



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 1

Neiva, 25 de Febrero 2021

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Jose Manuel Pérez Figueroa con C.C. No.1075306739

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado Desarrollo de un inmunoensayo ligado a enzima (elisa) para la detección de infecciones humanas con *arbovirus* co-circulantes en el sur de Colombia. Presentado y aprobado en el año 2019 como requisito para optar al título de Médico general.

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE: Jose Manuel Pérez Figueroa

Firma: *Jose Manuel P.*

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Desarrollo de un inmunoensayo ligado a enzima (elisa) para la detección de infecciones humanas con *arbovirus* co-circulantes en el sur de Colombia.

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Pérez Figueroa	Jose Manuel

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Narvéez Rojas	Carlos Fernando

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Narvéez Rojas	Carlos Fernando
Castro Betancourt	Dolly

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Médico general

FACULTAD: Salud

PROGRAMA O POSGRADO: Medicina

CIUDAD: Neiva

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2021

NÚMERO DE PÁGINAS: 52

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías___ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general_x___ Grabados___
Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas
o Cuadros_x_



SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento: Word Office.

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

Español	Inglés
1. Arbovirus	Arboviruses
2. ELISA	ELISA
3. ZIKA	ZIKA
4. DENGUE	DENGUE
5. NS1	NS1

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

Las arbovirosis agrupan a las enfermedades virales transmitidas por vectores. Dentro de estas se encuentran los flavivirus y a estos pertenecen las infecciones con los virus del Dengue (DENV), Zika (ZIKV). La proteína no estructural 1 (NS1) es una proteína importante secretada por las células infectadas con el virus e interactúa con el huésped. Además, NS1 es una proteína soluble altamente secretada, lo que sugiere que el virus puede escapar del sistema inmunológico para fortalecer las interacciones con el huésped. Más importante aún, como es el antígeno principal, NS1 puede inducir la producción de anticuerpos, que son importantes en el diagnóstico temprano de marcadores virales.

Actualmente, la detección temprana del ZIKV depende en gran medida de la proteína NS1. La detección del antígeno ZIKV para el desarrollo de un método de diagnóstico aún no se ha reportado con precisión, por lo que el desarrollo de un inmunoensayo para la detección de ZIKV basado en un anticuerpo monoclonal específico (mAb) es absolutamente necesario.

Se realizó un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) tipo sándwich para la detección de NS1 de ZIKV utilizando diferentes anticuerpos monoclonales específicos contra este virus a distintas concentraciones y así lograr las mejores condiciones para realizar este ensayo y obtener los mejores resultados. Se encontró que los pares de anticuerpos monoclonales ideales para la detección de la proteína no estructural 1 (NS1) del ZIKV fueron el 680 y 644 ambos con una concentración de 2µg/ml que demostró ser la más óptima. La concentración saturante al momento de la detección fue de 200ng de NS1. Para terminar se obtuvo la curva de detección de la proteína NS1 a diferentes concentraciones de esta obteniendo buenos niveles de detección que se encuentran entre los 5-7 nanogramos.



ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Arboviruses are a group of viral diseases transmitted by vectors. Within these are the flaviviruses and to these belong the infections with the Dengue virus (DENV), Zika (ZIKV). Non-structural protein 1 (NS1) is an important protein secreted by cells infected with the virus and interacts with the host. In addition, NS1 is a highly secreted soluble protein, which suggests that the virus can escape from the immune system to strengthen interactions with the host. More importantly, as is the main antigen, NS1 can induce the production of antibodies, which are important in the early diagnosis of viral markers.

Currently, the early detection of ZIKV depends to a large extent on the NS1 protein. The detection of the ZIKV antigen for the development of a diagnostic method has not yet been reported accurately, so the development of an immunoassay for the detection of ZIKV based on a specific monoclonal antibody (mAb) is absolutely necessary.

A sandwich-linked enzyme immunoassay (ELISA) was performed for the detection of NS1 of ZIKV using different specific monoclonal antibodies against this virus at different concentrations and thus achieve the best conditions to carry out this test and obtain the best results. It was found that the pairs of monoclonal antibodies ideal for the detection of non-structural protein 1 (NS1) of ZIKV were 680 and 644 both with a concentration of 2ug / ml that proved to be the most optimal. The saturating concentration at the time of detection was 200ng of NS1. Finally, the detection curve of the NS1 protein was obtained at different concentrations of this, obtaining good levels of detection that are between 5-7 nanograms.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Dolly Castro Betancourt

Firma:

DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA LA
DETECCIÓN DE INFECCIONES HUMANAS CON *ARBOVIRUS* CO-
CIRCULANTES EN EL SUR DE COLOMBIA.

JOSE MANUEL PEREZ FIGUEROA

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA- HUILA
2021

DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA LA
DETECCIÓN DE INFECCIONES HUMANAS CON *ARBOVIRUS* CO-
CIRCULANTES EN EL SUR DE COLOMBIA.

JOSE MANUEL PEREZ FIGUEROA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Médico

Asesores:

CARLOS FERNANDO NARVAEZ ROJAS
Médico, Doctorado en Inmunología

DOLLY CASTRO BETANCOURT
Enfermera Magister en epidemiología y Magister en Salud Pública

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA-HUILA
2021

Nota de aceptación:

___ Aprobado en Diciembre 2019 ___

A handwritten signature in black ink that reads "Polly Castro" followed by a stylized flourish consisting of several horizontal lines.

Firma del Presidente de Jurados

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Neiva, 12 de diciembre de 2019

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi familia por brindarme un apoyo incondicional en cada meta durante mi carrera profesional.

A mis docentes.

Al semillero de infección e inmunidad con el cual trabajé y realicé este proyecto.

Jose Manuel

AGRADECIMIENTOS

A la universidad Surcolombiana por acogernos y brindarnos todas las herramientas necesarias para ser excelentes profesionales con carácter humano, por inculcarnos el interés investigativo y así desarrollar nuevo conocimiento para la comunidad.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	15
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACION	19
3. JUSTIFICACION	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GENERAL:	21
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:	21
5. MARCO TEÓRICO	22
5.1 GENERALIDADES DE LOS ARBOVIRUS	22
5.2 GENERALIDADES DE LOS FLAVIVIRUS	23
5.3 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA)	25
6. DISEÑO METODOLÓGICO	28
6.1 TIPO DE ESTUDIO	28

	Pág.
6.2 LUGAR	28
6.3 POBLACIÓN Y MUESTRA	28
6.4 ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR VARIABLES DE CONFUSION	28
6.5 TÉCNICAS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS	29
6.6 INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	31
6.7 PLAN DE PROCESAMIENTO DE DATOS	31
6.8 PLAN DE ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	31
6.9 FUENTES DE INFORMACIÓN	31
6.10 ASPECTOS ÉTICOS	31
7. ANALISIS DE LOS RESULTADOS	33
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	39
10. RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41

ANEXOS

45

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentraciones de los anticuerpos monoclonales 130 y 110 en Boston y en Neiva medidos por espectrofotometría	33
Tabla 2. Presupuesto global por fuentes de financiación	50
Tabla 3. Descripción de los gastos de personal (en miles de \$)	50
Tabla 4. Descripción y cuantificación de los equipos de uso propio(en miles de \$)	51
Tabla 5. Materiales y suministros (en miles de \$)	51

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1a. Concentraciones de los anticuerpos monoclonales 130-110	34
Figura 1b. ELISA tipo Sandwich con los anticuerpos 110 y 130 para detección de NS1 ZIKV	34
Figura 1c. ELISA tipo Sandwich con diferentes anticuerpos para la detección de NS1 ZIKV	34
Figura 1d. Elisa Indirecto para evaluar la biotina del anticuerpo 130	34
Figura 2a. Elisa Indirecto para evaluar la biotinización del anticuerpo 644 y 181	36
Figura 2b. ELISA tipo Sandwich para evaluar el mejor par de anticuerpos para la detección de NS1 ZIKV con el anticuerpo 644 biotinilado	36
Figura 2c. ELISA tipo Sandwich para determinar la mejor concentración de los pares de anticuerpos 680-644 para la detección de NS1 ZIKV	36
Figura 2d. Curva de concentración de NS1 ZIKV mediante ELISA tipo Sandwich con Mab 680/644	36

ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Operacionalización de variables	46
Anexo B. Instrumento	47
Anexo C. Carta de aprobación del comité de bioética	48
Anexo D. Cronograma de actividades	49
Anexo E. Presupuestos	50

RESUMEN

Las arbovirosis agrupan a las enfermedades virales transmitidas por vectores. Dentro de estas se encuentran los flavivirus y a estos pertenecen las infecciones con los virus del Dengue (DENV), Zika (ZIKV). La proteína no estructural 1 (NS1) es una proteína importante secretada por las células infectadas con el virus e interactúa con el huésped. Además, NS1 es una proteína soluble altamente secretada, lo que sugiere que el virus puede escapar del sistema inmunológico para fortalecer las interacciones con el huésped. Más importante aún, como es el antígeno principal, NS1 puede inducir la producción de anticuerpos, que son importantes en el diagnóstico temprano de marcadores virales.

Actualmente, la detección temprana del ZIKV depende en gran medida de la proteína NS1. La detección del antígeno ZIKV para el desarrollo de un método de diagnóstico aún no se ha reportado con precisión, por lo que el desarrollo de un inmunoensayo para la detección de ZIKV basado en un anticuerpo monoclonal específico (mAb) es absolutamente necesario.

Se realizó un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) tipo sándwich para la detección de NS1 de ZIKV utilizando diferentes anticuerpos monoclonales específicos contra este virus a distintas concentraciones y así lograr las mejores condiciones para realizar este ensayo y obtener los mejores resultados. Se encontró que los pares de anticuerpos monoclonales ideales para la detección de la proteína no estructural 1 (NS1) del ZIKV fueron el 680 y 644 ambos con una concentración de 2ug/ml que demostró ser la más óptima. La concentración saturante al momento de la detección fue de 200ng de NS1. Para terminar se obtuvo la curva de detección de la proteína NS1 a diferentes concentraciones de esta obteniendo buenos niveles de detección que se encuentran entre los 5-7 nanogramos.

Palabras clave: Arbovirus, Dengue, Zika, ELISA, NS1.

ABSTRACT

Arboviruses are a group of viral diseases transmitted by vectors. Within these are the flaviviruses and to these belong the infections with the Dengue virus (DENV), Zika (ZIKV). Non-structural protein 1 (NS1) is an important protein secreted by cells infected with the virus and interacts with the host. In addition, NS1 is a highly secreted soluble protein, which suggests that the virus can escape from the immune system to strengthen interactions with the host. More importantly, as is the main antigen, NS1 can induce the production of antibodies, which are important in the early diagnosis of viral markers.

Currently, the early detection of ZIKV depends to a large extent on the NS1 protein. The detection of the ZIKV antigen for the development of a diagnostic method has not yet been reported accurately, so the development of an immunoassay for the detection of ZIKV based on a specific monoclonal antibody (mAb) is absolutely necessary.

A sandwich-linked enzyme immunoassay (ELISA) was performed for the detection of NS1 of ZIKV using different specific monoclonal antibodies against this virus at different concentrations and thus achieve the best conditions to carry out this test and obtain the best results. It was found that the pairs of monoclonal antibodies ideal for the detection of non-structural protein 1 (NS1) of ZIKV were 680 and 644 both with a concentration of 2ug / ml that proved to be the most optimal. The saturating concentration at the time of detection was 200ng of NS1. Finally, the detection curve of the NS1 protein was obtained at different concentrations of this, obtaining good levels of detection that are between 5-7 nanograms.

Keywords: Arboviruses, Dengue, Zika, ELISA, NS1.

INTRODUCCIÓN

El ZIKV es un flavivirus emergente transmitido por mosquitos que causa enfermedades graves, incluidos defectos congénitos de nacimiento durante el embarazo (3). Recientemente, un brote de ZIKV en el noreste de Brasil dio lugar a un número alarmante de bebés nacidos con microcefalia en esta región (29). Sobre la base de las manifestaciones clínicas actuales, es muy difícil detectar el ZIKV, especialmente en las primeras etapas de la infección. En cualquier caso, el diagnóstico precoz de la infección por ZIKV es importante porque es un factor importante en el tratamiento de los pacientes y en el control de futuros brotes (30).

Los métodos de diagnóstico tradicionales que involucran técnicas serológicas y aislamiento del virus se consideran gold estándar. Sin embargo, estos métodos llevan mucho tiempo, con baja especificidad. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR) se ha utilizado ampliamente en la detección de ZIKV, debido a su alta sensibilidad y especificidad. Aunque este método es confiable, la mayoría de las regiones del mundo no tienen acceso al equipo costoso. Debido al período limitado de la ventana oportuna de detección de virus, es difícil diagnosticar a los pacientes una o dos semanas después de la aparición de los síntomas.

Por lo tanto, es muy importante que se aborde este problema de detección temprana. Se necesita urgentemente una técnica de diagnóstico rápida, precisa y sensible para la detección temprana de pacientes infectados con ZIKV.

El presente estudio se enfoca en validar métodos diagnósticos para ZIKV mediante la implementación de un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) tipo sándwich con el fin de poder utilizar esta técnica en beneficio de la detección oportuna de ese virus circulante en nuestra región y así implementar un adecuado abordaje terapéutico de esta enfermedad.

1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Dentro de los artículos revisados se encontró uno que tenía como objetivo evaluar la sensibilidad y especificidad de 4 pruebas serológicas 2 de ellas para detectar IgM y las otras 2 para detectar anticuerpos totales en varios estadios de la infección desde su fase aguda, fase temprana de convalecencia y fase tardía de convalecencia. El estudio fue de cohorte prospectivo en pacientes de Nicaragua con 301 muestras bien caracterizadas de zika, dengue o enfermedad febril que no sea dengue ni zika. Dentro de los resultados se encontró una sensibilidad de 94,5% y 70,1% junto con una especificidad de 85,6% y 82,8% respectivamente para las pruebas serológicas de IgM ; por otro lado, se encontró una sensibilidad de 85% y 96.5% y una especificidad de 91,4% y 92,6% respectivamente para las pruebas de detección de anticuerpos totales(1).

Otro estudio multicéntrico investigó como la mutación específica en el dominio FL de la proteína E de los flavivirus puede ser usada para la detección específica de anticuerpos frente a dengue y zika en ensayos de ELISA. En sus resultados se observó que los anticuerpos de IgM frente a dengue y zika tuvieron una especificidad para cada uno del 100% y del 94,2% y una sensibilidad del 90,7% y 87,5% respectivamente. Frente a los anticuerpos de IgG se observó reacción cruzada que se superó mediante la preincubación de los sueros con el antígeno heterólogo, por lo cual dio como resultado una sensibilidad del 100% tanto para dengue como para zika y una especificidad del 97,1% para dengue y del 97,9% para zika respectivamente, con todo lo anterior concluyeron que la mutación en este dominio puede ser útil para aumentar la especificidad y sensibilidad de estos ensayos (2).

En otro estudio se reportó la caracterización de anticuerpos mononucleares que se implementaron en pruebas de inmunocromatografía rápida para detectar específicamente el antígeno de la proteína viral no estructural 1 (NS1) y distinguir los 4 serotipos de dengue (DENV 1-4) y zika sin que se presente reacción cruzada. Usando una muestra de suero de 30 µl, los valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas para detectar los 4 serotipos de dengue, variaron de 76-100%. La sensibilidad / especificidad para la prueba rápida ZIKV fue de 81% y de 86% respectivamente, usando una muestra de suero de 150 µl. Con todo esto concluyen que su enfoque y reactivos de inmunocromatografía rápida tienen aplicación inmediata en el diagnóstico clínico diferencial de casos agudos de ZIKV y DENV (3).

Un estudio tuvo como objetivo distinguir la infección secundaria por el virus del dengue de la infección por el virus del Zika mediante una combinación de tres pruebas serológicas simples, en lo que se observó que los ELISA de IgM e IgG para la proteína NS1 de zika (ZIKV) combinados pueden detectar la infección por ZIKV con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 66,7%. La reactividad cruzada de IgG ZIKV-NS1 por muestras de casos secundarios de infección por DENV varió de 66.7% a 28.1%. Para agregar el ELISA de IgG para la proteína NS1 de dengue (DENV) puede distinguir la infección primaria por ZIKV; por todo lo anterior proponen un algoritmo para el serodiagnóstico de ZIKV basado en tres ELISAs simples para distinguir el ZIKV primario, ZIKV con dengue previo y las infecciones secundarias por DENV; esto podría aplicarse al serodiagnóstico de ZIKV, la vigilancia serológica y la monitorización de la infección por ZIKV durante el embarazo para comprender la epidemiología, la patogénesis y las complicaciones del ZIKV en las regiones endémicas del dengue.(4)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las arbovirosis agrupan a las enfermedades virales transmitidas por vectores de los cuales los mosquitos del género *Aedes* transmiten el virus del dengue (DENV), el zika virus (ZIKV) y el Chikungunya (CHIKV), importantes patógenos responsables de alta carga a los sistemas de salud pública.(3) El dengue tiene una amplia distribución, con más de una cuarta parte de la población del mundo en riesgo y cientos de millones de nuevas infecciones anualmente. Hay cuatro serotipos de DENV y la infección con uno de los cuatro serotipos de DENV no proporcionan inmunidad de larga duración contra los tres serotipos virales restantes. Algunos informes sugieren que la gravedad de la enfermedad varía entre los serotipos de DENV.

La fiebre de Chikungunya es causada por el virus Chikungunya (CHIKV), un patógeno del género *alfavirus* y la familia *Togaviridae*. Dentro de este género, hay 30 especies de *alfavirus*, todos ellos transportados por artrópodos. CHIKV tiene tres genotipos: asiático, africano del oeste y este centro sudafricano, todos nombrados por sus distribuciones geográficas.(5)

Dentro de los métodos diagnósticos está el inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) que es una técnica que usa anticuerpos y antígenos junto con el cambio de color de los pozos de las placas para identificar una sustancia.

Se tomara como área de estudios el laboratorio de inmunología de la Universidad Surcolombiana en la cual se realizarán las pruebas con las muestras de la población infantil que consultó al servicio de urgencias pediátricas del Hospital Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva-Huila para el periodo comprendido entre Junio del 2015 a Junio del 2016 que se encuentran almacenadas en la seroteca del laboratorio.

Una crisis real en la salud pública con un gran impacto socioeconómico es la que se vive en las américas gracias a las epidemias simultáneas por arbovirus en los últimos años. Existe una preocupación mundial por la emergencia y re emergencia de enfermedades virales transmitidas por vectores, que generan grandes costos en la atención en salud gracias a la alta carga de enfermedad y a las complicaciones severas que producen. (6)

Entre todas las arbovirosis el dengue es el que tiene más impacto en la salud humana, se estima que ocurren alrededor de 390 millones de infecciones por dengue producidas en más de un centenar de países tropicales y subtropicales y que causa miles de muertes por año de las cuales el 40% cursan de forma asintomática (7). La epidemia del Zika en América empezó en 2015 en Brasil (8) y se expandió rápidamente a través de todo el hemisferio por lo que pasó de ser un virus no considerado importante para el ser humano a ser uno de los más importantes después de su alta asociación con el síndrome de Guillain Barré y microcefalia(9). El Chikungunya no se notaba en América antes del 2013, pero desde entonces se ha extendido rápidamente por toda la región ya que en los años posteriores ha causado entre 795,000 y 1.1 millones de casos y se ha extendido a 43 países y territorios.

Clínicamente estas enfermedades se sobreponen entre sí por lo cual el diagnóstico temprano de laboratorio es útil para decidir el curso del tratamiento y reducir la severidad de la infección, pero debido a que pertenecen a la misma familia y género viral, el DENV y ZIKV, su estructura molecular es similar por lo que genera reactividad cruzada frente a las pruebas serológicas y virológicas que se utilizan de rutina.

Con base en lo anterior se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿cuál es la manera más apropiada de realizar inmunoensayos ligados a enzimas que permitan la detección de arbovirus como el zika?

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuál es la manera más apropiada de realizar inmunoensayos ligados a enzimas que permitan la detección de arbovirus como el zika?

3. JUSTIFICACION

En los últimos años se ha evidenciado que el departamento del Huila es una zona endémica para las arbovirosis. Estas enfermedades tienen un gran impacto en la calidad de vida de las personas debido al número de infecciones, los costos directos e indirectos de las consultas médicas y hospitalizaciones. Además, la demostrada relación de la infección con ZIKV durante la gestación y un síndrome congénito, introduce un riesgo más en la salud materno-fetal regional.

Durante junio del 2015 a Junio del 2016 se produjo una gran epidemia en las américas (particularmente en Brasil y Colombia) de ZIKV, que se sumó a recientes epidemias debidas a CHIKV y las que se presentan regularmente por DENV. La cocirculación de estos virus se ha convertido en un gran problema para el personal de salud, sobre todo en su diagnóstico ya que la estructura molecular del virus genera reactividad cruzada frente a las pruebas serológicas que se utilizan de rutina, además, que la presentación clínica de estos es similar por lo que es común encontrar superposición de síntomas en estos pacientes; lo anterior dificulta establecer con certeza la etiología de la infección.

El Departamento del Huila es una zona endémica para las arbovirosis, quienes en los últimos 5 años han sido responsables de más de 40,000 infecciones sintomáticas. Debido a la alta prevalencia de arbovirosis en el Huila, a la dificultad que se tiene para poder establecer un diagnóstico etiológico de la infección, al amplio porcentaje de infección asintomática, a la ausencia de caracterización epidemiológica regional, y a la dificultad para el diagnóstico clínico, se debe realizar la caracterización de las infecciones por arbovirus que circulan en la región.

Lo anterior permitirá adquirir información sobre esta problemática actual de salud que ayude a caracterizar epidemiológicamente la infección y fomentar la implementación de pruebas médicas tempranas para el manejo de estas enfermedades.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) para la detección de la infección de zika en muestras de pacientes pediátricos.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Determinar las concentraciones de cada anticuerpo monoclonal.

Establecer la mejor combinación de pares de anticuerpos para el inmunoensayo.

Determinar las condiciones ideales de tiempo y concentración de reactivos para un ensayo basado en la detección de la proteína no-estructural 1 de ZIKV.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 GENERALIDADES DE LOS ARBOVIRUS:

Los arbovirus son, como lo describió la Organización Mundial de la Salud en 1967, un grupo de virus que existen en la naturaleza principalmente, debido a la transmisión biológica entre hospederos vertebrados y artrópodos hematófagos (10). Debido a que su vigilancia requiere el estudio de los vectores, las enfermedades causadas por arbovirus son difíciles de prevenir y controlar. Los arbovirus son un grupo taxonómicamente heterogéneo de más de 500 virus; de éstos, aproximadamente 150 causan enfermedad en el hombre. Estos se dividen en 4 familias, en las que se encuentran los *Flaviviridae* de la que hacen parte el dengue, fiebre amarilla y zika, y por el otro lado está la familia *Togaviridae* en los que se encuentran el chikungunya y el mayaro (11).

Los principales vectores de dengue, zika y chikungunya son los culícidos pertenecientes al género *Aedes* como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Se cree que el *Aedes aegypti* arribó de África a América con la llegada de los primeros europeos al continente americano (12). Los primeros brotes de la enfermedad por dengue en la región de las Américas datan de 1635. El *Aedes albopictus* también es un eficiente vector de arbovirus en Asia suroriental y apareció en el continente americano por primera vez en Estados Unidos en 1985(13). El *Aedes albopictus* puede actuar como vector en áreas urbanas y rurales, y no es antropofílico obligatorio, como *Aedes aegypti*, por lo que en ocasiones este último es desplazado de su hábitat (14).

Las hembras de *Aedes aegypti* se consideran las más eficientes de los mosquitos vectores por sus marcados hábitos domésticos, que satisfacen todas sus necesidades vitales en la vivienda humana (15). La hembra requiere sangre humana para mantener su reproducción; pone sus huevos en depósitos de agua limpia o semi-limpia, lo cual es un dato importante para su control, ya que los criaderos viables para el mosquito son todos esos objetos que sirven como recipientes donde se colecta el agua de lluvia (16)

5.2 GENERALIDADES DE LOS FLAVIVIRUS:

Los flavivirus son icosaédricos, con un diámetro de unos 50 nm, y constan de una envuelta lipídica densamente cubierta con proyecciones de superficie que comprenden 180 copias de la glucoproteína M (membrana) y 180 copias de la E (envoltura) (17). Estas últimas se encuentran organizadas como dímeros, emparejadas horizontalmente de la cabeza a la cola, en la superficie del virión. Los virus son inestables en el ambiente y sensibles al calor, a la radiación ultravioleta, a los desinfectantes (incluidos el alcohol y el yodo) y al pH ácido.

La nucleocápside une la proteína capsídica (C) con una única cadena de ARN de sentido positivo de 11 kilobases, con un único marco de lectura abierta de 10 kilobases que se traduce en una única poliproteína precursora. Ésta se procesa durante y después de la traducción para dar lugar a 10 proteínas. El orden de los productos de los genes de la proteína desde el extremo 5' es C, premembrana (preM, un precursor de la proteína madura M), E, y una serie de 7 proteínas no estructurales necesarias en el proceso viral de replicación: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. El genoma está flanqueado por una región corta 5' no codificante (de unos 100 nucleótidos) y una región 3' codificante de longitud variable (100-700 nucleótidos) (18).

La proteína NS1 se expresa en la superficie de las células infectadas, y también se secreta como un antígeno fijador de complemento. Aunque los anticuerpos frente a NS1 no neutralizan el virus, contribuyen a la inmunidad protectora, probablemente por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y respuestas mediadas por células frente a las células infectadas. Además de sus funciones en la replicación viral NS1, NS2A, NS3 y NS5 presentan epítomos que determinan el serotipo viral y las respuestas linfocíticas restringidas por los antígenos leucocitarios humanos (HLA) con reactividad cruzada entre los Flavivirus(19).

Fiebre Zika: Es un virus emergente del género *Flavivirus*, miembro de la familia Flaviviridae, transmitido por la picadura de mosquitos vectores del género *Aedes*, relacionado evolutivamente con otros arbovirus como el dengue, fiebre amarilla y virus del Nilo Occidental. Tiene un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo, con un tamaño aproximado de 11 Kb en donde se han identificado dos linajes principales: el asiático y el africano en donde el brote en las Américas probablemente se originó en el sudeste de Asia (20).

Cuenta con tres genes estructurales que codifican la cápside (C), la membrana lipídica externa (M) y envoltura (E); y siete genes no estructurales que codifican NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, las cuales tienen actividad enzimática o funciones reguladoras durante la replicación intracelular (21).

Fue aislado por primera vez en abril de 1947 en un mono Rhesus de África en abril de 1947, en un bosque conocido con el nombre de Zika en Uganda. Posteriormente, a través de estudios serológicos en 1952, se detectó la infección en seres humanos en Uganda y República Unida de Tanzania (22). En Colombia se describen los primeros casos en la semana epidemiológica 32 del 2015, registrándose 99.721 casos de los cuales 8826(8.99%) se definieron serológicamente y fueron confirmados por RT-PCR (reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa) hasta la semana 28 del 2016 donde se declaró el cierre epidémico de esta enfermedad (23).

Tras un período de incubación de 3 a 12 días después de la picadura del mosquito infectado, ocurre la infección por el ZIKV. Su cuadro clínico es bastante variable, el cual va desde presentaciones asintomáticas en el 80% de los casos (23), hasta cuadros febriles leves o moderados-graves.

Las formas sintomáticas, guardan cierta similitud en sus signos y síntomas con respecto a otras arbovirosis. Son cuadros autolimitados que tienen una duración promedio de 4 a 7 días y se caracterizan por presentar síntomas como fiebre, conjuntivitis no purulenta, cefalea, mialgia, artralgia, astenia, erupción maculopapular pruriginosa que se extiende en sentido cefalocaudal, edema en miembros inferiores y, con menor frecuencia, dolor retroocular, anorexia, vómitos, diarrea o dolor abdominal.

La transmisión vertical intrauterina del ZIKV provoca una infección congénita y causa el síndrome de ZIKV congénito (CZS), con una amplia gama de malformaciones potenciales, donde la microcefalia es la complicación más grave y reconocible.

El CZS es un patrón reconocible de anomalías estructurales y discapacidades funcionales, secundarias a la infección por ZIKV. El reconocimiento de este fenotipo permite definir el rango de anomalías en un niño afectado, así como determinar muchas de las consecuencias de este síndrome a nivel cognitivo, sensorial y motor.

Dentro de las anomalías cerebrales del CZK se encuentran (24)

- Microcefalia.
- Hidrocefalia/hidranencefalia.
- Estructuras ausentes: cuerpo caloso, puente, vermis cerebeloso
- Desórdenes de migración neuronal: lisencefalia, displasia focal cortical
- Reducción cortical severa
- Calcificaciones cerebrales
- Asimetría cerebral

El diagnóstico de la infección por ZIKV no es sencillo, sobretodo en áreas endémicas de arbovirosis, se basa mayormente en la detección de ARN en muestras de sangre por RT-PCR, el periodo virémico en humanos es corto, de tres a cinco días luego de iniciados los síntomas (17). Las pruebas serológicas también son ampliamente usadas. Sin embargo, la frecuencia de reacciones cruzadas con otros flavivirus puede hacer difícil el diagnóstico. Además, en la fase temprana de la infección, los niveles de IgM e IgG pueden ser muy bajos dificultando la confirmación del diagnóstico (21).

5.3 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA):

Este término evolucionó a finales de la década de 1960 a partir de los radioinmunoensayos con la observación de que el anticuerpo o el analito (antígeno) podían ser adsorbidos a una superficie sólida y aún participar en la unión específica de alta afinidad (25).

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

Este se ha vuelto extraordinariamente útil porque permite un cribado rápido o la cuantificación de un gran número de muestras para detectar la presencia de un antígeno o el anticuerpo que lo reconoce. Las variaciones en este tema se utilizan ahora para examinar las interacciones entre proteína-proteína, ácido nucleico-proteína, ácido nucleico-ácido nucleico entre otro. Además sigue siendo popular debido a su simplicidad, rendimiento, automatización, precisión y la disponibilidad de reactivos baratos. Por otra parte Una limitación de esta técnica es que proporciona información sobre la presencia de un antígeno pero no información sobre sus propiedades bioquímicas, como el peso molecular o su distribución en un tejido (26).

Los pasos generales de un ELISA son:

1. Cubrir el pozo con el antígeno o anticuerpo.
2. Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos.
3. Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo
4. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido
5. Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima
6. Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo
7. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida
8. Adición del sustrato
9. Unión del sustrato a la enzima
10. Desarrollo del color

Existen diferentes tipos de ELISA pero en general son dos: Directo e Indirecto (27). El directo consiste en la fijación del antígeno a la placa, el lavado y posteriormente la adición de un anticuerpo conjugado para que reaccione con el antígeno y después adicionar el sustrato sobre el cual va a actuar la enzima marcadora. El indirecto consiste en la fijación del antígeno a la placa, el lavado y posteriormente la adición del suero del paciente de tal forma que sus anticuerpos reaccionen contra el antígeno y así adicionar después el anti-anticuerpo conjugado con una enzima los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado para al final adicionar el sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora (27).

Al final para todos los ensayos enzimáticos, la etapa final es la adición del sustrato enzimático, el cual da lugar a productos de reacción soluble o insoluble y es elegido por su rendimiento cuantitativo de producto de reacción. Para ensayos colorimétricos, la tasa de desarrollo de color es proporcional, dentro de un cierto rango, a la cantidad de conjugado enzimático presente por eso la densidad óptica del mismo es proporcional a la cantidad de producto medido (26).

La proteína viral NS1 es un objetivo ideal para el diagnóstico porque es altamente secretada por las células infectadas, y se puede detectar desde el inicio de los síntomas hasta 9 días o más después del inicio de la enfermedad al menos en las infecciones primarias(28). La primera vez que se usó la técnica de ELISA para la detección de NS1 en muestras de sangre de los pacientes fue en el 2000(29).

El desarrollo de pruebas diagnósticas comerciales para NS1 ha revolucionado ha revolucionado el diagnóstico de dengue y zika, ya que ha proporcionado ensayos simples y rápidos que poseen una alta sensibilidad y especificidad permitiendo un diagnóstico temprano y un manejo más efectivo del paciente. La desventaja principal de estos ensayos se da en los pacientes que presentan una infección secundaria por el rápido aumento de anticuerpos que presentan reacción cruzada durante la fase aguda de la infección. Estos anticuerpos forman complejos inmunes con NS1 que hace que no se puede detectar fácilmente en los ensayos de captura. Por consiguiente, la cinética de la detección de NS1 a lo largo de la enfermedad durante las infecciones secundarias son más cortas que en las infecciones primarias(28).

Con base a lo anterior se ha implementado combinar ensayos que detecten NS1 junto con otros que detecten IgM o IgG y esto ha evidenciado una mejora notable en el diagnóstico. Existen varios kits de diagnóstico actualmente disponibles que aprovechan este enfoque incluidos los desarrollados por SD Bioline Dengue Duo (NS1 Ag + Ab Kit). Usando este enfoque combinado, se han reportado sensibilidades de detección cercanas al 100% desde el inicio de la enfermedad hasta la recuperación(28).

6. DISEÑO METODOLOGICO

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizará un estudio prospectivo de desarrollo de un ensayo de laboratorio. Es un ensayo de laboratorio porque todo el proyecto se realizará dentro de este, haciendo experimentos y utilizando reactivos del laboratorio.

6.2 LUGAR

Se tomó como área de estudios el laboratorio de inmunología de la Universidad Surcolombiana ubicado en el segundo piso de la facultad de salud el cual cuenta con todos los equipos necesarios para realizar los experimentos del proyecto y para analizar los resultados de estos.

6.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se tomó como población las muestras serológicas de la seroteca del laboratorio. La muestra fue el número de muestras de la seroteca con las cuales se puedan estandarizar el ensayo de laboratorio en donde estas contaron con las características de ser una muestra de pacientes pediátricos con sospecha de arbovirosis tomadas en la última epidemia de zika del 2015.

6.4 ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR LAS VARIABLES DE CONFUSIÓN.

Reactividad cruzada entre los flavivirus: Este variable se controló mediante los anticuerpos monoclonales específicos frente a cada virus.

Error en la técnica del ensayo: Se controló mediante la repetición de cada ensayo con los mismos parámetros y tomando como punto de comparación la curva recombinante para corroborar de manera adecuada los resultados.

6.5 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

Las muestras de la seroteca se tomaron acorde a su infección por ZIKV. Después de esto se realizó un ensayo ligado a inmunoenzima de tipo sándwich en el laboratorio siguiendo estos pasos:

PROTOCOLO: ELISA NS1 ZIKV

Procedimiento día 0

- PREPARAR EQUIPOS Y REACTIVOS
- Pipeta monocanales de 1000, 200, 10 uL y multicanales de 50 y 200 uL (BRAND)
- Buffer salino fosfato (PBS) estéril (Gibco- Lot 1806048)
- Tween 20 10% (ACROS, Cat. 23336-2500)
- Leche descremada en polvo (Slight, Colanta, Lote 7)
- Anticuerpo de captura anti NS1 ZIKV para coating 680.
- Anticuerpo de detección anti NS1 ZIKV 644 biotinilado.
- Estreptavidina-Peroxidasa (KPL, Cat)
- Tetrametilbenzidina (TMB, KPL, Lote 100610)
- Ácido Sulfúrico 2M (MERCK, Cat K38346532)
- Placa de ELISA de 96 pozos de alta afinidad (NUNC, Cat)
- Tubos Falcon de poliestireno 15 ml (BD, Cat: 352096)
- Tubos eppendorf 1.5 ml
- Recipiente para solución de lavado
- Lector de ELISA MultiSkan FC (Thermo)

Preparación de Soluciones

- Blotto 5%: 2,5 g de leche descremada y completar a 50 ml de PBS 1X + 500 uL Tween 20 10%)
- Blotto 2,5%: Diluir al medio el Blotto 5%.
- Solución de Lavado: PBS 1X Tween 0,1%
- Ácido sulfúrico 2M: 5,4 ml de ácido sulfúrico puro + 44,6 ml de agua destilada (volumen final: 50 ml)

- Procedimiento día 1 (Preparación de la placa)

Diluir el anticuerpo de captura en PBS 1X a una concentración final de 2ug/ml a partir del stock.

Adicional 100 µl por pozo del anticuerpo de captura, cubrir la placa e incubar toda la noche a temperatura ambiente.

- Procedimiento día 2

Descartar la solución.

Adicionar 150ul a cada pozo de la solución de bloqueo(BLOTTO 5%), cubrir los bordes con PBS 1X e incubar por 1 hora a 37° C.

Descartar solución.

Adicionar 100 µl de la muestra y del control, previamente diluidos en la solución diluyente (BLOTTO 2.5%), cubrir e incubar por 2 horas a 37°C.

Lavar la placa con solución de lavado (0.01% tween, PBS1X). Finalizados los lavados, secar la placa en toallas de papel mediante tres golpes secos.

Adicionar 100 µl a cada pozo del anticuerpo de detección a una concentración de 2ug/ml en solución diluyente (BLOTTO 2.5%), cubrir e incubar por 1 hora a 37° C.

Lavar como en el paso 5.

Adicionar 100 µl por pozo de la Streptavidina-HRP diluida 1/1000 en solución diluyente. Cubrir la placa y protegerla de la luz, e incubar por 1 hora a 37°C.

Lavar la placa con solución de lavado (0.01% tween, PBS1X). Finalizados los lavados, secar la placa en toallas de papel mediante tres golpes secos.

Agregar 100 uL de TMB por cada pozo.

Adicionar 30 µl por pozo de la solución de stop (H₂SO₄ 2M).

Determinar la densidad óptica por pozo a 450nm (540 nm o 570 nm de referencia al momento de la lectura).

6.6 INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

El instrumento para la recolección de información fue una hoja que contiene las siguientes variables: Número de la muestra, Concentración de reactivos, Tiempos de incubación y los volúmenes de los reactivos, en los cuales se anotó cada detalle respecto a estas variables. (Anexo B)

6.7 PLAN DE PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos se almacenaron mediante una base de datos en el programa Excel versión 2017 además los gráficos de los resultados serán realizados mediante el programa Graphpadprism 7.

6.8 PLAN DE ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se evaluó la replicabilidad del ensayo con los resultados obtenidos, y esos serán comparados con la prueba gold estándar para la detección de zika que es la PCR, con base a estas comparaciones se determinarán la sensibilidad y la especificidad del ensayo.

6.9 FUENTES DE INFORMACIÓN

La fuente de información fue directa ya que se tomó las muestras de la seroteca del laboratorio.

6.10 ASPECTOS ÉTICOS.

El estudio contó con la aprobación previa del comité de ética de la Universidad Surcolombiana (ANEXO C), el cual, con base al artículo 4 de la resolución 8430 del año 1993 donde se establecen las “normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”, la investigación “DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE

INFECCIONES HUMANAS CON ARBOVIRUS CO-CIRCULANTES EN EL SUR DE COLOMBIA”, se ubica en el tipo de estudio que comprende el desarrollo de acciones que contribuyen al estudio de las técnicas y métodos que se recomienden o empleen para la prestación de servicios de salud.

7. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Se realizó un total de 8 inmunoensayos en donde cada uno sirvió para poder obtener los mejores estándares a la hora de realizar este experimento. A continuación, se evidencia los diferentes resultados de cada uno de estos junto con su respectivo análisis.

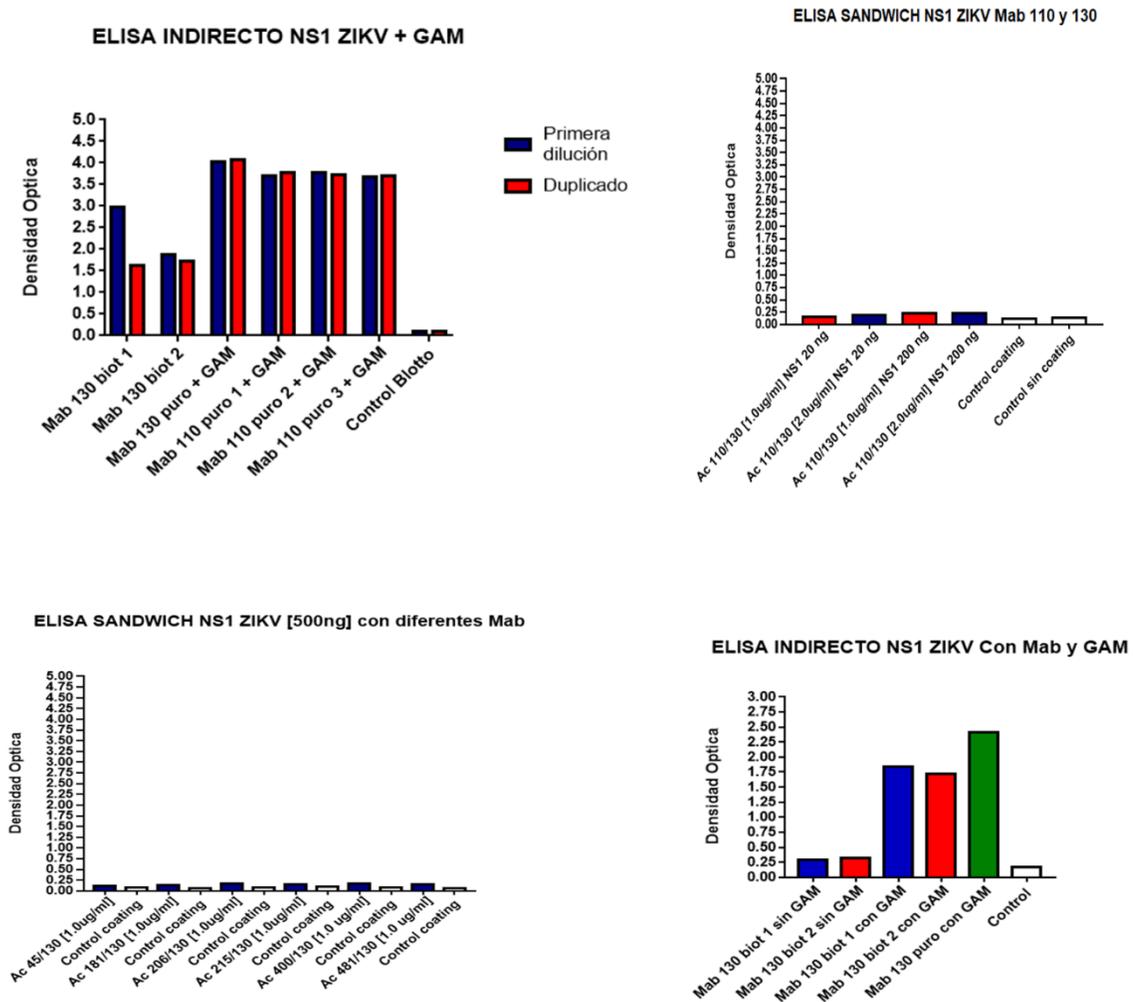
Tabla 1. Concentraciones de los anticuerpos monoclonales 130 y 110 en Boston y en Neiva medidos por espectrofotometría.

Nombre de los anticuerpos	Concentraciones en Boston	Concentraciones en Neiva
Ac 130 biotinilado n°1	5.1 mg/ml	9.39 mg/ml
Ac 130 biotinilado n°2	0.25 mg/ml	0.43 mg/ml
Ac 130 puro n°3	0.25 mg/ml	0.30 mg/ml
Ac 110 puro n°1	1 mg/ml	2.30 mg/ml
Ac 110 puro n°2	2.2 mg/ml	2.25 mg/ml
Ac 110 puro n°3	2.2 mg/ml	2.25 mg/ml
Ac 45 Puro	2mg/ml	4mg/ml
Ac 45 Biotinilado	1mg/ml	1.69mg/ml

Fuente Propia

Se observan las diferentes concentraciones de los anticuerpos medidos por espectrofotometría en donde se puede evidenciar que las concentraciones obtenidas en Neiva son diferentes a las concentraciones reportadas en Boston. Estas diferencias pueden ser explicadas por el hecho de que con el paso del tiempo los anticuerpos sufren fenómenos de evaporación que contribuyen a que se concentren más ya que se pierde volumen.

Figura 1a. Concentraciones de los anticuerpos monoclonales 130-110. Figura 1b. ELISA tipo Sandwich con los anticuerpos 110 y 130 para la detección de NS1 ZIKV. Figura 1c. ELISA tipo Sandwich con diferentes anticuerpos para la detección NS1 ZIKV. Figura 1d. Elisa Indirecto para evaluar la biotina del anticuerpo 130.



Fuente propia

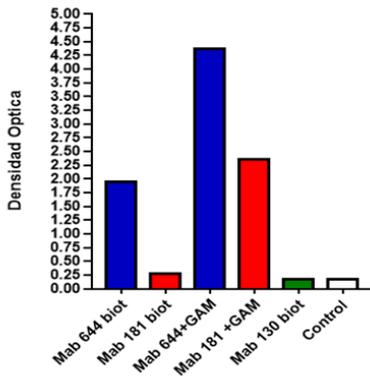
En la figura 1a se observa las diferentes concentraciones de los anticuerpos 130 biotilado, 130 puro y 110 puro, en donde se evidencia que los anticuerpos puros al adicionarle el anti-anticuerpo hecho de ratón (GAM) aumentan casi el doble la lectura en el espectrofotómetro en comparación con la biotina. Además con este resultado podemos afirmar que todos estos anticuerpos son funcionales ya que están detectando la proteína no estructural 1 (NS1) del ZIKV.

En la figura 1b se observa que al realizar el ensayo con los pares de anticuerpos 110 y 130 biotinilado no se detectó la proteína no estructural 1 de ZIKV a pesar de usar diferentes concentraciones de esta y de los anticuerpos para su detección. En la figura 1c Se observa que a pesar de utilizar diferentes combinaciones de anticuerpos para la detección de NS1 de ZIKV a una concentración sobresaturada no se logra detectar nada.

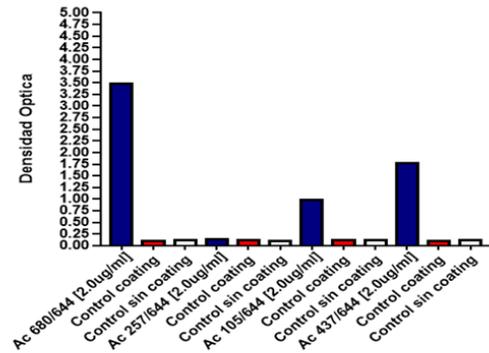
En la figura 1d se observa que los anticuerpos con biotina si son funcionales ya que están detectando la NS1 ZIKV pero la biotina no es funcional esto se corrobora al compararlos con los mismos anticuerpos adicionándoles GAM, ya que se evidencian densidades ópticas por el hecho de que el GAM contiene biotina demostrando que si son funcionales pero que su biotina está dañada.

Figura 2a. Elisa Indirecto para evaluar la biotinilización del anticuerpo 644 y 181. Figura 2b. ELISA tipo Sandwich para evaluar el mejor par de anticuerpos para la detección de NS1 ZIKV con el anticuerpo 644 biotinilado. Figura 2c. ELISA tipo Sandwich para determinar la mejor concentración de los pares de anticuerpos 680-644 para la detección de NS1 ZIKV. Figura 2d. Curva de concentración de NS1 ZIKV mediante ELISA tipo Sandwich con Mab 680/644.

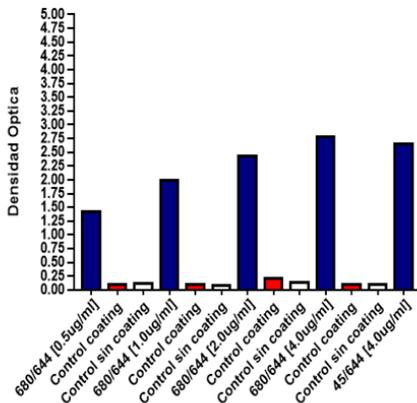
ELISA INDIRECTO NS1 ZIKV Con Mab y GAM



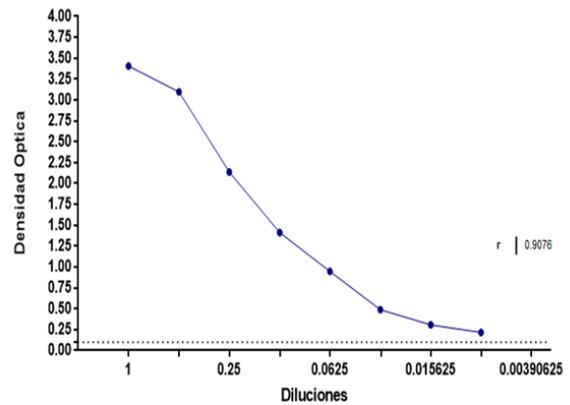
ELISA SANDWICH NS1 ZIKV con diferentes Mab



ELISA SANDWICH NS1 ZIKV con Mab 644 diferentes concentraciones



ELISA SANDWICH NS1 ZIKV CURVA CONCENTRACIÓN Mab 680/644



Fuente propia

En la figura 2a se observa que al comprobar el proceso de biotinilización de los anticuerpos 644 y 181 el único que mostró una adecuada funcionalidad de la biotina

fue el 644 ya que detectó de manera óptima la proteína NS1 de ZIKV, diferente al anticuerpo 181 que no mostró detección no por su funcionalidad sino porque su biotina no sirvió.

En la figura 2b se observan los diferentes pares de anticuerpos que se probaron para determinar cuál sería el más óptimo para la detección de NS1 ZIKV por medio de ELISA tipo Sandwich en donde el par de anticuerpos 680/644 mostró los mejores resultados para la detección de esta.

En la figura 2c después de obtener el mejor par de anticuerpos para la detección de NS1 de ZIKV, se procedió a modificar las concentraciones de ambos para determinar la mejor concentración para la detección observando que usar concentraciones de 2ug para ambos anticuerpos evidencio una buena detección al compararla con las demás concentraciones, siendo esta una opción costoefectiva para su aplicación.

En la figura 2d se observa la curva de detección utilizando diferentes concentraciones de NS1 ZIKV al realizar el ELISA tipo Sandwich con los anticuerpos 680/644 a una concentración de 2ug/ml cada uno, evidenciando $r=0.9076$.

8. DISCUSIÓN

Las arbovirosis agrupan a las enfermedades virales transmitidas por vectores. A ellas pertenecen las infecciones con los virus del Dengue (DENV), Zika (ZIKV). El diagnóstico clínico de estas es necesario porque las consecuencias de la infección con un miembro u otro son diferentes. Sin embargo, el diagnóstico es difícil debido a que estas infecciones inducen signos y síntomas similares y a la alta homología estructural entre algunos de los Arbovirus que hace difícil el diagnóstico microbiológico por la alta reacción cruzada que se presenta (7).

En el presente estudio se encontró que la mejor pareja de anticuerpos para realizar este tipo de ensayo fueron los anticuerpos monoclonales 680 y 644 biotinilado en comparación con lo previamente ya reportando, en donde los anticuerpos óptimos fueron el 110 y 130 biotinilado pero en nuestro caso dichos anticuerpos no fueron funcionales al momento de realizar el experimento (3).

En cuanto a la concentración óptima se encontró que en nuestro ensayo se requiere una concentración de 2ug/ml tanto para el anticuerpo de captura como del de detección ya que este valor nos evidenció los mejores resultados sin la necesidad de excederse la concentración, esto difiere de lo publicado ya que Zhang Liding et al reportaron que para que su ensayo fuese óptimo se requería concentraciones de 1.4 ug/ml para el anticuerpo de captura y 10ug/ml para el anticuerpo de detección (1).

Para terminar en nuestro ensayo de evidenció una adecuada detección de bajos niveles de NS1 entre 5-7 nanogramos. Esto es diferente por lo reportado con Irene et al que su margen de detección fue de 15 ng, lo que demuestra un adecuado nivel de detección (3). Debido a la falta de muestras clínicas en seres humanos no fue posible evaluar esta prueba en ese contexto, pero se espera que con el paso del tiempo se generen nuevas investigaciones sobre este tema (3).

9. CONCLUSIONES

Los pares de anticuerpos monoclonales ideales para la detección de la proteína no estructural 1 (NS1) del ZIKV son 680 y 644 ambos con una concentración de 2ug/ml.

La concentración saturante al momento de la detección es de 200ng de NS1.

Se obtuvo la curva de detección de la proteína NS1 a diferentes concentraciones de ésta obteniendo buenos niveles de detección.

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda incentivar la investigación en estas áreas ya que son de vital importancia para nuestra región debido a la gran cantidad de casos reportados mensual y anualmente por lo que si se motivan a generar estudios de este tipo o relacionados con el tema se podrá impactar de una mejor forma en la región.

Se recomienda informar a las familias de lo importante que son estas patologías en nuestro medio y que frente a un cuadro clínico compatible con estas infecciones acudir lo más pronto posible al médico para darles un manejo oportuno evitando algún tipo de complicación.

Es de vital importancia poder apoyar estas investigaciones con presupuesto financiero ya que el aporte que pueden generar es muy grande y generan muchos beneficios a la región al momento de abordar esta problemática tratando de dar soluciones a esta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Balmaseda A, Zambrana JV, Collado D, Garcia N, Saborío S, Elizondo D, et al. Comparison of four serological methods and two RT-PCR assays for diagnosis and surveillance of Zika. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018;56(3):JCM.01785-17. Available from: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01785-17>
2. Rockstroh A, Moges B, Barzon L, Sinigaglia A, Palù G, Kumbukgolla W, et al. Specific detection of dengue and Zika virus antibodies using envelope proteins with mutations in the conserved fusion loop. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2017;6(11):e99. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/emi.2017.87>
3. Bosch I, Puig H De, Hiley M, Carré-Camps M, Perdomo-Celis F, Narváez CF, et al. Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and zika virus in patient serum. *Sci Transl Med*. 2017;9(409):1–14.
4. W.Y. T, H.H. HH, C. B, J.J. T, J. T, C. P, et al. Distinguishing secondary dengue virus infection from zika virus infection with previous dengue by a combination of three serological tests. 2017; Available from: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emexb&AN=620730489%0Ahttp://dw2zn6fm9z.search.serialssolutions.com/?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&rft_id=info:sid/Ovid:emexb&rft.genre=article&rft_id=info:
5. Ganesan VK, Duan B, Reid SP. Chikungunya virus: Pathophysiology, mechanism, and modeling. *Viruses*. 2017;9(12):1–14.
6. Stewart-ibarra AM, Ryan SJ, Kenneson A, King CA, Barbachano-guerrero A, Beltrán-ayala E, et al. The Burden of Dengue Fever and Chikungunya in Southern Coastal Ecuador: Epidemiology , Clinical Presentation , and Phylogenetics from the First Two Years of a Prospective Study. 2015;1–35.
7. Shukla MK, Singh N, Sharma RK, Barde P V. Utility of dengue NS1 antigen rapid diagnostic test for use in difficult to reach areas and its comparison with

dengue NS1 ELISA and qRT-PCR. *J Med Virol.* 2017;89(7):1146–50.

8. Pereira AM, Monteiro DLM, Werner H, Daltro P, Fazecas T, Guedes B, et al. Zika virus and pregnancy in Brazil: What happened? *J Turkish-German Gynecol Assoc* [Internet]. 2018;19(1):39–47. Available from: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_16777/JTGGA-19-39-En.pdf
9. Barzon L, Percivalle E, Pacenti M, Rovida F, Zavattoni M, Del Bravo P, et al. Virus and Antibody Dynamics in Travelers With Acute Zika Virus Infection. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2017;(January):1–8. Available from: <http://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/cix967/4782288>
10. WHO_TRS_369.pdf.
11. Navarrete-espinoza J, Gómez-dantés H. Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2006;347–53.
12. Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. 2013;(October):2013.
13. Hurk AF Van Den, Hall-mendelin S, Pyke AT, Smith GA, Mackenzie JS. Vector Competence of Australian Mosquitoes for Chikungunya Virus. 2010;10(5).
14. Médica R, Vicente F, Gerardo H. El dengue en México Conocer para mejorar la calidad. 2012;
15. Icaza JT. y el dengue en México.
16. Villegas-trejo A, C M, Che-mendoza A, C M, González-fernández M, C M, et al. Control enfocado de *Aedes aegypti* en localidades de alto riesgo de transmisión de dengue en Morelos , México. 2011;53(2):141–51.
17. Heinz FX, Allison SL. FLAVIVIRUS STRUCTURE AND MEMBRANE FUSION. 2003;59:63–97.

18. Manuscript A. NIH Public Access. 2014;108(5):717–25.
19. Welsby PD. Infectious diseases. Vol. 70, Postgraduate Medical Journal. 1994. 74–85 p.
20. Noor R, Ahmed T. Zika virus: Epidemiological study and its association with public health risk. J Infect Public Health [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.007>
21. Laerte V, Junior P, Luz K, Parreira R, Ferrinho P. Zika Virus : A Review to Clinicians. 2015;28(6):760–5.
22. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. Review An update on Zika virus infection. Lancet [Internet]. 2017;6736(17). Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31450-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31450-2)
23. Anaya JM, Rodríguez Y, Monsalve DM, Vega D, Ojeda E, González-Bravo D, et al. A comprehensive analysis and immunobiology of autoimmune neurological syndromes during the Zika virus outbreak in Cúcuta, Colombia. J Autoimmun. 2017;77:123–38.
24. Soriano-arandes A, Rivero-calle I, Nastouli E, Espiau M, Alarcon A, Martínóntorres F, et al. Ac ce pt cr t. Expert Rev Anti Infect Ther [Internet]. 2018;0(0). Available from: <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1438265>
25. Daven S. Technical Guide for ELISA - Protocols - Troubleshooting. 2009;1–40.
26. Elisa S, Elisas T De, Directo E, Indirecto E, De P. Fundamentos y Tipos de ELISAs. 2006;1.
27. Watson J. The laser guidebook second edition. Optics & Laser Technology. 1994.
28. Muller DA, Depelsenaire ACI, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. J Infect Dis [Internet]. 2017;215(suppl_2):S89–95.

Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiw649>

29. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1053–7.

ANEXOS

Anexo A. Operacionalización de variables

Variable	Definición	Categorías	Nivel de medición	Indicadores
Género	Características fenotípicas del individuo.	Masculino, femenino	Nominal	Porcentaje, frecuencia
Edad	Tiempo que ha vivido una persona desde su nacimiento.	Número de años	Numérica	Porcentaje, Mediana
Concentración	La cantidad de soluto presente en una cantidad de solvente	Densidades ópticas y mg-ug/ml	Numérica	Densidades ópticas y mg-ug/ml
Tiempo de incubación	Tiempo en el cual la muestra está en la incubadora	Minutos y horas	Numérica	Valor bruto
Volumen	Espacio que ocupa un cuerpo	Microlitros y mililitros	Numérica	Valor bruto

Anexo B: Instrumento



**ESTANDARIZACIÓN DE UN INMUNOENSAYO
LIGADO A ENZIMA PARA LA DETECCIÓN DE
ARBOVIRUS CIRCULANTES EN ZONA
ENDÉMICA.**



El objetivo de este proyecto es estandarizar una prueba de inmunoensayo ligado a enzima para la detección de partículas virales de zika en muestras serológicas de pacientes pediátricos expuestos a la epidemia de arbovirus de junio 2015-junio 2016.

Variables:

Número de muestra: _____

Concentración de reactivos: _____

Tiempos de incubación: _____

Volúmenes de reactivos: _____

Anexo C: Carta de aprobación del comité de bioética



SEROTECA ARBOVIRUS GRUPO DE PARASITOLOGÍA Y MEDICINA TROPICAL UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA.

APROBACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Las muestras tomadas y almacenadas en esta seroteca se toman debido a los problemas de salud que las arbovirosis están generando actualmente, entre los cuales se encuentra el aumento en el número de casos graves y la mortalidad por esta causa. Entendiendo además, que esta enfermedad puede afectar a muchos órganos como: El corazón, hígado, riñón y el sistema nervioso entre otros.

El virus del dengue y del zika es endémico en Colombia, siendo el departamento del Huila uno de los más afectados, encontrándose dentro de los primeros en reporte de casos en el País. Esta enfermedad tiene un amplio espectro clínico de manifestaciones desde cuadros asintomáticos pasando por manifestaciones leves, con signos de alarma, hasta formas graves y potencialmente mortales.

Objetivo: El objetivo de esta Seroteca es recolectar muestras para estudios actuales de vigilancia virológica y seguimiento de factores relacionados con la severidad de la enfermedad, así como futuros estudios de predicción, diagnóstico y tratamiento del dengue los cuales contribuirán a reducir morbilidad y mortalidad de la enfermedad.

Beneficios: La información obtenida en todos los estudios que se realicen con estas muestras podrán beneficiar a la comunidad regional en el presente y futuro, ayudando a los médicos a encontrar formas mejores de diagnosticar en forma temprana y tratar oportunamente a pacientes con dengue o zika.

En todos los registros de los estudios las muestras serán identificadas por un número de código y el nombre de la persona será reconocido solamente por los investigadores, la información obtenida se manejará con todos los cuidados que las normas de confidencialidad demandan. Los resultados se guardarán en una base de datos segura en el laboratorio de inmunología de la universidad.

En el caso de tener inquietudes, preguntas o dudas o si desea alguna aclaración frente a los proyectos que se estén llevando a cabo con esta seroteca por favor comunicarse con el Doctor Carlos Fernando Narváez Rojas, Jefe Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana a los teléfonos 8715907 Ext 3112 y 8718311 Ext 3144 respectivamente.

Dado lo anterior el comité consideró que la investigación no representa ningún riesgo para las personas que participan. La investigación se ajusta a los estándares de buenas prácticas clínicas.

Consentimiento aprobado en Comité de Bioética de la Universidad Surcolombiana de Neiva con el acta No. 004-002 del 15 de enero de 2018

Anexo D: Cronograma de actividades

ACTIVIDADES	2018										2019					
	M a r	A b r	M a y	J u n	J u l	A g o	S e p	O c t	N o v	D i c	E n e	F e b	M a r	A b r	M a y	J u n
Elaboración del proyecto																
Prueba piloto																
Presentación y aprobación anteproyecto comité																
Recolección de información																
Análisis de la información																
Discusión de resultados																
Elaboración de informe final																

Anexo E. Presupuestos

Tabla 2. Presupuesto global de la propuesta por fuentes de financiación (en miles de \$)

RUBROS	TOTAL
PERSONAL	5.800.800
EQUIPOS	520.000
MATERIALES	36.940.000
TOTAL	43.260.000

Fuente propia.

Tabla 3. Descripción de los gastos de personal (en miles de \$)

INVESTIGADOR/ EXPERTO / AUXILIAR	FORMACION ACADEMICA	FUNCION DENTRO DEL PROYECTO	DEDICACION	RECURSOS
José Manuel Pérez Figueroa	Bachiller	Investigador principal	200	600.000
Carlos F Narváez	PhD	Asesor	40	4.000.000
Dolly Castro	Magister	Asesora	20	1.200.000
TOTAL				5.800.000

Fuente propia.

Tabla 4. Descripción y cuantificación de los equipos de uso propios (en miles de \$)

EQUIPO	VALOR
Espectrofotómetro	100.000
Nevecón	100.000
Cámara de esterilización	100.000
Incubadora	100.000
Balanza	40.000
MilliQ	60.000
Computador de Mesa	20.000
Total	520.000

Fuente propia.

Tabla 5. Materiales, suministros (en miles de \$)

Materiales	JUSTIFICACIÓN	VALOR
Pipeta monocanales de 1000, 200, 10 uL y multicanales de 50 y 200 uL (BRAND)	Para realizar el experimento	160.000 c/u
Buffer salino fosfato (PBS) estéril (Gibco- Lot 1806048)	Para realizar el experimento	70.000
Tween 20 10% (ACROS, Cat. 23336-2500)	Para realizar el experimento	50.000
Leche descremada en polvo (Slight, Colanta, Lote 7)	Para realizar el experimento	60.000
Anticuerpo de captura anti NS1 ZIKV para coating 130	Para realizar el experimento	6.000.000 c/u
Anticuerpo de detección anti NS1ZIKV o segunda capa 110	Para realizar el experimento	6.000.000 c/u

Estreptavidina-Peroxidasa (KPL, Cat)	Para realizar el experimento	100.000
Tetrametilbenzidina (TMB, KPL, Lote 100610)	Para realizar el experimento	100.000
Ácido Sulfúrico 2M (MERCK, Cat K38346532)	Para realizar el experimento	60.000
Placa de ELISA de 96 pozos de alta afinidad (NUNC, Cat)	Para realizar el experimento	200.000
Tubos Falcon de poliestireno 15 ml (BD, Cat: 352096)	Para realizar el experimento	80.000
Tubos eppendorf 1.5 ml	Para realizar el experimento	50.000
Recipiente para solución de lavado	Para realizar el experimento	10.000
Pipeta monocanales de 1000, 200, 10 uL y multicanales de 50 y 200 uL (BRAND)	Para realizar el experimento	160.000 c/u
Total		13.100.000

Nota: El laboratorio cuenta con todos los reactivos del listado.