

Neiva, junio 06 de 2022

**PARA:** **CESAR ALBERTO POLANÍA**  
Secretario de Salud Departamental


**DE:** **CARLOS FERNANDO NARVÁEZ**  
Jefe División de Inmunología

Estimado Dr. Polanía,

Con la presente comunicación hago entrega del séptimo Informe Técnico Trimestral del proyecto titulado "FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA", proyecto código BPIN 2020000100145, financiado con por el SGR del Departamento el Huila. En él se muestran significativos avances en el cumplimiento de las actividades del proyecto asignadas. El presente informe fue radicado y revisado por la Vicerrectoría de Investigación y Proyección Social de la Universidad Surcolombiana (quien recibe copia de este correo). En el informe va adjunto una sección de Anexos que soporta toda la información brindada. Adicionalmente va un file con soportes gráficos de las actividades y resultados obtenidos. El informe también se radicó en físico en cada una de las dependencias.

Cualquier inquietud, no dude en contactarme.

Cordialmente,

  
**CARLOS E. NARVÁEZ**  
Médico Inmunólogo  
Jefe División de Inmunología  
Universidad Surcolombiana  
[cnarvaez@usco.edu.co](mailto:cnarvaez@usco.edu.co)

GOBERNACIÓN DEL HUILA  
SECRETARÍA DE SALUD DEPARTAMENTAL  
Comunicaciones Oficiales y Relaciones

Radicado No. 18046  FIC  COP  
Fecha Día 09 Mes 06 Año 22  
Hora: 3:45  
Original:  Copia:   
Puntado:  Terminado:   
Radicado: BMO

Neiva, junio 06 de 2022

**PARA:** **MARÍA CLEMENCIA ROJAS CHARRY**  
Coordinadora Laboratorio de Salud Pública

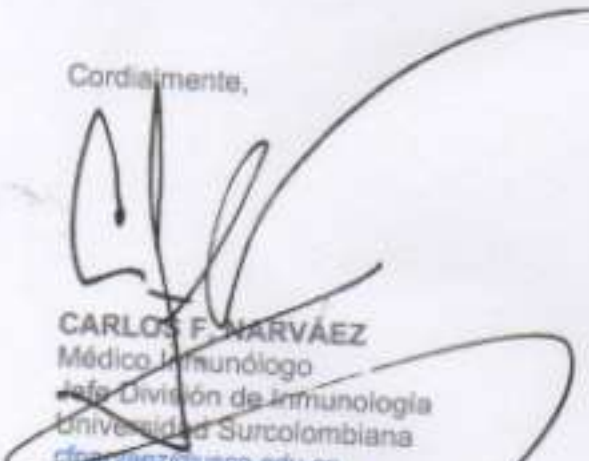
**DE:** **CARLOS FERNANDO NARVÁEZ**  
Jefe División de Inmunología

Estimada Dra. Rojas,

Con la presente comunicación hago entrega del séptimo Informe Técnico Trimestral del proyecto titulado "FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA", proyecto código BPIN 2020000100145, financiado con por el SGR del Departamento el Huila. En él se muestran significativos avances en el cumplimiento de las actividades del proyecto asignadas. El presente informe fue radicado y revisado por la Vicerrectoría de Investigación y Proyección Social de la Universidad Surcolombiana (quien recibe copia de este correo). En el Informe va adjunto una sección de Anexos que soporta toda la información brindada. Adicionalmente va un file con soportes gráficos de las actividades y resultados obtenidos. El informe también se radicó en físico en cada una de las dependencias.

Cualquier inquietud, no dude en contactarme,

Cordialmente,

  
**CARLOS F. NARVÁEZ**  
Médico Inmunólogo  
Jefe División de Inmunología  
Universidad Surcolombiana  
[cfnarvasz@usurco.edu.co](mailto:cfnarvasz@usurco.edu.co)

GOBERNACIÓN DEL HUILA  
SECRETARÍA DE SALUD DEPARTAMENTAL  
Constituciones Oficiales Recibidas

Radicado No. 18866  COR  CDR  
Fecha: Día 09 Mes 06 Año 22  
Hora: 3:45  
Origen:    
Presión:    
Radicado: [Signature]

Neiva, junio 06 de 2022

**PARA:**

**PEDRO ELIAS PLATA**

Apoyo a la Supervisión – Proyecto BPIN 2020000100145

**DE:**

**CARLOS FERNANDO NARVÁEZ**

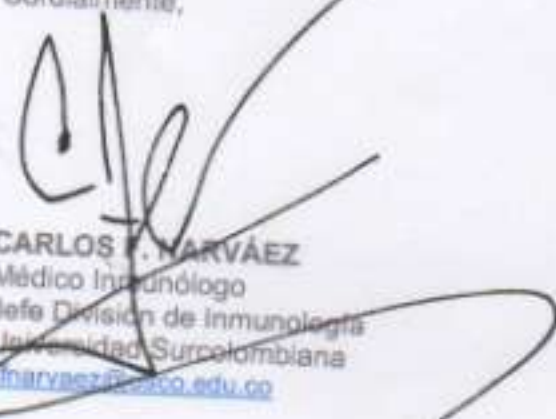
Jefe División de Inmunología

Estimado Dr. Plata,

Con la presente comunicación hago entrega del séptimo Informe Técnico Trimestral del proyecto titulado "FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA", proyecto código BPIN 2020000100145, financiado con por el SGR del Departamento el Huila. En él se muestran significativos avances en el cumplimiento de las actividades del proyecto asignadas. El presente informe fue radicado y revisado por la Vicerrectoría de Investigación y Proyección Social de la Universidad Surcolombiana (quien recibe copia de este correo). En el Informe va adjunto una sección de Anexos que soporta toda la información brindada. Adicionalmente va un file con soportes gráficos de las actividades y resultados obtenidos. El informe también se radicó en físico en cada una de las dependencias.

Cualquier inquietud, no dude en contactarme.

Cordialmente,

  
**CARLOS F. NARVÁEZ**  
Médico Inmunólogo  
Jefe División de Inmunología  
Universidad Surcolombiana  
[cnarvaez@usco.edu.co](mailto:cnarvaez@usco.edu.co)

GOBERNACIÓN DEL HUILA  
SECRETARÍA DE SALUD DEPARTAMENTAL  
Comunicaciones Generales Recibidas

Radicado en: 18866  PCR  CDR  
Fecha Día: 09 Mes: 06 Año: 22  
Hora: 3:45  
Original:  Copia:   
Prioridad:  Urgente  Normal   
Radicaón: BMO



Carlos Fernando Narvaez Rojas <cfnarvaez@usco.edu.co>

---

## ENTREGA Y AVAL SÉPTIMO INFORME TRIMESTRAL PROYECTO BPIN 2020000100145

1 message

---

Carlos Fernando Narváez <cfnarvaez@usco.edu.co>

Wed, May 18, 2022 at 5:00 PM

To: vicerrectoria de investigaciones y proyeccion social - usco <viceinvestigaciones@usco.edu.co>

Cc: carlos harvey salamanca falla <carlos.salamanca@usco.edu.co>

Cordial saludo,

Con la presente comunicación hago entrega del séptimo Informe Técnico Trimestral del proyecto titulado **“FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA”**, proyecto código BPIN 2020000100145, financiado con por el SGR del Departamento el Huila y en donde actuamos como aliados de la Secretaría de Salud Departamental del Huila. En él se muestran significativos avances en el cumplimiento de todas las actividades del proyecto asignadas a la Universidad. Va con los soportes respectivos. Por favor revisar y archivar en la carpeta del proyecto que reposa en su despacho. Para ser radicado ante la entidad ejecutora es necesario obtener el aval de la VIPS, como en las ocasiones previas.

Cualquier inquietud, no duden en contactarme,

Cordialmente,

**CARLOS F. NARVÁEZ**

Médico Inmunólogo

Jefe División de Inmunología

Departamento de Pediatría y Básicas

Universidad Surcolombiana - Hospital Universitario de Neiva



**SEPTIMO INFORME BPIN 2020000100145.doc-fusionado.pdf**

5862K

**SÉPTIMO INFORME TÉCNICO TRIMESTRAL PRESENTADO POR LA UNIVERSIDAD  
SURCOLOMBIANA DEL PROYECTO TITULADO “FORTALECIMIENTO DE  
CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN  
DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER  
PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO  
PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA”.**

**BPIN 2020000100145**

**Carlos Fernando Narváez Rojas**

Médico Inmunólogo

[cfnarvaez@usco.edu.co](mailto:cfnarvaez@usco.edu.co)

Laboratorio de Infección e Inmunidad (I&I Lab)

División de Inmunología - Programa de Medicina

Facultad de Salud

Universidad Surcolombiana

15 de Mayo de 2022

Neiva – Huila

Colombia

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>2. OBJETIVOS</b>	5
2.1.    Objetivo general	5
2.2.    Objetivo específico (OE1).	5
<b>3. ACTIVIDADES ASOCIADAS AL CUMPLIMIENTO DEL OE1</b>	5
3.1.    Realizar entrenamiento especializado del talento humano (en identificación y estudio de agentes virales por métodos moleculares y serológicos).	5
3.2.    Detectar SARS-CoV-2 por métodos moleculares	5
3.3.    Realizar la estandarización y validación local de pruebas moleculares para detectar DENV y ZIKV.	6
3.3.1. Validación de Métodos moleculares para detección de ZIKV.	6
3.3.2. Efectuar la estandarización y validación de un inmunoensayo ligado a enzima para detectar anticuerpos IgM e IgG circulantes anti-SARS-CoV-2	14
3.3.3. Efectuar la estandarización y validación de un inmunoensayo ligado a enzima para detectar anticuerpos IgG e IgM circulantes anti-DENV y anti-ZIKV.	14
3.3.3.1. Validación de ELISA para detección de IgM e IgG ZIKV-específica circulante.	15
3.3.3.2. Estandarización y validación de un ELISA basado en NS1 para detectar IgG ZIKV específica circulante.	19
3.4.    Aplicar las pruebas moleculares/serológicas	25
3.4.1. Caracterización clínica	25
3.4.2. Caracterización virológica	25
3.5.    Realizar la administración del proyecto.	26
3.6.    Realizar el apoyo a la supervisión	27
<b>4. OE2: FORTALECER LA INFRAESTRUCTURA PARA EL DESARROLLO DE INVESTIGACIÓN PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA DEL DEPARTAMENTO DEL HUILA.</b>	<b>27</b>
4.1.    Gestionar la compra e instalación de equipos	27

4.2. Adquirir insumos para laboratorio	27
4.3. Realizar mantenimiento y calibración de equipos de laboratorio	27
4.4. Adelantar obras de adecuación de espacios	28
<b>5. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	29
<b>6. PROBLEMAS E INCONVENIENTES</b>	30
<b>7. REFERENCIAS</b>	30
<b>8. ANEXOS</b>	31
- Anexo 1. POE para la detección de ZIKV por RT-qPCR.	
- Anexo 2. Análisis estadístico de la validación de la RT-qPCR para ZIKV.	
- Anexo 3. Informe general de validación de la RT-qPCR para ZIKV.	
- Anexo 4. Protocolo para detección de IgG específica de DENV1-4 por ELISA.	
- Anexo 5. Protocolo para detección de IgG específica de ZIKV por ELISA.	
- Anexo 6. Protocolo para detección de IgM específica de ZIKV por ELISA.	
- Anexo 7. Análisis estadístico de la validación del ELISA para IgM para ZIKV.	
- Anexo 8. Análisis estadístico de la validación del ELISA para IgG para ZIKV.	
- Anexo 9. Análisis estadístico de la validación del ELISA para IgG ZIKV basado en la relación ZIKV/DENV1-4 IgG.	
<b>9. SOPORTES GRÁFICOS</b>	

## 1. INTRODUCCIÓN

A través del siguiente texto se presentan los avances técnicos y científicos realizados a través de la ejecución del proyecto titulado “FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA”, BPIN 2020000100145, detallándose particularmente las actividades y productos logrados por la División de Inmunología de la Universidad Surcolombiana como entidad aliada de la Secretaría de Salud Departamental del Huila (SSDH), para el cumplimiento de las actividades planeadas en la propuesta y realizadas en los meses de febrero, marzo, abril e inicios de mayo de 2022.

Es de notar, que durante este trimestre la situación de COVID-19 en Colombia ha mejorado significativamente, presentándose el número de casos de infección y muerte por SARS-CoV-2 más bajos desde el inicio de la pandemia en Colombia en el 2020 (<https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/Coronavirus.aspx>).

Durante el séptimo trimestre se enfocó el trabajo en el desarrollo de las actividades relacionadas con el estudio de los Flavivirus del Dengue virus (DENV) y Zika virus (ZIKV), haciéndose énfasis en los métodos de identificación del genoma viral por métodos moleculares y la detección de anticuerpos isotipo-específicos por inmunoensayo ligado a enzima (ELISA). Se presenta datos que demuestran la estandarización y validación de estos métodos en especímenes clínicos, usando para ellos indicadores y métodos estadísticos como el grado de concordancia, índice Kappa de Cohen, tablas de contingencia, determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y análisis de curva ROC.

También, se realizó transferencia de técnicas y procedimientos, además se ofreció entrenamiento de personal entre las dos instituciones aliadas. Finalmente, se envían soportes del inicio de las obras de adecuaciones en los dos Laboratorios aliados que hacen parte de esta propuesta y que era la actividad que más inconvenientes administrativos ha tenido. Como ha sido usado en los informes anteriores, se seguirá un

modelo de Informe que describe cada una de las actividades planteadas originalmente en el respectivo proyecto, asignándole un porcentaje de avance al final de cada descripción. Como será notado a lo largo del presente informe, la gran mayoría de actividades originalmente propuestas ya tienen un cumplimiento del 100%.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Mejorar las capacidades en CTel del departamento del Huila para atender problemáticas asociadas con agentes biológicos de alto riesgo para la salud humana.

### 2.2. Objetivo específico (OE1).

Prestar servicios científicos y tecnológicos para atender problemáticas asociadas con agentes biológicos de alto riesgo para la salud humana en el departamento del Huila.

## 3. ACTIVIDADES ASOCIADAS AL CUMPLIMIENTO DEL OE1

### 3.1. Realizar entrenamiento especializado del talento humano (en identificación y estudio de agentes virales por métodos moleculares y serológicos).

Actividad realizada e informada en los Informes Técnicos Trimestrales anteriores. Se reporta cumplimiento del 100%.

### 3.2. Detectar SARS-CoV-2 por métodos moleculares

Durante el tiempo planeado de ejecución de la propuesta se validaron métodos comerciales y además se estandarizó y validó la identificación de SARS-CoV-2 desde hisopado nasofaríngeo en especímenes clínicos usando el protocolo Berlín-Charité recomendado por el Instituto Nacional de Salud (INS), en los dos laboratorios según lo planeado. Esto puede ser corroborado en el primero, segundo, tercero y cuarto Informes Técnicos Trimestrales.

Se reporta un cumplimiento del 100%.

### **3.3. Realizar la estandarización y validación local de pruebas moleculares para detectar DENV y ZIKV.**

Anteriormente se mostraron resultados en la estandarización del ensayo de RT-qPCR para la detección de *Flavivirus* que fueron presentados en los Informes Técnicos Trimestrales anteriores. Los datos mostrados y los respectivos informes fueron los siguientes:

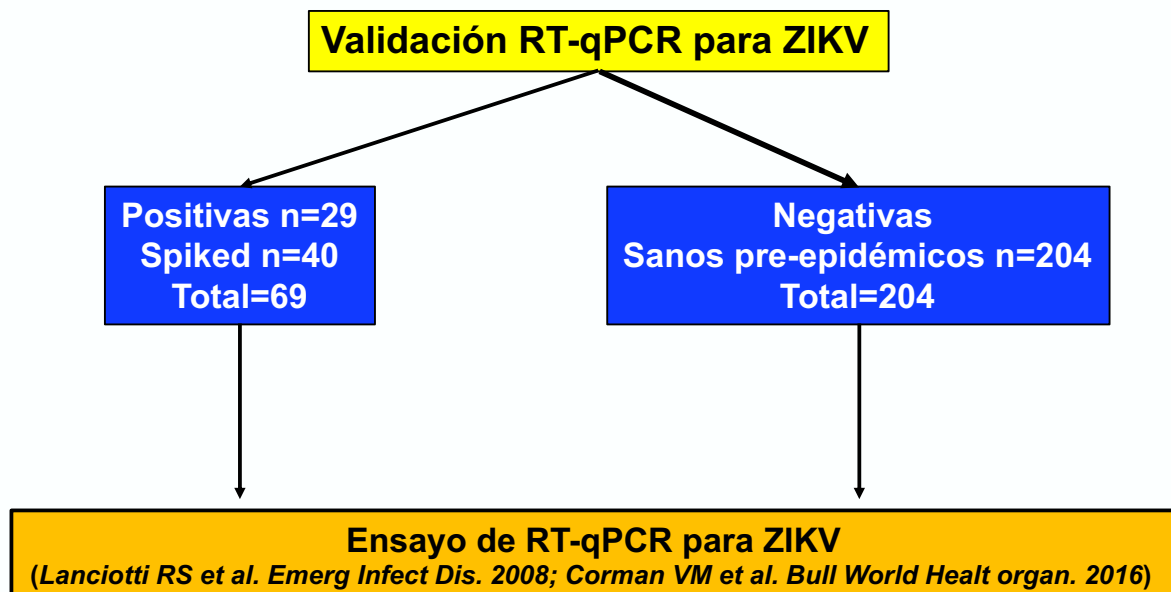
- Eficiencia de la extracción automatizada de RNA DENV usando el dispositivo de extracción automatizada adquirido con la propuesta (ver tercer Informe Técnico Trimestral, páginas 18-31, Tablas 3 y 4, y Figuras 3-8).
- Aplicación preliminar de RT-qPCR para detección de DENV serotipo-específica en especímenes clínicos (ver tercer Informe Técnico Trimestral, página 28, Figura 7).
- Detección de ZIKV por RT-qPCR desde sobrenadante de cultivo celular (ver tercer Informe Técnico Trimestral, página 36, Figura 10).
- Reporte de la sensibilidad del ensayo de RT-qPCR para ZIKV, usando diluciones seriadas del virus previamente titulado por ensayo de formación de foco (FFA, en inglés) en sobrenadante de cultivo celular para realizar curva estándar (ver tercer Informe Técnico Trimestral, página 36, Figura 9-11, Tabla 5).

El protocolo producto de la estandarización de la RT-qPCR para detección de ZIKV es mostrado como Anexo 1 y es presentado el formato del Sistema de Gestión de Calidad de la Universidad Surcolombiana (SGC).

#### **3.3.1. Validación de Métodos moleculares para detección de ZIKV.**

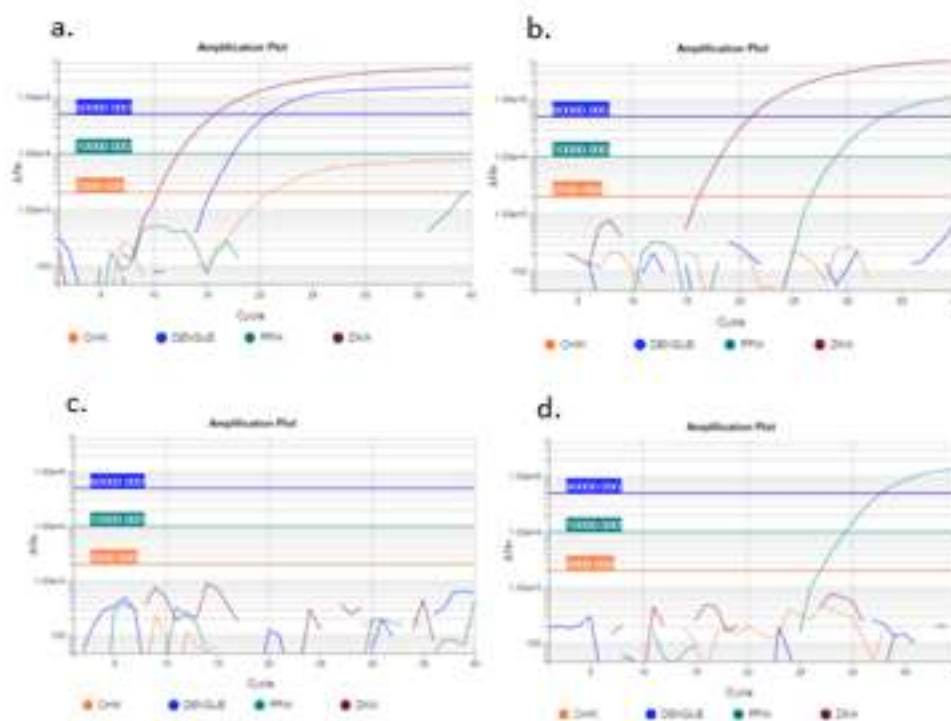
Una vez obtenido y probado el protocolo de RT-qPCR para detección de ZIKV (ver tercer Informe Técnico Trimestral, páginas 35-38, Figuras 10 y 11, Tabla 5; Anexo 1 actual informe, Anexo 1), se procedió a la validación del ensayo de detección molecular del virus. Como fue reportado en los anteriores Informes Técnicos Trimestrales (ver segundo

Informe Técnico Trimestral, página 28), a diferencia de los ocurrido para SARS-CoV-2 y DENV, para ZIKV, se contó con un limitado número de especímenes clínicos de infección natural confirmada, hecho también soportado por la muy baja circulación de ZIKV en Colombia después de la epidemia del 2015-2016 (<https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ZIKA%20PE%20XIII%202021.pdf>). Se buscaron alternativas como la solicitud elevada a la Secretaría de Salud Departamental del Huila (SSDH) y desde ella al Instituto Nacional de Salud (INS). Sin embargo, no se logró aumentar el número de especímenes y la validación se realizó con las muestras disponibles pertenecientes a la Seroteca de la División de Inmunología, Grupo de Parasitología y Medicina tropical de la Universidad Surcolombiana. Para aumentar el número de especímenes de plasma con presencia del ZIKV incluidos en la validación y aumentar por lo tanto su poder estadístico, se planeó una estrategia de experimentos de “spike”, que consisten en la adición de cantidades conocidas del virus (desde sobrenadante de cultivo) a muestras de plasma y realizar después su detección por el método de RT-qPCR que se está validando. Con ella se evalúa el ensayo, controlando, por ejemplo, los factores inhibidores de la reacción que pueden estar presentes en el plasma y la cantidad mínima de partículas detectadas en la muestra, ya que la cantidad de virus adicionada es previamente conocida por el Ensayo de Formación de Foco (FFA). Esta estrategia es altamente usada en estudios de validación de métodos moleculares diagnóstico de patógenos incluyendo el ZIKV (Pawley DC et al. ACS Omega. 2019; Chotiwan N et al. Sci Trasl Med. 2017). El diseño de la validación de la RT-qPCR para DENV es mostrado como Figura 1.



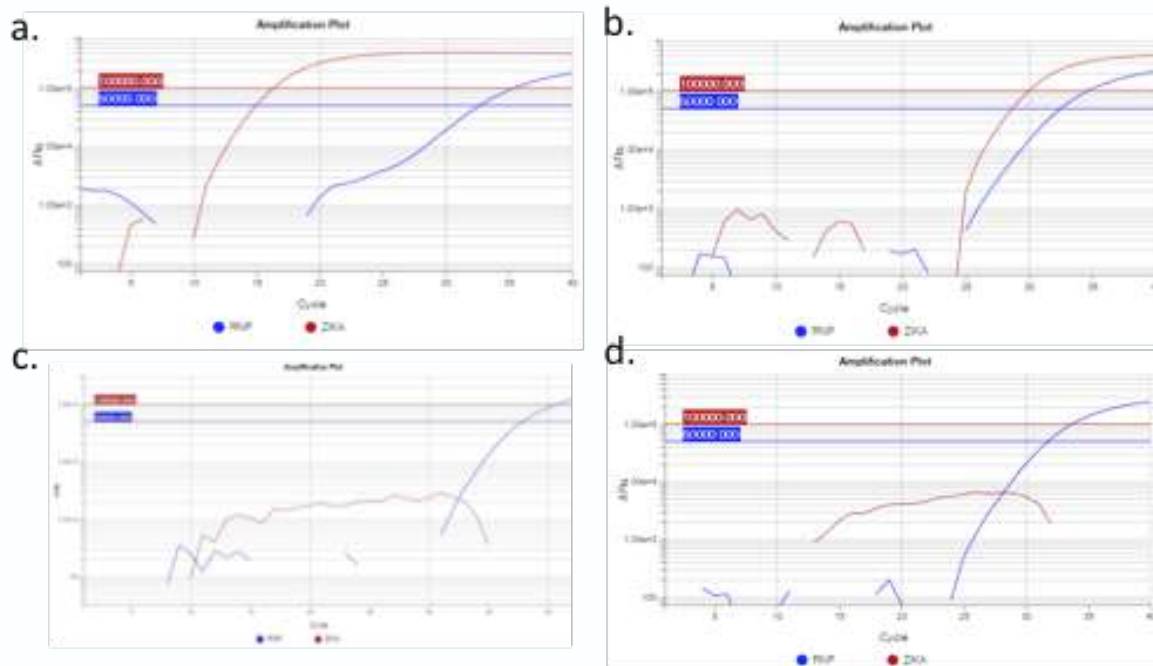
**Figura 1.** Diseño de la validación del ensayo de RT-qPCR para ZIKV. Todos los especímenes considerados como positivos fueron identificado inicialmente con el ensayo comercial Taqman® Zika Virus Triplex Kit (Appliedbiosystem. Cat: A31747). Los especímenes negativos consistieron en muestra de plasma tomada antes de la llegada del ZIKV a las Américas (2011-2014) desde voluntarios sanos.

Como mostrado en la Figura 1, para la validación del ensayo de RT-qPCR para ZIKV se incluyeron 273 muestras biológicas. De ellas, 29 fueron infecciones, 40 correspondieron a muestras a las que se les adicionó una cantidad conocida de ZIKV (experimentos de “spiked”) y 204 fueron muestras de plasma obtenidas desde voluntarios sanos tomados antes de la epidemia de ZIKV en las Américas (pre-epidémicos). En todos los pacientes positivos (n=69) y en una fracción de voluntarios sanos pre-epidémicos negativos (n=16), la infección fue confirmada por la aplicación de un estuche comercial de RT-qPCR ampliamente usado (Taqman® Zika Virus Triplex Kit, Appliedbiosystem, cat: A31747), que fue considerado como estándar de oro. Imágenes de la aplicación del ensayo estándar de oro en los especímenes es mostrado como Figura 2.



**Figura 2.** Experimento de detección de ZIKV por RT-qPCR usando la prueba estándar de oro TaqMan TRIPLEX ZIKV (Applied Biosystem). a. Control Positivo TaqMan® Zika Virus Triplex Kit, que muestra amplificación para ZIKV (línea roja) y DENV (línea azul); b. Muestra de plasma Positiva para ZIKV detectada por el TaqMan® Zika Virus Triplex Kit; c. Control Negativo TaqMan® Zika Virus Triplex Kit; D. Muestra biológica de plasma Negativa determinada por TaqMan® Zika Virus Triplex Kit. Nota: Debido a que los controles positivo y negativo corresponden a sobrenadante de cultivo de células Vero-76 tratadas y no tratadas con el ZIKV, respectivamente, una amplificación del gen constitutivo (línea verde) que está diseñado para humanos, no es notada.

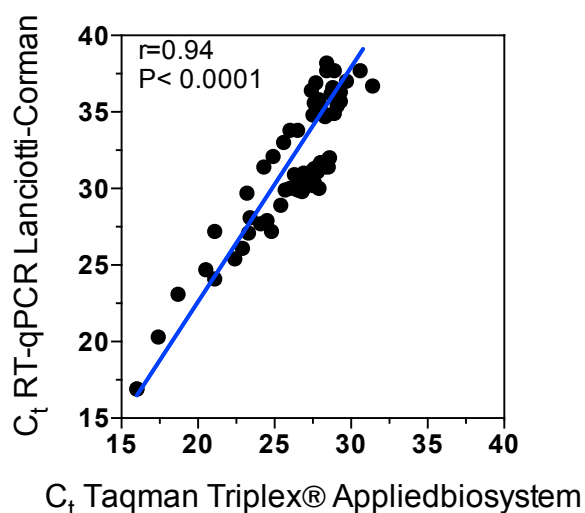
Para la validación del ensayo de RT-qPCR para ZIKV, se realizó la extracción automatizada de RNA desde todas las muestras incluidas, usando el dispositivo automatizado KingFisher™ Flex (Thermo Scientific) y el estuche comercial MagMax™ Viral Pathogen (Thermo-Appliedbiosystem). RT-qPCR fue realizada en el dispositivo QuantStudio 5. La Figura 3, muestra ejemplos de la amplificación de los controles y especímenes previamente caracterizados usando en ensayo de RT-qPCR de la propuesta.



**Figura 3.** Validación del ensayo de RT-qPCR para detectar ZIKV propuesto en el proyecto. a y c. Controles positivo y negativo del ensayo, correspondiente a sobrenadante de cultivo celular con el ZIKV y en ausencia del mismo, respectivamente. b y d. Especímenes biológicos de plasmas positivo y negativo, respectivamente. La amplificación de ZIKV corresponde a la línea roja. El ensayo fue mejorado a través de la propuesta durante su estandarización al introducirse un control interno de amplificación correspondiente a un gen constitutivo (gen de la RNasa P) cuya amplificación corrobora la presencia del RNA purificado en la reacción (línea azul).

De los 69 especímenes positivos identificados con el estándar de oro, 64 fueron identificados por el ensayo de RT-qPCR del proyecto y cinco mostraron no ser detectado (64/69). Con respecto a los especímenes negativos que fueron probados por el estándar de oro, todos ellos resultaron también negativos cuando fueron probados usando la RT-qPCR del proyecto (16/16). Un análisis de asociación entre los resultados de “cycles threshold” (Ct, en inglés) obtenidos usando el estándar de oro (ensayo TaqMan Triplex Appliedbiosystem) y el ensayo estandarizado y en validación por la División de Inmunología (Lanciotti RS et al. *Emerg Infect Dis.* 2008; Corman VM et al. *Bull World*

Health Org. 2016) para detectar ZIKV en las 64 muestras confirmadas positivas, es mostrado en la Figura 4, que muestra una alta correlación significativa en los Ct obtenidos por ambos métodos, a pesar de la diferencia en los genes blanco y fluorocromos de las sondas usados en cada uno de los dos ensayos.



**Figura 4.** Medida de relación entre los Ct de los especímenes probados por el ensayo estándar de oro (TRIPLEX, Applied Biosystem) y el método estandarizado con la propuesta (Lanciotti-Corman). La gráfica muestra el coeficiente de correlación de Pearson y su respectiva P.

Una vez realizado el análisis de los datos obtenidos tras la comparación de los resultados entre el estándar de oro y el ensayo de RT-qPCR del proyecto se calculó la concordancia entre los dos métodos, además, del índice Kappa generado (Figura 5). De notar, todas las muestras incluidas en la validación fueron usadas para el análisis (Positivas n=69 y Negativas n=204), un total de 273 especímenes.

Posteriormente, se calcularon la sensibilidad y especificidad del ensayo de RT-qPCR para ZIKV. Para esto, todas las muestras positivas, además de todas las muestras negativas (incluyendo al total de voluntarios sanos pre-epidémicos y por lo tanto tomados como negativos confirmados) fueron usadas para el análisis. Ninguno de las muestras

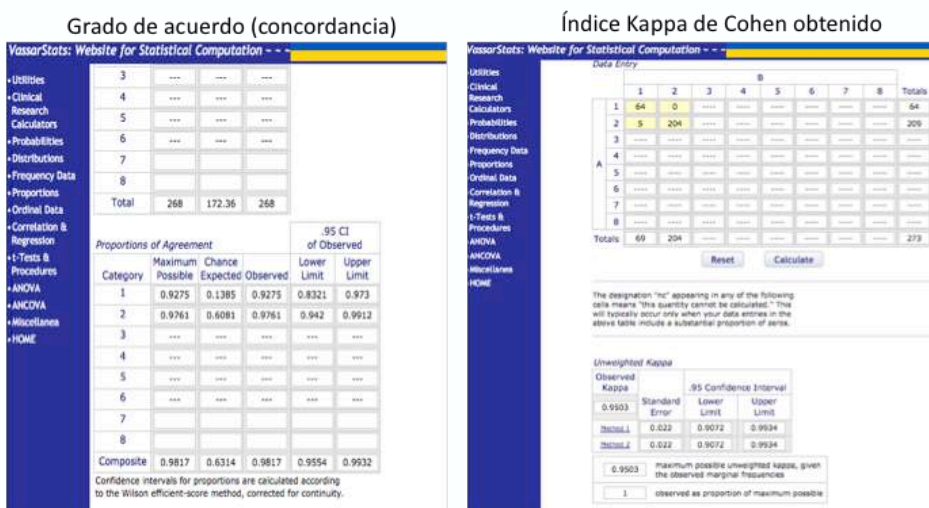
provenientes de los voluntarios sanos tomadas antes de la epidemia de ZIKV arrojó señal alguna de amplificación en el ensayo de RT-qPCR.

Con los dos grupos de especímenes probados para ZIKV, se construyó la siguiente Tabla de contingencia de 2x2:

**Tabla 1.** Tabla de contingencia de 2x2 para el cálculo de la eficiencia de la detección de ZIKV por RT-qPCR.

RT-qPCR Lanciotti-Corman	Muestras confirmadas		Total
	Ausente	Presente	
Positivo	0	64	64
Negativo	204	5	209
Total	204	69	273

Con la anterior Tabla de contingencia se realizaron los respectivos análisis que son mostrados como Anexo 2 del presente informe. Los análisis realizados arrojaron los siguientes resultados finales de la validación local de un método de RT-qPCR para la identificación de ZIKV que fueron obtenidos usando la “Vassar Stats: webpage for statistical computation” (<http://vassarstats.net/>)



**Figura 5.** Análisis de concordancia entre el estándar de oro y el método de detección de ZIKV por RT-qPCR. Izquierda: análisis de concordancia entre los dos métodos. Derecha: Índice de Kappa de la Concordancia obtenida entre los métodos comparados.

Con los datos presentados en la Tabla 1, se obtuvieron además todos los valores derivados de validación de la RT-qPCR para detección de ZIKV, que en resumen son Figura 6.

VassarStats: Website for Statistical Computation ~ ~ ~

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	0	64	64
Test Negative	204	5	209
Totals	204	69	273

Calculate    Reset

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.252747	0.203186	0.309412
Sensitivity	0.927536	0.832096	0.973016
Specificity	1	0.976962	1

For any particular test result, the probability that it will be:

Positive	0.234432	0.186405	0.290095
Negative	0.765568	0.709905	0.813595

For any particular positive test result, the probability that it is:

True Positive (Positive Predictive Value)	1	0.929452	1
False Positive	0	0	0.070548

For any particular negative test result, the probability that it is:

True Negative (Negative Predictive Value)	0.976077	0.941993	0.99116
False Negative	0.023923	0.00884	0.058007

**Figura 6.** Validación del ensayo de RT-qPCR para detección de ZIKV en muestras biológicas. Análisis de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos obtenidos con los resultados de la comparación de los métodos mostrados en la Tabla 1, usando la plataforma digital de análisis computacional y estadístico en línea VassarStats (<http://vassarstats.net/>).

Los resultados finales obtenidos durante la validación son (Datos evaluados a un intervalo de confianza de 95%):

Concordancia (min-max): 0.94 (0.88-0.98).

Índice Kappa de Cohen: 0.95 (90-99), grado de acuerdo muy alto.

Sensibilidad (min-max): 92.7% (83-97)

Especificidad (min-max): 100% (97-100).

Valor Predictivo Positivo (VPP): 100% (92-100).

Valor Predictivo Negativo (VPN): 97% (94-99).

El Informe completo de validación de la RT-qPCR de ZIKV se presenta en este informe como Anexo 3.

**En conclusión, se validó localmente un método para detección por métodos moleculares de ZIKV en muestras biológicas. Soportado en lo anterior, se reporta un cumplimiento del 100% en la actividad de estandarizar y validar localmente un método molecular para detectar ZIKV. Se concluye que las entidades aliadas cuentan con un método sensible y específico para detectar infección por ZIKV en el departamento del Huila.**

### **3.3.2. Efectuar la estandarización y validación de un inmunoensayo ligado a enzima para detectar anticuerpos IgM e IgG circulantes anti-SARS-CoV-2**

Soportes del cumplimiento de esta actividad se presentan en el sexto Informe Técnico Trimestral, página 7 a 21. **Se reporta un cumplimiento del 100%.**

### **3.3.3. Efectuar la estandarización y validación de un inmunoensayo ligado a enzima para detectar anticuerpos IgG e IgM circulantes anti-DENV y anti-ZIKV.**

En los Informes Técnicos Trimestrales anteriores se han mostrado avances en la estandarización de los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para detectar IgM e IgG circulantes específicas de Flavivirus (DENV y ZIKV). Durante el proceso de estandarización de los ensayos se mostró:

- La descripción del protocolo general y la selección de la dosis de la proteína no estructural (NS)-1 recombinante de los Flavivirus necesaria para realizar el cubrimiento de la fase sólida de los ELISAS para detección de isotipos humanos

- virus-específicos (ver segundo Informe Técnico Trimestral, páginas 32-34, Figura 7).
- Se demostró especificidad del ELISA para detección de IgG anti-ZIKV mediante la realización de ensayo de inhibición competitiva usando anticuerpos monoclonales murinos específicos contra NS1 de DENV1-4 y ZIKV (ver segundo Informe Técnico Trimestral, página 34, Figura 8).
  - Se mostraron datos de la aplicación del ELISA para IgG NS1-DENV1-4 en especímenes clínicos caracterizados de infección por DENV y su reactividad cruzada con ZIKV (ver segundo Informe Técnico Trimestral, Página 36, Figura 9).
  - Se comparó la eficiencia de un ELISA indirecto con sistema de detección secundario acoplado a Peroxidasa o a Biotina (ver sexto Informe Técnico Trimestral, página 22, Figura 10).
  - Se mostró la comparación en la eficiencia para detectar IgM DENV1-4 circulantes entre un ELISA sándwich y un ELISA indirecto (ver sexto Informe Técnico Trimestral, página 23, Figura 11).

Los protocolos finales de los ensayos para detección de IgG para DENV y ZIKV productos del proceso de estandarización descrito se muestran como Anexo 4 y 5 del presente informe en el formato del sistema de gestión de calidad de la Universidad.

### **3.3.3.1. Validación de ELISA para detección de IgM e IgG ZIKV-específica circulante.**

Como se ha informado en varios Informes Técnicos Trimestrales anteriores, el número de especímenes disponibles con infección confirmada por ZIKV es el más bajo de todos los grupos incluidos y son de muy difícil consecución. Esto se soporta además en la muy baja circulación del ZIKV en Colombia tras la epidemia de 2015-2016 ([Instituto Nacional de Salud. BES. Sem 53 2021](#)). Después de analizar los especímenes disponibles después del proceso de validación de la RT-qPCR, se reunieron 23 muestras de plasma provenientes de pacientes con infección confirmada por RT-qPCR que además fueron tomadas en la convalecencia (entre 10-45 días de iniciados los síntomas). Por lo tanto, estos especímenes fueron tomados como el estándar de oro para la validación del ELISA para IgM específica de ZIKV circulante. Como muestras confirmadas negativas, al igual que la estrategia usada para validar la RT-qPCR de ZIKV, se tomaron pacientes sanos

pre-epidémicos, cuya muestra de plasma fue tomada entre el 2010-2014 (la mayoría de ellos, en el 2013, n=138). El protocolo estandarizado y usado en la validación del ELISA para IgM de ZIKV es mostrado como Anexo 6.

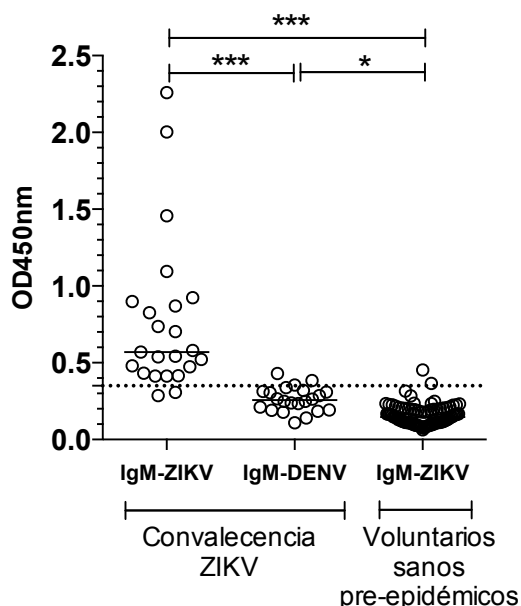
Inicialmente, la Figura 7A muestra una imagen representativa de la aplicación del ELISA basados en NS1 para detectar IgM de ZIKV circulante en muestras sospechosas y confirmadas de infección por ZIKV tomadas durante el pico de su epidemia en Colombia en 2016. La parte B de la Figura 7 muestra la aplicación del ELISA en los mismos especímenes, pero a diferencia del anterior, usando como antígeno para cubrir los inmunoensayos, una mezcla de la proteína NS1 recombinante de DENV1-4 (mezcla de los 4 serotipos), previamente titulada a sus concentraciones óptimas (ver quinto Informe Técnico Trimestral, página 23, Figura 11), probando de esa manera el nivel de reacción cruzada de los anticuerpos de isotipo M entre ambos Flavivirus co-circulantes en el Departamento.

Como muestra la Figura 7, una significativa reactividad para la IgM en el ELISA basado en NS1 fue observada en los especímenes de pacientes sospechosos y confirmados de la infección por ZIKV (Figura 7A). Cuando la reactividad de los anticuerpos IgM a NS1 de DENV1-4 fue probada en estos mismos pacientes, una evidente disminución en dicha reactividad fue notada (Figura 7B). Como mencionado anteriormente, voluntarios sanos pre-epidémicos, cuya muestra de plasma fue tomada entre el 2011 – 2014 fueron usados como muestras confirmadas negativas. La Figura 8C, muestra un ejemplo del ELISA basado en NS1 para detectar IgM-ZIKV en este grupo. Un poco, si alguna reactividad fue notada.



**Figura 7.** ELISAS para detección de IgM NS1 de DENV probado en varios grupos tipificados de especímenes clínicos. A. Detección de IgM-ZIKV en pacientes sospechosos y confirmados de infección por ZIKV tomados en el 2016. B. Detección de IgM-DENV en el mismo grupo de pacientes mostrados en la parte A, mostrando baja reactividad cruzada. C. Detección de IgM-ZIKV en voluntarios sanos tomados antes (2011-2014) de la epidemia de ZIKV en Colombia. Especímenes realizados por duplicado. En la esquina superior izquierda de cada placa, se observan los respectivos controles positivos y negativos.

Para obtener finalmente los datos de concordancia, sensibilidad, especificidad y otros relacionados con la validación, se tomaron los resultados del ELISA IgM-ZIKV basado en NS1 de los pacientes en convalecencia de la infección confirmada por ZIKV (muestras positivas) y los especímenes confirmados negativos (voluntarios pre-epidémicos). La reactividad cruzada de los anticuerpos IgM-ZIKV contra DENV fue analizada independientemente. Como mostrado en la Figura 8, una clara diferencia en las OD450nm de los ELISAS para IgM-ZIKV basado en NS1 fue observada entre las muestras de pacientes con infección por ZIKV en convalecencia comparado con los voluntarios sanos pre-epidémicos ( $P < 0.0001$ , Dunn post test). La reactividad cruzada de los anticuerpos IgM anti-NS1 de ZIKV contra NS1 de DENV1-4 estuvo presente, pero fue significativamente menor que la señal emitida por los anticuerpos IgM anti-NS1 ZIKV en los mismos pacientes (Figura 8) y el valor de esta reactividad cruzada fue levemente superior que las OD45nm absolutas encontradas en los voluntarios sanos pre-pandémicos.



**Figura 9.** Evaluación de la IgM específica de NS1 de ZIKV por ELISA en muestras de pacientes con infección confirmada por ZIKV convalecientes (positivos) y voluntarios sanos pre-epidémicos (negativos). Para probar la reactividad cruzada de la IgM entre Flavivirus, se evaluó simultáneamente el nivel de unión a NS1 de DENV1-4 en los pacientes positivos. La línea continua en cada columna representa la mediana del respectivo grupo. La línea punteada representa el punto de cohorte que corresponde al doble del valor de la mediana de todos los controles positivos de las placas analizadas. \* $P < 0.05$ . \*\*\* $P < 0.0001$  post test.

Usando los datos mostrados en la Figura 8, se construyó la tabla de contingencia de 2x2 para obtener los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo (VPP) valor predictivo negativo (VPN).

**Tabla 2.** Tabla de contingencia de 2x2 de los resultados del análisis del ELISA para IgM-ZIKV basado en NS1 usando las muestras previamente caracterizadas.

ELISA basado en NS1	Condición ausente	Condición presente	Total
ELISA IgM-ZIKV positivo	2	21	23
ELISA IgM-ZIKV negativo	136	2	138
<b>Total</b>	<b>138</b>	<b>23</b>	<b>161</b>

Con la tabla anterior se obtuvieron los siguientes resultados de validación:

- Concordancia (límite inferior – límite superior): 0.84 (0.63 – 0.94).
- Índice Kappa de Cohen (min-max): 0.89 (0.80-99), alta concordancia.
- Sensibilidad (min-max): 91.3% (70-98).
- Especificidad usando los voluntarios sanos pre-epidémicos (min-max): 98.5% (94-99).
- VPP (min-max): 91.3% (70-98).
- VPP (min-max): 98.5 (94-99).

Los datos usados para el análisis estadístico pueden ser encontrados como Anexo 7.

Sin embargo, es bien conocido que el principal obstáculo de los ensayos que usan la detección de anticuerpos anti-Flavivirus es la alta reactividad cruzada particularmente entre ZIKV y DENV ([Priyamvada L et al. PNAS. 2016](#); [Dejnnirattisai W et al. Nat Immunol. 2016](#)). Debido a esto, en los mismos ensayos realizados para detectar IgM-ZIKV NS1 en pacientes previamente expuestos, se les evaluó además la reactividad cruzada para NS1 de DENV1-4, como mostrado en la Figura 8. De los 23 pacientes en convalecencia post fiebre zika, 3 tuvieron valores de IgM que se unió a DENV1-4 NS1 superiores al valor establecido como punto de cohorte (Figura 8), por lo que se puede establecer que el valor de reactividad cruzada entre los dos Flavivirus en este set de ensayos fue del 15%. Estos resultados están de acuerdo con resultados recientemente obtenidos que soportan la utilidad de un ensayo de ELISA indirecto basado en NS1 para la identificación adecuada de IgM ZIKV específica en especímenes clínicos, con una buena capacidad de discriminación entre pacientes infectados recientemente por ZIKV de los infectados por DENV ([Mora-Cárdenas E et al. Plos Neglec Trop Dis. 2020](#)).

En conclusión, se estandarizó y validó un método de ELISA basado en NS1 para detectar IgM ZIKV específica circulante en especímenes clínicos que mostró aceptables resultados.

### **3.3.3.2. Estandarización y validación de un ELISA basado en NS1 para detectar IgG ZIKV específica circulante.**

Posterior a la validación de un ELISA basado en NS1 para detectar IgM-ZIKV específica circulante, nos propusimos estandarizar y validar un ELISA para la detección de IgG específica contra el mismo Flavivirus. Aspectos de la estandarización como la selección de la concentración de la proteína recombinante rNS1 ZIKV para el cubrimiento, la prueba de especificidad del ensayo por pruebas de competición y otros, fueron detallados en anteriores Informes Técnicos Trimestrales (Ver segundo Informe Técnico Trimestral, Figura 7, Figura 8 y Figura 9; Ver cuarto Informe Técnico Trimestral, Figura 5). Como producto este trabajo se generó el protocolo para detectar IgG de ZIKV en plasma, que es presentado en formato de POE (Plan Operativo Estandarizado) del sistema de gestión de calidad de la Universidad Surcolombiana (Ver cuarto Informe Técnico Trimestral, Anexo 5).

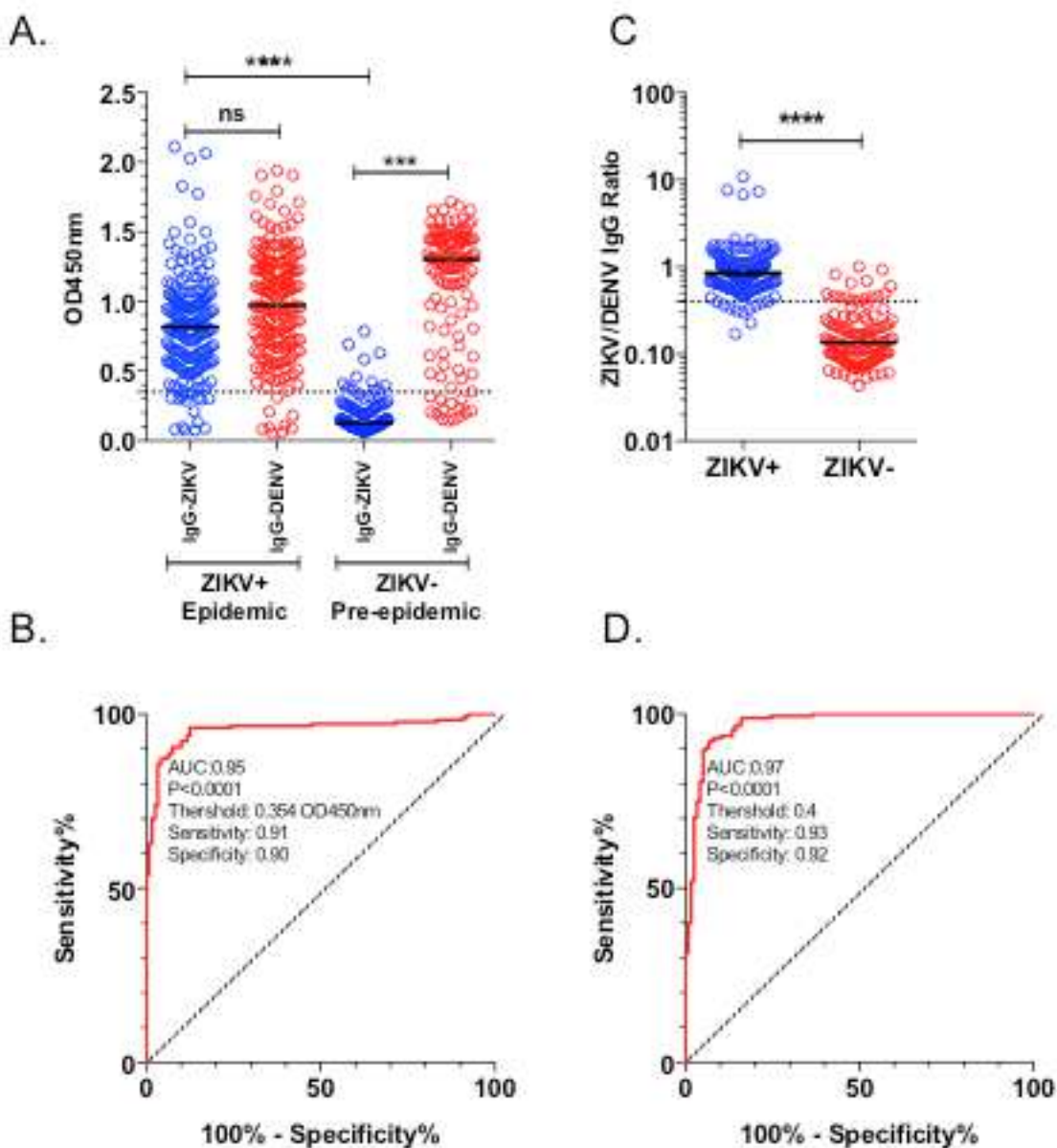
Para la validación del ensayo se conformaron paneles de muestras clínicas previamente caracterizadas divididas en dos grupos:

- Especímenes tomados como positivos: muestra de caso confirmado por RT-qPCR de infección por ZIKV tomado después de la primera semana de iniciados los síntomas; Madre de niño con síndrome congénito por ZIKV. Muestra de paciente con diagnóstico clínico de Zika durante su brote epidémico 2015-2016 en el departamento del Huila (n=198).
- Especímenes tomados como negativos: Muestras de voluntarios sanos tomadas antes de la epidemia por ZIKV en las Américas (2011-2014), disponibles en el repositorio de la División de Inmunología de la Universidad Surcolombiana (n=138).

A todos los especímenes previamente caracterizados se les evaluó la presencia de IgG-ZIKV NS1 circulante por el ELISA indirecto previamente estandarizado. Para comparar y mejorar la capacidad de análisis de la reactividad cruzada entre Flavivirus co-circulantes, a las mismas muestras caracterizadas como positivas y negativas se les evaluó en simultánea la IgG DENV1-4 a través del ELISA estandarizado (ver cuarto Informe Técnico Trimestral, Anexo 5).

La Figura 10, muestra los resultados completos del proceso de validación del protocolo de IgG circulante para ZIKV basado en NS1 y su respectivo análisis. Como mostrado en la Figura 10A, los valores de IgG-ZIKV NS1 e IgG DENV1-4 circulantes fueron evaluados simultáneamente en los dos pools de muestras previamente caracterizadas positivas y negativas. El grupo de pacientes positivos mostró una fuerte señal en la cantidad relativa de IgG-ZIKV e IgG DENV1-4 detectada por el ELISA (Figura 10A). Sin embargo, los pacientes negativos pre-epidémicos mostraron una escasa, si alguna reactividad de isotipo IgG para la NS1 de ZIKV (Figura 10A). Demostrando la muy alta seroprevalencia de DENV a lo largo de los últimos años, los pacientes pre-epidémicos para ZIKV aunque no mostraron reactividad contra ZIKV, mostraron muy altos niveles relativos de IgG DENV1-4 específica, resultado consistente con la alta seroprevalencia para DENV encontrada en la población Colombiana (85% en niños y 90% en adultos) (Velandia-Romero M et al. *Int Infect Dis J.* 2020). Los muy altos valores relativos de IgG DENV1-4 pero no de IgG-ZIKV en los voluntarios pre-epidémicos para ZIKV soporta la capacidad del ensayo en separar respuesta de anticuerpos IgG específicos de NS1 para cada uno de los dos Flavivirus (Figura 10A). Con los valores de OD450nm obtenidos en los grupos de especímenes positivos y negativos para IgG ZIKV NS1, se realizó un análisis de curva ROC para determinar el punto de cohorte que brindara la mejor sensibilidad y especificidad. Como mostrado en la Figura 7B, un punto de cohorte de 0.35 OD450nm, ofreció un área bajo la curva del 95% ( $P < 0.0001$ ), con una sensibilidad para discriminar los dos grupos de 91% y una especificidad del 90%.

Estudios previos mostraron aumento de la especificidad del ensayo de ELISA basado en NS1 cuando se evaluaba la relación IgG-ZIKV/IgG-DENV1-4 en los mismos especímenes biológicos (Tsai. *Jour Clin Microb.* 2017). Siguiendo esta posibilidad, a los mismos especímenes biológicos de los grupos clasificados como positivos y negativo, se les evaluó en simultánea la IgG DENV1-4 por el ELISA basado en NS1.



**Figura 10.** Análisis de validación del ensayo de ELISA basado en NS1 para la detección de IgG ZIKV-específica circulante. A. Valor relativo de la IgG-ZIKV (azul) e IgG DENV1-4 (rojo) en los grupos de muestras caracterizadas positivas (ZIKV+) y negativas (ZIKV-) es mostrado. \*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\*\* $P < 0.00001$ , Dunn post test. B. Análisis de Curva ROC de las OD450nm de los grupos de especímenes positivos y negativos. Los resultados de área bajo la curva, P y valores de sensibilidad y especificidad son mostrados. C. Índice generado por la IgG-ZIKV / IgG-DENV1-4 evaluadas en cada uno de los especímenes de los grupos positivo (azul) y negativo (rojo). \*\*\*\* $P < 0.00001$ , Mann-Whitney test. D. Análisis de curva ROC usando el índice IgG-ZIKV / IgG-DENV1-4 obtenido desde el grupo de

especímenes positivo y negativo. Son mostrados el resultado de análisis estadístico que describe el área bajo la curva obtenido, su respectivo valor de P, además de la sensibilidad y especificidad obtenida con un punto de cohorte del índice de 0.4.

Como muestra la Figura 10C, la relación IgG-ZIKV/IgG-DENV1-4 fue significativamente más alta en el grupo de especímenes positivos para IgG ZIKV comparado con el negativo ( $P < 0.00001$ , Mann-Whitney test). Posteriormente, un análisis de curva ROC fue también realizado usando esta relación. Con un valor de cohorte de la relación de 0.4 entre la IgG-ZIKV y la IgG-DENV1-4, se obtuvo un significativa ( $P < 0.0001$ ) área bajo la curva del 97%, con una sensibilidad de 93% y una especificidad de 92%. Los anteriores resultados demuestran un modesto incremento en la sensibilidad y especificidad en la capacidad del ELISA basado en NS1 para detección de IgG-ZIKV cuando su relación con la IgG DENV1-4 evaluada en cada paciente es usada.

Para completar la validación del ensayo de ELISA basado en NS1 para detectar IgG-ZIKV, se realizó una Tabla de contingencia de 2x2, que arrojó los siguientes resultados:

Tabla 3. Tabla de contingencia de 2x2 que muestra las muestras positivas y negativas encontradas con el ELISA basado en NS1 en cada uno de los grupos.

	Especímenes confirmados		Total
	Negativo	Positivo	
ELISA IgG ZIKV NS1 Positivo	11	180	<b>191</b>
ELISA IgG ZIKV NS1 Negativo	127	18	<b>145</b>
<b>Total</b>	<b>138</b>	<b>198</b>	<b>336</b>

Usando la plataforma en línea para análisis estadístico VassarStats (<http://vassarstats.net/>), con los datos anteriores se obtuvieron los siguientes resultados:

Concordancia: La concordancia observada fue de 0.91 (0.87 – 0.94).

Índice Kappa de Cohen: El índice Kappa de Cohen observado fue de 0.82 (0.76 – 0.88), que puede ser interpretado como una concordancia alta.

Sensibilidad: 90%

Especificidad: 92%

Valor Predictivo Positivo: 94%.

Valor Predictivo Negativo: 87%.

El análisis completo estadístico de los resultados anteriormente mostrados es presentado como Anexo 8.

Por otro lado, un análisis con a través de una nueva Tabla de contingencia de 2x2 (Tabla 4) se realizó también para las muestras caracterizadas usando la relación ZIKV/DENV1-4 IgG circulante encontrada en cada uno de ellos, obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 4.** Tabla de de 2x2 con los resultados de la relación ZIKV/DENV1-4 IgG.

	Especímenes confirmados		Total
	Negativo	Positivo	
ELISA IgG ZIKV NS1 Positivo	12	184	<b>196</b>
ELISA IgG ZIKV NS1 Negativo	126	14	<b>140</b>
<b>Total</b>	<b>138</b>	<b>198</b>	<b>336</b>

Los análisis estadísticos de la validación del ensayo que usa la relación ZIKV/DENV IgG arrojó los siguientes resultados:

Concordancia (min-max): 0.92 (0.88 – 0.94), a un intervalo de confianza del 95%.

Índice Kappa de Cohen (rango): 0.84 (0.78 – 0.89), que corresponde a un índice que soporta una alta concordancia entre los métodos.

Sensibilidad (min-max): 92% (88 - 95)

Especificidad % (min-max): 91% (84 – 95)

Valor Predictivo Positivo % (min-max): 93% (89 – 96)

Valor Predictivo Negativo: 90% (83 – 94)

Todos los soportes estadísticos de esta sección son mostrados como Anexo 9.

En conclusión, se presentan datos de la estandarización y validación de ensayos de ELISA para la detección de IgM e IgG específica de ZIKV.

**Con los datos acá mostrados se reporta un avance del 100% en esta actividad de estandarizar y validar un Inmunoensayo ligado a enzima para detectar IgM e IgG ZIKV circulante.**

### **3.4. Aplicar las pruebas moleculares/serológicas**

#### **3.4.1. Caracterización clínica**

Como planeado en el proyecto, se realizó la caracterización clínica de los pacientes con sospecha de infección por DENV provenientes de todo el departamento colectados por la División de Inmunología durante la última década. También se analizaron las características paraclínicas y de marcadores bioquímicos de los pacientes incluidos. En total, se analizaron clínica y paraclínicamente más de 2,300 pacientes (ver quinto Informe Técnico Trimestral, páginas 18-23, Tabla 2 y Figuras 4 y 5).

#### **3.4.2. Caracterización virológica**

La caracterización virológica de los pacientes del departamento incluye el análisis de dos aspectos: a. La identificación de serotipo de DENV infectante por RT-qPCR. b. La detección de la proteína no estructural (NS)-1 circulante, evento llamado antigenemia.

Actualmente se está esperando la entrega de los primers y sondas para la RT-qPCR serotipo-específica para DENV y validar el método de detección molecular de detección de DENV1-4. Este punto se ha tratado en varias mesas técnicas y se ha informado a la Universidad que la adquisición de dichos reactivos por parte de la SSDH ha tenido significativos retrasos administrativos.

Por otro lado, se evaluó en un porcentaje importante de paciente, los niveles de antigenemia. La antigenemia fue evaluada también, usando el estuche comercial DENV Detect™ NS1 ELISA (InBios International Inc; Catalog DNS1-1; Lot: AM6112). Para la detección de la NS1 en los pacientes se siguieron todas las recomendaciones del Fabricante. En total, 518 muestras de plasma provenientes de todo el departamento fueron evaluadas. La Tabla 5, muestra las características de la fracción de pacientes con clínicamente con dos grados de severidad de la infección en los que la antigenemia fue

analizada. No se encontró diferencia en la edad o días de enfermedad en los pacientes analizados.

Tabla 5. Pacientes en donde la antigenemia fue analizada.

	DSSA (n=202)	DCSA (n=316)	P
Edad, Años. Mediana (rango)	15.5 (0.5-85)	15 (0.3-84)	0.772 <sup>a</sup>
Días de enfermedad, Mediana (rango)	3 (1-8)	3 (1-12)	0.50 <sup>a</sup>
NS1 circulante (Negativo/Positivo)	76/126	136/180	P=0.234 <sup>b</sup>

DSSA: Dengue sin signos de alarma. DCSA: Dengue con signos de alarma. NS1: Proteína no estructural-1. <sup>a</sup>P de Mann-Whitney test. <sup>b</sup>P de test exacto de Fisher.

Cuando la frecuencia de especímenes positivos y negativos en cada uno de los grupos clínicos fue analizada, no se encontró diferencia entre ellos (Tabla 5). También se realizó un análisis semicuantitativo de la cantidad relativa de la NS1 circulante, a través de la evaluación de las unidades arbitrarias (UA) obtenidas después del ensayo y usando los estándares y calibradores establecidos por el estuche comercial. Como mostrado en la Figura 11, no se encontró diferencia entre las UA encontradas en cada uno de los grupos, aunque una tendencia fue encontrada (P=0.09, Mann-Whitney test). Por lo tanto, no encontramos diferencia entre la antigenemia y el grado de severidad clínica en esta cohorte. Sin embargo, actualmente se está ampliando el número de pacientes incluidos, en especial, con un grupo de pacientes que padecieron dengue grave.

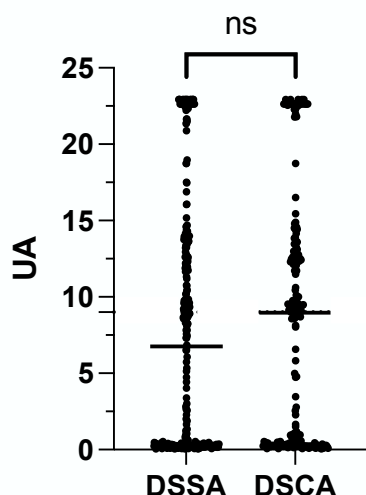


Figura 11. Evaluación de la antigenemia en una fracción de muestras de plasma de pacientes clasificados en dos grados de severidad clínica de la infección por DENV. UA: Unidades arbitrarias que representan la relación del estado inmune (ISR en inglés),

calculado como recomendado por el estuche. DSSA: Dengue sin signos de alarma.  
DCSA: Dengue con signos de alarma. ns: No significativo, Mann-Whitney test.

**Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, reportamos un avance del 50%.**

### **3.5. Realizar la administración del proyecto.**

La administración y supervisión del proyecto la realiza la entidad ejecutora. Por parte de la División de Inmunología, Laboratorio de Infección e Inmunidad, se ha participado activamente en todas las mesas técnicas programadas, cumpliendo con la responsabilidad científica e investigativa de la propuesta, como lo soporta el presente informe.

### **3.6. Realizar el apoyo a la supervisión:**

Desde el Trimestre anterior la entidad ejecutora contrató un profesional para realizar el apoyo a la supervisión.

## **4. OE2: FORTALECER LA INFRAESTRUCTURA PARA EL DESARROLLO DE INVESTIGACIÓN PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA DEL DEPARTAMENTO DEL HUILA.**

### **4.1 Gestionar la compra e instalación de equipos**

Actividad realizada en un 100%.

### **4.2 Adquirir insumos para laboratorio**

Se han adquirido el 90% de los insumos y reactivos. Actualmente, como entidad aliada esperamos la entrega de los reactivos para cumplir con el total de las actividades que es la validación local de una RT-qPCR para detectar DENV de manera serotipo-específica y la serotipificación de la cohorte del Departamento por métodos moleculares. Esta preocupación se ha tratado en varias mesas técnicas donde se ha informado que se han presentado.

**Se reporta avance del 90%.**

#### 4.3 Realizar mantenimiento y calibración de equipos de laboratorio

Actividad terminada. Avance del 100%.

#### 4.4 Adelantar obras de adecuación de espacios

Como entidad aliada, reportamos el inicio de las obras de adecuación del Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana, que iniciaron a principios de mayo, después de muchos inconvenientes en su contratación y varias discusiones en las mesas técnicas. La Figura 11 muestra soportes gráficos de las obras. A la fecha que cubre el presente informe, se reporta un avance de las obras de adecuación del 30%. La entidad ejecutora informé en meza técnica que el periodo de ejecución de las adecuaciones de los dos laboratorios (el Laboratorio Departamental de Salud Pública de la SSDH y el Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Universidad Surcolombiana), será de 4 meses (incluyendo el mes de liquidación).



**Figura 12.** Imágenes que soportan los avances en las adecuaciones de parte del Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana.

Adicionalmente, durante el presente trimestre se realizaron actividades de transferencia técnico-tecnológica entre las entidades aliadas. Personal vinculado a la SSDH, realizó

entrenamiento en técnicas de identificación de Flavivirus por biología molecular y además desarrolló aumento de aptitudes en la detección de anticuerpos isotipo-específicos contra Flavivirus por ELISA (ver Figura 13).

A.



B.



**Figura 13.** Transferencia de conocimiento técnico-tecnológico entre las entidades aliadas. Personal de la SSDH realizando entrenamiento en el Laboratorio de Infección e Inmunidad en: A. Detección molecular de Flavivirus en especímenes clínicos. B. Detección de Inmunoglobulina G específica de DENV por Inmunoensayo ligado a enzima en especímenes biológicos.

## 5 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Durante el séptimo trimestre de ejecución de la propuesta se lograron significativos avances en las actividades del proyecto que son listadas a continuación:

- Estandarización y validación de RT-qPCR para detección de ZIKV.
- Estandarización y validación de Inmunoensayo para detección de IgM específica de ZIKV circulante.

- Estandarización y validación de Inmunoensayo ligado a enzima para detectar IgG ZIKV específica circulante.
- Caracterización virológica de cohorte departamental de pacientes mediante la detección de antigenemia (NS1 circulante), por ELISA.
- Inicio de las adecuaciones de los Laboratorios de Infección e Inmunidad de la Universidad Surcolombiana y el Laboratorio Departamental de Salud Pública.

## 6 PROBLEMAS E INCONVENIENTES

Aún persiste el retraso en la adquisición de las sondas y primers para detección molecular de DENV serotipo-específica.

## 7 REFERENCIAS

Gómez JL. Instituto Nacional de Salud. Informe de Evento – Enfermedad por Virus Zika, periodo epidemiológico XIII Colombia 2021. 2021.

Pawley DC, Ricciardi MJ, Dikici E, Deo SK, Daunert S. Highly Sensitive and Selective Direct Detection of Zika Virus Particles in Human Bodily Fluids for Accurate Early Diagnosis of Infection. ACS Omega. 2019 Apr 30;4(4):6808-6818.

Chotiwan N, Brewster CD, Magalhaes T, Weger-Lucarelli J, Duggal NK, Rückert C, Nguyen C, Garcia Luna SM, Fauver JR, Andre B, Gray M, Black WC 4th, Kading RC, Ebel GD, Kuan G, Balmaseda A, Jaenisch T, Marques ETA, Brault AC, Harris E, Foy BD, Quackenbush SL, Perera R, Rovnak J. Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. Sci Transl Med. 2017 May 3;9(388):eaag0538.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis. 2008 Aug;14(8):1232-9.

Corman VM, Rasche A, Baronti C, Aldabbagh S, Cadar D, Reusken CB, Pas SD, Goorhuis A, Schinkel J, Molenkamp R, Kümmerer BM, Bleicker T, Brünink S, Eschbach-Bludau M, Eis-Hübinger AM, Koopmans MP, Schmidt-Chanasit J, Grobusch MP, de

Lamballerie X, Drosten C, Drexler JF. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. *Bull World Health Organ.* 2016 Dec 1;94(12):880-892.

Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud y Protección Social. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana 53 2021.

Velandia-Romero ML, Coronel-Ruiz C, Castro-Bonilla L, Camacho-Ortega S, Calderón-Peláez MA, Castellanos A, Olano VA, Porras A, Arevalo-Herrera M, Villamil-Gómez W, Castellanos JE. Prevalence of dengue antibodies in healthy children and adults in different Colombian endemic areas. *Int J Infect Dis.* 2020 Feb;91:9-16. doi:10.1016/j.ijid.2019.10.045.

Tyson J, Tsai WY, Tsai JJ, Brites C, Mässgård L, Ha Youn H, Pedroso C, Drexler JF, Stramer SL, Balmaseda A, Harris E, Wang WK. Combination of Nonstructural Protein 1-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Can Detect and Distinguish Various Dengue Virus and Zika Virus Infections. *J Clin Microbiol.* 2019 Jan 30;57(2):e01464-18. doi: 10.1128/JCM.01464-18. Print 2019 Feb.

Perdomo-Celis F, Romero F, Salgado DM, Vega R, Rodríguez J, Angel J, Franco MA, Greenberg HB, Narváez CF. Identification and Characterization at the Single-Cell Level of Cytokine-Producing Circulating Cells in Children With Dengue. *J Infect Dis.* 2018 Apr 11;217(9):1472-1480. doi: 10.1093/infdis/jiy053.

Perdomo-Celis F, Salgado DM, Narváez CF. Magnitude of viremia, antigenemia and infection of circulating monocytes in children with mild and severe dengue. *Acta Trop.* 2017 Mar;167:1-8. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.12.011.

Toro JF, Salgado DM, Vega R, Rodríguez JA, Rodríguez LS, Angel J, Franco MA, Greenberg HB, Narváez CF. Total and Envelope Protein-Specific Antibody-Secreting Cell Response in Pediatric Dengue Is Highly Modulated by Age and Subsequent Infections. *PLoS One.* 2016 Aug 25;11(8):e0161795. doi: 10.1371/journal.pone.0161795.

# ANEXO 1



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

1 de 1

## 1. OBJETIVO

Describir el protocolo I&I Lanciotti-Corman modificado que el laboratorio de Infección e Inmunidad estandarizó y empleada para la extracción del RNA viral a partir de muestras de plasma y la amplificación por RT-qPCR del virus Zika (ZIKV).

## 2. ALCANCE

Este procedimiento aplica a todas las muestras del Laboratorio de Infección e Inmunidad (I&I Lab), para la detección de ZIKV. Inicia desde la recepción, conservación, extracción de RNA y finaliza con la identificación por RT-qPCR.

## 3. LÍDER DEL PROCEDIMIENTO:

Está a cargo de bacteriólogos (a) capacitados y certificados en la realización de pruebas de biología molecular y el Coordinador del Laboratorio de Infección e Inmunidad quien es Médico con estudios a nivel de Docotrado en patogénesis de enfermedades virales.

## 4. REFERENCIAS NORMATIVAS Y DOCUMENTALES

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug;14(8):1232-9. doi: 10.3201/eid1408.080287.

Corman VM, Rasche A, Baronti C, et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. *Bull World Health Organ.* 2016;94 (12):880-892. doi:10.2471/BLT.16.175950.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Mar;30(3):545-51. doi: 10.1128/JCM.30.3.545-551.1992. PMID: 1372617; PMCID: PMC265106.



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

2 de 2

## 5. DEFINICIONES

- **RT-PCR en tiempo real:** La PCR con transcripción inversa o RT-PCR, es una técnica de biología molecular, que permite el uso de RNA como molde, el RNA se transcribe de forma inversa en DNA complementario (cDNA) utilizando una transcriptasa inversa. El primer paso de la RT-PCR es la síntesis de un híbrido DNA / RNA, la molécula de DNA de cadena sencilla restante sirve entonces como molde para la formación de cDNA, mediante la actividad DNA polimerasa dependiente de DNA, de la transcriptasa inversa, el producto de amplificación se puede detectar en tiempo real mediante el uso de sondas, por lo que los datos se recopilan durante todo el proceso de PCR, en lugar de al final de la PCR.
- **Cebador y/o iniciador:** secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el método PCR se emplea un par de cebadores para hibridar con el ADN de la muestra y definir la región del ADN que será amplificada. También se les conoce como oligonucleótidos. (Institute, 2019).
- **Extracción de material genético:** Se le llama extracción al método por el cual se obtiene el ADN o RNA a partir de material biológico, utilizando técnicas físicas y químicas. Consiste en la separación y purificación del ADN o RNA con el fin de poder estudiarlo, analizarlo o manipularlo. (Rojas, 2017).
- **Sonda:** Una sonda es una secuencia de ADN o ARN de cadena simple que se utiliza para encontrar su secuencia complementaria en el genoma de una muestra. La sonda se coloca en contacto con la muestra bajo condiciones que permitan que la secuencia de la sonda se una con su secuencia complementaria. La sonda está marcada con un marcador radiactivo, químico ó fluorescente que permite visualizarla. (Institute, Sonda, 2019).
- **Master mix:** mezcla maestra que contiene sales, oligonucleótidos, magnesio, sondas y primers en las concentraciones adecuadas para permitir una reacción de PCR.



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

3 de 3

6. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD

Nº	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1.	Preparación de Materiales, Equipos y Reactivos	<p>Se preparan los siguientes materiales para el procesamiento desde la extracción hasta la lectura e interpretación de resultados.</p> <p><b>MATERIALES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml libres de RNAsas y DNAsas</li> <li>• Puntas estériles con filtro, libres de RNAsas y DNAsas (10ul, 200ul y 1000ul)</li> <li>• Toallas absorbentes</li> <li>• Paños absorbentes</li> <li>• Gasas estériles</li> <li>• Elementos de protección (guantes de nitrilo, bata y gorro)</li> <li>• Gradillas para tubos de PCR</li> <li>• Gradillas</li> </ul> <p><b>EQUIPOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifuga para tubos eppendorf de 1.5 ml</li> <li>• Termociclador con sistema de detección en tiempo real</li> <li>• Equipo de extracción de ácidos nucleicos automatizado</li> <li>• Micropipeta de 0.5-10ul</li> <li>• Micropipeta de 20 -200ul</li> <li>• Micropipeta de 100-1000ul</li> <li>• Vórtex</li> </ul>	Auxiliar de Laboratorio	Ninguno

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

4 de 4

		<ul style="list-style-type: none"> <li>Cabinas de bioseguridad AII.</li> </ul> <p><b>REACTIVOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Kit de extracción viral mini Kit Amp de Qiagen (Qiagen, referencia 52904) o Kit de extracción Molecular MagMAX™ Viral/Pathogen (Applied Biosystem, Ref A42352).</li> <li>Etanol absoluto al 96-100% grado biología molecular.</li> <li>Agua grado biología molecular.</li> <li>SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR System (Thermo Invitrogen, Ref: 11732-088).</li> <li>Primers y sondas específicos para Zika Virus y RNPasa</li> <li>TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV). 0,2 mL de Applied Biosystems, referencia A31746).</li> </ul>			
2.	<p><b>FUNDAMENTO RT-qPCR</b></p>	<p>La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction por sus siglas en inglés) en tiempo real, es la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La PCR en tiempo real se basa en el principio del método de la PCR desarrollado por Kary Mullis en la década de los 80, que permite detectar ADN a partir de pequeñas cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de veces (Mullis 1990).</p> <p>PCR en tiempo real (qPCR) Es el monitoreo continuo de la acumulación del producto amplificado durante una PCR en cada uno de los ciclos. Se basa en la detección y cuantificación de la fluorescencia de una molécula reportera (sonda), medida a lo largo del ciclaje. Esto constituye la principal diferencia con la</p>	No Aplica	Ninguno	



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

SC 7384-1 SA-CERE 597528 OS-CER 597555

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

5 de 5

		RT-PCR de punto final.		
3.	<b>INTERFERENCIAS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La técnica RT-qPCR es muy sensible y podría mostrar amplificación ante cualquier contacto con agente contaminante.</li> <li>La calidad de la muestra clínica es de gran importancia para la prueba, por tal motivo debe conservar en cadena de frío y ser enviada dentro del tiempo estipulado.</li> <li>Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento repetido de las muestras.</li> <li>Los analistas deben estar entrenados y familiarizados con las técnicas de biología molecular.</li> <li>No utilizar agua DEPC (Kit Zika Virus Triplex (ZIKV/DENV/CHIKV))</li> </ul> <p>Un resultado falso negativo puede ocurrir debido a una recolección, manejo o transporte inapropiados. También puede ocurrir si hay un exceso de plantilla DNA/RNA purificado en la reacción.</p>	Bacteriólogo	Ninguno
4.	<b>CONDICIONES DE LA MUESTRA</b>	<p>El traslado de las muestras biológicas al Laboratorio de Infección e Inmunidad debe efectuarse de acuerdo con las normas de transporte de muestras biológicas de la IATA.</p> <p>Almacene las muestras a -20°C al recibirlas. Descongele las muestras y manténgalas en hielo durante el procesamiento de las muestras. Almacene el remanente de la muestra a -70°C para la conservación a largo plazo.</p> <p>Una vez realizada la extracción de la muestra sea por técnica manual o automatizada, deberá evitarse el congelamiento y descongelamiento repetidos de los extractos con el fin de</p>	Bacteriólogo y Auxiliar de Laboratorio	MI-INV-LAB-I&I-FO-39 MUESTRAS CON CRITERIOS DE RECHAZO

Vigilada Mineducación



**IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR**

SC 7384-1 SA-CERE 597528 OS-CER 597555

**CÓDIGO**

**MI-INV-LAB-I&I-PR-18**

**VERSIÓN**

**2**

**VIGENCIA**

**2022**

**PÁGINA**

**6 de 6**

		prevenir la pérdida de infectividad. Los ácidos nucleicos RNA se deben conservar a $-70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ .		
<b>5.</b>	<b>CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA</b>	<p>Cada vez que se realiza el montaje de la técnica de RT-qPCR se deben utilizar los controles de:</p> <p>NTC: no Template Control (Control negativo de la reacción) controles que definen la calidad de la mezcla de reacción, este control no debe mostrar amplificación y se utiliza agua ultrapura.</p> <p>MOCK (Se maneja como control negativo en este caso y Control de extracción): Sólo muestra amplificación en el RNP pero no en el ZIKA. Este debe realizarse con sobrenadante de cultivo celular ya identificado como negativo. Con este control se verifica la extracción evidenciando únicamente el gen RNP.</p> <p>Control positivo: (Control de la reacción) Debe mostrar amplificación y este se realiza con el sobrenadante de cultivo de células Vero-76 infectadas con ZIKV.</p>	Bacteriólogo	Ninguno

**6.2 ENSAYO**

<b>Nº</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>RESPONSABLE</b>	<b>REGISTRO</b>
	<b>Recomendaciones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Todos los materiales deben ser libres de RNasas y DNasas y por lo tanto deben manipularse bajo condiciones estrictas de esterilidad para evitar su contaminación.</li> <li>• Mantener separadas las áreas de preparación de reactivos y mezclas de reacción del área de extracción de ácidos nucleicos.</li> <li>• Cada área debe contar con su material, puntas pipetas y</li> </ul>	Bacteriólogo	No Aplica

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

7 de 7

- tubos por aparte y no debe hacerse traslado de materiales entre ellos.
- Se debe utilizar bata y guantes libres de polvo específicos para cada área
  - Mantenga los reactivos y los tubos de reacción tapados o cubiertos.
  - El flujo de trabajo debe ser en un solo sentido y sin devolverse, ya que esto puede generar contaminaciones.
  - Los reactivos de la PCR (master mix, sondas, primers, magnesio, enzima, etc.) se deben sacar y trabajar sobre hielo.

**Extracción de RNA a partir de un estuche comercial**

Para evitar la degradación del RNA, es necesario trabajar en un ambiente limpio y libre de RNAsas y se debe usar material nuevo y estéril.

Para eliminar RNAsas endógenas en el proceso de extracción se usan agentes sin talco y todos los elementos de bio-protección.

Las áreas deben estar muy limpias y haber sido expuestas a luz UV por 10 minutos.

Las técnicas de extracción pueden variar dependiendo del estuche de la casa comercial que se utilice, se deben seguir paso a paso las recomendaciones del fabricante. Actualmente se pueden emplear estuches los cuales son recomendados por la CDC para llevar a cabo dicha técnica:

**Kit de extracción viral mini KIt amp de Qiagen:**

**Componentes del kit**

- ✓ Columnas para extracción

Bacteriólogo

MI-INV-LAB-I&I-FO-36  
HOJA DE TRABAJO  
EXTRACCIÓN



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

8 de 8

- ✓ Buffer AVL
- ✓ Carrier
- ✓ Etanol
- ✓ Buffer de lavado AW1 y AW2
- ✓ Agua Ultrapura

**Materiales requeridos**

- Vortex, tubos eppendorf de 1.5 ml, puntas de 1 ml, 200 µl y 10 µl. pipetas,

**Recomendaciones**

- Evite descongelar y congelar repetidamente las muestras
- Los reactivos y las muestras deben equilibrarse a temperatura ambiente por lo menos durante media hora antes de usarlos.

**PROCEDIMIENTO**

- ✓ Prepare el buffer de lisis AVL + Carrier así: adicionar 5.6 µl de carrier a cada 560 µl de buffer AVL por muestra a aislar
- ✓ Coloque 560 µl de AVL + Carrier en tubo eppendorf de 1.5 ml
- ✓ Adicione 140 µl de la muestra y de vortex por 10 segundos e incube a temperatura ambiente por 10 minutos
- ✓ Adiciones 560µl de Etanol absoluto y de vortex por 10 segundos.
- ✓ Pasar 630 µl de la mezcla anterior por la columna y centrifugar a 6.000 g/minuto por 1 minuto.
- ✓ Cambiar el tubo colector y pasar los últimos 630 µl de

Vigilada Mineducación



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

9 de 9

- muestra+AVL + carrier por la columna y centrifugar a 6.000 g/minuto por 1 minuto.
- ✓ Cambie de tubo colector
  - ✓ Adicione 500 µl de buffer de lavado AW1 y centrifugue a 6.000 g/minuto por 1 minuto
  - ✓ Cambie de tubo colector y adicione 500 µl de buffer de lavado AW2.
  - ✓ Centrifugue a 17.000 g/ minuto por 3 minutos.
  - ✓ Cambie de tubo colector y centrifugue a 17.000 g/ minuto por 1 minuto.
  - ✓ Coloque la columna en eppendorf previamente marcado.
  - ✓ Adicione cuidadosamente 50 µl de agua Ultrapura e incube a temperatura ambiente por 5 minutos
  - ✓ Centrifugue a 6.000 g/minuto por 1 minuto.
  - ✓ Tome con cuidado el eluído que se encuentra en el eppendorf y adiciónelo de nuevo a la columna.
  - ✓ Centrifugue a 6.000 g/minuto por 1 minuto.
  - ✓ El RNA está listo para usar.

Si no se va a amplificar el mismo día guardar el RNA a -80 °C.

**Kit de extracción Molecular MagMAX™ Viral/Pathogen de applied biosystem:**

- ✓ En el plato de trabajo del KINGFISHER FLEX THERMO-SCIENTIFIC, adicionar 5 µL de Proteinasa K. (Con esta proteinasa K, la muestra queda Inactiva y ayuda a la lisis celular), Dispensar 200 µL de muestra y 275 µL de mezcla de Binding tabla 1. (llenar la misma cantidad de pozos que el plato de muestras).
- ✓ En un segundo plato adicionar 500 µL Wash MagMax

Vigilada Mineducación



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

10 de 10

- ✓ En un tercer Plato adicionar 500  $\mu$ L de etanol al 80% tabla1. (llenar la misma cantidad de pozos que el plato de muestras)
- ✓ Adicionar en un cuarto plato 50  $\mu$ L Elution (llenar la misma cantidad de pozos que el plato de muestras)

**NOTA:** La mezcla Binding y el Etanol al 80% se prepara como se observa en la tabla 1. Dependiendo la cantidad de las muestras:

PREPARACIÓN	
Etanol al 80%:	400 mL de Etanol Absoluto + 100 mL de H <sub>2</sub> O libre de RNAsa
Mezcla binding buffer Para una muestra:	265 $\mu$ L de SIn Binding + 10 $\mu$ L de beads

Tabla 1. Mezcla para Extracción por perlas magnéticas automatizadas

- ✓ **Montaje en el KINGFISHER FLEX THERMO-SCIENTIFIC:** Previamente se debe realizar una verificación. Esta se realiza de la siguiente manera:
  - Oprimir en la pantalla principal en el menú la opción Herramientas que se encuentra en forma de llave
  - Luego oprimir nuevamente la llave que aparecerá en la parte inferior del listado.

Vigilada Mineducación



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

11 de 11



**Protocolo de mantenimiento** Puede establecer qué protocolo se selecciona automáticamente como mantenimiento

protocolo cuando el KingFisher Flex está encendido.



Vaya al menú de Mantenimiento. Seleccione la fila Protocolo de mantenimiento.



prensa OKAY. Se mostrarán todos los protocolos de mantenimiento disponibles.

- Se elige la opción Check\_96\_dw\_tip y se monta el plato de mantenimiento



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

12 de 12



Utilice las teclas de flecha hacia arriba y hacia abajo para seleccionar el protocolo de ma



prensa COMIENZO para ejecutar el protocolo deseado.



prensa Okay volver.

- Luego se oprime START
- Luego de que finalice nuevamente se oprime START y se desmonta el plato de mantenimiento
- Luego de que el mantenimiento haya finalizado y se encuentre verificado el sistema se inicia el montaje de las placas previamente preparadas en el equipo
- Primero se selecciona donde se encuentran los programas preestablecidos para el montaje (otros)

Vigilada Mineducación



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

13 de 13

Seleccionar el protocolo

Vaya al menú Protocolos de fábrica / Protocolos de usuario. Seleccione, por ejemplo, la fila ADN / AR



- En este menú escojo el protocolo establecido para el procedimiento (MVP\_2WASH\_200\_FLEX) se oprime 2 veces OK.
- Se oprime START e inmediatamente aparece la lista de platos que debo ubicar en el equipo, a medida que voy oprimiendo cada plato el equipo me da la ubicación para colocarlo. Los platos se ubican en el siguiente orden
  - Primero Las puntas
  - Segundo Elution
  - Tercero Wash 2 Etanol
  - Cuarto Wash 1 Wash
  - Quinto Muestras
- Y finalmente se oprime START
- Cuando el equipo finalice se retiran todos los platos y se adiciona todo lo que se encuentre en el plato de Elution en los tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Para almacenamiento de RNA
- En caso de que se procesen dentro de las 4 horas siguientes, deberán refrigerarse entre 2 a 8 °C, de lo

Vigilada Mineducación



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

14 de 14

contrario deberán congelarse a -80 °C

**Amplificación por RT-PCR Tiempo Real**

La detección de genoma viral se lleva a cabo mediante RT-qPCR utilizando ARN purificado.

➤ **PROCOLO I&I MODIFICADO: Super Script III Platinum One-Step q RT-PCR System**

Se utiliza una mezcla de reacción que contiene por cada reacción:

Componentes	Vol. µl/1Rx
Buffer de reacción	10 µl
Mix de enzimas	0.5 µl
MgSO4 25 mM	0.5 µl
Mix de primers F+R y Sonda de ZIKV	6 µl
Mix de primers F+R y Sonda de RNP	3 µl
RNA	5 µl
Volumen de reacción	25 µl

Preparar un mix de primers y sonda de cada analito en la siguiente proporción:  
ZIKV: 1 µl de forward 9 µM + 1µl de Reverse 9 µM + 0.5 µl de sonda 2.5 µM  
RNP: 1 µl de forward 2 µM + 1µl de Reverse 2 µM + 1 µl de

Bacteriólogo

MI-INV-LAB-I&I-FO-37 HOJA DE TRABAJO RT-PCR.



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

15 de 15

sonda 2 µM

**ZIKV**

**PRIMERS Y SONDA**

Probe 3: (G. KEMSKE, 144721329)

5'-/56-FAM/AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA A-  
Black Hole

Forward Primer: (G. KEMSKE, 144675056)

5'CCG CTG CCC AAC ACA AG 3' (MW: 5,109.4 g/mol) (5.3 OD =  
33.6 nmol = 0.20 mg) (Tm=57.4°C)

Reverse Primer: (G. KEMSKE, 144675057)

5' CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT 3' (MW: 7,262.8 g/mol)  
(6.2 OD = 27.8 nmol = 0.17 mg) (Tm=55.8°C)

**RNP**

**PRIMERS Y SONDA**

Probe 3: (G. KEMSKE, 144721329)

5'-/56-VIC/ TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG3-Black Hole

Forward Primer: (G. KEMSKE, 144675056)

5' AGATTTGGACCTGCGAGCG '3  
(MW: 5,109.4 g/mol) (5.3 OD = 33.6 nmol = 0.20 mg)  
(Tm=57.4°C)

Reverse Primer: (G. KEMSKE, 144675057)

5' GAGCGGCTGTCTCCACAAGT' 3  
(MW: 7,262.8 g/mol) (6.2 OD = 27.8 nmol = 0.17 mg)  
(Tm=55.8°C)



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

16 de 16

**PREPARACION DE PRIMERS Y SONDAS**

1picomol/ $\mu$ l = 1micromolar

**PRIMERS**

Vienen a 10,000 pico moles liofilizadas por vial.  
Si adiciono 100  $\mu$ l de agua ultrapura, la concentración a la que quedan los primers es de 100 picomoles/ $\mu$ l  
o en el vial dice que cantidad de agua ultrapura debo adicionar para que la concentración del vial quede en 100 picomoles / $\mu$ l

La concentración al final de los primers en la reacción debe ser de 0.9 $\mu$ M.  
Por lo tanto:

Concentración de los primers: 100picomol/ $\mu$ l = 100 micromolar  
V1= ¿?  
C1= 100 $\mu$ M  
V2= 100  $\mu$ l  
C2= 0.9  $\mu$ M

Aplicamos la fórmula:  $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

$V1 = 100 \mu l * 0.9 \mu M / 100 \mu M$   
 $V1 = 0.9 \mu l$

A 99.1  $\mu$ l de agua Ultrapura adiciono 0.9  $\mu$ l de primers 100 $\mu$ M para obtener 100  $\mu$ l de primers 0.9  $\mu$ M

A 1  $\mu$ l de primers (100 Micromolar) adiciono 99  $\mu$ l de agua y me queda lista la solución de trabajo



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

17 de 17

**SONDAS**

Están a 100 picomol/ $\mu$ l = 100  $\mu$ M  
Vol. final de la reacción = 10  $\mu$ l  
La concentración al final de la reacción debe ser de 0.25 $\mu$ M

La concentración de la sonda debe estar a 2.5  $\mu$ M  
Las sondas están a 100picomolar/ $\mu$ l = 100  $\mu$ M  
V1= X,  
C1=100 $\mu$ M,  
V2=100  $\mu$ l,  
C2= 2.5  $\mu$ M

Aplico la formula:  $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$

$V1 = 100\mu\text{l} \cdot 2.5\mu\text{l} / 100\mu\text{M}$   
V1: 2.5  $\mu$ l  
A 97.5  $\mu$ l de agua debo adicionar 2.5  $\mu$ l de sonda 100 $\mu$ M para obtener 100  $\mu$ l de sonda 2.5 $\mu$ M

**MIX DE PRIMERS + SONDA**

Se preparan en una proporción de: 1  $\mu$ l de Forward + 1  $\mu$ l Reverse + 1  $\mu$ l Sonda. Tanto para el mix de Primers y Sonda de ZIKV como para el RNP.

**MONTAJE DE LA PLACA**

Se hace el mapa del corrido, ubicando los controles positivos, negativo y las muestras.  
Se pone 20  $\mu$ l del mix en cada pozo y 5  $\mu$ l de RNA extraído y



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

18 de 18

controles en el pozo correspondiente según el mapa.

Sellar la placa con el film y asegurarla con el rodillo.

Se hace el mapa del corrido, ubicando los controles (Control Positivo, Control Negativo o MOCK y NTC) y las muestras que se vayan a procesar.

➤ **PROTOCOLO TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV). 0,2 mL de applied biosystems:**

- Adicionar 25 µl de RNA de la muestra en liofilizado según el mapa de trabajo. En caso de que sea necesario, se completa el volumen a 25 µl con agua ultrapura.
- Tapar los tubos de forma que queden bien sellados y mezclar en vortex y por último dar un spin down.

**Montaje en el ECO ILLUMINA**

- Prenda el termociclador con el botón que se encuentra en la parte trasera del equipo 20 minutos antes de colocar la placa
- Prenda el PC
- De clic en el icono **eco** para abrir el software
- Tipo de experimento que se va a realizar:
  - Opciones de aplicación: Quantificatin
  - Detección química: Hydrolisis Probe
  - Material de inicio: RNA
  - Método de cuantificación: Cuantificación relativa.
  - Nombre del experimento: ZIKA aaaa-mm-dd
- Dar ✓
- En Thermal profile programar el perfil térmico deseado y el número de ciclos

Bacteriólogo

MI-INV-LAB-I&I-FO-37 HOJA DE TRABAJO RT-PCR.



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

19 de 19

PERFIL TERMICO:

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	15 min	50°C
1	3 min	95°C
45	15 seg	95°C
	20 seg	56°C
	15 seg	72°C

7. En Plate Layout:

En Set Up Assays dar nombre al ensayo:  
definir cuál es el reportero de cada analito:

\*ZIKA: FAM y el quencher none

\*RNP: VIC y el quencher none

8. En Set Up Samples Indicar el número de muestras que se van a montar y darles nombre

9. En la placa y según el mapa ubicar los ensayos y los pozos correspondientes a los diferentes roles del ensayo (negativo, positivo, TNC, desconocido)

10. Ubicar la placa en el termociclador

11. Dar click en **Start Run**.

Montaje en el  
QuantStudio 5

- Se enciende el computador del QuantStudio5 y se debe introducir la clave: USCO4745

Vigilada Mineducación



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

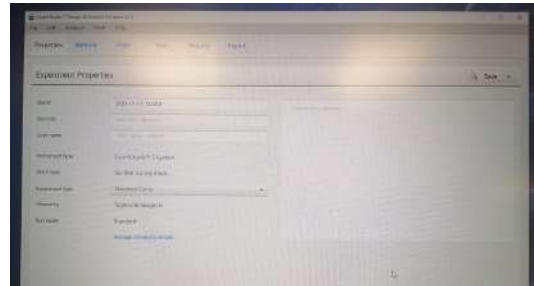
VIGENCIA

2022

PÁGINA

20 de 20

- Acceder a la aplicación del Software Dar doble click en el logo de QuantStudio Desing & Analysis Software
  - Encender el Termociclador de la parte de atrás y verificar que la USB para internet se encuentre puesta. Para acceder a la nube la clave del usuario es 1319
  - Siempre crear protocolo nuevo
- Properties:**
- Nombre: fecha y experimento a realizar
  - Run mode: estándar



**Method**

- Se coloca el volumen final
- En la gráfica se colocan las temperaturas, los tiempos mencionados y el total de los ciclos (42) según inserto o Protocolo:



SC 7384-1

SA-CERE 557528

OS-CER 557555

IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

21 de 21

➤ **PROTOCOLO I&I MODIFICADO: Super Script III Platinum One-Step q RT-PCR System**

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	15 min	50°C
1	3 min	95°C
42	15 seg	95°C
	20 seg	56°C
	15 seg	72°C

➤ **PROTOCOLO TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV). 0,2 mL de applied biosystems:**

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	20 min	50°C
1	2 min	95°C
40	15 seg	95°C
	1 min	60°C

Vigilada Mineducación



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

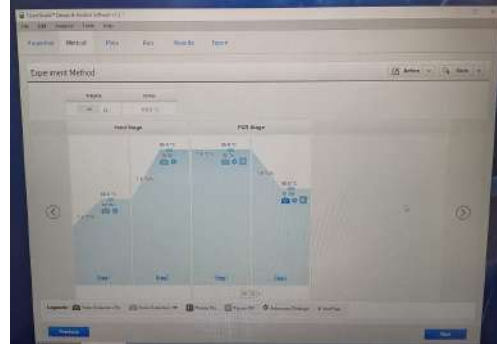
VIGENCIA

2022

PÁGINA

22 de 22

- La cámara que aparece al final (sección PCR stage-step 2) siempre debe de estar encendida.



- Plate

### Quick Setup

- En Passive Reference cambiar de ROX a **none**. Esto es muy importante si no tenemos normalizador ya que no se verían los resultados en caso de dejarlo con fluoróforo.

### Advanced setup

- En la parte de targets: adiciono los genes que vamos a utilizar: ZIKAV y RNP
- En reporter el nombre del fluorocromo con el que va marcado así:

### PROTOCOLO I&I: Super Script III Platinum One-Step q RT-PCR Sistem

Vigilada Mineducación



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

23 de 23

ZIKAV: canal FAM, RNP: canal VIC

**PROTOCOLO TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV). 0,2 mL de applied biosystems:**

ZIKAV canal FAM para el gen DENV canal VIC y CHICKV canal ABY, PPIA (Control endógeno humano) canal ROX.

- En quencher se pone **none** para cualquier protocolo si en caso de no estar referenciado.
- Task se coloca: **U** desconocido (control)  
**S** estándar  
**N** negativo (**NTC**)
- En la parte de Samples
- Se adicionan la cantidad de muestras a procesar incluyendo los controles



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

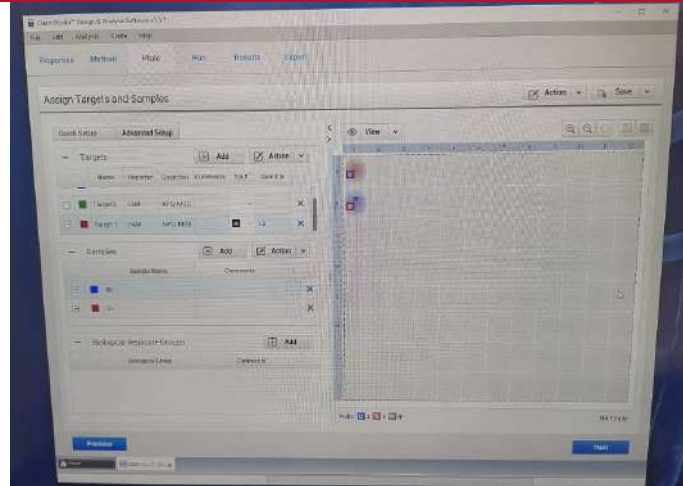
2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

24 de 24



- Luego, Se selecciona cada una de las muestras a procesar y se van colocando en el plato que está a mano derecha, siempre deben de quedar las muestras equilibradas, por tanto la cantidad de muestras a la derecha deben ser la misma cantidad en la parte izquierda.

Al finalizar de montan las muestras se seleccionan y se indica que genes se deben de identificar

- Se procede a montar la placa o las tiras en el equipo y luego se va a run, se da click y se da en el número de serie del equipo, ahí sale una ventana que guarda automáticamente la corrida en donde se le debe poner la fecha del día que se está procesando.

Vigilada Mineducación



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

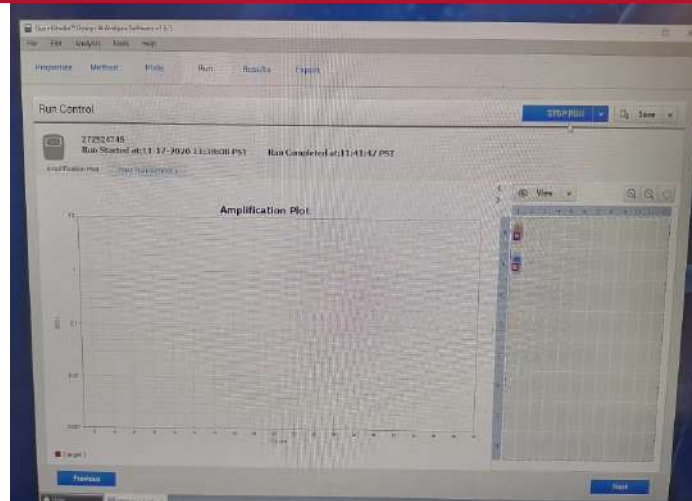
2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

25 de 25



- Al terminar la corrida podemos verificar los resultados en el ítem de result y exportar a la nube.

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

Las curvas de amplificación del RNP en las muestras y los controles indican que la extracción se hizo adecuadamente. El NTC no debe presentar curva de amplificación en el RNP.

Una vez se corrobora que la extracción se hizo correctamente se observa si hay o no curvas de amplificación en las muestras para ZIKV.

Bacteriólogo

MI-INV-LAB-I&I-FO-37 HOJA DE TRABAJO RT-PCR.



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

26 de 26

➤ **PROTOCOLO I&I: Super Script III Platinum One-Step q RT-PCR Sistem**

Parta validar la corrida, debe cumplir con los siguientes requisitos:

El control NTC no debe presentar curva de amplificación en ninguno de los genes (ZIKV y RNP).

El control Negativo o Mock, debe presentar amplificación del gen RNP únicamente.

En el caso del control positivo, este debe mostrar curva de amplificación tanto para el gen ZIKV como para el gen RNP.

Todas las muestras deben presentar amplificación del gen RNP.

Para considerar un resultado positivo se debe presentar la curva de amplificación del gen ZIKV.

Los criterios que se deben tener en cuenta para determinar el resultado POSITIVO o NEGATIVO son las referenciadas por Robert S. Lanciotti, en su artículo Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007.

En este escrito se determina que el cut-off para Zika es con un CT <38,5, usando los primers y reactivos referenciados en el artículo.



IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR

CÓDIGO

MI-INV-LAB-I&I-PR-18

VERSIÓN

2

VIGENCIA

2022

PÁGINA

27 de 27

El threshold estandarizado para el QuantStudio es de 100.000 para Zika y 50.000 para RNPasa.

- **PROTOCOLO TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV). 0,2 mL de applied biosystems:**

Para validar la corrida, debe cumplir con los siguientes requisitos:

El control NTC no debe presentar curva de amplificación en ninguno de los genes (ZIKV, DENV, CHIKV y PPIA).

Todas las muestras deben presentar amplificación en el PPIA.

Para considerar un resultado positivo se debe presentar la curva de amplificación del gen Diana antes de un CT de 38,5.

El threshold estandarizado para el QuantStudio es de 50,000 para Zika, PPIA: 10.000, DENV: 50.000 y CHICUNGUÑA: 20,000

Estos resultados deberán ser pasados del MI-INV-LAB-I&I-FO-37 HOJA DE TRABAJO RT-PCR.

## 6. OBSERVACIONES

- El ARN debe mantenerse siempre en frío y debe evitarse congelar y descongelar repetidamente.
- Utilizar equipos, cubículos y cabinas de bioseguridad exclusivos para todos los procedimientos preparativos de una PCR (pre-PCR). Los análisis y procesos de manipulación de ácidos nucleicos, amplificación y análisis posteriores (post-PCR) deben ser realizados en

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



**IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR**

<b>CÓDIGO</b>	<b>MI-INV-LAB-I&amp;I-PR-18</b>	<b>VERSIÓN</b>	<b>2</b>	<b>VIGENCIA</b>	<b>2022</b>	<b>PÁGINA</b>	<b>28 de 28</b>
---------------	---------------------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	-----------------

cubículos separados usando elementos y equipos exclusivos para estos trabajos. No compartir ningún equipo ni elemento (incluyendo guantes, batas, marcadores) entre los procedimientos pre-PCR y post-PCR.

- Se recomienda tener áreas o espacios separados, cada uno con sus batas, equipos y elementos, así: área de pre-PCR o preparación de reactivos; área de manipulación de ARN de muestras; área de manipulación de controles positivos (esta última es ideal pero no obligatoria); área de amplificación.
- Usar guantes a lo largo de todos los experimentos para prevenir la contaminación con ribonucleasas (ARNasas) que están presentes en las manos.
- Se debe hacer cambio o desinfección de guantes después de tocarse la piel (por ejemplo, la cara) o tocar superficies de uso común como chapas, puertas, etc.
- Contar con un juego de micropipetas dedicado exclusivamente al trabajo con ARN.
- Usar puntas con filtro y tubos sean libres de ARNASas.
- Usar químicos y reactivos libres de ARNASas.
- Para reducir la contaminación con ARNASas se debe limpiar las gradillas, las micropipetas y las superficies de trabajo (mesones y/o cabina de PCR) con una solución de eliminación de estas enzimas o con hipoclorito de sodio al 0.5% antes y después de su uso.
- Para reducir la contaminación con ácidos nucleicos se recomienda el uso de luz ultravioleta durante 15 minutos en las cabinas donde trabaje.

**7. DOCUMENTOS REFERENCIADOS:**

- Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Robert S. Lanciotti,\* Olga L. Kosoy,\* Janeen J. Laven,\* Jason O. Velez,\* Amy J. Lambert,\* Alison J. Johnson,\* Stephanie M. Stanfield,\* and Mark R. Duffy\*
- Corman VM, Rasche A, Baronti C, et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. Bull World Health Organ. 2016;94(12):880-892. doi:10.2471/BLT.16.175950

**8. CONTROL DE CAMBIOS**

VERSION	DOCUMENTO Y FECHA DE APROBACIÓN	DESCRIPCIÓN DE CAMBIOS
---------	---------------------------------	------------------------

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO**



**IDENTIFICACIÓN DE VIRUS ZIKA POR RT-qPCR**

**CÓDIGO**

**MI-INV-LAB-I&I-PR-18**

**VERSIÓN**

**2**

**VIGENCIA**

**2022**

**PÁGINA**

**29 de 29**

1

Creación del Documento.

**ELABORÓ**

SANDRA LILIANA DELGADO MARTÍNEZ  
Líder de Calidad

VoBo: CARLOS FERNANDO NARVAEZ  
Coordinador Laboratorio de Infección e Inmunidad

**REVISÓ**

Coordinador SGC

**APROBÓ**

MAYRA ALEJANDRA BERMEO BALAGUERA  
Coordinador SGC

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.

# ANEXO 2

- Utilities
- Clinical Research Calculators
- Probabilities
- Distributions
- Frequency Data
- Proportions
- Ordinal Data
- Correlation & Regression
- t-Tests & Procedures
- ANOVA
- ANCOVA
- Miscellanea
- HOME

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	0	64	64
Test Negative	204	5	209
Totals	204	69	273

Calculate

Reset

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.252747	0.203186	0.309412
Sensitivity	0.927536	0.832096	0.973016
Specificity	1	0.976962	1
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.234432	0.186405	0.290095
Negative	0.765568	0.709905	0.813595
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive (Positive Predictive Value)	1	0.929452	1
False Positive	0	0	0.070548
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative (Negative Predictive Value)	0.976077	0.941993	0.99116
False Negative	0.023923	0.00884	0.058007
likelihood Ratios: [C] = conventional [W] = weighted by prevalence <a href="#">[definitions]</a>			

# ANEXO 3



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

1 de 1

<b>NOMBRE LABORATORIO:</b>	<b>DEL</b>	LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD (I&I LAB) – FACULTAD DE SALUD – UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
<b>FECHA:</b>		23 DE MARZO DE 2022
<b>NOMBRE DEL INFORME:</b>		INFORME DE VALIDACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE ZIKV POR RT-qPCR DE MUESTRAS CLÍNICAS DE PLASMA: PROTOCOLO LANCIOTTI-CORMAN.
<b>PRESENTADO POR:</b>		EQUIPO DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD, UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA – FACULTAD DE SALUD – DIVISIÓN DE INMUNOLOGÍA.
<b>CARGO:</b>		BACTERIÓLOGOS Y COORDINADOR DEL LABORATORIO
<b>OBJETIVO DEL INFORME:</b>		FAMILIALIZARCE CON LA METODOLOGÍA Y VALIDAR LOCALMENTE EL PROTOCOLO LANCIOTTI-CORMAN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ZIKV POR RT-qPCR EN ESPECÍMENES BIOLÓGICOS.

## 1. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS

### VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO LANCIOTTI-CORMAN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ZIKV POR RT-qPCR

#### 1. Selección de especímenes:

Para la validación de la RT-qPCR para ZIKV se contó con un número de 29 muestras de plasma de pacientes confirmados tomados durante la epidemia de ZIKV en el 2015-2016 en Colombia. Debido a el número de muestras con infección natural, adicionalmente, se realizaron experimentos de "Spike" que consiste en la adición de cantidades conocidas de ZIKV proveniente de cultivo celular a muestras de plasma. Los experimentos de Spike son altamente usados en los ensayos de validación de métodos diagnósticos, incluyendo la detección de ZIKV y DENV. En total, se realizó la detección de 40 muestras de plasma a las que se les adicionó ZIKV de sobrenadante de cultivo. Por lo tanto, el número total de muestras con presencia de ZIKV fue de 69. Los plasmas seleccionados para para realizar los ensayos de spike fueron tomados de la base de datos de la seroteca del Laboratorio I&I. Se seleccionaron pacientes pediátricos sanos, anteriores al año 2014 (antes del brote de Zika). Se realizaron diluciones intermedias discontinuas del sobrenadante del cultivo celular de ZIKV en un rango de 1/10 a 1/1000, las cuales fueron posteriormente diluidas en los especímenes de plasma seleccionados al azar, adicionando de ésta predilución 20 µL a 180 µL del plasma dejando un volumen final de 200µL y así realizar el Spike para ZIKV obteniendo una dilución final de un rango de 1/10 a 1/10,000. Estas diluciones se realizaron al azar en un total de 40 especímenes y se completaron un total de 69 especímenes positivos usados para el análisis del método a verificar (**Protocolo Lanciotti-Corman**). Como estándar de oro se usó el estuche comercial de RT-qPCR para identificación de Arbovirus **TaqMan® Zika Virus Triplex** (Applied Biosystem, referencia: A31746), una estuche de reconocida compañía y muy usado para la identificación de Flavivirus, siguiendo todas las recomendaciones del fabricante.



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

2 de 2

Figura 1. Muestras usadas para los experimentos de Spike.



Seroteca Laboratorio I&I – Universidad Surcolombiana.

Tabla 1. Codificación de los especímenes a usar en los experimentos de Spike.

ESPECÍMENES POSITIVOS POR SPIKE PARA ZIKV				
772	798	928	973	1016
782	801	931	974	1024
783	839	933	992	1071
784	840	937	993	2356
785	845	938	998	
787	858	939	1000	
788	859	950	1005	
791	867	961	1008	
796	872	967	1009	

Para la selección de especímenes NEGATIVOS se usaron muestras de plasma previamente caracterizadas como negativas de la base de datos del Laboratorio I&I, voluntarios pediátricos sanos tomadas antes de la llegada del ZIKV a las américas (la mayoría de ellas tomadas en el 2013) y se analizaron un total de 204 especímenes clasificados como muestras confirmadas negativas (Figura 2). La Tabla 2 muestra a los especímenes negativos confirmados.

Figura 2. Ejemplo de muestras de plasma usadas como Negativas confirmadas



Seroteca laboratorio I&I



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

3 de 3

Tabla 2. Codificación de los especímenes NEGATIVOS.

ESPECÍMENES CONFIRMADOS NEGATIVOS															
1	22	47	69	88	142	191	208	238	258	281	329	350	468	501	1005
6	23	50	70	89	144	192	215	239	261	282	330	353	470	504	1008
7	25	54	71	91	154	193	217	240	262	287	331	354	472	505	1009
8	27	55	73	94	172	194	219	241	263	292	332	367	473	509	1016
10	28	58	74	95	174	195	220	242	265	297	335	444	478	511	1024
11	31	59	76	96	175	196	221	243	268	298	337	451	479	515	1071
12	33	60	77	97	179	197	224	244	269	304	338	452	480	980	2356
13	34	61	78	98	180	199	225	248	270	313	339	453	482	986	2358
15	37	62	80	101	182	201	227	249	271	316	340	456	486	989	1008-29
16	41	64	83	103	185	203	231	251	275	318	342	461	488	992	
18	43	66	84	108	186	204	232	255	278	320	343	465	495	993	
20	44	67	85	113	188	205	235	256	279	326	344	466	498	998	
21	46	68	86	122	189	206	236	257	280	327	345	467	499	1000	

Seroteca Laboratorio I&I

ente, a los especímenes confirmados POSITIVOS (n=69) y NEGATIVOS (n=204), se les realizó la automatizada de RNA usando el dispositivo KingFisher Flex y el estuche comercial MagMax (Applied Biosystem), para su posterior identificación por RT-qPCR.

**Extracción de RNA desde las muestras clínicas: Técnica de perlas magnéticas automatizadas:**

Con 200 µL de cada una de las muestras en la placa de aislamiento asignada para muestras del KingFisher Flex y se inactivaron con 5 µL de proteinasa K. La mezcla "binding" y la dilución del Etanol se preparó de la siguiente manera teniendo en cuenta el protocolo del kit MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Purification Kit modificado por la compañía local que nos suministra el producto (Equipos y Laboratorios de KingFisher, calculándose el volumen necesario de reactivos para el análisis de los 273 especímenes, además de un control de calidad Negativo del proceso de extracción, que consiste en agua calidad biología molecular y un control Positivo (controló desde el momento de la extracción como si fuera una muestra clínica), y el control Positivo consistió en sobrenadante de cultivo de células Vero-76 infectadas o no con el ZIKV (Control positivo y negativo respectivamente).

Volúmenes de los volúmenes de reactivos usados para el aislamiento del RNA.

para 1 muestra. Esto se multiplica para la cantidad de muestras que se vayan a procesar en el día.	
80%:	400 µL de Etanol Absoluto + 100 µL de H <sub>2</sub> O libre de RNAsa
Binding buffer:	Para una muestra: 265 µL + 10 µL

Preparar el binding buffer, se adicionó a la placa con las muestras, 275 µL/pozo de mezcla



**INFORME GENERAL**

**CÓDIGO**

**MI-INV-LAB-FO-29**

**VERSIÓN**

**1**

**VIGENCIA**

**2020**

**Página**

**4 de 4**

En un segundo plato se adicionaron a cada pozo teniendo en cuenta la cantidad de muestras además de los controles, 500 µL de solución de lavado (Wash buffer) en un segundo plato, 500 µL de buffer de elución al 80% en un tercer plato y se adicionó 50 µL de buffer de elución en un cuarto plato.

Los platos fueron procesados automatizadamente en el KingFisher™ Flex, siguiendo todas las instrucciones del fabricante y obteniéndose un volumen final de elución de 50µL de cada muestra.

**Amplificación por RT-qPCR Multiplex de un solo paso**

La amplificación por el protocolo Lanciotti-Corman usando el estuche comercial One-Step RT/Platinum III Thermo-Invitrogen, Ref: 11732-088, Lote: 2223827, con fecha de vencimiento del 31 de mayo de 2022 y se compara con el estándar de oro que corresponde al estuche comercial Zika Virus Triplex, Ref:A31746, Lote 19121902. Los primers y sondas de MacroGen para ZIKV a las concentraciones óptimas fueron también preparados por el personal del I&I Lab.

Para preparar la mezcla final para la RT-qPCR, se siguió el protocolo ya establecido para cada uno de los tipos de reacciones (protocolo Lanciotti-Corman y estuche comercial TaqMan® Zika Virus Triplex). A cada una de las reacciones se le realizó los controles correspondientes, en el caso de los especímenes POSITIVOS, 1 MOCK, 1 negativo de reacción (NTC) y 1 Control Positivo (sobrenadante de cultivo celular infectado con ZIKV). Para los especímenes negativos se realiza Mock y control positivo (sobrenadante de cultivo celular no infectado e infectado con ZIKV, respectivamente).

Según el protocolo Lanciotti-Corman, se realiza el cálculo del Mix para 69 especímenes POSITIVOS y 204 especímenes NEGATIVOS con los volúmenes y concentraciones especificadas en la Tabla 4:

Volúmenes para Protocolo Lanciotti-Corman RT-qPCR para ZIKV.

<b>Mezcla RT-qPCR para ZIKV</b>		
<b>COMPONENTES</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL</b>	<b>VOL 1RX</b>
REACCIÓN	1X	10
WASH BUFFER 2X	1X	6
RT BUFFER 10X	1X	3
RT ENZIMA 20X	1X	0,5
DTSSO4		0,5
RNA		5
TOTAL EN FINAL		25

En cada uno de los pozos se agrega 20 µL de la mezcla. Luego de esto, se tomó directamente la muestra de



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

5 de 5

de elución en donde se encuentra el RNA aislado y se aplicaron en cada pozo que contenía los 20µL de RT-qPCR, 5 µL de RNA purificado de cada uno de los pacientes, del MOCK, del control negativo (NTC) y el control Positivo, llegando a un volumen final de 25 µL/pozo. Se sellaron y se usaron en el equipo QuantStudio 5 para realizar RT-PCR en tiempo real. El termociclador fue programado con el protocolo de Lanciotti-Corman.

El estuche comercial TaqMan® Zika Virus Triplex se adiciona directamente los 25 µL del RNA purificado directamente sobre el liofilizado proveído por el estuche comercial para reconstituirlo y se siguieron las instrucciones del inserto para su homogenización. Con este ensayo se evaluaron los 69 especímenes y se obtuvieron 16 especímenes confirmados negativos.

Los protocolos térmicos utilizados para los dos protocolos fueron los siguientes:

**PROTOCOLO Lanciotti-Corman:**

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	15 min	50°C
1	3 min	95°C
42	15 seg	95°C
	20 seg	56°C
	15 seg	72°C

**Perfil térmico recomendado por el fabricante del estuche comercial TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV). 0.2 mL de Applied Biosystem:**

Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	20 min	50°C
1	2 min	95°C
40	15 seg	95°C
	1 min	60°C

**Obtención e Interpretación de Resultados**

Los datos fueron exportados directamente a nuestra nube de datos de Thermo-Fisher y desde allí todo el trabajo realizó la interpretación de cada una de las muestras.

Los resultados que se tuvieron en cuenta en el protocolo **Lanciotti-Corman** para determinar el resultado positivo o NEGATIVO fueron los siguientes:

El control NTC no debe presentar curva de amplificación en ninguno de los genes blanco (en ZIKV y DENV).

El control Negativo o Mock, debe presentar amplificación del gen RNP únicamente.

En el caso del control positivo, este debe mostrar curva de amplificación tanto para el gen de ZIKV



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

6 de 6

como para el gen RNP.

- ✓ Todas las muestras deben presentar amplificación del gen RNP.
- ✓ Para considerar un resultado positivo se debe presentar la curva de amplificación en ZIKV.
- ✓ Los criterios que se deben tener en cuenta para determinar el resultado POSITIVO o NEGATIVO son las referenciadas por Robert S. Lanciotti-Corman, en su artículo Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007.
- ✓ En este escrito se determina que el cut-off para Zika es con un CT <39.
- ✓ El threshold estandarizado para el QuantStudio es de 100,000 para Zika y 50,000 para RNasa P.

Los criterios que se tuvieron en cuenta en el protocolo **TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV)** para determinar el resultado POSITIVO o NEGATIVO fueron los siguientes (como recomendado por el fabricante):

- ✓ El control NTC no debe presentar curva de amplificación en ninguno de los genes (ZIKV, DENV y PPIA).
- ✓ Todas las muestras deben presentar amplificación en el PPIA.
- ✓ Para considerar un resultado positivo se debe presentar la curva de amplificación del gen diana antes de un CT de 38.5.
- ✓ El threshold estandarizado para el Quant Studio es de 50,000 para Zika, PPIA: 10,000, DENV: 50,000)

Con estos criterios se procede al análisis de los controles positivos y negativos del ensayo, además de cada una de las muestras. A continuación, se mostrarán los resultados de expresión del genoma de ZIKV evaluados tanto en los especímenes como en los controles POSITIVOS, CONTROL NEGATIVO (NTC) y MOCK.

- Análisis de los controles en la corrida del Protocolo **TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV)** para especímenes incluidos:

### Control negativo (NTC):

En este control sólo se adicionó agua de calidad biología molecular. En este resultado se puede observar que ambos blancos ZIKV y el gen PPIA (gen constitutivo) no supera el threshold y no amplificó como se esperaba lo cual lo valida como resultado NEGATIVO, Figura 3.

### Mock:

Este control negativo, se adiciona sobrenadante de cultivo celular en ausencia de ZIKV. En el Mock también podemos observar al igual que el control anterior, que el ZIKV y el Gen PPIA no superan el threshold, lo que lo valida como control NEGATIVO de la extracción y control de contaminación cruzada de todo el experimento (ver también Figura 3). Nota: el gen constitutivo PPIA no amplificó en esta condición porque el sobrenadante de cultivo proviene de células Vero-76, que corresponden a células epiteliales renales de simio verde del África y no a células humanas.



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

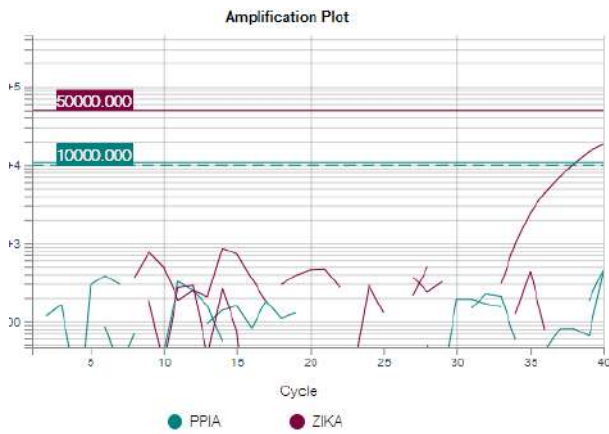
VIGENCIA

2020

Página

7 de 7

Figura 3. Corrida **TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV)**. Control NTC.



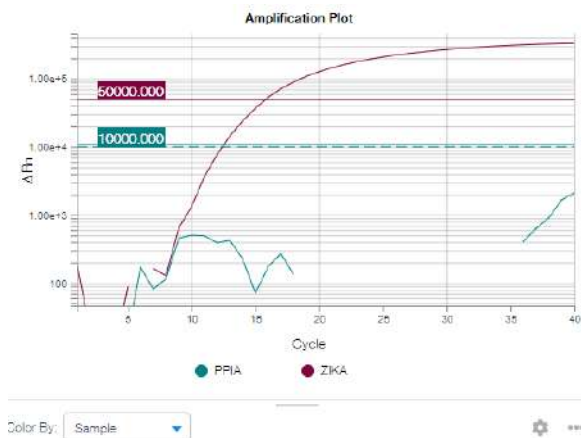
Well#	Sample#	Target#	Cq#	Result Qua
A1	NTC	PPIA	Undetermined	
A1	NTC	ZIKA	Undetermined	
A2	MOCK	PPIA	Undetermined	
A2	MOCK	ZIKA	Undetermined	
A3	SU772	PPIA	29.098	
A3	SU772	ZIKA	21.083	
A4	SU782	PPIA	30.307	
A4	SU782	ZIKA	23.209	

Corrida Triplex Kit Applied LabI&I

**CONTROL POSITIVO: Sobrenadante de cultivo celular (células Vero Infectadas con ZIKV y DENV)**

En Figura 4, observa que la amplificación del ZIKV tiene un valor de Ct menor de 39 y se encuentran por encima del threshold estandarizado (50,000) por lo que se considera como resultado POSITIVO, como era esperado. En el caso del Gen PPIA constitutivo no se observa amplificación por la razón antes expuesta.

Figura 4. Corrida **TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV)** para control Positivo.



Well#	Sample#	Target#	Cq#	Result Qu
D8	SU1024	ZIKA	39.558	
D9	SU1024-2	PPIA	27.822	
D9	SU1024-2	ZIKA	20.262	
D10	SU1071	PPIA	28.762	
D10	SU1071	ZIKA	Undetermined	
D11	SU1071-2	PPIA	30.267	
D11	SU1071-2	ZIKA	22.123	
D12	CONTROL POSI...	PPIA	Undetermined	
D12	CONTROL POSI...	ZIKA	15.805	

Corrida Triplex Kit labI&I

En la Figura 5, se observa un control positivo extra introducido que amplifica para ZIKV y DENV, puesto que corresponde a una mezcla de RNA aislado de células vero-76 infectadas con ZIKV y otras células Vero-76



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

8 de 8

infectadas con DENV-2. De notar, este estuche también detecta el virus Chicunguña, pero este virus no fue analizado.

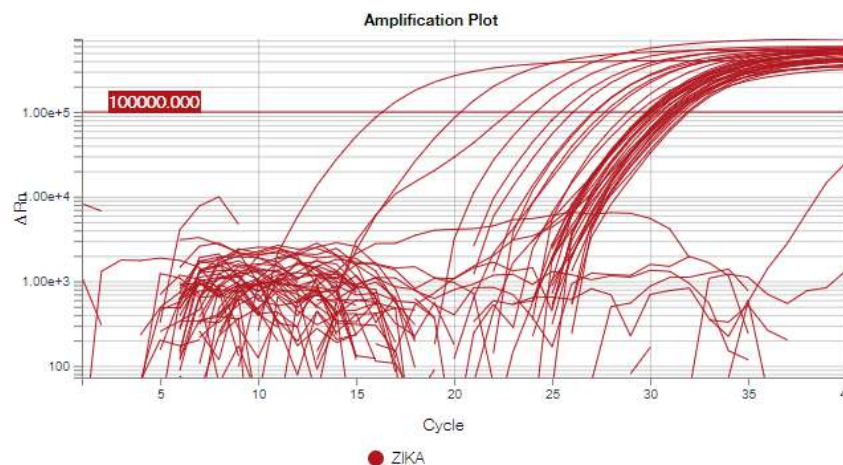
Figura 5. Corrida **TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV)** para espécimen producto de la mezcla de RNA purificado de células Vero-76 infectadas con ZIKV y con otras con DENV usado como control Positivo para la amplificación de los dos virus por RT-qPCR.



Corrida Triplex Kit commercial Lab I&I

En la Figura 6 observamos una corrida de especímenes positivos y negativos para ZIKV y en la Figura 7 se observa el control endógeno humano que detecta el estuche comercial (PPIA) para cada uno de los especímenes, lo que globalmente nos indica que las muestras son aptas para el análisis pues había presencia de RNA purificado de buena calidad.

Figura 6. Corrida **TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV)** para especímenes positivos y negativos para ZIKV.

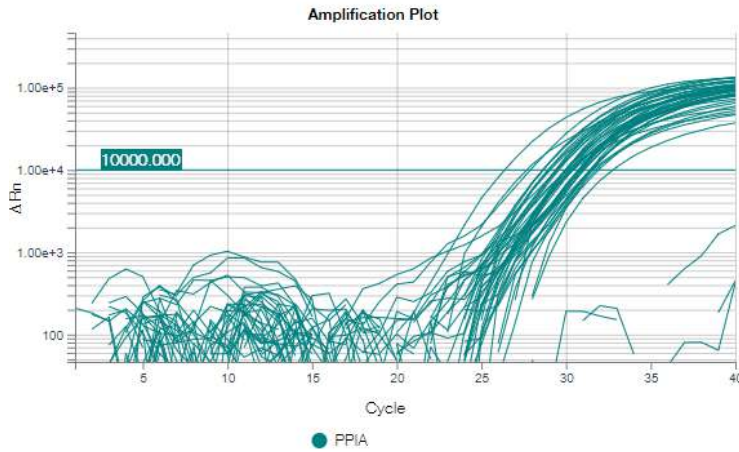


Corrida Protocolo I&I para muestras positivas y negativas para ZIKV



INFORME GENERAL

Figura 7. Corrida **TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV)** para muestras de plasma positivas y negativas para ZIKV donde se demuestra la amplificación del gen constitutivo.



Well#	Sample#	Target#	Cq#
A1	NTC	PPIA	Undetermined
A2	MOCK	PPIA	Undetermined
A3	SU772	PPIA	28.971
A4	SU782	PPIA	30.157
A5	SU783	PPIA	31.57
A6	SU784	PPIA	28.894
A7	SU785	PPIA	28.631
A8	SU787	PPIA	29.031
A9	SU788	PPIA	29.177

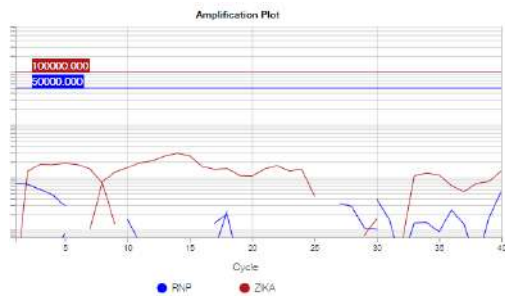
Especímenes analizados. Target PPIA

- Análisis de los controles en la corrida del **Protocolo Lanciotti-Corman** para especímenes Positivos y especímenes negativos:

**Control Negativo (NTC):**

En este control sólo se adicionó el Mix de RT-qPCR para ZIKV, pero ningún RNA. En este resultado se puede observar que ambos targets, ZIKV y el gen RNasa P no supera el threshold y no amplificó como se esperaba lo que valida el resultado NEGATIVO, Figura 8.

Figura 8. Amplificación muestras **Lanciotti-Corman**. Control negativo NTC.



Well#	Sample#	Target#	Cq#
A1	NTC	PNP	Undetermined
A1	NTC	ZIKA	Undetermined
A2	MOCK	PNP	Undetermined
A2	MOCK	ZIKA	Undetermined
A3	784-1	PNP	34.187
A3	784-1	ZIKA	22.858
A4	785-2	PNP	34.854
A4	785-2	ZIKA	25.335

Corrida Protocolo Lanciotti-Corman para control negativo NTC

**Mock:**

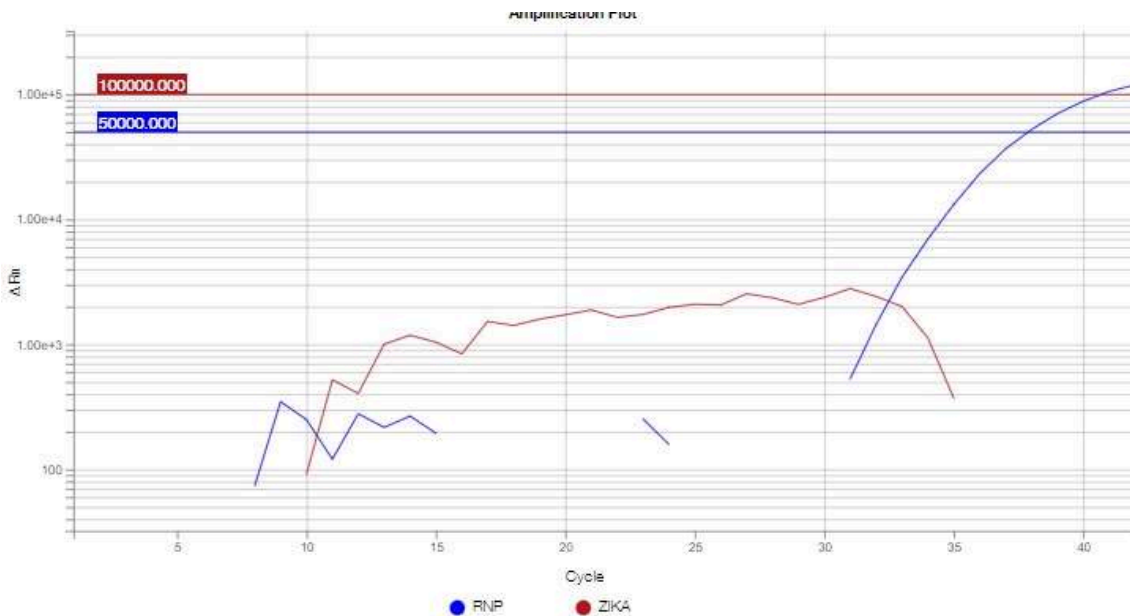
En el Mock se observa al igual que el control anterior, que el blanco ZIKV no supera el threshold, con



INFORME GENERAL

amplificación del RNP, lo que lo valida como control NEGATIVO de la extracción y control de contaminación cruzada de todo el experimento (Figura 9).

Figura 9. Control negativo Mock.



De notar, una hallazgo inesperado de este ensayo fue la amplificación del gen constitutivo RNP de las células Vero-76, usando los primers para el gen humano, esto posiblemente dado por la alta homología entre los genes RNP de ambas especies.

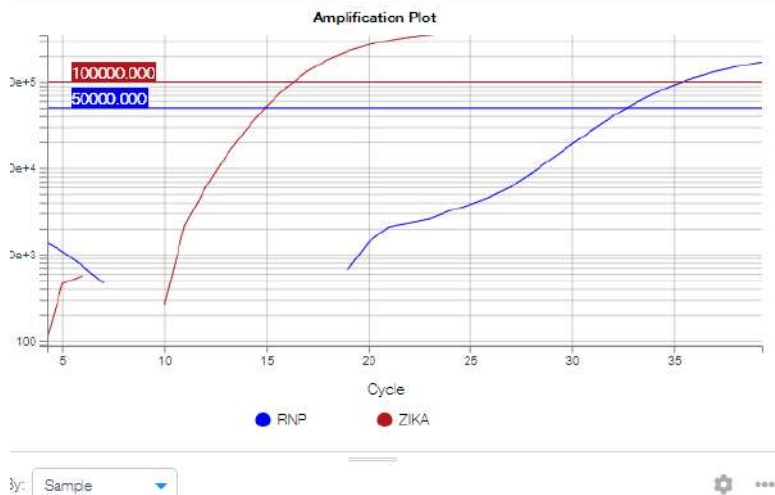
**CONTROL POSITIVO: Sobrenadante de cultivo celular (Células Vero-76 infectadas con ZIKV)**

Se observa que los targets ZIKV y Gen RNasa P, tiene un valor de Ct menor de 39 y se encuentran por debajo del threshold, considerado por lo tanto como POSITIVO, como era esperado (Figura 10).

Figura 10. Control Positivo usado en el ensayo en validación.



### INFORME GENERAL

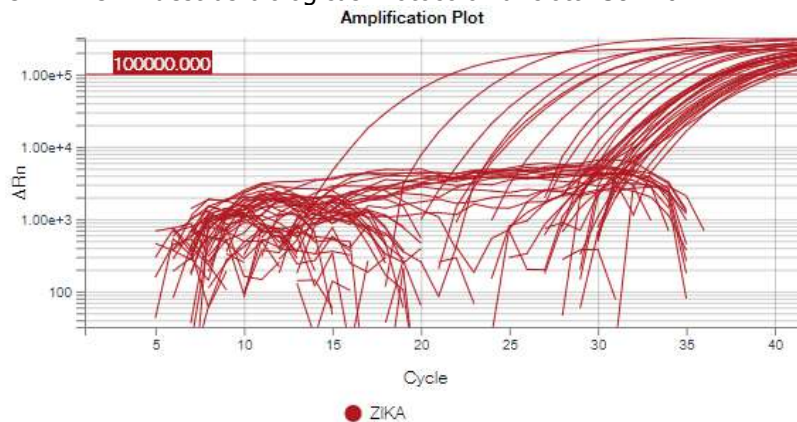


Well#	Sample#	Target#	Cq#
D8	2327	ZIKA	Undetermined
D9	2356	RNP	38.866
D9	2356	ZIKA	Undetermined
D10	2358	RNP	31.732
D10	2358	ZIKA	Undetermined
D11	2304	RNP	37.303
D11	2304	ZIKA	Undetermined
D12	ONTROL POSI...	RNP	32.69
D12	ONTROL POSI...	ZIKA	16.293

Corrida Protocolo Lanciotti-Corman control Positivo

En la Figura 11 como ejemplo se observa la corrida de especímenes positivos y negativos amplificadas por el protocolo Lanciotti-Corman.

Figura 11. Amplificación de ZIKV en muestras biológicas Protocolo Lanciotti-Corman.



En la Figura 12 se observa una corrida de muestras negativas confirmadas ya caracterizadas como se mencionó anteriormente. De notar, la única curva que amplificó y traspasó el umbral establecido, fue la generada por el control positivo.



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

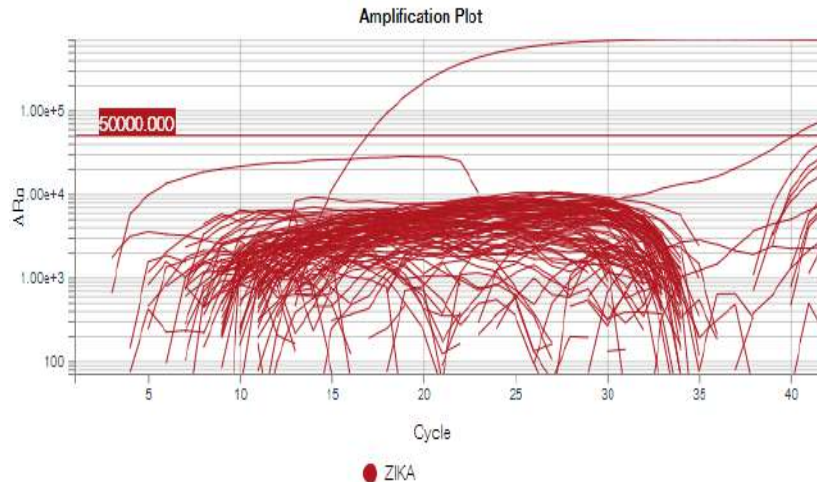
VIGENCIA

2020

Página

12 de 12

Figura 12. Amplificación de muestras NEGATIVAS para ZIKV, protocolo Lanciotti-Corman.



Corrida protocolo Lanciotti - Corman para muestras NEGATIVAS para ZIKV. Nótese que la única muestra que amplificó fue el control positivo que tuvo un Ct de 18.

Se demuestra que los controles de los ensayos realizados funcionaron apropiadamente y por lo tanto los experimentos fueron considerados como interpretables.

### COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS POR LOS PROTOCOLOS TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) y el protocolo Lanciotti-Corman:

Tabla 5. Comparación de los resultados del protocolo Lanciotti-Corman modificado y TaqMan® Zika Virus Triplex Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) considerado como el estándar de oro:



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

13 de 13

Tabla 5. Resultados comparación del estándar de oro y el métodos Lanciotti-Corman evaluado.

MUESTRA	Lanciotti-Corman	Triplex	CONCORDANCIA	MUESTRA	Lanciotti-Corman	Triplex	CONCORDANCIA
1000-9	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	974-18	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1005-3	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	974-19	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1005-30	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	992-21	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1005-6	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	993-12	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1008-28	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	998-15	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1009-26	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU1024-2	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1009-27	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU1071-2	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1016-23	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU772	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1016-24	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU782	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1016-25	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU783	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1024-20	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU784	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1024-21	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU785	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1024-22	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU787	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
SU974	NEGATIVO	POSITIVO	NO CONCUERDA	SU788	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
1071-18	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU791	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
784-1	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU933	NEGATIVO	POSITIVO	NO CONCUERDA
785-2	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU796	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
788-3	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU798	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
798-4	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU801	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
839-5	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU839	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
840-6	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU840	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
845-7	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU845	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
859-9	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU858	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
867-10	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU859	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
SU933-2	NEGATIVO	POSITIVO	NO CONCUERDA	SU867	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
867-14	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU867-2	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
931-11	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU872	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
938-12	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU928	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
938-13	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU931	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
950-15	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU937	NEGATIVO	POSITIVO	NO CONCUERDA
958-8	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU937-2	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
967-24	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU950	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
973-16	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU961	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
974-17	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA	SU973	POSITIVO	POSITIVO	CONCUERDA
SU938	NEGATIVO	POSITIVO	NO CONCUERDA				

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



INFORME GENERAL

CÓDIGO

MI-INV-LAB-FO-29

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2020

Página

14 de 14

Para calcular la especificidad y la sensibilidad y en general para aumentar el poder del análisis, se le sumaron los todos los especímenes caracterizados previamente como negativas, que correspondieron a 204 muestras de plasma de niños sanos que fueron tomadas antes del 2014 (la mayoría en el 2013, mucho antes de la llegada del ZIKV a las Américas), pertenecientes al repositorio de la División de Inmunología, grupo de Parasitología y Medicina Tropical de la Universidad Surcolombiana. Con estos datos se construyó la siguiente tabla de 2x2:

Tabla 6. Tabla de 2x2 con los resultados de la validación de la RT-qPCR para ZIKV

		ZIKV (estándar de oro)		Total
		Presente	Ausente	
Protocolo Lanciotti-Corman	Positivo	64	0	64
	Negativo	5	204	209
	Total	69	204	273

Con los datos anteriormente mostrados se obtuvieron los siguientes resultados:

Concordancia (min-max): 94% (88 – 98) a un intervalo de confianza de 95%.

Índice Kappa de Cohen (min-max): 0.95 (0.92 – 99).

Sensibilidad (min-Max): 92.7% (83-97)

Especificidad: 100% (97-100)

Valor predictivo positivo: 100% (92-100)

Valor predictivo negativo: 97% (94-99)

Nombre: Carlos F. Narváez  
Director Laboratorio Infección e Inmunidad (I&I Lab)  
[cfnarvaez@usco.edu.co](mailto:cfnarvaez@usco.edu.co)  
Facultad de Salud – Universidad Surcolombiana

Nombre: Sandra L. Delgado Martínez  
Bacterióloga Líder de Calidad Lab. I&I  
[sandra.delgado@usco.edu.co](mailto:sandra.delgado@usco.edu.co)  
Facultad de Salud – Universidad Surcolombiana

# ANEXO 4

# ANEXO 5



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



## 1. OBJETIVO

Describir la metodología del Laboratorio de Infección e Inmunidad para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos de isotipo IgG específicos contra la proteína no estructural de DENV1-4 y ZIKV.

## 2. ALCANCE

Este procedimiento va dirigido a todo el personal con formación básica en técnicas de laboratorio.

## 3. LÍDER DEL PROCEDIMIENTO:

Los responsables del siguiente protocolo es el Coordinador del Laboratorio de Infección e Inmunidad.

## 5. DEFINICIONES

- **ELISA** El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza como sus siglas lo indican una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Existen diversas variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligandos de alto peso molecular (>30 000 daltons), el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpos específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario
- **ANTICUERPOS** Los anticuerpos utilizados en el método ELISA son de origen monoclonal o policlonal que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina purificada, pueden ser solubles o estar inmóviles en un soporte sólido, son empleados



como conjugados no marcados o enzimáticos y por ultimo reaccionan con determinante antigénico específico de un antígeno o de un anticuerpo ligando-específico (anticuerpo primario) según el protocolo de análisis.

- **ANTIGENO:** Los antígenos se purifican o se producen con tecnología recombinante, y al igual que los anticuerpos se utilizan como conjugados marcados o enzimáticos y son inmóviles o solubles, dependiendo del protocolo de análisis.
- **CONJUGADOS ENZIMATICOS:** son antígenos o anticuerpos unidos en forma covalente a la enzima de elección . Así pues, el reactivo que se forma de la unión covalente entre enzima y antígeno o anticuerpo es el conjugado

## 6. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD

Nº	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1.	Preparación de Materiales, Equipos y Reactivos	Se preparan los siguientes materiales para el procesamiento: <b>Reactivos y equipo:</b> - 1X PBS (Gibco, Ref: 10010-023) - Blotto, leche en polvo descremada (Chem Cruz, Cat: sc-2325) - Tween 20 (Sigma, Cat: p-1379) - ZIKV NS1 recombinante (concentración de stock: 0.5 mg/mL. Native Antigen Co. UK). Producidas en células eucariotas.	Bacteriólogo	Ninguno



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO

ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE IgG NS1 ESPECÍFICO DE ZIKV  
O DENV1-4



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2021

PÁGINA

3 de 8

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Marca de anti-IgG humana hecho cabra biotinilado (Seracare-KPL).</li> <li>- Estreptavidina marcada con peroxidasa (Thermo Scientific™ Pierce™ Streptavidin HRP Conjugate, High Sensitivity; 1mg / mL; Cat: 21130). (KPL-Seracare)</li> <li>- Solución de tetrametilbencidina (KPL-Seracare)</li> <li>- 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> <li>- Placas ELISA (Thermo 4HBX, encuadernación alta de fondo plano; Cat: 3855)</li> <li>- Micropipetas de 0.5-10uL, 20-200uL, 200-1000uL.</li> <li>- Pipeta multicanal electrónica de 20-200uL.</li> <li>- Lector de placas ELISA (VarioSkan Lux, Thermo)</li> </ul> <p>Nota: deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (TA) antes de comenzar.</p>		
2.	<b>Cálculos para ELISA:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solución para cubrir pozos: rNS1-ZIKV o mezcla de rNS1-DENV (1-4): 32ng/mL en 1X PBS, de cada una de ellas.</li> <li>• Para preparar Blotto al 5% (Blotto al 5%, Tween 20 0.05% en 1X PBS): para 50 mL: 2.5 g en 1X PBS + 500</li> </ul>	Bacteriólogo	MI-INV-LAB-FO Mapa y Hoja de Cálculo para ELISA

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO

ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE IgG NS1 ESPECÍFICO DE ZIKV  
O DENV1-4



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2021

PÁGINA

4 de 8

		<p>uL de Tween 20 al 10% (se puede diluir al 2.5% con agua desionizada).</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Buffer de lavado: Tween 20 al 0.1% en 1X PBS: 10 ml de Tween 20 al 10% en 1L de 1X PBS.</li><li>• Concentración de anticuerpos marcados con biotina, solución de trabajo: 0.5ug/mL en blotto al 2.5%.</li><li>• Estreptavidina marcada con peroxidasa, concentración de trabajo (0.5ug / mL en blotto 2.5%)</li></ul>		
3.	<b>PROCEDIMIENTO</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Agregue 100 uL/pozo de ZIKV o DENV1-4 rNS1 (60ng/mL). Incubar durante la noche a 4°C.</li><li>2. Deseche y elimine cualquier líquido restante invirtiendo la placa y frotándola con toallas de papel limpias. Luego, agregue 150 uL/pozo de blotto al 5%. Incubar durante 1 hora a 37°C.</li><li>3. Desechar y añadir 100 uL/pozo de las muestras de plasma diluidas 1/200 en Blotto 2.5%. Incubar durante 2 horas a 37°C.</li><li>4. Desechar y lavar manualmente con buffer de lavado cuatro veces. Deseche y elimine cualquier líquido restante invirtiendo la placa, golpeándola suavement y secando con toallas de papel limpias.</li><li>5. Añada 100uL/pozo de anticuerpo de detección biotinilado. Incubar durante 1 hora a 37°C.</li></ol>	Bacteriólogo	<p>MI-INV-LAB-FO REPORTE DE RESULTADO PARA DENV</p> <p>MI-INV-LAB-FO REPORTE DE RESULTADO PARA ZIKA</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](http://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.



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO**

**ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE IgG NS1 ESPECÍFICO DE ZIKV  
O DENV1-4**



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

**CÓDIGO****MI-INV-LAB-PR****VERSIÓN****1****VIGENCIA****2021****PÁGINA****5 de 8**

		<p>6. Desechar y lavar manualmente con buffer de lavado cuatro veces. Deseche y elimine cualquier líquido restante invirtiendo la placa y secando con toallas de papel limpias.</p> <p>7. Añada 100 uL/pozo de estreptavidina marcada con HRP e incube durante 1 hora a 37°C.</p> <p>8. Desechar y lavar manualmente con buffer de lavado cuatro veces. Deseche y elimine cualquier líquido restante invirtiendo la placa, golpeando sutilmente y secando con toallas de papel limpias.</p> <p>9. Agregue 100 uL/pozo de TMB. Incubar a TA el tiempo necesario, tomando como referencia los controles positivo y negativo. Evite colocar la placa a la luz directa.</p> <p>10. Agregue 50uL/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M para detener la reacción.</p> <p>11. Leer la placa a 450nm.</p>		
4.	<b>CONDICIONES DE LA MUESTRA</b>	<p>El traslado de las muestras biológicas al Laboratorio de Infección e Inmunidad debe efectuarse de acuerdo con las normas de transporte de muestras biológicas de la IATA.</p> <p>Se debe realizar lista de chequeo en el formato MI-INV-LAB-FO Criterios de Rechazo de muestras.</p> <p>Al recibir las muestras, estas vienen en tubo tapa lila, se deben centrifugar a 200 gravedades por 20 minutos y separar el plasma</p>	Bacteriólogo y de Laboratorio	MI-INV-LAB-FO Criterios de Rechazo de muestras

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO**

**ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE IgG NS1 ESPECÍFICO DE ZIKV  
O DENV1-4**



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

**CÓDIGO****MI-INV-LAB-PR****VERSIÓN****1****VIGENCIA****2021****PÁGINA****6 de 8**

		<p>en viales, estos deben ser congelados a -80 y deben ser codificadas según la base de datos.</p> <p>Descongele las muestras directamente a temperatura ambiente.</p> <p>Realizar la menor cantidad de veces posibles la descongelación de las muestras. En caso tal lo recomendable es poner alícuotas con lo mínimo en los viales (400 µL).</p>		
<b>5.</b>	<b>CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA</b>	<p><b>CONTROL NEGATIVO:</b> ZIKA: Muestras de adultos seronegativos para flavivirus tomadas antes del 2014 DENV: Muestras tipificadas previamente para DENV con estuche comercial que salgan negativos</p> <p><b>CONTROL POSITIVO:</b> DENV Y ZIKA: Suero de pacientes previamente tipificados por PCR y ELISA de estuche comercial que den positivos.</p>	Bacteriólogo	<p>MI-INV-LAB-FO REGISTRO DE CONTROLES PARA DENV</p> <p>MI-INV-LAB-FO REGISTRO DE CONTROLES PARA ZIKA</p>

## 6.2 ENSAYO

<b>Nº</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>RESPONSABLE</b>	<b>REGISTRO</b>
<b>1.</b>	<b>Recomendaciones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tener en cuenta los criterios de rechazo para estas muestras:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Muestras hemolíticas</li> <li>○ Muestras lipémicas</li> <li>○ Pacientes pediátricos con patologías diferentes</li> <li>○ Pacientes con síndrome febril de origen desconocido.</li> </ul> </li> </ul>	Bacteriólogo	No Aplica

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO

ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE IgG NS1 ESPECÍFICO DE ZIKV  
O DENV1-4



SC 7384-1

SA-CERE 557626

OS-CER 597555

CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2021

PÁGINA

7 de 8

- Utilizar todas las medidas de protección necesarias con el buen uso de EPP.
- Recuerde verificar los cálculos antes de iniciar el procesamiento
- Las pipetas deben estar al día con su calibración
- El material debe estar limpio y estéril
- Mantenga los reactivos a la temperatura adecuada.
- El flujo de trabajo debe ser en un solo sentido y sin devolverse, ya que esto puede generar contaminaciones.

## 6. OBSERVACIONES

- Todos los equipos que se usen deben ser registrados en el formato MI-INV-LAB-FO-93 CONTROL USO DE EQUIPOS
- Usar todos los EPP a lo largo de todos los experimentos para prevenir la contaminación
- Se debe hacer cambio o desinfección de guantes después de tocarse la piel (por ejemplo, la cara)
- Contar con un juego de micropipetas dedicado exclusivamente al trabajo con ELISA.

## 7. DOCUMENTOS REFERENCIADOS:

- Clinical, laboratory and immune aspects of Zika virus-associated encephalitis in children. Salgado DM, Vega R, Rodríguez JA, Niño Á, Rodríguez R, Ortiz Á, DeLaura I, Bosch I, Narváez CF. Int J Infect Dis. 2020 Jan;90:104-110.
- Combination of Nonstructural Protein 1-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Can Detect and Distinguish Various Dengue Virus and Zika Virus Infections. Tyson J, Tsai WY, Tsai JJ, Brites C, Mässgård L, Ha Youn H, Pedroso C, Drexler JF, Stramer SL, Balmaseda A, Harris E, Wang WK. 2019 Jan 30;57(2):e01464-18.
- Distinguishing Secondary Dengue Virus Infection From Zika Virus Infection With Previous Dengue by a Combination of 3 Simple Serological Tests. Tsai WY, Youn HH, Brites C, Tsai JJ, Tyson J, Pedroso C, Drexler JF, Stone M, Simmons G, Busch MP, Lanteri M, Stramer SL, Balmaseda A, Harris E, Wang WK. Clin Infect Dis. 2017 Nov 13;65(11):1829-1836.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO

ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE IgG NS1 ESPECÍFICO DE ZIKV  
O DENV1-4



SC 7384-1



SA-CERE 557626



OS-CER 597555



PÁGINA

8 de 8

CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2021

## 8. CONTROL DE CAMBIOS

VERSION	DOCUMENTO Y FECHA DE APROBACIÓN	DESCRIPCIÓN DE CAMBIOS
1		Creación del Documento.

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
SANDRA LILIANA DELGADO MARTÍNEZ Líder de Calidad  VoBo: CARLOS FERNANDO NARVAEZ Coordinador Laboratorio de Infección e Inmunidad	ARIADNA HOYOS STERLING Coordinador SGC	MAYRA ALEJANDRA BERMEO BALAGUERA Coordinador SGC

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.

# ANEXO 6



## 1. OBJETIVO

Describir la metodología del Laboratorio de Infección e Inmunidad (I&I Lab) para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos de isotipo IgM e IgG circulantes específicos contra la proteína no estructural (NS)-1 circulantes contra el Zika virus (ZIKV)

## 2. ALCANCE

Este procedimiento va dirigido a todo el personal con formación básica en técnicas de laboratorio como profesionales en Bacteriología, Microbiología, Bioanalistas, Médicos, estudiantes del campo de la salud, entre otros.

## 3. LÍDER DEL PROCEDIMIENTO:

El líder de este procedimiento es el I&I Lab – División de Inmunología, Programa de Medicina, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana.

## 5. DEFINICIONES

- **ELISA** El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza como sus siglas lo indican una enzima como marcador para identificar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Existen diversas variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligandos de bajo y alto peso molecular (>30 Kd), el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con anticuerpo que a su vez se une a un ligando generalmente antígeno protéico o un anticuerpos específico para el antígeno de interés o un anti-anticuerpo para el anticuerpo primario.
- **ANTICUERPOS** Los anticuerpos utilizados en el ELISA son de origen monoclonal o policlonal que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina purificada, o fragmentos de anticuepros que contienen la región variable de unión al antígeno (Fab o Fab<sub>2</sub>'), pueden ser solubles o estar inmóviles en un soporte sólido, son empleados como conjugados no marcados o



enzimáticos y por ultimo reaccionan con determinante antigénico específico de un antígeno o de un anticuerpo ligando-específico (anticuerpo primario) según el protocolo de análisis.

- **ANTIGENO:** Los antígenos se purifican o se producen con tecnología recombinante, y al igual que los anticuerpos se utilizan como conjugados marcados o enzimáticos y son inmóviles o solubles, dependiendo del protocolo de análisis.
- **CONJUGADOS ENZIMATICOS:** son antígenos o anticuerpos unidos en forma covalente a la enzima de elección . Así pues, el reactivo que se forma de la unión covalente entre enzima y antígeno o anticuerpo es el conjugado

## 6. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD

Nº	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1.	<b>Preparación de Materiales, Equipos y Reactivos</b>	<p>Se preparan los siguientes materiales para el procesamiento:</p> <p><b>Reactivos y equipo:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 1X PBS estéril (Thermo Gibco, ref: 10010-023)</li><li>- Blotto, leche en polvo descremada (Slight Colanta leche descremada)</li><li>- Tween 20 (Sigma-Aldrich, ref: p-1379)</li><li>- Proteína no estructural (NS)-1 de ZIKV (Suriname) recombinante, producida en células 293. Native Antigen Co. Ref: ZIKVSU-NS1-500. Batch #: 18022009. Pureza &gt;90%.</li></ul>	Bacteriólogo	Ninguno

Vigilada Mineducación



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO

ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA  
DETECCIÓN DE IgM ZIKV ESPECÍFICA CIRCULANTE



SC 7384-1 SA-CERE 597528 OS-CER 597555

CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2021

PÁGINA

3 de 8

		<ul style="list-style-type: none"><li>- Anti-IgM humana hecho en cabra biotinilado (Seracare-KLP, catalog: 5260-0029).</li><li>- Estreptavidina marcada con peroxidasa (Seracare-KPL, ref: 5270-0029).</li><li>- 2-componentes peroxidasa-substrato (Seracare-KPL, ref: 5120-0050).</li><li>- Ácido Sulfúrico (<math>H_2SO_4</math>, Merk, 98% pureza), 2M.</li><li>- Microplacas de ELISA 96 pozos (ThermoScientific Immulon 4HBX, fondo plano, ref: 3855)</li><li>- Micropipetas de 0.5-10uL, 20-200uL, 200-1000uL.</li><li>- Pipeta multicanal de 20-200uL.</li><li>- Lector de microplacas multiuso (VarioSkan DeLux, Thermo)</li></ul> <p>Nota: Todos los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente (TA) para ser usados en el ELISA.</p>		
2.	<b>Cálculos para ELISA:</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Solución para cubrir pozos: rNS1-ZIKV. Para la IgM, la IgM la concentración de la solución para cubrir es de 2ug/mL en PBS 1X estéril.</li><li>• Para preparar Blotto al 5% (Blotto al 5%, Tween 20 0.05% en 1X PBS): para 50 mL: 2.5 g en 1X PBS + 500</li></ul>	Bacteriólogo	MI-INV-LAB-FO Mapa y Hoja de Cálculo para ELISA

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO

ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA  
DETECCIÓN DE IgM ZIKV ESPECÍFICA CIRCULANTE



SC 7384-1 SA-CERE 557528 OS-CER 597555

CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2021

PÁGINA

4 de 8

		<p>uL de Tween 20 al 10% (se puede diluir al 2.5% con agua desionizada).</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Buffer de lavado: Tween 20 al 0.1% en 1X PBS: 10 ml de Tween 20 al 10% en 1L de 1X PBS.</li><li>• Concentración de anticuerpos marcados con biotina, solución de trabajo: 0.5ug/mL en blotto al 2.5%.</li><li>• Estreptavidina marcada con peroxidasa, concentración de trabajo (0.5ug / mL en blotto 2.5%)</li></ul>		
3.	<b>PROCEDIMIENTO</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Agregue 50uL/pozo de rNS-1 ZIKV a la concentración de 2ug/mL (para detectar IgM) o 64ng/mL (para detectar IgG-ZIKV). Incubar durante la noche a 4°C.</li><li>2. Deseche y elimine cualquier líquido restante invirtiendo la placa y frotándola con toallas de papel limpias. Luego, agregue 150 uL/pozo de blotto al 5%. Incubar durante 1 hora a 37°C.</li><li>3. Desechar y añadir 50 uL/pozo de las muestras de plasma diluidas 1/100 (para detectar IgM-ZIKV). Incubar durante 2 horas a 37°C.</li><li>4. Desechar y lavar manualmente con buffer de lavado cuatro veces. Deseche y elimine cualquier líquido restante invirtiendo la placa, golpeándola suavemente y secando con toallas de papel limpias.</li></ol>	Bacteriólogo	MI-INV-LAB-FO Mapa y Hoja de Cálculo para ELISA

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO

ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA  
DETECCIÓN DE IgM ZIKV ESPECÍFICA CIRCULANTE



SC 7384-1



SA-CERE 557528



OS-CER 597555



CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2021

PÁGINA

5 de 8

		<p>5. Añada 50uL/pozo de anticuerpo de detección biotinilado. Para la IgM se usará el anti-IgM humano biotinilado diluido 1/1,000 en blotto a 2.5%. Incubar durante 1 hora a 37°C.</p> <p>6. Desechar y lavar manualmente con buffer de lavado cuatro veces. Deseche y elimine cualquier líquido restante invirtiendo la placa y secando con toallas de papel limpias.</p> <p>7. Añada 50 uL/pozo de estreptavidina marcada con HRP e incube durante 1 hora a 37°C (dilución de trabajo 1/1,1000).</p> <p>8. Desechar y lavar manualmente con buffer de lavado cuatro veces. Deseche y elimine cualquier líquido restante invirtiendo la placa, golpeando sutilmente y secando con toallas de papel limpias.</p> <p>9. Agregue 50 uL/pozo de TMB. Incubar a TA el tiempo necesario, tomando como referencia los controles positivo y negativo. Evite colocar la placa a la luz directa.</p> <p>10. Agregue 50uL/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M para detener la reacción.</p> <p>11. Leer la placa a 450nm.</p>		
4.	<b>CONDICIONES DE LA MUESTRA</b>	El traslado de las muestras biológicas al Laboratorio de Infección e Inmunidad debe efectuarse de acuerdo con las normas de transporte de muestras biológicas de la IATA.	Bacteriólogo Auxiliar de Laboratorio	y de Criterios de Rechazo de muestras

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO**

**ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA  
DETECCIÓN DE IgM ZIKV ESPECÍFICA CIRCULANTE**



SC 7384-1 SA-CERE 597528 OS-CER 597555

<b>CÓDIGO</b>	<b>MI-INV-LAB-PR</b>	<b>VERSIÓN</b>	<b>1</b>	<b>VIGENCIA</b>	<b>2021</b>	<b>PÁGINA</b>	<b>6 de 8</b>
---------------	----------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

		<p>Se debe realizar lista de chequeo en el formato MI-INV-LAB-FO Criterios de Rechazo de muestras.</p> <p>Al recibir las muestras, estas vienen en tubo tapa lila, se deben centrifugar a 200 gravedades por 20 minutos y separar el plasma en viales, estos deben ser congelados a -80 y deben ser codificadas según la base de datos.</p> <p>Descongele las muestras directamente a temperatura ambiente.</p> <p>Realizar la menor cantidad de veces posibles la descongelación de las muestras. En caso tal lo recomendable es poner alícuotas con lo mínimo en los viales (400 µL).</p>		
<b>5.</b>	<b>CONTROLES Y MATERIAL DE REFERENCIA</b>	<p><b>CONTROL NEGATIVO IgM:</b> Muestras de pacientes sanos seronegativos para Flavivirus tomadas antes del 2014.</p> <p><b>CONTROL POSITIVO IgM:</b> Muestra de paciente con infección confirmada por RT-qPCR cuya muestra fue tomada entre la el día 14 y 30 de iniciado los síntomas.</p>	Bacteriólogo	MI-INV-LAB-FO Mapa y Hoja de Cálculo para ELISA

**6.2 ENSAYO**

<b>Nº</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>RESPONSABLE</b>	<b>REGISTRO</b>
<b>1.</b>	<b>Recomendaciones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tener en cuenta los criterios de rechazo para estas muestras:               <ul style="list-style-type: none"> <li>Muestras hemolíticas</li> </ul> </li> </ul>	Bacteriólogo	No Aplica

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO

ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA  
DETECCIÓN DE IgM ZIKV ESPECÍFICA CIRCULANTE



CÓDIGO

MI-INV-LAB-PR

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2021

PÁGINA

7 de 8

- Muestras lipémicas
- Pacientes pediátricos con patologías diferentes
- Pacientes con síndrome febril de origen desconocido.
- Utilizar todas las medidas de protección necesarias con el buen uso de EPP.
- Recuerde verificar los cálculos antes de iniciar el procesamiento
- Las pipetas deben estar al día con su calibración
- El material debe estar limpio y estéril
- Mantenga los reactivos a la temperatura adecuada.
- El flujo de trabajo debe ser en un solo sentido y sin devolverse, ya que esto puede generar contaminaciones.

## 6. OBSERVACIONES

- Todos los equipos que se usen deben ser registrados en el formato MI-INV-LAB-FO-93 CONTROL USO DE EQUIPOS
- Usar todos los EPP a lo largo de todos los experimentos para prevenir la contaminación
- Se debe hacer cambio o desinfección de guantes después de tocarse la piel (por ejemplo, la cara)
- Contar con un juego de micropipetas dedicado exclusivamente al trabajo con ELISA.

## 7. DOCUMENTOS REFERENCIADOS:

- Clinical, laboratory and immune aspects of Zika virus-associated encephalitis in children. Salgado DM, Vega R, Rodríguez JA, Niño Á, Rodríguez R, Ortiz Á, DeLaura I, Bosch I, Narváez CF. Int J Infect Dis. 2020 Jan;90:104-110.
- Combination of Nonstructural Protein 1-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Can Detect and Distinguish Various Dengue Virus and Zika Virus Infections. Tyson J, Tsai WY, Tsai JJ, Brites C, Mässgård L, Ha Youn H, Pedroso C, Drexler JF, Stramer SL, Balmaseda A, Harris E, Wang WK. 2019 Jan 30;57(2):e01464-18.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
LABORATORIO

ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA  
DETECCIÓN DE IgM ZIKV ESPECÍFICA CIRCULANTE



**CÓDIGO**

**MI-INV-LAB-PR**

**VERSIÓN**

**1**

**VIGENCIA**

**2021**

**PÁGINA**

**8 de 8**

- Distinguishing Secondary Dengue Virus Infection From Zika Virus Infection With Previous Dengue by a Combination of 3 Simple Serological Tests. Tsai WY, Youn HH, Brites C, Tsai JJ, Tyson J, Pedroso C, Drexler JF, Stone M, Simmons G, Busch MP, Lanteri M, Stramer SL, Balmaseda A, Harris E, Wang WK. Clin Infect Dis. 2017 Nov 13;65(11):1829-1836.

## 8. CONTROL DE CAMBIOS

VERSION	DOCUMENTO Y FECHA DE APROBACIÓN	DESCRIPCIÓN DE CAMBIOS
1		Creación del Documento.

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
SANDRA LILIANA DELGADO MARTÍNEZ Líder de Calidad  VoBo: CARLOS FERNANDO NARVAEZ Coordinador Laboratorio de Infección e Inmunidad	ARIADNA HOYOS STERLING Coordinador SGC	MAYRA ALEJANDRA BERMEO BALAGUERA Coordinador SGC

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional [www.usco.edu.co](http://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.

# ANEXO 7

- Utilities
- Clinical Research Calculators
- Probabilities
- Distributions
- Frequency Data
- Proportions
- Ordinal Data
- Correlation & Regression
- t-Tests & Procedures
- ANOVA
- ANCOVA
- Miscellanea
- HOME

*Frequencies of Agreement*

Category	Maximum Possible	Chance Expected	Observed
1	23	3.29	21
2	138	118.29	136
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	---	---	---
7			
8			
<b>Total</b>	<b>161</b>	<b>121.5800</b>	<b>157</b>

*Proportions of Agreement*

Category	Maximum Possible	Chance Expected	Observed	.95 CI of Observed	
				Lower Limit	Upper Limit
1	1	0.0769	0.84	0.6308	0.9475
2	1	0.75	0.9714	0.9239	0.9908
3	---	---	---	---	---
4	---	---	---	---	---
5	---	---	---	---	---
6	---	---	---	---	---
7					
8					
<b>Composite</b>	<b>1</b>	<b>0.7552</b>	<b>0.9752</b>	<b>0.9336</b>	<b>0.992</b>

Confidence intervals for proportions are calculated according to the Wilson efficient-score method, corrected for continuity.

[Home](#) Click this link **only** if you did not arrive here via the VassarStats main page.

- Utilities
- Clinical Research Calculators
- Probabilities
- Distributions
- Frequency Data
- Proportions
- Ordinal Data
- Correlation & Regression
- t-Tests & Procedures
- ANOVA
- ANCOVA
- Miscellanea
- HOME

Data Entry

		B								Totals
		1	2	3	4	5	6	7	8	
A	1	21	2	----	----	----	----	----	----	23
	2	2	136	----	----	----	----	----	----	138
	3	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	4	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	5	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	6	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	7	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	8	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Totals		23	138	----	----	----	----	----	----	161

The designation "nc" appearing in any of the following cells means "this quantity cannot be calculated." This will typically occur only when your data entries in the above table include a substantial proportion of zeros.

*Unweighted Kappa*

Observed Kappa	.95 Confidence Interval	
	Standard Error	Upper Limit
<b>0.8986</b>		
Method 1	0.0501	0.9968
Method 2	0.0499	0.9965

1	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.8986	observed as proportion of maximum possible

- Utilities
- Clinical Research Calculators
- Probabilities
- Distributions
- Frequency Data
- Proportions
- Ordinal Data
- Correlation & Regression
- t-Tests & Procedures
- ANOVA
- ANCOVA
- Miscellanea
- HOME

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	2	21	23
Test Negative	136	2	138
Totals	138	23	161

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.142857	0.094555	0.208739
Sensitivity	0.913043	0.704913	0.984794
Specificity	0.985507	0.943298	0.997486
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.142857	0.094555	0.208739
Negative	0.857143	0.791261	0.905445
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive (Positive Predictive Value)	0.913043	0.704913	0.984794
False Positive	0.086957	0.015206	0.295087
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative (Negative Predictive Value)	0.985507	0.943298	0.997486
False Negative	0.014493	0.002514	0.056702
likelihood Ratios:			
[C] = conventional			
[W] = weighted by prevalence <a href="#">[definitions]</a>			
Positive [C]	63	15.824264	250.817351
Negative [C]	0.088235	0.023465	0.331786
Positive [W]	10.5	2.776271	39.711537
Negative [W]	0.014706	0.003714	0.058223
The entry 'NaN' in any of the above cells means that the calculation cannot be performed because the values entered include one or more instances of zero.			
<a href="#">Technical note</a> on calculation of confidence intervals.			

# ANEXO 8

- Utilities
- Clinical Research Calculators
- Probabilities
- Distributions
- Frequency Data
- Proportions
- Ordinal Data
- Correlation & Regression
- t-Tests & Procedures
- ANOVA
- ANCOVA
- Miscellanea
- HOME

*Frequencies of Agreement*

Category	Maximum Possible	Chance Expected	Observed
1	191	112.55	180
2	138	59.55	127
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	---	---	---
7			
8			
<b>Total</b>	<b>329</b>	<b>172.1</b>	<b>307</b>

*Proportions of Agreement*

Category	Maximum Possible	Chance Expected	Observed	.95 CI of Observed	
				Lower Limit	Upper Limit
1	0.9646	0.4071	0.8612	0.8052	0.9036
2	0.9517	0.2665	0.8141	0.7423	0.8701
3	---	---	---	---	---
4	---	---	---	---	---
5	---	---	---	---	---
6	---	---	---	---	---
7					
8					
<b>Composite</b>	<b>0.9792</b>	<b>0.5122</b>	<b>0.9137</b>	<b>0.8771</b>	<b>0.9405</b>

Confidence intervals for proportions are calculated according to the Wilson efficient-score method, corrected for continuity.

[Home](#) Click this link **only** if you did not arrive here via the VassarStats main page.

- Utilities
- Clinical Research Calculators
- Probabilities
- Distributions
- Frequency Data
- Proportions
- Ordinal Data
- Correlation & Regression
- t-Tests & Procedures
- ANOVA
- ANCOVA
- Miscellanea
- HOME

Data Entry

		B								
		1	2	3	4	5	6	7	8	Totals
A	1	180	11	----	----	----	----	----	----	191
	2	18	127	----	----	----	----	----	----	145
	3	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	4	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	5	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	6	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	7	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	8	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Totals		198	138	----	----	----	----	----	----	336

Reset

Calculate

The designation "nc" appearing in any of the following cells means "this quantity cannot be calculated." This will typically occur only when your data entries in the above table include a substantial proportion of zeros.

Unweighted Kappa

Observed Kappa	.95 Confidence Interval	
	Standard Error	Upper Limit
0.8231	0.0314	0.8847
Method 1	0.0314	0.8846
Method 2	0.0314	0.8846

0.9573	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.8598	observed as proportion of maximum possible

- Utilities
- Clinical Research Calculators
- Probabilities
- **Distributions**
- Frequency Data
- Proportions
- Ordinal Data
- Correlation & Regression
- t-Tests & Procedures
- ANOVA
- ANCOVA
- Miscellanea
- HOME

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	11	180	191
Test Negative	127	18	145
Totals	138	198	336

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.589286	0.534462	0.642034
<b>Sensitivity</b>	<b>0.909091</b>	<b>0.857938</b>	<b>0.943717</b>
<b>Specificity</b>	<b>0.92029</b>	<b>0.858519</b>	<b>0.957551</b>

For any particular test result, the probability that it will be:

Positive	0.568452	0.513522	0.621792
Negative	0.431548	0.378208	0.486478

For any particular positive test result, the probability that it is:

<b>True Positive</b> (Positive Predictive Value)	<b>0.942408</b>	<b>0.896612</b>	<b>0.969437</b>
False Positive	0.057592	0.030563	0.103388

For any particular negative test result, the probability that it is:

<b>True Negative</b> (Negative Predictive Value)	<b>0.875862</b>	<b>0.808349</b>	<b>0.922763</b>
False Negative	0.124138	0.077237	0.191651

likelihood Ratios:

[C] = conventional

[W] = weighted by prevalence [\[definitions\]](#)

Positive [C]	11.404959	6.458718	20.139148
Negative [C]	0.098783	0.063512	0.153642
Positive [W]	16.363636	9.210189	29.073083
Negative [W]	0.141732	0.091806	0.218809

# ANEXO 9

- Utilities
- Clinical Research Calculators
- Probabilities
- Distributions
- Frequency Data
- Proportions
- Ordinal Data
- Correlation & Regression
- t-Tests & Procedures
- ANOVA
- ANCOVA
- Miscellaneous
- HOME

Data Entry

		B								Totals
		1	2	3	4	5	6	7	8	
A	1	184	12	----	----	----	----	----	----	196
	2	14	126	----	----	----	----	----	----	140
	3	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	4	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	5	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	6	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	7	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	8	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Totals		198	138	----	----	----	----	----	----	336

The designation "nc" appearing in any of the following cells means "this quantity cannot be calculated." This will typically occur only when your data entries in the above table include a substantial proportion of zeros.

*Unweighted Kappa*

Observed Kappa	.95 Confidence Interval	
	Standard Error	Upper Limit
<b>0.8405</b>		
Method 1	<b>0.03</b>	<b>0.8994</b>
Method 2	0.03	0.8994

0.9877	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.851	observed as proportion of maximum possible

- Utilities
- Clinical Research Calculators
- Probabilities
- Distributions
- Frequency Data
- Proportions
- Ordinal Data
- Correlation & Regression
- t-Tests & Procedures
- ANOVA
- ANCOVA
- Miscellanea
- HOME

*Frequencies of Agreement*

Category	Maximum Possible	Chance Expected	Observed
1	196	115.5	184
2	138	57.5	126
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	---	---	---
7			
8			
<b>Total</b>	<b>334</b>	<b>173</b>	<b>310</b>

*Proportions of Agreement*

Category	Maximum Possible	Chance Expected	Observed	.95 CI of Observed	
				Lower Limit	Upper Limit
1	0.9899	0.4147	0.8762	0.8221	0.9161
2	0.9857	0.2608	0.8289	0.7575	0.8833
3	---	---	---	---	---
4	---	---	---	---	---
5	---	---	---	---	---
6	---	---	---	---	---
7					
8					
<b>Composite</b>	<b>0.994</b>	<b>0.5149</b>	<b>0.9226</b>	<b>0.8873</b>	<b>0.9479</b>

Confidence intervals for proportions are calculated according to the Wilson efficient-score method, corrected for continuity.

- Utilities
- Clinical Research Calculators
- Probabilities
- Distributions
- Frequency Data
- Proportions
- Ordinal Data
- Correlation & Regression
- t-Tests & Procedures
- ANOVA
- ANCOVA
- Miscellaneous
- HOME

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	12	184	196
Test Negative	126	14	140
Totals	138	198	336

Calculate

Reset

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.589286	0.534462	0.642034
Sensitivity	0.929293	0.881799	0.959331
Specificity	0.913043	0.849815	0.952245
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.583333	0.52847	0.63626
Negative	0.416667	0.36374	0.47153
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive (Positive Predictive Value)	0.938776	0.892939	0.966513
False Positive	0.061224	0.033487	0.107061
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative (Negative Predictive Value)	0.9	0.834934	0.942221
False Negative	0.1	0.057779	0.165066

Likelihood Ratios:

[C] = conventional

[W] = weighted by prevalence

[\[definitions\]](#)



UNIVERSIDAD

**SURCOLOMBIANA**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD  
SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS  
CON AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD  
HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA

**[BPIN 2020000100145](#)**

**Carlos Fernando Narvárez**  
**Médico Inmunólogo**  
**Jefe División de Inmunología**  
**[cfnarvaez@usco.edu.co](mailto:cfnarvaez@usco.edu.co)**

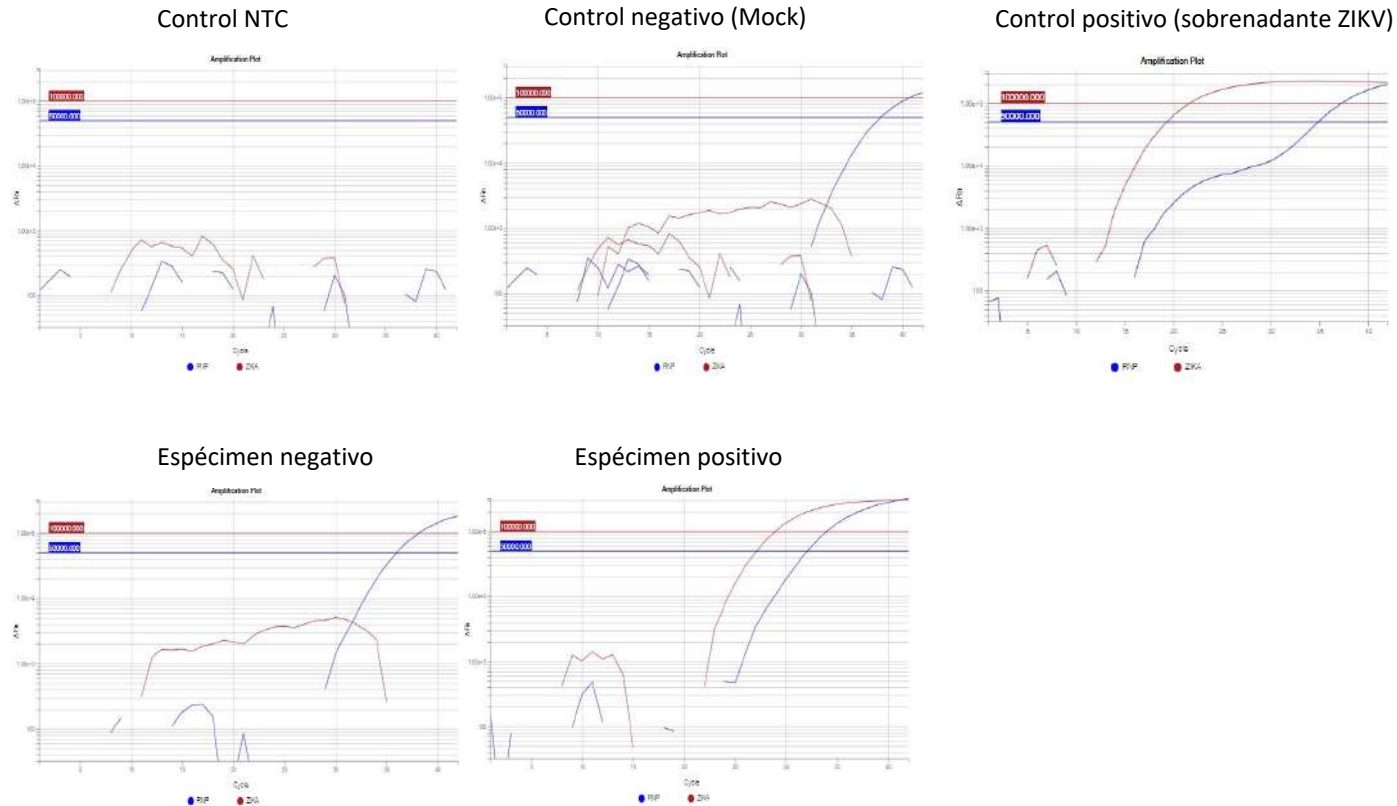
Soporte gráfico  
Séptimo Informe Técnico Trimestral  
Mayo de 2022  
Neiva - Huila

# **SOPORTES EN IMÁGENES DE LA ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN ENSAYO DE RT-qPCR PARA DETECCIÓN DE ZIKV EN MUESTRAS CLÍNICAS**

Carlos Fernando Narváez  
Médico Inmunólogo  
Jefe División de Inmunología  
Facultad de Salud  
[cfnarvaez@usco.edu.co](mailto:cfnarvaez@usco.edu.co)  
Neiva – Huila

Séptimo Informe Técnico Trimestral  
Universidad Surcolombiana  
Facultad de Salud – Programa de Medicina

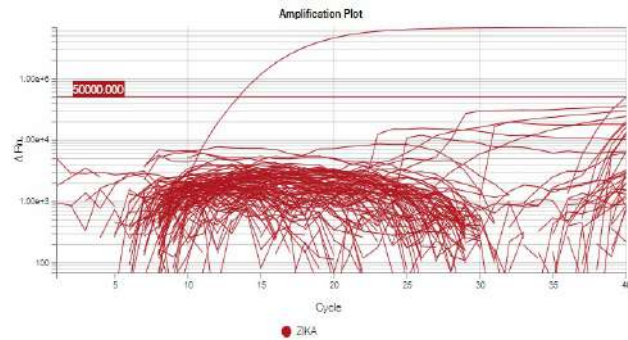
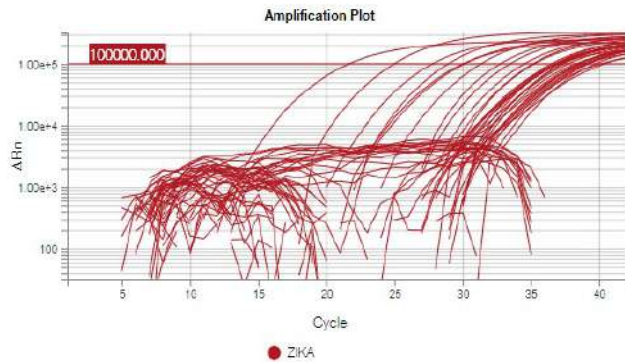
# RT-qPCR para ZIKV



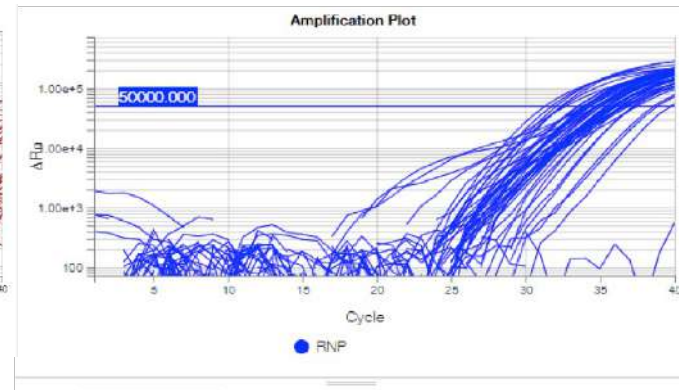
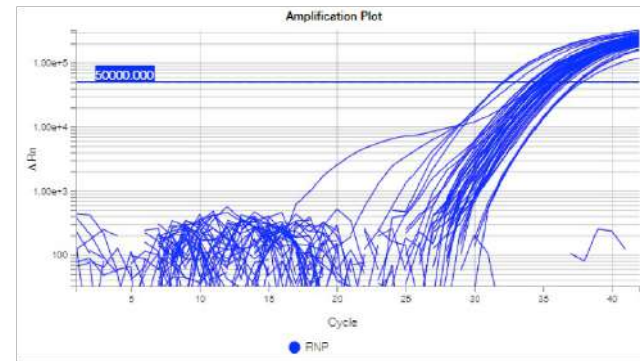
Ejemplo de resultados de controles y especímenes obtenidos durante la validación de la RT-QPCR de ZIKV. Control NTC: Control de reacción, en ausencia de RNA. Control negativo: Sobrenadante de cultivo celular en ausencia de ZIKV. Control positivo: Sobrenadante de cultivo de células infectadas con ZIKV. Parte inferior: ejemplos de especímenes negativo (Izq) y Positivo (der).

# Amplificación de especímenes por RT-qPCR para ZIKV

Amplificación muestras positivas y negativas para ZIKV



Amplificación del gen constitutivo (RNP) en los Especímenes mostrados en la Izquierda.



Ejemplo de resultados de especímenes biológicos probados por la RT-qPCR para ZIKV.



UNIVERSIDAD  
**SURCOLOMBIANA**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## **SOPORTES EN IMÁGENES DE LA ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DEL INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMA PARA DETECCIÓN DE IgM e IgG para ZIKV CIRCULANTE ESPECÍFICA**

Carlos Fernando Narváez  
Médico Inmunólogo  
Jefe División de Inmunología  
Facultad de Salud  
[cfnarvaez@usco.edu.co](mailto:cfnarvaez@usco.edu.co)  
Neiva – Huila

Séptimo Informe Técnico Trimestral  
Universidad Surcolombiana  
Facultad de Salud – Programa de Medicina

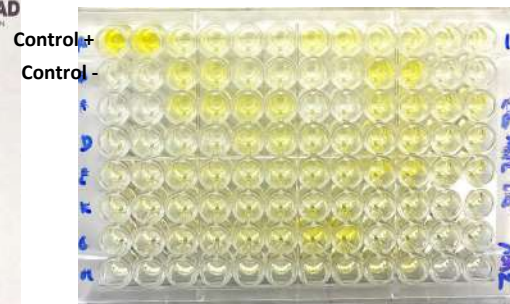
## Validación de ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima para detección de IgM DENV-específica

**A.**  
Confirmados DENV



IgM-DENV

**B.**  
Confirmados DENV



IgM-ZIKV

**C.**  
DENV negativos



IgM-DENV

ELISA para detección de IgM específica de DENV. 45 pacientes con infección confirmada por DENV fueron evaluados por duplicado. A. Detección de IgM DENV. B. Detección de IgM ZIKV específica para probar la reactividad cruzada. C. Pacientes negativos para IgM DENV evaluados por estuche comercial.

# Ensayo de Inmunoabsorbancia Ligado a Enzima para detección de IgM ZIKV-específica

Pacientes sospechosos y confirmados de infección por ZIKV tomadas en 2016



ELISA para detección de IgM específica de ZIKV. 45 pacientes con infección sospechosa o confirmada por ZIKV tomados en el 2016 fueron evaluados por duplicado. A. Detección de IgM ZIKV. B. Detección de IgM DENV1-4 específica para probar la reactividad cruzada. C. Pacientes negativos para IgM ZIKV que correspondieron a voluntarios sanos cuya muestra de plasma fue tomada antes de la llegada del ZIKV a las Américas.

## Estado adecuaciones Laboratorio de Infección e Inmunidad



---

**Antes de la intervención**

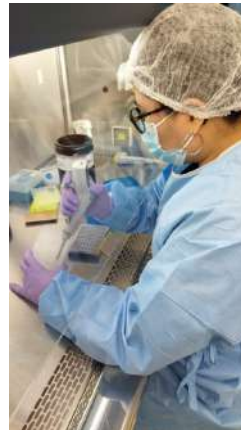
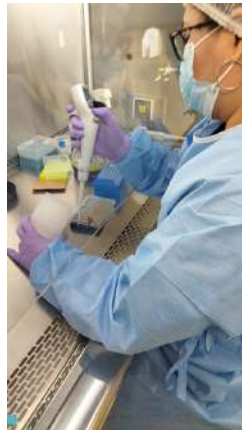


---

**Intervención**

# Transferencia de conocimiento

A.



B.



Personal de la Secretaría de Salud del Huila recibiendo entrenamiento en detección de Flavivirus por RT-qPCR (A), o detección isotipo-específica de anticuerpos circulantes anti-Flavivirus (B.)