_ZK (a partir de la 1×10^{-1} ng/ μL). Estos se utilizaron como estándares para obtener una curva estándar. Para ello, se configuraron reacciones multiplexadas RT-PCR en tiempo real en volumen final de 10 μL que contienen 0.5 μL de SuperScript® III/Platinum® Taq Mix, 0.3 μL de RnaseOUT (40U/L), 5 μL de Buffer 2X Reaction, 1.5 μL de la dilución del ARN control, 1 μL de los primers y sondas para CHIKV, DENV1-4 y ZIKV (4.2 μM /3.6 μM) y 1.7 μL de agua libre de nucleasas. El perfil térmico fue de 50°C durante 15 minutos, 95°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y la temperatura de anillaje/extensión (50, 55 o 60°C) durante 45 segundos. Se analizaron las curvas estándar, la temperatura de anillaje/extensión con la mejor eficiencia de PCR (pendiente más cercana a $-3.32 = 100\%$) y el coeficiente de correlación ($R^2 > 0.985$) fue escogida para usarla en el perfil térmico de los ensayos de límite de detección.

Límite de detección (LoD).

El límite de detección fue evaluado en ensayos de RT-PCR en sistema singleplex y multiplex en tiempo real utilizando 10 diluciones en serie con factor de dilución 10 del control Mpx-CHK_DEN_ZK (a partir de 1×10^{-1} ng/ μL) con ocho réplicas de cada dilución. El LoD fue determinado como la última dilución donde el 95% de las réplicas fueron positivas (Cycle

treshold, $CT < 38$). Se estimó el número de copias de genoma equivalente (GCE) a nanogramos del control Mpx-CHK_DEN_ZK fórmula partir de la ecuación que se muestra en la Ecuación 1 (27). Los datos de LoD se calcularon y expresaron en GCE por reacción de PCR (GCE/Rxn) utilizando el algoritmo de análisis probit de SPSS v.18.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

$$\text{Copias de genoma equivalentes (GCE)} = \frac{\text{Cantidad} * 6.022 \times 10^{23}}{\text{Tamaño} * 1.0 \times 10^9 * 340}$$

Ecuación 1. Conversión de ng de ARN a GCE. Cantidad = ng del ADN del constructo. Tamaño = tamaño en pares de bases del constructo.

Detección de ARN viral a partir de aislados clínicos.

La utilidad de la prueba Mpx-CHK_DEN_ZK en la detección simultánea y cuantitativa de los tres virus se evaluó de forma exploratoria, por lo que se empleó un muestreo no probabilístico por conveniencia donde el tamaño de la muestra para DENV fue de tres (3) muestras de sobrenadante de cultivo de aislado clínico para cada serotipo, mientras que para CHIKV fue de dos (2) muestras de sobrenadante de cultivo y para ZIKV fue de dos (2) muestras de tejido de ratón BALB/c infectado con ZIKV. El rendimiento de la detección y cuantificación de la carga viral las muestras experimentales se evaluaron en formatos singleplex y multiplex, usando como estándar para la cuantificación absoluta 5 diluciones seriales con factor de dilución 10 del control Mpx-CHK_DEN_ZK (a partir de 4.47×10^8 GCE/Rxn) con 3 réplicas de cada dilución. El ARN viral fue purificado usando el MiniKit de ARN Viral QIAamp, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para los virus los tres virus se montaron tres (3) réplicas técnicas de cada muestra.

Todos los aislamientos usados para la detección fueron facilitados y clasificados según la disponibilidad del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud.

RESULTADOS

Amplificación del constructo Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6) por PCR convencional.

La electroforesis de gel de agarosa de los ensayos de PCR con el constructo Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6) mostró un tamaño de banda aproximado al esperado, ubicándose al límite inferior de la banda de 650 pb del marcador, así como bandas inespecíficas en todas las temperaturas de anillaje probadas (Fig. 3). Sin embargo, se observaron menos bandas no específicas con 58°C, aunque con menor resolución. El fragmento esperado fue extraído de la banda de gel de agarosa de los ensayos de PCR realizados con la temperatura de anillaje de 58°C. El ADN resultante fue cuantificado por espectrofotometría (Nanodrop 2000, ThermoFisher Scientific, USA), y se obtuvieron un total de 240 ng/μL del constructo amplificado. Los ensayos de PCR en tiempo real utilizando el constructo amplificado y los juegos de primers y sondas para cada virus mostraron las curvas de amplificación esperadas, confirmando la presencia de las secuencias objetivo en cada virus (Fig. 4).

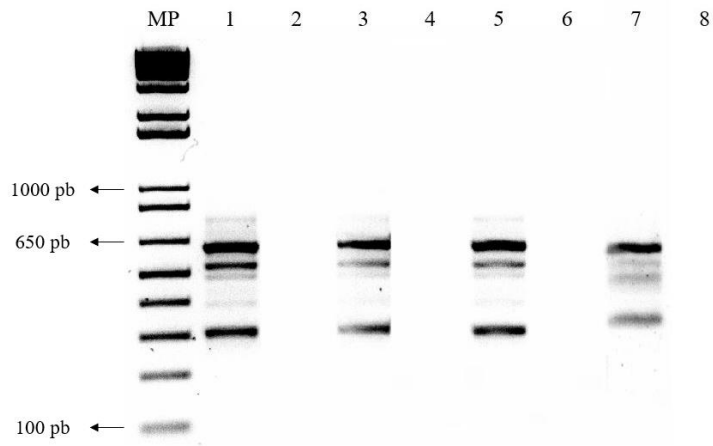


Figura. 3. Electroforesis de gel de agarosa del ensayo PCR convencional en el que se prueban diferentes temperaturas de anillaje. Carril 1: 42°C; Carril 3: 45°C; Carril 5: 50°C; Carril 7: 58°C; Carriles 2, 4, 6 y 8: Controles negativos, MP: marcador de peso molecular (1kb DNA Ladder-Thermo).

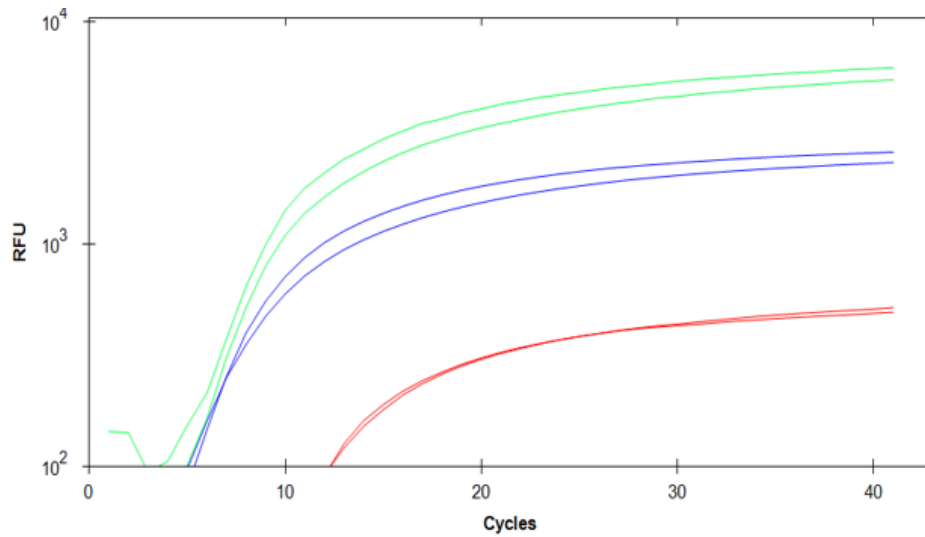


Figura. 4. Curvas de amplificación de PCR en tiempo real de secuencias objetivo: CHIKV (rojo), DENV (azul) y ZIKV (verde), utilizando ADN extraído y purificado a partir del producto de

amplificación del constructo Mpx_CHIKV-DENV-ZIKV(T7-SP6) resuelto en el gel de agarosa.

RFU: Unidades de Fluorescencia Relativa.

Transcripción *in vitro* de ARN Mpx-CHK_DEN_ZK a partir del promotor T7.

La cantidad resultante del control de ARN Mpx-CHK_DEN_ZK después de la transcripción *in vitro* a partir del promotor T7 fue de 11.290 ng/μL de ARN. La eliminación completa del ADN de la plantilla se confirmó en los ensayos de RT-PCR de dos pasos después de observar la ausencia de curvas de amplificación en los ensayos RT- (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de ensayos RT-PCR en tiempo real en dos pasos para validar la eliminación completa del ADN molde del control de ARN Mpx-CHK_DEN_ZK

ENSAYO	VIRUS	Fluoróforo	Ct Promedio
CHIKV (RT+)	CHIKV	HEX	24,02
DENV1-4 (RT+)	DENV1-4	CY5	26,83
ZIKV (RT+)	ZIKV	FAM	24,98
CHIKV (RT-)	CHIKV	HEX	Indet.
DENV1-4 (RT-)	DENV1-4	CY5	Indet.
ZIKV(RT-)	ZIKV	FAM	Indet.

Estandarización del perfil térmico para la amplificación de fragmentos virales en el control de ARN Mpx-CHK_DEN_ZK.

Los experimentos con tres mezclas diferentes de concentraciones de los primers y sondas mostraron que las condiciones 2 y 3 tenían CVs bajos y comparables (Tabla 3). La mezcla 2 de primers y sondas fue elegida para estandarizar las condiciones del ciclo térmico debido a que el gasto de reactivos es menor. Las curvas estándar generadas con diluciones en serie del

control Mpx-CHK_DEN_ZK mostraron la mejor eficiencia de PCR y R^2 con 55°C como temperatura de anillaje/extensión para las tres secuencias blanco (Fig. 6).

Tabla. 3. Coeficientes de variación en porcentaje (CV) con diferentes concentraciones de primers y sondas para la amplificación de secuencias para cada virus en Mpx-CHK_DEN_ZK.

Mezcla Primers/Sondas	Concentración (μ M)	(CV)		
		CHIKV	DENV	ZIKV
1	Primers: 0.14 Sondas: 0.1	0.09	0.09	0.08
2	Primers: 0.43 Sondas: 0.3	0.02	0.02	0.02
3	Primers: 1 Sondas: 0.37	0.02	0.01	0.01

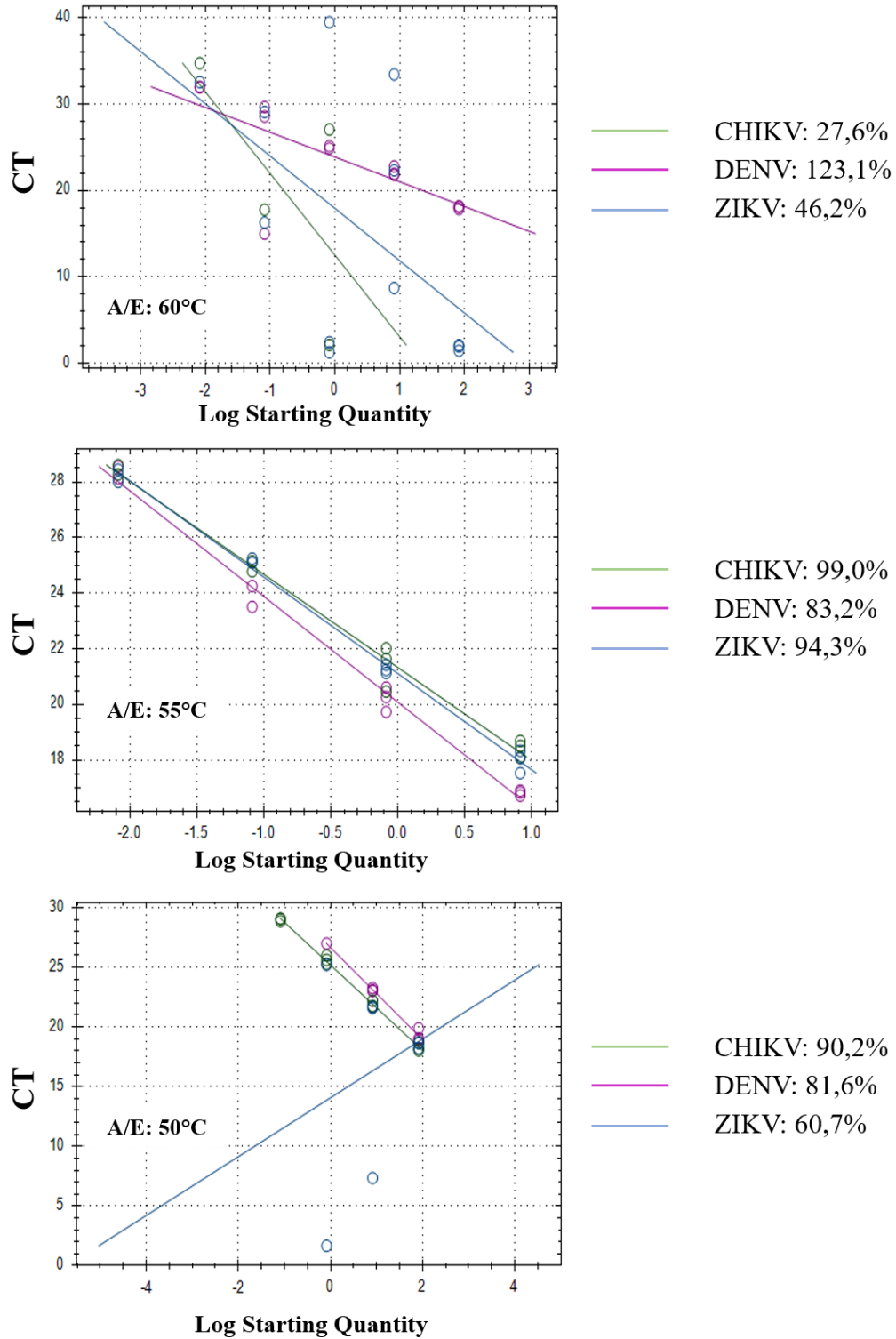


Figura. 6. Resultados de las eficiencias obtenidas al realizar variaciones en la temperatura de anillaje; TM de 50°C, 55°C y 60°C. La TM de 55°C produjo los mejores resultados en los 3 virus. (HEX:

Fluoróforo correspondiente a CHIKV; CY5: Fluoróforo correspondiente a DENV; FAM: Fluoróforo correspondiente a ZIKV)

Evaluación del límite de detección.

El análisis del rendimiento de la prueba de detección Mpx-CHK_DEN_ZK a través de diluciones seriales del control Mpx-CHK_DEN_ZK mostró que el LoD en formato singleplex fue de 6.37×10^3 , 1.56×10^3 y 4.68×10^1 GCE/Rxn para CHIKV, DENV, y ZIKV respectivamente (Fig. 7). El rendimiento en formato multiplex se evaluó utilizando tres concentraciones diferentes de mezcla de primers y sondas, tal como se indica en la figura 8, (A), (B) y (C). El LoD para la mezcla de primers y sondas A fue de 5.42×10^4 (CHIKV), 1.60×10^5 (DENV1-4) y 5.42×10^4 (ZIKV) GCE/Rxn; para la mezcla de primers y sondas B fue 6.00×10^4 (CHIKV), 2.8×10^5 (DENV1-4) y 1.30×10^5 (ZIKV) GCE/Rxn; y para la mezcla de primers y sondas C fue de 2.60×10^6 (CHIKV), 5.00×10^6 (DENV1-4) y 4.90×10^6 (ZIKV) GCE/Rxn. Estos resultados indican que la mezcla de primers y sondas A, donde se utilizaron concentraciones equimolares de primers y sondas virales específicas, ofrece el mejor rendimiento para el formato multiplex. Cuando se comparó el rendimiento de los formatos single y multiplex (mix A), se observó que el LoD (GCE/Rxn) para CHIKV, DENV1-4 y ZIKV era 10, 100 y 1000 veces mayor para el formato multiplex, respectivamente, lo que indica que el formato singleplex es más sensible (Fig. 7 y 8A), y que el formato múltiplex puede generar falsos negativos en muestras con números de copias por debajo de esos límites de detección.

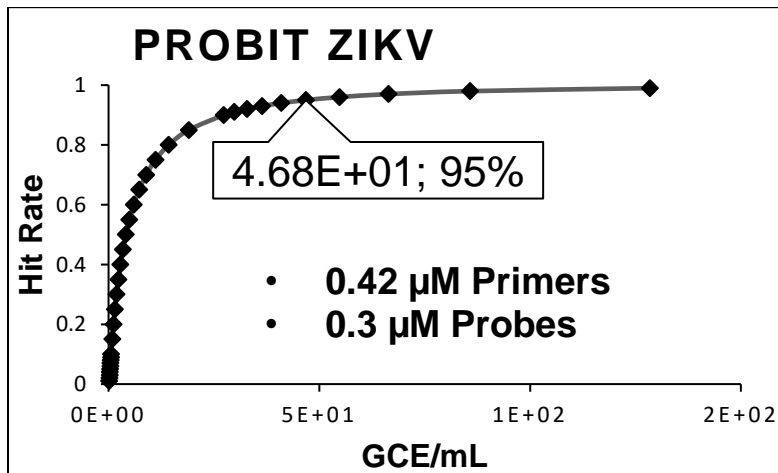
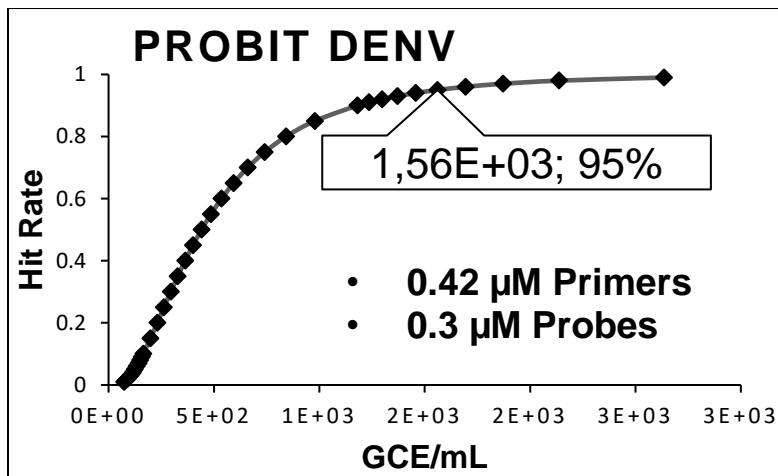
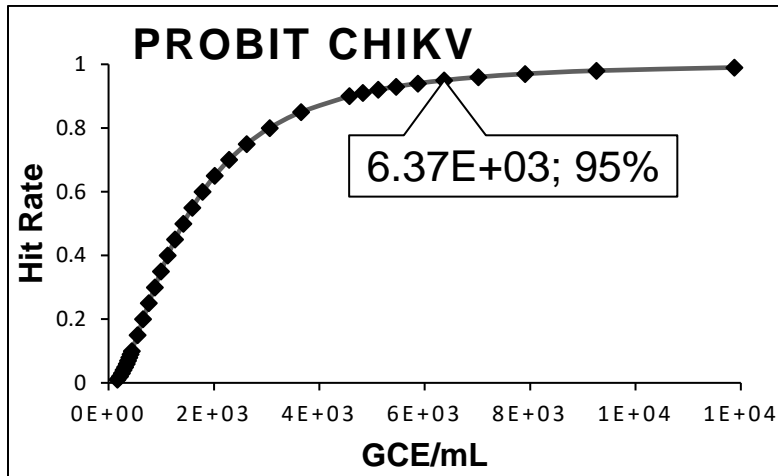


Figura. 7. Análisis de regresión probit para CHIKV, DENV1-4 y ZIKV en GCE/Rxn a través de RT-qPCR en formato singleplex. El LoD y la detección correspondiente al 95% se indican en el cuadro de diálogo para cada virus. Hit Rate: Proporción de aciertos de detección.

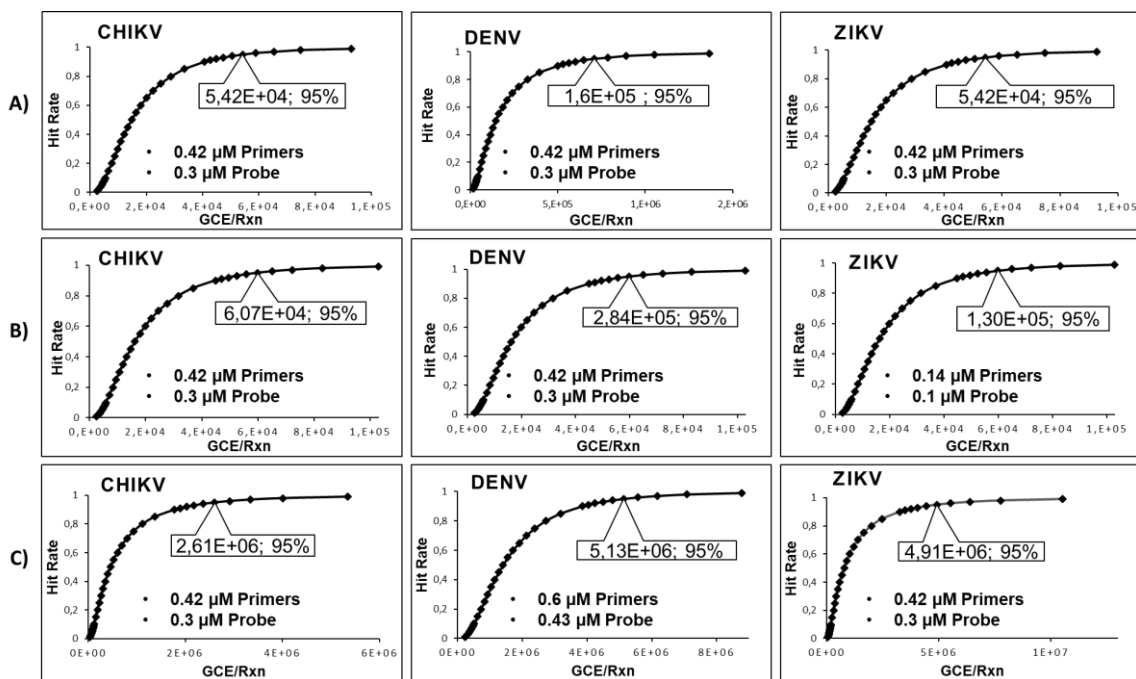


Figura. 8. Análisis de regresión probit para CHIKV, DENV1-4 y ZIKV en GCE/Rxn a través de RT-qPCR en formato multiplex. Las concentraciones de mezcla de primers y sondas específicas del virus utilizadas en las reacciones RT-qPCR se indican en A, B y C. El LoD y la detección correspondiente del 95% se indican en el cuadro de diálogo de cada virus.

Determinación de la carga viral de CHIKV, DENV 1-4 y ZIKV

Las curvas estándar desarrolladas con diluciones en serie del control Mpx-CHK_DEN_ZK permitieron la cuantificación absoluta de los GCE para CHIKV, DENV 1-4 y ZIKV en aislados clínicos provenientes de sobrenadantes de cultivos celulares y de extracciones de ARN a muestras de ratón infectados, tanto en formatos single como en multiplex. Las eficiencias de amplificación en formato singleplex fueron del 95.5%, 100.1% y 98.6%,

mientras que para el formato multiplex fue del 86.6%, 74.1%, 86.2% para CHIKV, DENV1-4 y ZIKV, respectivamente (Fig. 9). Además, el comportamiento lineal de los formatos singleplex y multiplex indicaba que el rango dinámico de formato singleplex (5 logs) era mayor que el formato multiplex (4 logs). Además, al analizar el comportamiento lineal de la prueba de detección Mpx-CHK_DEN_ZK, se observó un rango dinámico más alto en singleplex (5 logs) que en multiplex (4 logs) (Fig. 9). En general, la estimación de los GCEs entre formatos single y multiplex fue comparable para los tres virus; sin embargo, una muestra de DENV-1 y todas las muestras probadas de DENV-4 no fueron determinadas (Indet.) en el ensayo multiplex. Este resultado era de esperarse, dado que el ensayo singleplex mostró que los GCEs de estas muestras de DENV estaban por debajo del LoD estimado (Tabla 4). Por último, se simuló muestras de coinfección combinando dos o tres virus en un único tubo de reacción. Las mezclas de aislamientos virales de CHIKV y ZIKV se identificaron correctamente en la concentración esperada. DENV1 no se detectó en los ensayos de coinfección como se esperaba debido a que la muestra estaba por debajo del LoD, sin embargo, DENV2 no se detectó a pesar de que la muestra estaba por encima del LoD estimado (Tabla 4). Finalmente, no se observó amplificación de otros virus ajenos de los que estaban en la muestra, por lo cual no se observó reactividad cruzada entre los 3 virus.

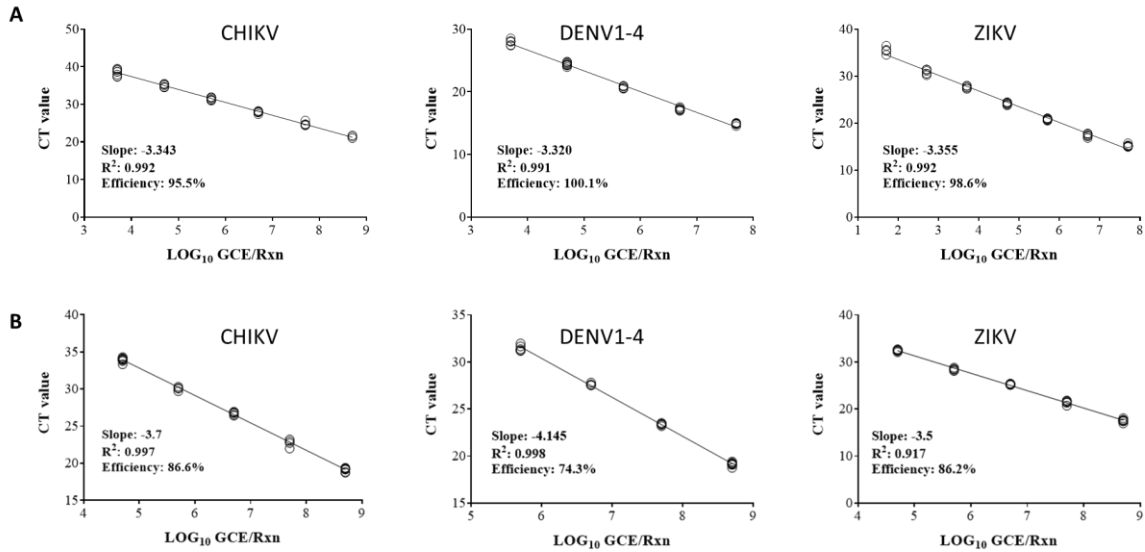


Figura. 9. Desempeño de la RT-qPCR viro específica usando el control Mpx-CHK_DEN_ZK. Las curvas estándar muestran la eficiencia y la linealidad obtenida de las diluciones seriadas del control de ARN.

Tabla 4. Cuantificación del ARN viral en aislados clínicos de CHIKV, DENV1-4 y ZIKV.

VIRUS	SAMPLES	GCE/Rxn (SINGLEPLEX)	GCE/Rxn (MULTIPLEX)
CHIKV	Aislado 1	2,89E+06	2,61E+06
	Aislado 2	1,41E+06	1,34E+06
DENV 1	Aislado 1	3,71E+05	3,47E+05
	Aislado 2	2,12E+04	Indet.
	Aislado 3	3,41E+05	9,38E+06
DENV 2	Aislado 1	1,06E+06	9,75E+05
	Aislado 2	8,25E+05	5,10E+05
DENV 3	Aislado 3	1,18E+07	2,12E+07
	Aislado 1	1,68E+06	2,96E+06
DENV 4	Aislado 2	4,24E+06	4,29E+06
	Aislado 1	1,19E+05	Indet.
ZIKV	Aislado 2	9,08E+02	Indet.
	Aislado 3	3,49E+03	Indet.
CHIKV; DENV-1	Aislado 1	1,40E+06	1,64E+06
	Aislado 2	6,18E+05	7,00E+05
CHIKV; ZIKV	Aislado 1; Aislado 2	N/A	2,14E+06; Indet.
DENV-2; ZIKV	Aislado 1; Aislado 1	N/A	2,35E+06; 1,18E+06
DENV-2; ZIKV	Aislado 1; Aislado 1	N/A	Indet.; 6,77E+06

CHIKV; DENV-2; ZIKV	Aislado 2; Aislado 1; Aislado 1	N/A	2,00E+06; Indet.; 4,58E+05
----------------------------	------------------------------------	-----	-------------------------------

DISCUSIÓN

En países tropicales como Colombia, los mosquitos vectores de CHIKV, DENV y ZIKV están ampliamente distribuidos en todo el país, lo que implica un alto riesgo de transmisión a la población (19, 28) Sin embargo, no sólo los países tropicales, sino también algunas regiones de América del Norte y Europa han reportado la transmisión local de estos virus (29-32). Por lo tanto, el desarrollo de herramientas diagnósticas con aplicaciones clínicas y de investigación, contribuirían al control y prevención de las epidemias causadas por estos virus.

Existen diferentes métodos para la detección simultánea de CHIKV, DENV y ZIKV (comerciales y no comerciales), sin embargo, la disponibilidad de métodos para la cuantificación simultánea es limitada (12, 28, 33-35)

Estudios realizados por Santiago G., et al, 2013, dónde comparó el desempeño y la sensibilidad de los ensayos RT-qPCR del Centers for Disease Control and Prevention (CDC) y de Johnson et al., 2005 para la detección y serotipificación de DENV; observó que el ensayo del CDC superó al de Johnson detectando diez veces menos objetivos DENV en formatos single y multiplex; sin embargo, los rangos de detección de GCE/Rxn para estos ensayos fueron alrededor de 1.00×10^3 a 1.00×10^5 GCE/Rxn para formato singleplex, y 1.00×10^3 a 1.00×10^6 GCE/Rxn dependiendo del serotipo de DENV (36). El rendimiento general del ensayo de detección Mpx-CHK_DEN_ZK fue similar al mencionado anteriormente con LoDs de 1.56×10^3 y 1.60×10^5 GCE/Rxn para formatos individuales y multiplex respectivamente, aunque no permite la identificar el serotipo de DENV (Figs. 7 y 8A).

En comparación con los datos de sensibilidad analítica reportada para los métodos existentes para la detección multiplexada de CHIKV, DENV y ZIKV, el ensayo de detección Mpx-CHK_DEN_ZK detectó 100 veces menos ARN objetivo para CHIKV y ZIKV y 1000 veces menos ARN blanco para DENV1-4, mientras que el formato singleplex detectó cantidades similares de GEC/reacción para ZIKV y 10 veces menos ARN objetivo para DENV1-4 y CHIKV (35, 37-40)

El aparente menor rendimiento del ensayo de detección Mpx-CHK_DEN_ZK en formato multiplex podría deberse a que el ARN utilizado como estándar, contiene simultáneamente las secuencias blanco para los tres virus en concentraciones equimolares, mientras que los ensayos mencionados anteriormente utilizaban estándares de un solo blanco para las estimaciones de LoD de cada virus en sus formatos multiplex. Por lo tanto, se espera que en el formato multiplex de la prueba de detección Mpx-CHK_DEN_ZK, la competencia de recursos entre diferentes amplicones afecte negativamente a la eficiencia de amplificación de los objetivos y por lo tanto a la sensibilidad de la reacción (41). En este sentido, el LoD encontrado en el sistema multiplex desarrollado en este estudio describiría el LoD cuando los tres virus están presentes en la muestra y el LoD cuando sólo un virus está presente sigue sin ser probado.

El rendimiento del ensayo de detección Mpx-CHK_DEN_ZK para distinguir simultáneamente la infección de CHIKV, DENV y ZIKV en biofluidos humanos, no se evaluaron en este estudio, por lo que se requerirán estudios adicionales para evaluar el desempeño en este tipo de muestras. Aun así, el ensayo de detección de CHK_DEN_ZK Mpx es potencialmente aplicable para obtener información que dirija el tipo de tratamiento a un paciente, a los estudios de investigación en los que es necesario realizar un seguimiento

de la carga viral de estos virus por separado o cuando sea necesaria la detección y cuantificación simultáneas de cualquier combinación de estos virus, incluidos los estudios de competencia de virus *in vitro* e *in vivo* (42, 43) en mosquitos (44).

CONCLUSIONES

Se desarrolló una herramienta con potencial apoyo diagnóstico, epidemiológico y de investigación para la detección y cuantificación simultánea de los arbovirus CHIKV, DENV y ZIKV mediante un sistema de RT-qPCR y un ARN *in vitro* como control de amplificación. Esta herramienta permite la detección y cuantificación simultánea de los 3 arbovirus de forma específica en sobrenadantes de aislamientos virales y en muestras de tejido de ratón infectado, sin embargo, la sensibilidad del sistema multiplex fue notablemente menor respecto al sistema singleplex. Por otro lado, la sensibilidad del formato multiplex respecto a otros sistemas de detección disponibles no es comparable, debido a que en estos sistemas el LoD en formato multiplex se obtuvo mediante controles de ARN individuales para cada virus, a diferencia de este en el cual se encuentra simultáneamente ARN de los tres virus.

Al ser una metodología novedosa, se espera que la prueba de detección llamada Mpx-CHK_DEN_ZK proporcione un mecanismo de apoyo de diagnóstico para los laboratorios de vigilancia epidemiológica del país y sea potencialmente aplicable en la investigación asociada con estos arbovirus gracias a la capacidad de cuantificación múltiple e individual de los tres virus, donde podría usarse para evaluar los efectos de posibles candidatos antirretrovirales, evaluar el comportamiento de la viremia a lo largo del tiempo en modelos biológicos o determinar la competencia de virus *in vitro* e *in vivo* en mosquitos.

LISTA DE ABREVIATURAS

CHIKV: Chikungunya virus; DENV: Dengue virus; ZIKV: Zika virus; LoD: Limit of detection; GCE: Genome copy equivalents; RT-qPCR: Reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction; PAHO: Pan American Health Organization; CDC: Centers for Disease Control and Prevention; INS: Instituto Nacional de Salud.

REFERENCIAS

1. Martínez JD, Garza JAC, Cuellar-Barboza A. Going Viral 2019: Zika, Chikungunya, and Dengue. *Dermatol Clin.* 2019;37(1):95-105.
2. Bello-Pérez SL. COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DEL DENGUE EN COLOMBIA AÑO 2010. In: Pública SdVyceS, editor. 2010.
3. Salas-Botero D. INFORME FINAL DEL EVENTO CHIKUNGUÑA, COLOMBIA, 2015. In: Pública DdVyAdReS, editor. 2015.
4. Pacheco O, Beltran M, Nelson CA, Valencia D, Tolosa N, Farr SL, et al. Zika Virus Disease in Colombia - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2016.
5. Lima MES, Bachur TPR, Aragao GF. Guillain-Barre syndrome and its correlation with dengue, Zika and chikungunya viruses infection based on a literature review of reported cases in Brazil. *Acta Trop.* 2019;197:105064.
6. Angelo JR, Fuller TL, Leandro BBS, Praca HLF, Marques RD, Ferreira JMC, et al. Neurological complications associated with emerging viruses in Brazil. *Int J Gynaecol Obstet.* 2020;148 Suppl 2:70-5.
7. PAHO. Epidemiological Alert Dengue. Washington, D.C.; 2018.
8. Organization PAH. Epidemiological Update Dengue 2019.

9. Avila-Rubiano MA. INFORME EVENTO CHIKUNGUNYA, Periodo epidemiológico XIII Colombia, 2019. In: Pública DdVyAdReS, editor. 2019.
10. Rodríguez-Reyes AJ. INFORME DE EVENTO DENGUE Periodo epidemiológico XIII, Colombia, 2019. In: Publica DdVyAdReS, editor. 2019.
11. Avila-Rubiano MA. INFORME DE EVENTO ZIKA Periodo epidemiológico XIII, Colombia, 2019. In: Pública DdVyAdReS, editor. 2019.
12. Mansuy JM, Lhomme S, Cazabat M, Pasquier C, Martin-Blondel G, Izopet J. Detection of Zika, dengue and chikungunya viruses using single-reaction multiplex real-time RT-PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;92(4):284-7.
13. Appassakij H, Khuntikij P, Kemapunmanus M, Wutthanarungsan R, Silpapojakul K. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? *Transfusion.* 2013;53(10 Pt 2):2567-74.
14. Grunnill M. An exploration of the role of asymptomatic infections in the epidemiology of dengue viruses through susceptible, asymptomatic, infected and recovered (SAIR) models. *Journal of Theoretical Biology.* 2018;439:195-204.
15. Haby MM, Pinart M, Elias V, Reveiz L. Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. *Bull World Health Organ.* 2018;96(6):402-13D.
16. Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infect Genet Evol.* 2019;67:191-209.
17. Villamil-Gomez WE, Rodriguez-Morales AJ, Uribe-Garcia AM, Gonzalez-Arismendy E, Castellanos JE, Calvo EP, et al. Zika, dengue, and chikungunya co-infection in a pregnant woman from Colombia. *Int J Infect Dis.* 2016;51:135-8.

18. Mercado-Reyes M, Acosta-Reyes J, Navarro-Lechuga E, Corchuelo S, Rico A, Parra E, et al. Dengue, chikungunya and zika virus coinfection: results of the national surveillance during the zika epidemic in Colombia. *Epidemiol Infect.* 2019;147:e77.
19. Rodriguez-Reyes AJ. INFORME DE EVENTO DENGUE, COLOMBIA, 2018. In: Pública DdVyAdReS, editor. 2018.
20. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12 Suppl):S30-8.
21. Alvarez-Diaz DA, Quintero PA, Pelaez-Carvajal D, Ajami NJ, Usme-Ciro JA. Novel pan-serotype control RNA for dengue virus typing through real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 2019;271:113677.
22. Solano-Luna LM, Chavarro-Mesa E, Ángel-Diaz JE. Quantitative PCR for detection of Citrus tristeza virus in Colombia. *Revista Ciencia y Agricultura.* 2018;15:7-18.
23. Laamiri N, Aouini R, Boutheina M, Abdeljelil G, Issam H. A multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of four most common avian respiratory viruses. *Virology.* 2017;515:29-37.
24. Taylor E, Morgan I. A novel technique with enhanced detection and quantitation of HPV-16 E1- and E2-mediated DNA replication. *Virology.* 2003;315:103-9.
25. Kang T. Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review. *Trends in Food Science & Technology.* 2019;91:574-85.
26. Pal T, Dutta SK, Mandal S, Saha B, Tripathi A. Differential clinical symptoms among acute phase Indian patients revealed significant association with dengue viral load and serum IFN-gamma level. *J Clin Virol.* 2014;61(3):365-70.
27. Staroscik A. Copy number calculator for realtime PCR. *Science Primer*2011.

28. Mishra N, Ng J, Rakeman JL, Perry MJ, Centurioni DA, Dean AB, et al. One-step pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of zika, dengue, chikungunya, West Nile viruses and a human housekeeping gene. *J Clin Virol*. 2019;120:44-50.
29. Kuhlisch C, Kampen H, Walther D. The Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Central Germany: Surveillance in its northernmost distribution area. *Acta Trop*. 2018;188:78-85.
30. Valerio L, Roure S, Fernandez-Rivas G, Ballesteros AL, Ruiz J, Moreno N, et al. Arboviral infections diagnosed in a European area colonized by *Aedes albopictus* (2009-2013, Catalonia, Spain). *Travel Med Infect Dis*. 2015;13(5):415-21.
31. Musso D, Rodriguez-Morales AJ, Levi JE, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ. Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(11):e355-e61.
32. Amraoui F, Failloux AB. Chikungunya: an unexpected emergence in Europe. *Curr Opin Virol*. 2016;21:146-50.
33. Kikuti M, Tauro LB, Moreira PSS, Nascimento LCJ, Portilho MM, Soares GC, et al. Evaluation of two commercially available chikungunya virus IgM enzyme-linked immunoassays (ELISA) in a setting of concomitant transmission of chikungunya, dengue and Zika viruses. *Int J Infect Dis*. 2020;91:38-43.
34. Boga JA, Alvarez-Arguelles ME, Rojo-Alba S, Rodriguez M, de Ona M, Melon S. Simultaneous detection of Dengue virus, Chikungunya virus, Zika virus, Yellow fever virus and West Nile virus. *J Virol Methods*. 2019;268:53-5.

35. Pabbaraju K, Wong S, Gill K, Fonseca K, Tipples GA, Tellier R. Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol.* 2016;83:66-71.
36. Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7):e2311.
37. Santiago GA, Vazquez J, Courtney S, Matias KY, Andersen LE, Colon C, et al. Performance of the Trioplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. *Nat Commun.* 2018;9(1):1391.
38. Simmons M, Myers T, Guevara C, Jungkind D, Williams M, Houg HS. Development and Validation of a Quantitative, One-Step, Multiplex, Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Dengue and Chikungunya Viruses. *J Clin Microbiol.* 2016;54(7):1766-73.
39. Wu W, Wang J, Yu N, Yan J, Zhuo Z, Chen M, et al. Development of multiplex real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Zika, dengue, yellow fever, and chikungunya viruses in a single tube. *J Med Virol.* 2018;90(11):1681-6.
40. Waggoner JJ, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Ballesteros G, Davila MJ, Tellez Y, et al. Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(7):1295-7.
41. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):559-70.
42. Phan D, Wodarz D. Modeling multiple infection of cells by viruses: Challenges and insights. *Math Biosci.* 2015;264:21-8.

43. Vogels CBF, Ruckert C, Cavany SM, Perkins TA, Ebel GD, Grubaugh ND. Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? *PLoS biology*. 2019;17(1):e3000130.
44. Ruckert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna SM, Young MC, Byas AD, Murrieta RA, et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nat Commun*. 2017;8:15412.