



“Revisión bibliográfica sobre los virus Zika, Dengue y Chikungunya y sus métodos de diagnóstico”.

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ, 2022



“Revisión bibliográfica sobre los virus Zika, Dengue y Chikungunya y sus métodos de diagnóstico”.

Elaborado por la estudiante:

NANCY MILENA CORTÉS ÁVILA

Asesor interno:

MAURICIO HUMBERTO RODRÍGUEZ PANDURO Biol. Esp

Asesora externa:

MÓNICA LOSADA BARRAGÁN, M. Sc. Bioquímica, Ph. D en Ciencias
Universidad Antonio Nariño

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ, 2022



“Revisión bibliográfica sobre los virus Zika, Dengue y Chikungunya y sus métodos de diagnóstico”.

APROBADA: _____

JURADOS: _____

ASESOR INTERNO: _____

ASESOR EXTERNO: _____

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ, 2022

DEDICATORIA

La presente monografía va dedicada principalmente a mi mami, por su amor incondicional, apoyo, trabajo y sacrificio en todos estos años ya que con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona a tal punto de ayudarme a convertir en la profesional que soy hasta el día de hoy.

A la Universidad Antonio Nariño y a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por brindarme la oportunidad de hacerme crecer profesionalmente, a mis asesores Mónica Losada y Mauricio Rodríguez, por confiar en mí y ser mis guías en este proceso gracias por su paciencia y apoyo incondicional.

A mi mascota Nala, que a pesar de su enfermedad ha compartido 9 años de vida brindándome amor y compañía. Las largas noches sin que durmieras temprano no han sido en vano, gracias por cruzarte en mi camino y hacerme creer en el amor a primera vista.

A Daniel, quien llegó de una manera totalmente inesperada a mi vida y ha sido parte fundamental para encontrar el equilibrio, amor y confianza que estaba buscando. ¡Hey, eres mi bonita casualidad!

A mis amigos Javier, Álvaro, Diego y Rosemary que con sus deseos y constantes consejos no me dejaron desfallecer ya que han estado presentes en mi crecimiento personal y profesional.

A mis abuelas Ana Julia y Sixta que estuvieron acompañándome en cada paso dado a lo largo de la carrera. Al Dr. Rafael Vargas que sin su motivación no estaría aquí el día de hoy, confirmo hasta este momento que no ha habido mejor médico que él. Son las estrellas más bonitas que tiene el cielo.

Finalmente, infinitas gracias a los profesores que desinteresadamente me brindaron de su conocimiento, en especial a la profe Liliana Caycedo y Hommy Copete quienes nunca dejaron de darme su voz de aliento.

Personas como ustedes no se encuentran fácilmente, es por ello por lo que soy doblemente afortunada de tenerlos en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

1. ANTECEDENTES	13
1.1 Virus del Zika.....	13
1.2 Virus del Dengue.....	14
1.3 Virus del Chikungunya.....	17
2. MARCO TEÓRICO.....	19
2.1 Generalidades del ZIKV.....	19
2.1.1 Taxonomía del ZIKV.....	19
2.1.2 Estructura del virus.....	19
2.1.3 Genoma del virus.....	19
2.1.4 Epidemiología.....	20
2.1.5 Patogénesis	21
2.1.6 Manifestaciones clínicas de la enfermedad	22
2.1.7 Complicaciones en el sistema nervioso	22
2.2 Generalidades del DENV	22
2.2.1 Taxonomía del DENV	22
2.2.2 Estructura del virus.....	23
2.2.3 Genoma del virus.....	23
2.2.4 Serotipos del DENV	24
2.2.5 Epidemiología.....	25
2.2.6 Patogénesis	25
2.2.7 Clasificación de la enfermedad.....	26
2.2.7.1 Fiebre del dengue (FD) o dengue clásico	26
2.2.7.2 Dengue hemorrágico (FHD)	26
2.2.7.3 Síndrome de Choque por Dengue (SCD).....	27
2.3 Generalidades del CHIKV	27
2.3.1 Taxonomía del CHIKV	27
2.3.2 Estructura del virus.....	28
2.3.3 Genoma del virus.....	28
2.3.4 Epidemiología.....	29
2.3.5 Patogénesis	29
2.3.6 Manifestaciones clínicas de la enfermedad	30

2.3.6.1 Fiebre de Chikungunya	30
2.3.6.2 Fiebre aguda.....	30
2.3.6.3 Fiebre crónica.....	30
2.4 Técnicas de diagnóstico para la identificación de ZIKV, DENV y CHIKV.....	31
2.4.1 ELISA.....	31
2.4.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	32
2.4.3 Amplificación mediada por Transcripción (TMA)	34
2.4.4 PCR en tiempo real.....	35
2.4.5 Tipos de muestras	35
3. DISEÑO METODOLÓGICO.....	37
4. RESULTADOS.....	37
5. DISCUSIÓN	40
6. CONCLUSIONES	43
7. BIBLIOGRAFÍA	45

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Genoma del ZIKV	21
Figura 2. Estructura viral y genoma del DENV.....	25
Figura 3. Sección transversal del virus Chikungunya. En el centro está la nucleocápside que contiene a la cadena de ARN. En la superficie se localizan las glicoproteínas E1 y E2 en la envoltura tanto en la bicapa lipídica del virus. A la derecha, un acercamiento a las espículas proteicas de las glicoproteínas de envoltura con sus dominios transmembranosos que interactúan con las proteínas de la cápside.	29
Figura 4. ELISA Indirecta. La placa de 96 pozos se recubre con antígenos específicos, los cuales son reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes. La unión se revela cuando se adiciona un anticuerpo anti-Fc humana conjugado con una enzima. Al agregar el sustrato de la enzima cambia de color el medio.	33
Figura 5. Diagrama que ilustra el procedimiento de la IFA. Después de fijar y permeabilizar las células cultivadas en un cubreobjetos, se añade un anticuerpo primario para detectar el antígeno específico, y el anticuerpo secundario conjugado con la etiqueta de fluorescencia se añade secuencialmente para unirse al anticuerpo primario. La proteína viral en una célula fijada se detecta al microscopio de fluorescencia.....	34
Figura 6. Resumen esquemático de la tecnología de amplificación mediada por transcripción (TMA).....	35

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de pruebas para la detección de CHIKV, DENV, y ZIKV realizados en 12 laboratorios clínicos.....	40
---	----

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Tipos de pruebas diagnósticas para los virus del <i>zika</i> , <i>dengue</i> y <i>chikungunya</i> realizadas en laboratorios clínicos en a. Bogotá, b. Medellín, c. Cali, d. Cartagena	42
--	----



RESUMEN

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA

Revisión bibliográfica sobre los virus Zika, Dengue y Chikungunya y sus métodos de diagnóstico

El zika, dengue y chikungunya son enfermedades tropicales transmitidas por mosquitos infectados por los virus del zika (ZIKV), dengue (DENV) y chikungunya (CHIKV). Estos virus tienen una amplia distribución en la naturaleza, presentando una estrecha relación con las poblaciones humanas. La enfermedad que puede causar cada uno de estos virus en los humanos puede ser muy debilitante, aunque dependiendo de la especie viral, la infección es capaz de provocar desde una encefalitis hasta la muerte.

Según la OPS/OMS, la infección causada por ZIKV, DENV, y CHIKV, pueden generar síntomas comunes tales como cefalea, fiebre, dolores articulares y musculares, afectando a personas de cualquier edad. Debido a que estas enfermedades tienen similitudes en sus síntomas, es difícil dar con un diagnóstico oportuno y de igual manera un posible tratamiento. Por tanto, resulta esencial su identificación para dar un oportuno tratamiento a las personas que se encuentran infectadas, con el fin de prevenir posibles malformaciones congénitas. En conjunto, un tardío e impreciso diagnóstico genera un aumento en las comorbilidades de las personas infectadas y una sobrecarga para los sistemas de salud del país.

Con el paso del tiempo han surgido varios métodos de detección, entre los cuales se destacan los métodos serológicos y moleculares. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se encuentran en el grupo de las pruebas serológicas. Por otra parte, en las pruebas moleculares se distinguen la amplificación mediada por transcripción (TMA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

Es por ello por lo que con esta monografía se espera realizar una revisión documental de las técnicas de diagnóstico de ZIKV, DENV y CHIKV, identificando y comparando diferentes parámetros entre cada una de ellas.

PALABRAS CLAVE: enfermedad tropical, infección, virus zika, virus dengue, virus chikungunya, *Aedes aegypti*, diagnóstico, ELISA, IFI, TMA, PCR en tiempo real.

Estudiante: Nancy Milena Cortés Ávila.

Docentes: Mónica Losada, Mauricio Rodríguez.

Institución: Universidad Antonio Nariño, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Abril 2022

INTRODUCCIÓN

El virus Zika (ZIKV) es un virus del género *Flavivirus* perteneciente a la familia *Flaviviridae*, clasificado en el grupo IV según la clasificación de Baltimore. El ZIKV tiene un ARN monocatenario con envoltura, con polaridad positiva que codifica 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales. Este virus fue identificado por primera vez en África en 1947 en un mono Rhesus (*Macaca mulatta*) y permaneció latente durante varias décadas hasta el 2007 donde reapareció en las Islas de Yap, Micronesia (1–3).

El ZIKV es transmitido por la picadura de mosquitos infectados y se ha asociado a complicaciones neurológicas como el síndrome de Guillain-Barré (GBS) y malformaciones en el recién nacido causando microcefalia (4,5). La infección causada por el virus del Zika se caracteriza por ser una enfermedad febril sistémica particularmente con fiebre de corta duración, conjuntivitis, erupciones cutáneas y artralgia. En países endémicos la detección del ZIKV es más compleja porque hay diferentes arbovirus circulando en el ambiente. Por lo tanto, los síntomas inespecíficos impiden dar un diagnóstico diferencial (4,6).

Debido a la falta de métodos serológicos precisos para la identificación de la infección causada por este virus, hace que sea complejo determinar la carga viral y la tasa de infecciones asintomáticas. Así mismo, se dificulta determinar la incidencia de síndrome congénito de Zika y por último identificar las futuras complicaciones neurológicas que puede presentar el paciente asociadas a la infección causada por ZIKV (2).

Por otra parte, el dengue es una enfermedad aguda causada por el virus del dengue (DENV), el cual pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. El DENV es un virus de ARN de cadena positiva y se encuentra categorizado en el grupo IV según la clasificación Baltimore. Genéticamente existen 4 serotipos distintos, los cuales pueden producir diferentes niveles de gravedad de la enfermedad, que pueden ir desde una fiebre leve hasta una hemorragia leve o mortal (7). El dengue es una enfermedad transmitida por mosquitos infectados de la especie *Aedes aegypti* y en menor medida *Aedes albopictus*, los cuales han sido los vectores principales durante varias décadas (8,9).

Asimismo, el virus Chikungunya (CHIKV), perteneciente al género *Alphavirus* de la Familia *Togaviridae*, es un virus de ARN de cadena positiva con envoltura ubicado en el grupo IV según

la clasificación Baltimore. Su genoma codifica para cuatro proteínas no estructurales y tres proteínas estructurales. El CHIKV es el agente etiológico de la fiebre del Chikungunya (CHIKF) que ha tenido gran impacto en África, Asia e India. Aunque rara vez amenaza la vida de quien lo posee, los síntomas que pueden presentar los pacientes pueden ser gravemente incapacitantes, es decir, hace que los pacientes no puedan realizar tareas cotidianas. Este virus es transmitido por la picadura de los mosquitos infectados de la especie *Ae. aegypti* (10,11).

Debido a que la sintomatología causada por estos virus es similar entre sí, en algunas ocasiones existen errores en el diagnóstico oportuno, lo que conlleva a retrasar un posible tratamiento para el paciente. Los virus anteriormente mencionados son unos de los más importantes a nivel mundial en términos de mortalidad, morbilidad y afectación económica. Entre algunos métodos conocidos para la detección de los virus se encuentra el aislamiento viral y la detección de anticuerpos por ELISA, pero esta estrategia puede generar reacciones cruzadas lo que conllevaría a dar un mal manejo del tratamiento del paciente y posibles complicaciones para el mismo. De igual manera, la obtención de resultados tardíos generará una progresión en el estado del paciente.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar una revisión documental sobre los virus Zika, Dengue y Chikungunya y sus métodos inmunológicos y moleculares de diagnóstico en Colombia.

Objetivos específicos

- Presentar una revisión bibliográfica actualizada sobre las generalidades y características de los virus ZIKV, DENV y CHIKV.
- Identificar las técnicas inmunológicas y moleculares de diagnóstico empleadas en cuatro (4) ciudades para la detección de los virus ZIKV, DENV y CHIKV.
- Comparar los diferentes métodos de diagnóstico inmunológicos y moleculares para la detección de los virus ZIKV, DENV y CHIKV.

1. ANTECEDENTES

1.1 Virus del Zika

El desarrollo de métodos para la identificación del ZIKV se ha descrito desde hace varias décadas. Una de las primeras descripciones realizadas estuvo a cargo por Dick y colaboradores en 1952. Su idea inicial era aislar por medio de los mosquitos el virus de la fiebre amarilla (YF), por lo que realizó una serie de capturas por al menos 24 horas, en el bosque Zika, ubicado en Uganda. Donde se utilizaron como objeto de estudio a monos Rhesus a los cuales les tomaban la temperatura diariamente. Notaron que uno de los monos empezó a aumentar la temperatura gradualmente llegando a los 40°C y al cabo de 3 días lo llevaron al laboratorio donde estuvo bajo observación por 30 días, los únicos hallazgos anormales que notaron fue el estado febril leve. Le tomaron una muestra de sangre y el suero se lo inyectaron a un grupo de ratones por vía intracraneal e intraperitoneal. El grupo de ratones a los que se inoculó el suero por vía intraperitoneal no mostraron ninguna anomalía durante un periodo de observación de 30 días. El agente aislado en los ratones se denominó como virus Zika (12).

La amenaza global que puede causar el ZIKV es inevitable, teniendo en cuenta que el vector puede proliferar rápidamente, a esto se le suma el hecho de que las áreas tropicales y subtropicales favorecen su reproducción y afectación. Una gran epidemia depende de la ecología local, la inmunidad de la población y la demografía de la región. Cuando el ZIKV invade con éxito, la amenaza puede ser temporal y el virus puede extinguirse localmente, como parece haber sido el caso en la isla Yap y la Polinesia Francesa, o, por el contrario, puede persistir endémicamente, como parece ser el caso de regiones de África y Latinoamérica. Varios grupos de investigadores han intentado mapear el rango global potencial que tiene el ZIKV basándose en los datos disponibles actualmente. Estos mapas se han logrado construir teniendo en cuenta los factores ambientales, la abundancia de vectores y socioeconómicos. Con los datos relacionados con la isla de Yap y la Polinesia Francesa, se estima que entre un 73,2 a 99,9% sería la población en riesgo de infectarse debido a un brote incontrolado (13).

Colombia cuenta con una población aproximada de 48 millones de habitantes, las especies de mosquitos que se encuentran con mayor frecuencia en el territorio son *A. aegypti* y *A. albopictus* en una menor proporción. La transmisión del ZIKV también puede ocurrir de la madre al feto y

por transmisión sexual. La incidencia en Colombia descrita por Pacheco y colaboradores fue estimada a partir del sexo, la edad, la distribución geográfica, los resultados de embarazo, fecha y aparición de los síntomas por 100.000 habitantes. El intervalo de confianza fue un 95%. También se evidenció que la incidencia tuvo una prevalencia 3 veces más alta entre las niñas y mujeres entre 15 y 29 años que los niños y hombres de la misma edad (14).

El diagnóstico serológico del ZIKV es un desafío, porque se presentan reacciones cruzadas con otros Flavivirus. Entre los métodos utilizados actualmente para la detección del ZIKV, se ha empleado la técnica PCR en tiempo real, como lo nombra Faye y colaboradores. La descripción brindada sobre una rRT-PCR de un solo paso para detectar el ZIKV pueden abrir un camino a realizar más posibles estudios con esta técnica molecular (6).

De igual manera, en diversos estudios realizados para la detección del ZIKV se ha usado la saliva como fuente de RNA viral. Al usar este tipo de muestra el ARN del ZIKV se detecta con más frecuencia que en muestras de sangre. Notablemente, la ventana de detección para las muestras de orina no aumenta en contraste con otras muestras. Además, la detección de ARN de arbovirus en orina permanece más tiempo que en la sangre para ZIKV, DENV y virus del Nilo Occidental (WNV) esto puede asociarse a en las etapas tardías de la enfermedad. En este estudio, los autores recomiendan recolectar muestras de sangre y saliva en la fase aguda para aumentar la sensibilidad de la detección molecular (15).

1.2 Virus del Dengue

Los primeros estudios realizados en el DENV, estuvo a cargo de Hotta y colaboradores en 1952, quien inoculó sangre heparinizada extraída de pacientes con el DENV a ratones, 48 horas después del primer pico febril. Los primeros síntomas que notaron en los ratones infectados eran debilidad, parálisis o temblores. En las patas traseras se observaba esta parálisis de tipo flácido. Asimismo, se pudo demostrar la presencia del virus en la sangre de los ratones infectados por vía intracerebral. Además, estos ratones tuvieron cambios significativos macroscópicamente, entre ellas se observaron pequeñas petequias en las meninges o en la superficie de los pulmones. En los demás órganos, en general, las paredes de las venas y arterias estaban afectadas. Para confirmar que era el DENV, revisaron la histopatología, la incubación en medios bacterianos y las pruebas de

filtración con emulsiones cerebrales de ratones y así pudieron llegar a la conclusión que era el patógeno buscado (16).

La mayoría de la población mundial vive en países donde el DENV es endémico y se ha extendido rápidamente, debido a que algunas veces los casos de pacientes que padecen esta infección no se reportan, dificultando la identificación del alcance real que posee. Se estima que el número anual de casos sintomáticos en todo el mundo alcanza hasta los 96 millones. Los estudios publicados sobre la carga económica son escasos, y sólo están disponibles para una pequeña parte de los países endémicos. Uno de los principales desafíos que ejerce la carga del DENV es conocer el número real de casos. Se han buscado métodos certeros y comparables que brinden estrategias de prevención y control. Para estimar el número de infecciones mortales por el DENV, Shepard y colaboradores recopilaron los casos reportados entre el 2000 y 2014 donde calcularon la relación entre las muertes y los casos notificados. Obtuvieron datos totales anuales de 45 países, donde tuvieron en cuenta los costos a corto plazo donde aquí se ve reflejado los episodios de dengue no mortales, es decir, el costo médico y no médico, el costo indirecto al tiempo perdido mientras se padeció esta infección. También, se obtuvieron los costos a largo plazo, es decir, los episodios mortales debido a este virus. Los resultados arrojados en este estudio indicaron que el 95% (58 millones) de los casos por DENV ocurrieron en 2013 en 141 países, entre los cuales 10 millones fueron tratados en el ámbito hospitalario, 28 millones fueron atendidos ambulatoriamente y 20 millones restantes permanecieron fuera del sistema de salud. De acuerdo con las estadísticas proporcionadas se estimó que había una proporción de una muerte por cada 5991 casos. De acuerdo a esto se determinó un total mundial de 13 586 muertes por DENV en el 2013 (17).

Colombia está ubicado en el noroeste de América del Sur, es un país tropical y esto genera alta incidencia de DENV. Entre 1980 y 2007 se reportaron 752.429 casos prevaleciendo los serotipos DENV-2, DENV-1 y DENV-4, en cambio el serotipo DENV-3 se informó por primera vez en 1975 con un solo caso, después en el 2001 se volvió a reportar y desde entonces se han documentado con frecuencia desde ese año en adelante. Entre el 2011 y 2017, se reportó al sistema de información en vigilancia epidemiológica un total de 175.834 casos. Y en el 2019, se notificaron 127.553 nuevos casos de dengue, siendo este el año con más casos en la historia regional. Nuestro país cuenta con 32 municipios donde 6 de ellos reportan más de la mitad de los casos, entre los cuales están Valle del Cauca, Santander, Norte de Santander, Antioquia y Tolima. Según Jiménez

y colaboradores en Santander el serotipo más prevalente es el DENV-3, además, la mayoría de los casos reportados son de esta zona del país. Dado que la transmisión de DENV es similar a otros arbovirus, los altos niveles de intercambio viral son consistentes con el rápido y reciente establecimiento del ZIKV y CHIKV en la región (18–21).

El diagnóstico del DENV en la actualidad es una necesidad que tiene la salud pública y aún más conocer métodos que permitan un diagnóstico temprano de la infección. Con ello, su principal utilidad actualmente consta de la detección de la circulación de alguno de los serotipos que posee en un área geográfica en especial, para la determinación de una incidencia por la infección causada por el DENV, se necesitan métodos sensibles, específicos, rápidos, económicos que permitan proporcionar de manera oportuna el diagnóstico del paciente (22,23).

Entre los diversos estudios se han realizado para la detección cuantitativa del DENV, en uno de ellos se diseñó una sonda de ADN fluorescente específica para la región no codificante 3' distal conservada del virus del dengue serotipo 2 y un par de cebadores, el objetivo de este estudio fue formular una reacción en cadena de la polimerasa específica para este virus. Adicionalmente, se utilizó un cebador de transcripción inversa para poder generar ADNc a partir del ARN viral de DENV. Este ensayo de RT-PCR fluorogénica fue un éxito como lo describió Houg y colaboradores ya que se detectó fácilmente la viremia en sueros de muestras de pacientes con dengue (24).

Debido a las manifestaciones clínicas en común que el CHIKV y el DENV poseen Laoprasopwattana y colaboradores implementaron dos métodos de comparación tales como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) o la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), dando como resultado que las pruebas de antígenos específicos podrían ser útiles para diferenciar el CHIKV del DENV, si se encuentran disponibles en el lugar, pero se inclinan más por la RT-PCR ya que esta cuenta con mayor sensibilidad y especificidad de detección (25).

Además, se han elaborado estudios en los cuales toman diferentes muestras, una de ellas es la que describe Hirayama y colaboradores, en la cual evaluó la detección del genoma del DENV en muestras de orina como una prueba de diagnóstico de laboratorio adicional o alternativa, utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real, ya que por su alta sensibilidad podrían tener resultados más certeros, así mismo, mientras hacían el estudio se fue comparando la detección entre el suero y la orina (26).

1.3 Virus del Chikungunya

El CHIKV, fue descrito por primera vez en 1952, en Tanzania, desde entonces se han registrado brotes recurrentes, aún más cuando la temporada de lluvias aumenta en la zona, como el caso registrado en 1984 en Myanmar, Birmania. Donde 1548 niños fueron ingresados al Hospital de Niños de Yangon, uno de los síntomas en común que tenían estos menores era la fiebre hemorrágica. Al realizar estudios descartaron que fuera infección por el DENV. Se realizó una (ELISA) ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima para la detección de anticuerpos IgM, obtuvieron un 90% de concordancia entre las pruebas de ELISA y las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI). Se pudo identificar a los portadores de infección aguda causada por el CHIKV, utilizando el método ELISA. En el momento no hubo resultados de falsos positivos utilizando esta técnica, sin embargo, esto no quiere decir que al realizar esta prueba no haya este tipo de resultados. Por medio de esta prueba, 103 muestras de las 163 recolectadas, indicaron que eran pacientes portadores del CHIKV, 4 tenían posibles infecciones con DENV y CHIKV, 16 tenían DENV y finalmente 30 no tenían infecciones por ninguno de estos dos virus, no se aclara el por qué no se pudo realizar un diagnóstico para 10 pacientes (27).

El CHIKV, se ha propagado rápidamente, mostrando una distribución en más de 60 países. En 2004 se registró un brote en Kenia, donde se propagó a lugares cercanos del Océano Índico. Dos años después, en la isla Reunión, se registraron alrededor de 500.000 casos. A la India llegó y permaneció por varios años, afectando a casi 1,5 millones de personas. El desplazamiento de viajeros alrededor de estos lugares causó que el virus se propagara hacia Tailandia, Maldivas, Sri Lanka, Myanmar e Indonesia. En Italia llegó el CHIKV en el 2007, siendo el primer caso registrado en Europa, posteriormente se registraron 197 casos más. Los viajeros portadores de este virus fueron los principales causantes de la llegada del CHIKV a Estados Unidos, Taiwán y Europa. Por esta misma razón, en el 2013 se registró el primer caso en las Américas en la Isla caribeña de San Martín, después de esto se expandió por toda la región. En este mismo año el Centro europeo lanzó una alerta ya que los países más afectados fueron Francia, Reino Unido y Alemania registrando 1500 nuevos casos. A finales del 2014, se registraron brotes en islas del Pacífico. En las Américas, los países más afectados y donde se notificaron más casos fueron Colombia, Brasil y Bolivia donde sumaban aproximadamente 300.000 presuntos casos. En el 2017, el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC), notificó 548 casos en 10 países, entre los

cuales, Italia se confirmó más del 50% de ellos. La fiebre del Chikungunya ha afectado más a las regiones de las Américas y Asia (28).

En Colombia, se reportó el primer caso importado de CHIKV en el 2014. La incidencia que presentó el país a causa del CHIKV en poblaciones urbanas fue de 72,4 casos por 100 000 habitantes, de los cuales se reportaron 12 muertes asociadas a este virus. Según los datos brindados por SIVIGILA, en el 2017 se notificaron 1128 posibles casos, de los cuales 34 fueron confirmados por laboratorio, 1050 se confirmaron por medio clínico y se tuvieron 44 casos sospechosos. Como se ha descrito anteriormente, nuestro país posee zonas tropicales y subtropicales, esto hace que sea una de las principales causas para que el CHIKV se encuentre en estas zonas, entre las cuales los departamentos con mayor incidencia se encontraron Guaviare, Putumayo, Cundinamarca, Casanare y Tolima (29,30).

Nuestra nación, se describe como un país hiperendémico para la transmisión de DENV, situación que se complicó con la llegada de CHIKV seguida de la circulación de ZIKV. La combinación de la circulación de estos virus patógenos aumenta el desafío con respecto a la confirmación de los casos teniendo en cuenta la similitud clínica, además, la reactividad cruzada que pueden generar las pruebas serológicas, es por ello que se quiere generar una importancia en la detección temprana para estos virus (14,31,32).

En la actualidad, para realizar la descripción de las características de replicación del CHIKV, la entrada viral y la sensibilidad de los interferones se debieron realizar numerosos ensayos para seguir la replicación viral, de esta manera Sourisseau y colaboradores dieron como resultado una visión general de la interacción del virus con el huésped mamífero (33). Adicionalmente, se describió por primera vez un panel de anticuerpos monoclonales reactivos a la glicoproteína E2 que presenta envoltura del CHIKV. Para que esto fuera posible Bréhin y colaboradores expresaron una proteína E2 soluble recombinante en células *Drosophila* S2 (10).

Uno de los métodos más utilizados para la detección y cuantificación del CHIKV, es la RT-PCR en tiempo real, como lo describe Waggoner, al utilizar esta prueba molecular para la detección y diferenciación de DENV y CHIKV. Donde se utilizaron 182 muestras de suero de casos sospechosos en Managua, Nicaragua. Gracias a este método molecular, se realizó la detección de DENV en 81 pacientes y 54 muestras positivas para CHIKV. Al combinar una prueba que reduce

el tiempo y el costo, esto mejora la rapidez para poder dar un diagnóstico oportuno y certero al paciente (34).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades del ZIKV

2.1.1 Taxonomía del ZIKV

A continuación, se presentará la taxonomía del ZIKV teniendo en cuenta los parámetros del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (35).

Familia: *Flaviviridae*

Género: *Flavivirus*

Especie: Zika

Clasificación de Baltimore: IV

2.1.2 Estructura del virus

El ZIKV es un arbovirus con envoltura que contiene ARN. Es un virus de ARN monocatenario con un genoma de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb. Posee un marco de lectura abierto que es capaz de codificar una poliproteína con tres componentes estructurales como la cápside (C), la premembrana (prM) o membrana (M) y la envoltura (E). Adicionalmente, codifica 7 proteínas no estructurales NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, y NS5 que están involucradas en la replicación, ensamblaje y antagonismo de la respuesta innata a la infección (36).

2.1.3 Genoma del virus

La cápside tiene la función principal de unirse al ARN para la formación de la nucleocápside, brinda ayuda durante la estabilización y la secreción de la proteína E. Esta cápside está involucrada en la patogénesis de infecciones como el dengue severo secundario. Por otra parte, la proteína E, se encarga de ser receptor de adherencia y fusión de la membrana, participando en la invasión celular. Así mismo, la función de la proteína no estructural NS1 es la replicación viral, ya que se

localiza en la superficie celular y es secretado extracelularmente, produciendo trombocitopenia, daño endotelial, induce apoptosis y también está involucrada en la modulación de la señalización del sistema inmune innato (Figura 1) (37).

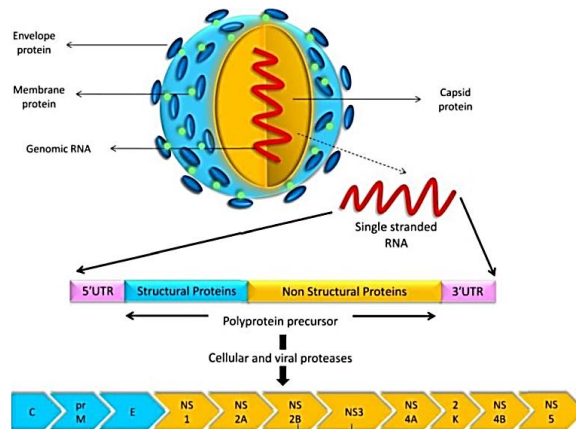


Figura 1. Genoma del ZIKV

Tomado de: noerasuficientecondengueychiku.pdf [Internet]. [citado 7 de abril de 2021]. Disponible en: http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portaIIG/home_148/recursos/seminarios/05042016/noerasuficientecondengueychiku.pdf

2.1.4 Epidemiología

La amenaza global que puede causar el ZIKV es inevitable, teniendo en cuenta que el vector puede proliferar rápidamente, a esto se le suma el hecho de que las áreas tropicales y subtropicales favorecen su reproducción y afectación (13,38).

En mayo del 2015, Brasil notificó por primera vez una transmisión por mosquitos confirmada, después del informe emitido sobre microcefalia, las autoridades sanitarias de la Polinesia Francesa reportaron malformaciones congénitas del sistema nervioso central en fetos y recién nacidos durante el brote de Zika reportado en la isla (39,40).

Por otra parte, Colombia en el 2015 notificó la confirmación de la transmisión local de ZIKV transmitida por mosquitos, después de ello gran parte de América del Sur, el Caribe, América Central y algunas partes de América del Norte notificaron transmisiones (39). Desde septiembre de 2015 a marzo de 2016 se reportaron 58.838 casos de infección por ZIKV de los cuales 2.361

casos fueron confirmados por laboratorio, 49.211 diagnosticados por criterios clínicos y 7.266 sospechosos (14,41). Colombia vio la llegada de un segundo arbovirus emergente en el territorio teniendo en cuenta que el primero fue el chikungunya en el 2014 (42).

En el 2016, Colombia se convierte en el segundo país con más casos de infecciones reportados después de Brasil (43). La población más afectada estuvo en el rango de 25 a 39 años (44). Al igual que otros países afectados por el ZIKV se ha observado el aumento del síndrome de Guillain-Barré (SGB), la microcefalia y la encefalitis, ya que son problemas de salud pública nuevos y emergentes en Colombia (45). En la semana epidemiológica 3 de 2021, las ciudades donde más se presentaron casos fueron Cali, Tolima, Cartagena y Medellín (46).

En la región de las américas, entre la semana epidemiológica 1 y 22 de 2021, se han reportado 6.012 casos de zika (47).

2.1.5 Patogénesis

El ZIKV se transmite por la picadura de un mosquito infectado de género *Aedes spp.*, el cual adquiere el virus durante la ingestión de sangre contaminada y se replica en el cuerpo del artrópodo, el cual llega a la glándula salival y se inyecta en la siguiente ingesta en el nuevo huésped. La piel, es el primer sitio de replicación viral, en donde los fibroblastos dérmicos, los queratinocitos epidérmicos, las células dendríticas inmaduras, células madre neurales, células precursoras de oligodendrocitos, células de la cresta neural craneal, neuronas, astrocitos, células de la retina y del nervio óptico, células placentarias, como trofoblastos, macrófagos residentes en el cerebro, macrófagos placentarios como las células de Hofbauer son permisivas a la infección y replicación del virus (48).

Después de haber ingresado a la piel, el virus se propaga por el ganglio linfático, donde se amplifica y se disemina por medio de la sangre a los tejidos periféricos y órganos viscerales, iniciando las manifestaciones clínicas entre las cuales se encuentra exantema, prurito, fiebre, artralgia, cefalea, conjuntivitis, entre otros (49).

Posteriormente de la endocitosis del virus, el ARN se libera en el citosol de la célula infectada. La infección y la replicación del ZIKV provocan un reordenamiento masivo de las estructuras celulares (50). Con ello, da como resultado la formación de un área conocida como fabrica viral

(FV), el cual es un retículo endoplásmico que contiene vesículas lumbales denominadas orgánulos de replicación (OR). Es así, dos membranas separan el lumen del orgánulo de replicación del citosol, donde la membrana externa es parte del retículo endoplásmico y la membrana interna es una vesícula luminal del retículo endoplásmico. Generalmente, se dice que las vesículas se forman por invaginación de la membrana del retículo endoplásmico, además, son el sitio de replicación del ARN viral debido a su medio óptimo para la síntesis de ARN viral, protegiendo al ARN viral de los receptores de reconocimiento de patrones citosólicos (51). No obstante, el ZIKV puede evadir estos procesos que usualmente llevan a una muerte celular (52).

2.1.6 Manifestaciones clínicas de la enfermedad

Los pacientes con enfermedad del zika se caracterizan por presentar fiebre, cefalea, conjuntivitis no pruriginosa y no purulenta, erupción cutánea maculopapular pruriginosa y artralgia que puede presentar edema en las pequeñas articulaciones de las manos y pies, dolor de espalda, mialgias, manifestaciones digestivas como diarrea, estreñimiento y dolor abdominal (53,54).

2.1.7 Complicaciones en el sistema nervioso

Entre las complicaciones que puede presentar el sistema nervioso está el síndrome de Landry-Guillain-Barré-Strohl, más conocido como Síndrome de Guillain-Barré (SGB), el cual es una polirradiculopatía aguda autoinmune, que suele afectar las raíces nerviosas de la médula espinal y los nervios periféricos (55). Como consecuencia produce parálisis motora simétrica, con o sin pérdida de la sensibilidad y rara vez hay alteraciones de tipo autonómico. La debilidad muscular se va deteriorando alrededor de un par de semanas después de que inicie el cuadro infeccioso, ésta debilidad suele aparecer primero en los pies y las piernas, después puede subir hacia los brazos y la cabeza, aunque se han reportado casos en donde el inicio de la debilidad empieza por los brazos y avanza hacia las extremidades inferiores (56).

2.2 Generalidades del DENV

2.2.1 Taxonomía del DENV

La clasificación correspondiente al DENV se describe de acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (57).

Familia: *Flaviviridae*

Género: *Flavivirus*

Especie: Dengue

Clasificación de Baltimore: IV

2.2.2 Estructura del virus

El DENV es un virus icosaedro que se encuentra conformado por una membrana lipídica derivada de las células huésped. Sobre esta membrana, se insertan las proteínas de membrana y envoltura. En el interior del virus está el complejo riboproteico conformado por la proteína de la cápside y el genoma viral, el cual está conformado por una única hebra de ARN de sentido positivo que codifica para un polipéptido único, éste contiene tanto las proteínas estructurales como las proteínas no estructurales que juegan un papel importante en la replicación del ARN y la unión a la célula huésped (58).

2.2.3 Genoma del virus

El genoma viral del DENV codifica una poliproteína que da lugar a 3 proteínas estructurales (C, E y M), 5 proteínas no estructurales como la NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5, y por último posee dos regiones no traducidas (Figura 2) (59). La función principal de la proteína C es ser el emisor de señales a través de la membrana ya que esto permite la interacción con el ARN viral y adicionalmente, colabora en la formación de la nucleocápside (58,59)

La glicoproteína E está distribuida sobre la superficie del virus y atraviesa la membrana, siendo determinante para el ensamblaje del virión. Además, esta proteína es catalizadora de la fusión de las membranas de las células virales y células diana (60,61). Por otra parte, la proteína M participa en la maduración de la partícula viral (58,62).

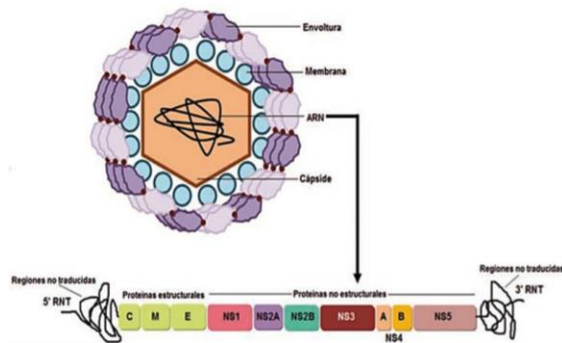


Figura 2. Estructura viral y genoma del DENV

Tomado de: 441942927002.pdf [Internet]. [citado 7 de abril de 2021]. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/4419/441942927002.pdf>

Como anteriormente se ha descrito, existen 5 proteínas no estructurales, la función de la proteína NS1 es participar en el ensamblaje viral, se puede encontrar soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular es por ello por lo que puede estimular al sistema inmune. La proteína NS2 se compone de dos subunidades NS2a y NS2b, mientras que NS2a promueve el ensamblaje y la replicación viral, NS2b está asociada a la membrana y en compañía con NS3 forman un complejo que actúa como cofactor de esta última. La NS4 también da origen a dos subunidades NS4a y NS4b, las cuales participan principalmente en el anclaje de componentes de la replicasa viral a la membrana celular. La última proteína codificada en el marco de lectura abierta es la NS5, que se encarga de actuar como la única polimerasa durante la replicación y transcripción virales (58,59).

2.2.4 Serotipos del DENV

Existen 4 serotipos del virus del dengue: DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4. Cada uno de ellos cuenta con diferentes genotipos y causan diversas formas de la enfermedad, desde la fiebre del dengue clásico (DF) hasta dengue grave caracterizado por presentar hemorragia y que puede llegar a ser mortal (63,64). Los 4 serotipos circulan habitualmente en áreas endémicas e hiperendémicas y cada uno de ellos causa la enfermedad conocida como dengue (58). Sin embargo, en el 2013, se aisló un quinto serotipo denominado DENV5, se caracteriza porque circula principalmente entre primates y sigue el ciclo selvático (65).

2.2.5 Epidemiología

En Colombia, la incidencia del dengue es alta debido a la influencia de diversos componentes climáticos, factores socioeconómicos y la evolución del virus en el tiempo (66). A lo largo de la historia del dengue en Colombia, se han presentado cuatro picos importantes de casos graves de dengue. El primero registrado en 1997 con 107 casos (correspondiente al 16,3% del total de casos de dengue), seguido de 2006 con 5.408 casos (14,0% del total de casos de dengue), 2009 con 7.131 casos (13,8% del total de casos de dengue), y 2013 con el mayor número de casos graves en el período comprendido entre 1990 y 2020, con 31.113 casos (24,8% del total de casos de dengue) (66). En el 2019, se notificaron 127.553 nuevos casos de dengue, siendo este el año con más casos en la historia regional (18–21). Para el 2020, las autoridades sanitarias de Colombia notificaron 71.995 casos, refiriendo que se ha aumentado los casos del dengue en el país (67).

Según el Instituto Nacional de Salud, Colombia entró en alerta epidemiológica a mediados de septiembre del 2021, por brotes que se han venido reportando en departamentos como Atlántico, Cauca, Casanare, Cesar, Chocó, Córdoba, La Guajira, Magdalena, Nariño, Norte de Santander, San Andrés y las ciudades de Barranquilla, Medellín, Cali, Buenaventura, Cartagena y Santa Marta (68).

2.2.6 Patogénesis

La infección primaria causada por el DENV suele ser asintomática o se manifiesta como una enfermedad febril leve, sin embargo, también puede causar fiebre hemorrágica en algunos pacientes (69). Las células dendríticas y queratinocitos son las primeras células en contacto con el virus, mediante la interacción de la proteína E con las proteínas de la membrana celular que intervienen en la unión y la endocitosis del virus (58). Posteriormente, el DENV se desplaza hacia los ganglios linfáticos donde amplifica y disemina la infección (58,70–72).

El reconocimiento del virus y la activación adecuada de las respuestas antivirales es fundamental para eliminar el virus; no obstante, con el tiempo los virus tienden a sufrir mutaciones favorables para ellos, lo que ayuda a evadir los sistemas de reconocimiento inmunológico del huésped (73). Entre los factores virales y del huésped presentes en la patogenia del DENV se encuentra la variación del genoma del DENV, el ARN subgenómico y la proteína no estructural NS1 (69).

El DENV utiliza la maquinaria celular del huésped para la producción de proteínas virales. La infección causada por el DENV causa estrés en el retículo endoplasmático, el cual genera una reacción celular de supervivencia conocida como respuesta de proteína desplegada (UPR). La UPR es una reacción celular del huésped que neutraliza y alivia el estrés del retículo endoplasmático el cual realiza interacciones complejas con la maquinaria de autofagia celular, mediadores de apoptosis, inmunidad innata y reacciones proinflamatorias (74). Existen tres elementos transmembrana del retículo endoplasmático que detectan las proteínas mal plegadas, entre ellas se encuentra la quinasa residente del retículo endoplasmático similar a la proteína quinasa (PERK), que activa el factor de transcripción 6 (ATF6) y la enzima 1 que requiere inositol (IRE1) (73).

El DENV altera selectivamente este proceso del huésped para mejorar la replicación viral y tiene la capacidad de evadir la inmunidad innata del huésped. Una vez activada la UPR, da como resultado una traducción atenuada del ARN mensajero (ARNm), lo que limita la carga de proteínas en el retículo endoplasmático, un aumento en la capacidad de plegamiento de la proteína del retículo endoplasmático y la degradación del retículo endoplasmático debido a las proteínas mal plegadas (74). El aumento de la producción de proteínas virales en la infección por DENV conlleva a la acumulación de proteínas desplegadas y mal plegadas en el retículo endoplasmático (73).

2.2.7 Clasificación de la enfermedad

2.2.7.1 Fiebre del dengue (FD) o dengue clásico

La fiebre del dengue, también conocida como dengue clásico, se caracteriza porque el paciente presenta cuadros febriles donde pueden tener o no manifestaciones hemorrágicas (75). Algunos de los síntomas acompañados por la fiebre pueden ser cefalea frontal, que suele ser frecuente y cuando se torna intensa puede generar fotofobia, mialgias, artralgias, náuseas, la anorexia es característica debido a los vómitos que puede presentar la persona infectada, entre otros. Un pequeño porcentaje de los pacientes con estos síntomas también pueden presentar hemorragias menores (epistaxis) y trombocitopenia (76,77).

2.2.7.2 Dengue hemorrágico (FHD)

Algunos pacientes después de pasar por un cuadro febril y tener algunos de los síntomas del dengue clásico posteriormente pueden padecer dolores intensos, fiebre alta y la permeabilidad vascular

incrementada, generando pérdida de plasma, hemorragias gastrointestinales, petequias, equimosis, sangrados a nivel de las mucosas, o hematemesis. A este conjunto de manifestaciones se le conoce como Dengue Hemorrágico (FHD), el cual es la manifestación más severa de la infección por el virus del Dengue donde los fagocitos y las células dendríticas son las células diana (77,78).

2.2.7.3 Síndrome de Choque por Dengue (SCD)

Aunque la mayoría de los pacientes se recuperan de una enfermedad febril, una pequeña pero significativa población llega a desarrollar el síndrome de choque por dengue, con muertes asociadas. Se estima que la causa principal del síndrome es la potenciación dependiente de anticuerpos, lo que genera un aumento de la replicación viral, aunque se le atribuye más a las bases inmunológicas que presentan las manifestaciones graves por el dengue (79,80).

Los síntomas suelen presentarse del día 2 al 5 después de que se inicia la fiebre típica de este virus, seguido de presentarse hemorragia pleural, pericárdica o peritoneal, que puede estar acompañado de un sarpullido llamado exantema maculopapuloso, que en la mayoría de las veces se ve en FD o en FHD. Este síndrome tiene un periodo de duración de 1 a 2 días y si el paciente cuenta con el seguimiento requerido, estará sometido a terapia con oxígeno, hidratación y administración de medicamentos (77).

2.3 Generalidades del CHIKV

2.3.1 Taxonomía del CHIKV

Finalmente, la descripción de la clasificación del CHIKV se lleva a cabo con la información del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (81).

Familia: *Togaviridae*

Género: *Alphavirus*

Especie: Chikungunya

Clasificación de Baltimore: IV

2.3.2 Estructura del virus

El virus del Chikungunya (CHIKV), agente etiológico de la fiebre Chikungunya (CHIKF), está constituido por ARN positivo monocatenario con envoltura pequeña, compuesta de aproximadamente 240 copias de heterodímeros de las glicoproteínas transmembranales tipo I, E2 y E1, las cuales forman proyecciones y participan en el reconocimiento del receptor para el virus en la célula diana. Por la parte central del virus, se localiza la cápside viral (82,83).

2.3.3 Genoma del virus

La E1 es una glicoproteína clase II de fusión de membrana activada por pH bajo durante la infección por virus. La E2 es una glicoproteína transmembrana tipo I de envoltura. Estas dos proteínas interactúan con la nucleocápside que tiene forma icosaédrica, ésta se une a la célula hospedera por medio de la glicoproteína E2 (10,84–86). La glicoproteína E2, es responsable de la unión al receptor y E1 de la fusión de membranas, las dos portan los principales determinantes antigénicos (87). Las glicoproteínas PE2 y E1 permanecen unidas formando un heterodímero, que es transportado hacia la membrana plasmática (84).

Las copias de heterodímeros que posee el CHIKV, tienen la capacidad de codificar cuatro proteínas no estructurales NSP1, NSP2 quien juega un papel importante para la replicación del ARN viral y las interacciones entre el virus y el hospedador, NSP3 y NSP4 y tres proteínas estructurales principales como la cápside y las glicoproteínas E1 y E2 en el ARN genómico y subgenómico, que cuentan con una gran capacidad antigénica ya que facilitan la unión a las superficies celulares y la entrada viral (Figura 3) (10,84,85,88).

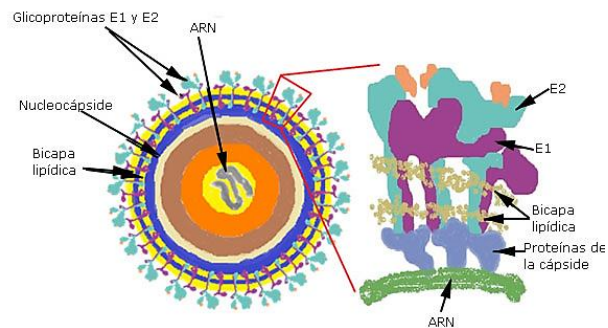


Figura 3. Sección transversal del virus Chikungunya. En el centro está la nucleocápside que contiene a la cadena de ARN. En la superficie se localizan las glicoproteínas E1 y E2 en la

envoltura tanto en la bicapa lipídica del virus. A la derecha, un acercamiento a las espículas proteicas de las glicoproteínas de envoltura con sus dominios transmembranosos que interactúan con las proteínas de la cápside.

Tomado de: med08115.pdf [Internet]. [citado 7 de abril de 2021]. Disponible en:
<http://scielo.sld.cu/pdf/med/v54n1/med08115.pdf>

2.3.4 Epidemiología

El CHIKV, se ha propagado rápidamente, mostrando una distribución en más de 60 países. A finales del 2014, se registraron brotes en islas del Pacífico. En las Américas, los países más afectados y donde se notificaron más casos fueron Colombia, Brasil y Bolivia donde sumaban aproximadamente 300.000 presuntos casos (28).

En Colombia, se reportó el primer caso importado de CHIKV en el 2014. La incidencia que presentó el país a causa del CHIKV en poblaciones urbanas fue de 72,4 casos por 100.000 habitantes, de los cuales se reportaron 12 muertes asociadas a este virus. Según los datos brindados por SIVIGILA, en el 2017 se notificaron 1128 posibles casos, de los cuales 34 fueron confirmados por laboratorio, 1050 se confirmaron por medio clínico y se tuvieron 44 casos sospechosos. Como se ha descrito anteriormente, nuestro país posee zonas tropicales y subtropicales, esto hace que sea una de las principales causas para que el CHIKV se encuentre en estas zonas, entre las cuales los departamentos con mayor incidencia se encontraron Guaviare, Putumayo, Valle del Cauca, Atlántico, Cundinamarca, Casanare y Tolima (29,30).

Para el 2021, en las Américas se reportó un total de 131.630 casos sospechosos, de los cuales 11 fallecieron, todas ellas fueron en Brasil (89).

2.3.5 Patogénesis

Se ha descrito que la patogenia se divide en 3 estadios: intradérmico, sanguíneo y la afectación a los órganos diana. Siendo la piel el principal acceso de entrada del virus por medio de la picadura del mosquito infectado, el cual introduce los viriones en la zona intradérmica y entran a los capilares subcutáneos. Allí la respuesta inmune local es crítica y se realiza la replicación viral local donde los fibroblastos, células epiteliales y macrófagos se ven comprometidos. Después de esto, el CHIKV se dirige a los nódulos linfáticos locales donde ocurre el proceso de replicación,

posteriormente pasa a través del conducto torácico, y al sistema circulatorio quien lo distribuye a órganos diana como el hígado, tejido muscular, articulaciones y cerebro (86,90,91).

A diferencia de las células adherentes, las células B y las células T no son susceptibles a la infección por CHIKV *in vitro* (92).

Las manifestaciones cutáneas suelen ser representativas después del tercer o cuarto día después de haber tenido contacto con el virus (93,94). La respuesta inflamatoria de la piel coincide con niveles elevados de mediadores inmunitarios y la infiltración de células del sistema inmune en las articulaciones infectadas y los tejidos circundantes (90,95).

2.3.6 Manifestaciones clínicas de la enfermedad

2.3.6.1 Fiebre de Chikungunya

La fiebre del chikungunya es una enfermedad que se caracteriza por tener una carga viral muy alta donde el paciente presenta trombocitopenia moderada y linfopenia marcada. Todo inicia por la picadura de un mosquito infectado. El periodo de incubación tarda de 2 a 6 días y se desarrolla en dos fases: aguda y crónica. Algunos de los síntomas que el paciente puede presentar son: fiebre alta, mialgias, artritis generalizadas, cefalea, lumbalgia, artralgia es la manifestación más común y erupción cutánea maculopapular. Ocasionalmente se puede presentar edema facial y dermatitis ampollosa, esta última principalmente en niños (86,96,97).

2.3.6.2 Fiebre aguda

Las personas que están cursando la fase aguda, entre 7 a 10 días, tienden a tener algunos síntomas que se ven reflejados en la carga viral, suelen tener fiebre alta intermitente que se alivia levemente con antipiréticos, erupción cutánea, cefalea, escalofríos, conjuntivitis, fatiga, vómito, dolor muscular y artralgia que se caracteriza por afectar falanges, muñecas y tobillos. De acuerdo a los resultados de laboratorio, también se puede ver que los pacientes presentan leucopenia, linfopenia o trombocitopenia (86,97,98).

2.3.6.3 Fiebre crónica

En esta fase los síntomas pueden durar más de 3 meses deteriorando la salud del paciente. El dolor articular puede prevalecer por años y los síntomas iniciales pueden empeorar hasta convertirse en crónicos, en especial los que comprometen al sistema muscular. En cuanto a la tonalidad de la piel

también se ve afectada apareciendo úlceras intertriginosas, hiperpigmentación, dermatosis y lesiones tipo vasculitis, entre otras (86).

2.4 Técnicas de diagnóstico para la identificación de ZIKV, DENV y CHIKV

Con el desarrollo progresivo de la investigación y su constante necesidad de brindar estrategias en diagnóstico oportunas y eficaces, han surgido técnicas con fundamentos de biología molecular (99). El diagnóstico molecular es un conjunto de herramientas que permiten el diagnóstico de enfermedades por medio del estudio de marcadores biológicos, como proteínas, DNA o RNA en un fluido o tejido. El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido mejorar la sensibilidad, y especificidad en comparación con las pruebas convencionales, convirtiéndolas en herramientas claves para la práctica clínica e investigativa. Además, la detección y cuantificación específica de material genético en una muestra biológica, ha mostrado un significativo impacto en todas las áreas de la salud (100,101).

En el marco del diagnóstico de enfermedades infecciosas virales, los principales métodos de diagnóstico son serológicas y moleculares. Aunque la de mayor distribución es ELISA por su bajo costo, existen otras herramientas moleculares como TMA, IFI y PCR en tiempo real que han surgido para mejorar las estrategias de detección (102). Es por ello, que las tecnologías de diagnóstico novedosas que se pueden realizar en laboratorios son muy necesarias para controlar Infecciones por ZIKV, DENV y CHIKV (103).

2.4.1 ELISA

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) consiste en un inmunoensayo de captura sobre fase sólida, con el fin de detectar anticuerpos, antígenos, proteínas y glicoproteínas en muestras biológicas. La prueba de ELISA se lleva a cabo generalmente en placas de 96 pocillos, lo que permite medir varias muestras en un solo experimento. Estas placas deben ser placas absorbentes especiales ya que se debe garantizar que el anticuerpo o antígeno se adhiera a la superficie (104).

El color se crea por la interacción de un sustrato cromogénico y una enzima que ha sido acoplada al anticuerpo detector. La reacción del antígeno con el anticuerpo se debe realizar en ambientes similares a las fisiológicas, es decir, pH 7.4 y temperatura de 37°C. El conjugado enzimático se

realiza por unión covalente de una enzima con el anticuerpo; esta enzima usualmente suele ser la peroxidasa de rábano. Entre los criterios de selección de la enzima están la toxicidad, estabilidad, disponibilidad, sensibilidad y precio. Finalmente, la lectura se realiza en un espectrofotómetro (105).

ELISA indirecto consta de dos pasos, donde se utilizan dos anticuerpos uno primario y otro secundario, éste último es conjugado con una enzima (Figura 4). Es un método altamente sensible debido a que se puede unir más de un anticuerpo marcado por objetivo de anticuerpo (106).



Figura 4. ELISA Indirecta. La placa de 96 pozos se recubre con antígenos específicos, los cuales son reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes. La unión se revela cuando se adiciona un anticuerpo anti-Fc humana conjugado con una enzima. Al agregar el sustrato de la enzima cambia de color el medio.

Tomado de: ELISA: ¿Qué es? ¿En qué consiste? ¿Cuáles son los distintos tipos de este ensayo y en qué se diferencian? [Internet]. AllScience. 2019 [citado el 18 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/elisa-que-es-en-que-consiste-cuales-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian#:~:text=ELISA%20indirecto%3A&text=En%20este%20m%C3%A9todo%2C%20el%20anticuerpo,una%20amplificaci%C3%B3n%20de%20la%20se%C3%B1al.>

2.4.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La inmunofluorescencia indirecta es una técnica que se basa en la detección de los anticuerpos que reconocen estructuras antigénicas celulares nativas. La interacción se evidencia por medio de un anticuerpo antiinmunoglobulina humana, que va dirigido contra las fracciones constantes (Fc) de las inmunoglobulinas IgG, IgA y/o IgM. Dicho anticuerpo antiinmunoglobulina humano está conjugado a un fluoróforo, como por ejemplo el isotiocianato de fluoresceína (FITC). Cuando se expone a la luz, el tinte fluorescente se estimula y emite una longitud de onda que se puede visualizar con un microscopio de fluorescencia (107–109).

Al ser utilizado con los virus, la inmunofluorescencia indirecta permite detectar y visualizar las proteínas virales expresadas en las células mediante la reacción antígeno-anticuerpo (Figura 5) (110).

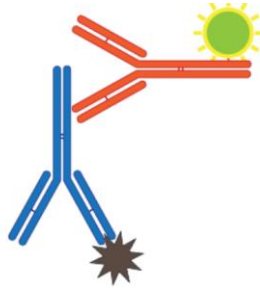


Figura 5. Diagrama que ilustra el procedimiento de la IFA. Después de fijar y permeabilizar las células cultivadas en un cubreobjetos, se añade un anticuerpo primario para detectar el antígeno específico, y el anticuerpo secundario conjugado con la etiqueta de fluorescencia se añade secuencialmente para unirse al anticuerpo primario. La proteína viral en una célula fijada se detecta al microscopio de fluorescencia.

Tomado de: Inmunofluorescencia [Internet]. Exa.unne.edu.ar. 2022 [citado el 27 de enero de 2022]. Disponible en: https://exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/Laboratorio_TPN8.pdf

En primer lugar, hay que saber que las células infectadas por el virus se cultivan en un cubreobjetos. Para visualizar el antígeno, las células se fijan con paraformaldehído para que las proteínas de las células estén preparadas para la unión del anticuerpo. Posteriormente, las células se permeabilizan con un detergente adecuado, como el Triton X-100, luego de ello, se aplica la muestra del paciente para que el antígeno viral sea reconocido por el anticuerpo. Después, se aplica el anticuerpo secundario específico del fragmento Fc de la molécula IgG del anticuerpo primario. Finalmente, teniendo en cuenta que el anticuerpo secundario lleva un colorante fluorescente, el antígeno puede visualizarse mediante el uso de un microscopio de fluorescencia. El requisito de que los anticuerpos demuestren reactividad con patrones de tinción característicos proporciona una especificidad adicional a la interpretación de la prueba (110–112).

2.4.3 Amplificación mediada por Transcripción (TMA)

La TMA involucra la amplificación isotérmica del ARNr por medio de la transcripción inversa y la posterior generación de numerosas transcripciones mediante la ARN polimerasa. Con un cebador específico de secuencia, que también contiene la secuencia promotora de la ARN polimerasa en su extremo 5', se hibrida con el ARN diana para iniciar la transcripción inversa y así crear una copia de ADN (113). Este proceso permite que otro cebador se una a la copia de ADN y se sintetice una segunda hebra de ADN. Ambas cadenas de la molécula de ADN bicatenaria creada ahora contienen secuencias promotoras de la ARN polimerasa y, por lo tanto, esta enzima puede usarla como plantilla e iniciar la transcripción (Figura 6) (114,115).

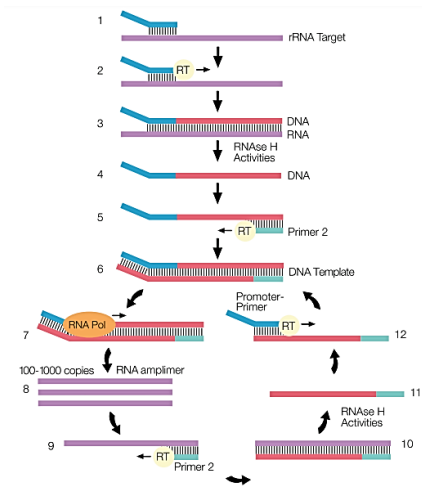


Figura 6. Resumen esquemático de la tecnología de amplificación mediada por transcripción (TMA)

Tomado de: Niesters HGM, van Leeuwen WB. Quantitative Isothermal Molecular Amplification Techniques. En: van Pelt-Verkuil E, van Leeuwen WB, te Witt R, editores. Molecular Diagnostics: Part 1: Technical Backgrounds and Quality Aspects [Internet]. Singapore: Springer; 2019 [citado 14 de julio de 2021]. p. 321-37. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-981-13-1604-3_7

Después de la amplificación, estas copias de ARN se hibridan con una sonda de oligonucleótidos complementaria para su detección mediante una etiqueta quimioluminiscente. Cada ciclo de esta técnica puede generar desde 100 a 1000 copias, por lo cual se traduce en un aumento de 10 mil millones de veces en 15 a 30 minutos (116,117).

2.4.4 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es considerada la técnica molecular más sensible para la detección de ácidos nucleicos (ARN y ADN). Este método se caracteriza porque puede monitorizar la acumulación de amplicones, mediante el cambio en la emisión de fluorescencia de los colorantes fluorescentes de unión al ADN o de los cebadores o sondas marcados con fluorescencia específicos de la secuencia diana añadidos a la PCR (118–120). La PCR en tiempo real utiliza un termociclador el cual es capaz de mantener una temperatura uniforme en todas las muestras, además, debe ser rápido en la transición de temperaturas de una etapa a otra, es decir, la desnaturalización del ADN molde, el alineamiento de los oligonucleótidos y la síntesis (121–123).

La PCR en tiempo real al ser combinada con los sistemas automáticos para la purificación de ácidos nucleicos, genera una variedad de pruebas moleculares para la identificación y cuantificación de microorganismos infecciosos de interés, esto hace que sea un método preciso, de fácil uso, rápido, específico y sensible siendo útil para la investigación y en varios campos de diagnóstico (118,124,125).

Es un método que no necesita análisis posteriores a la amplificación como la electroforesis, esto reduce el arrastre de contaminación hacia la muestra a analizar, por el contrario, se tendrá una representación gráfica de la acumulación del producto del ensayo, por lo general representada como unidades fluorescentes relativas (RFU) (119,126–128).

La PCR en tiempo real puede llevarse a cabo bajo dos formas diferentes, el primero de ellos, implica incluir el paso de transcripción inversa en el mismo tubo que la reacción de PCR (un paso). La segunda manera, implica crear ADNc primero por medio de una reacción de transcripción inversa separada y luego agregar el ADNc a la reacción de PCR (dos pasos) (129,130).

2.4.5 Tipos de muestras

Para el ZIKV, se ha informado que el análisis de sangre completa ofrece una detección más prolongada de la viremia. Además, el virus en suero se va disminuyendo a medida que aparecen los anticuerpos. En el suero, el ZIKV puede detectarse de 3 a 5 días después del inicio de los síntomas y se considera que la carga viral alcanza su punto máximo cuando aparecen los signos clínicos. También se ha descrito que este tipo de virus se elimina en la orina durante más tiempo,

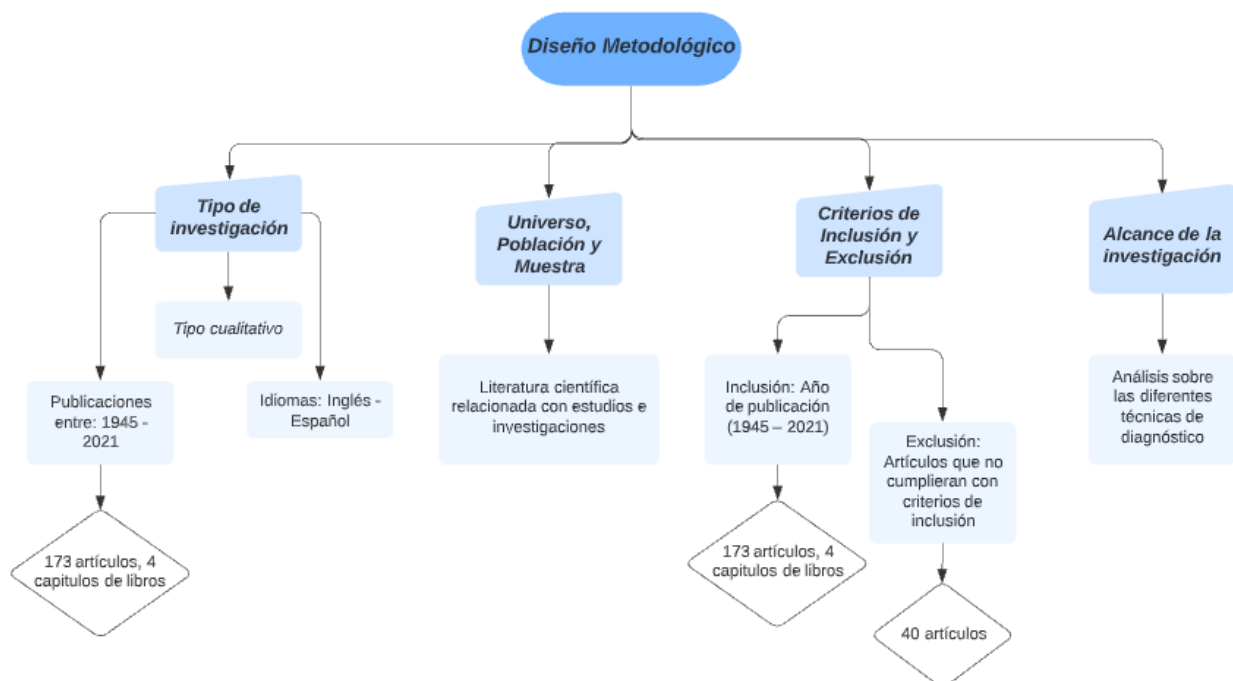
aproximadamente de 7 a 14 días después del inicio, y por lo general tiene un título más alto en la orina que en el suero. Es por esto, que los estudios recomiendan realizar la prueba molecular tanto de orina como de suero.

Adicionalmente, el ARN del ZIKV se ha detectado en leche materna, líquido amniótico y en el semen demostrando que a través de las relaciones sexuales se puede transmitir (131–135). La primera vez que se planteó que el ZIKV se puede transmitir sexualmente, fue en el 2011 por un investigador ya que su esposa se enfermó después de su regreso de Senegal a Estados Unidos (136). Posteriormente, se detectó el ZIKV en la muestra de semen en un hombre de Tahití, luego de padecer una enfermedad febril aguda (137). La mayoría de los casos documentados ha involucrado a un individuo sintomático transmitirlo a uno asintomático (138–140). La duración máxima notificada del ARN del ZIKV detectable en el semen es de al menos 188 días después del inicio de los síntomas (141).

En el caso del DENV, la muestra de elección para la rutina diagnóstica más utilizada es el suero, ya que el virus circula en el torrente sanguíneo durante varios días después del inicio de la enfermedad, aunque se han utilizado otros tipos de muestra como orina, plasma y saliva. Preferiblemente se requiere que las muestras se recolecten los primeros 7 días de presentar los síntomas, ya que es probable que después de ese tiempo, la muestra recolectada no genere un resultado positivo con la PCR en tiempo real (142–148).

La fase febril aguda de la infección causada por el CHIKV pertenece al periodo de la viremia, que dura 5 días aproximadamente después del inicio de la fiebre, durante este periodo de tiempo, se ha encontrado el ARN del CHIKV en diferentes tipos de muestras como: plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, placenta, tejidos frescos y sangre total. La muestra de suero se debe tomar dentro de los primeros 8 días del inicio del cuadro clínico ya bajo este criterio se pueden analizar las muestras con la técnica de PCR en tiempo real, sin que se altere el posible resultado, esto se realiza porque en el periodo de infección aumenta la carga viral en el organismo, siendo de gran ayuda para su detección (149–154).

3. DISEÑO METODOLÓGICO



4. RESULTADOS

De acuerdo con la revisión de portafolios de servicios de 12 laboratorios en las ciudades de Bogotá, Cali, Medellín y Cartagena. En la Tabla 1 se encuentra la información obtenida con esta investigación, en donde se identificó que el ELISA es la prueba rápida más utilizada para detectar anticuerpos IgG e IgM específicos para DENV en todo el país. El valor de la prueba fluctúa entre 49000 y 70000 pesos, aunque la mayoría de los laboratorios no proporciona el costo de cada prueba. El tiempo de entrega del resultado oscila entre 1 y 15 días hábiles dependiendo de la prueba y el laboratorio donde se realice. Entretanto, solo dos laboratorios brindan el servicio de diagnóstico para ZIKV y CHIKV, exclusivamente en la ciudad de Bogotá.

Tabla 1. Tipos de pruebas para la detección de CHIKV, DENV, y ZIKV realizados en 12 laboratorios clínicos.

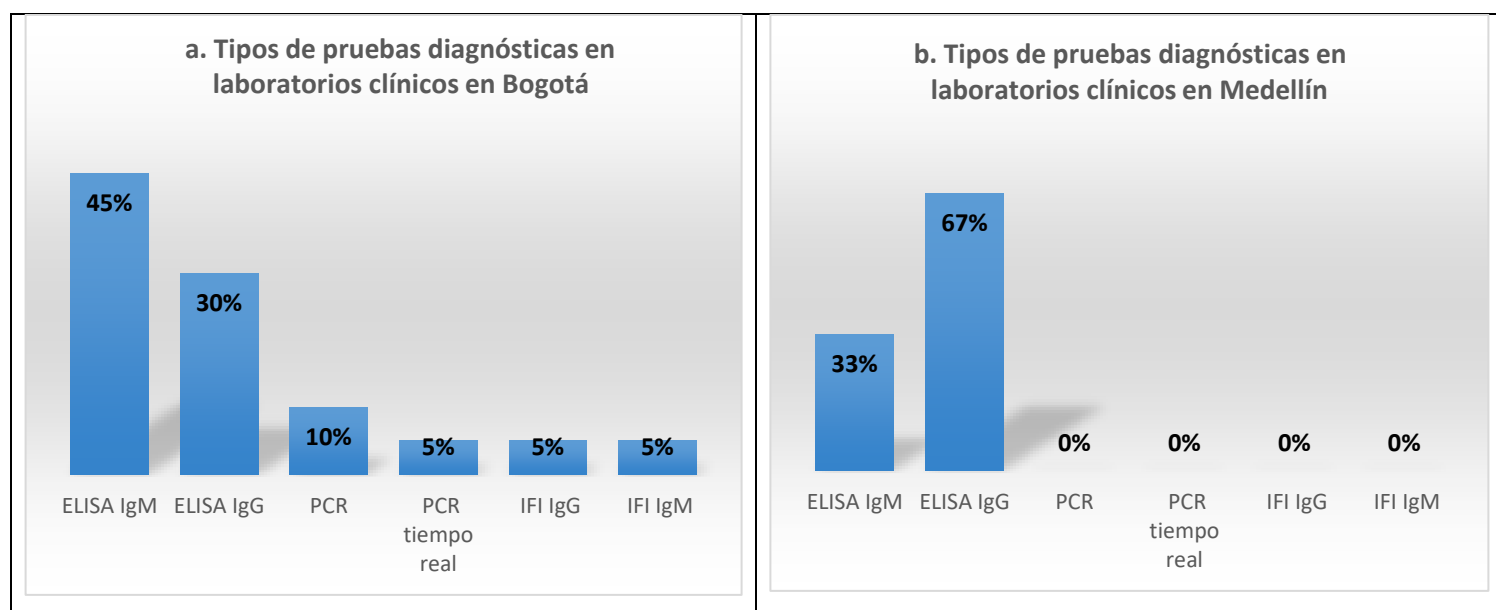
	Laboratorio	Tipo de Prueba	Virus que detecta	Tiempo de entrega	Cualitativa/Cuantitativa	Costo
Bogotá		ELISA – IgM	DENV	1 día	Cualitativa	ND

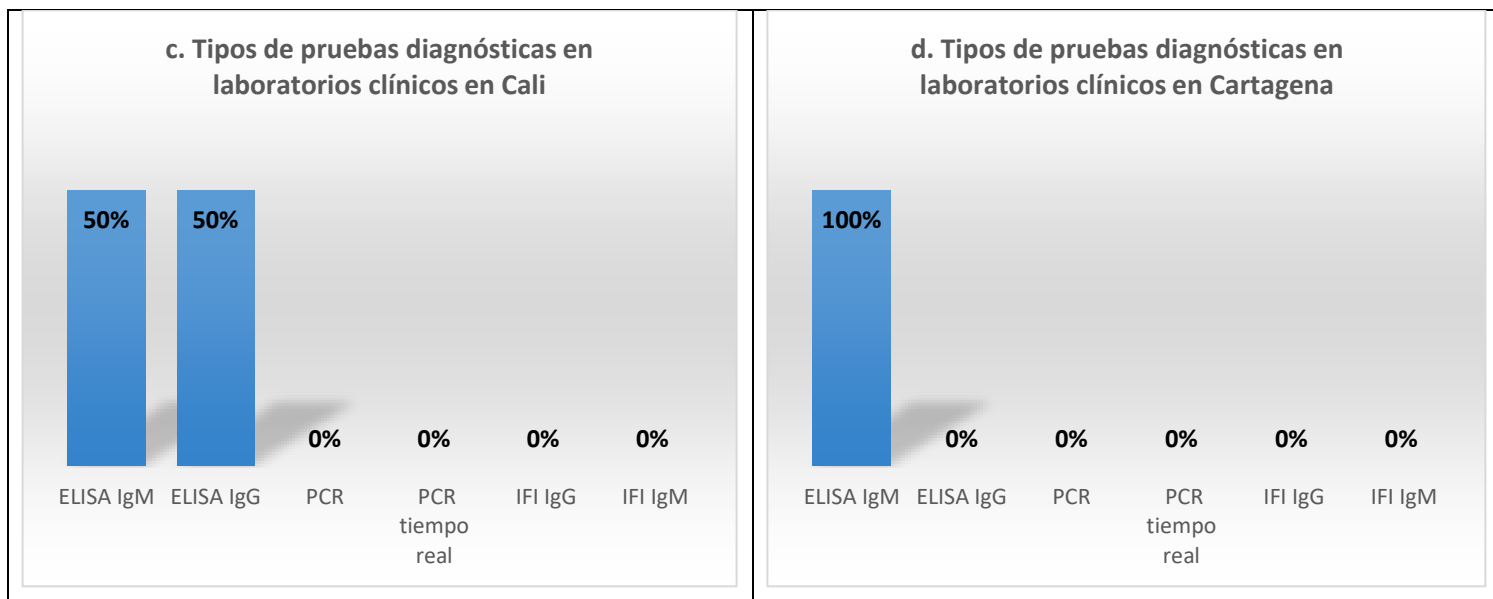
	Laboratorio clínico hematológico	ELISA – IgG	DENV	Se procesan los jueves	Cualitativa	ND
	Hospital Universitario San Ignacio	PCR	ZIKV	ND	Cualitativa	ND
	Colcan	ELISA – IgG	DENV	1 día	Cualitativa	\$ 49.000
		ELISA – IgM		1 día	Cualitativa	\$ 49.000
	Colsanitas	ELISA – IgM		1 día	Cualitativa	ND
	Synlab	ELISA – IgG	ZIKV	7 días	Cualitativa	\$ 60.000
		ELISA – IgM		7 días	Cualitativa	\$ 60.000
		PCR		7 días	Cualitativa	ND
		ELISA – IgG	DENV	1 día	Cuantitativa	\$ 60.000
		ELISA – IgM		1 día	Cuantitativa	\$ 60.000
		PCR en tiempo real		15 días hábiles	Cuantitativa	\$ 250.000
		IFI – IgG	CHIKV	8 días hábiles	Cualitativa	\$ 85.000
		IFI – IgM		8 días hábiles	Cualitativa	\$ 85.000
		ELISA – IgG		5 días hábiles	Cuantitativa	\$ 60.000
		ELISA – IgM		5 días hábiles	Cuantitativa	\$ 60.000
	AbbaLab	ELISA – IgG	DENV	2 días hábiles	Cualitativa	\$ 55.000
		ELISA – IgM		2 días hábiles	Cualitativa	\$ 55.000
	Mederi	ELISA – IgM		ND	ND	ND
	Laboratorio clínico central	ELISA – IgM		2 días	Cuantitativa	ND
Medellín	Central de referencia laboratorio clínico	ELISA – IgG	DENV	3 días hábiles	ND	ND
		ELISA – IgM		ND	Cualitativa	ND

	Bioreferencia laboratorio clínico	ELISA – IgG	ND	Cualitativa	ND
Cali	Laboratorio clínico especializado Nohemy Cruz	ELISA – IgM	1 día	Cualitativa	ND
		ELISA – IgG	1 día	Cualitativa	ND
Cartagena	Laboratorio clínico Rosario Arnedo	ELISA – IgM	1 día	ND	ND

Fuente: Elaboración propia. *ND: No determinado

Teniendo en cuenta las 4 ciudades donde se realizó el estudio de diferentes laboratorios que realizan pruebas para detectar el ZIKV, DENV y CHIKV, fue posible identificar que en Bogotá ofrece la mayor variedad de pruebas diagnósticas entre las cuales se destacan: ELISA, PCR convencional, PCR en tiempo real e IFI, siendo ELISA el que se aplica con mayor frecuencia. En Medellín el único tipo de prueba que se realiza es ELISA para diagnosticar dengue mediante la detección de IgM e IgG. Asimismo, en Cali y Cartagena también se realizan únicamente pruebas de ELISA IgM e IgG para detección de DENV (Gráfica 1).





Gráfica 1. Tipos de pruebas diagnósticas para los virus del ZIKV, DENV y CHIKV realizadas en laboratorios clínicos en a. Bogotá, b. Medellín, c. Cali, d. Cartagena.

5. DISCUSIÓN

América Latina se caracteriza por la abundancia de regiones con clima tropical, lo que la hace propensa a sufrir de brotes causados por enfermedades tropicales. Colombia ha presentado recientes epidemias transmitidas por vectores infectados por ZIKV, DENV, y CHIKV los cuales se han convertido en un problema de salud pública debido a su gran impacto (155).

Teniendo en cuenta que hasta el momento no hay una vacuna efectiva para la prevención, el diagnóstico oportuno es muy importante. Por medio de las manifestaciones clínicas que presente el paciente se puede realizar un diagnóstico presuntivo, pero lo que verdaderamente confirma el diagnóstico del paciente son las pruebas de laboratorio (156).

De acuerdo con las anteriores pruebas descritas para el diagnóstico de ZIKV, DENV y CHIKV, se debe tener en cuenta que varias de ellas presentan ventajas y desventajas lo cual hace que el diagnóstico sea errado o en otros casos se tarde en dar el verdadero diagnóstico al paciente.

Las ventajas que posee el ELISA son su costo relativamente económico y facilidad de uso. Además, al ser utilizada para la detección de antígeno en la fase aguda del CHIKV, es capaz de detectar las proteínas del virus producidas desde el inicio de los síntomas (157,158). También, es

utilizada para el diagnóstico serológico de infección aguda por el DENV, detectando anticuerpos después del quinto día del inicio de los síntomas (159). Sin embargo, este ensayo también posee desventajas entre las cuales están las lecturas temporales, ya que la detección se basa en reacciones enzima/sustrato, por lo tanto, la lectura debe obtenerse en un período corto de tiempo (160). Adicionalmente, proporciona información limitada de la cantidad o presencia del antígeno en la muestra. La desventaja más grande que se observa al utilizarla con los *Flavivirus* específicamente, radica en que posee una alta posibilidad de reactividad cruzada entre los anticuerpos contra otros *Flavivirus*, lo cual constituye un problema difícil de resolver (161–163).

Por otra parte, IFI posee la ventaja de ser fácil de manejar (107). Las desventajas que posee su utilización se encuentra el uso de un anticuerpo secundario conjugado para detectar el anticuerpo primario, lo cual involucra pasos adicionales y aumenta el riesgo de tener una contaminación (108). Además, la complejidad adicional del método indirecto radica en tener que seleccionar el anticuerpo secundario apropiado y existe una alta probabilidad de obtener resultados falsos positivos debido a la reacción cruzada de anticuerpos con epítomos similares encontrados en otros *Flavivirus* como resultado de una infección natural o vacunación (164,165).

Asimismo, la ventaja que proporciona TMA frente a las otras técnicas es que permite la detección altamente sensible del virus de forma isotérmica, esto quiere decir, que la reacción ocurre a una misma temperatura de forma continua. En contraste, su desventaja radica en el diseño de cebadores es un factor crítico para su rendimiento (113).

Finalmente, entre las innumerables ventajas que ofrece PCR en tiempo real en comparación con los otros métodos de diagnóstico se encuentran: (1) la combinación de las tecnologías para la amplificación y la detección en un mismo paso; (2) la capacidad para detectar el ADN en un amplio rango de concentraciones; (3) la cantidad del producto se correlaciona con la intensidad de fluorescencia emitida; (4) la facilidad de procesar múltiples muestras simultáneamente; (5) la rapidez en proporcionar la información inmediata (118,121); y (6) la detección mediada por cebadores tienen la gran ventaja de tener un costo reducido en comparación con las sondas y aun así, el uso de sondas ofrece la posibilidad de multiplexación en contraste con los tintes de unión al ADN inespecíficos (123,166,167).

Con la PCR en tiempo real de un solo paso, la calidad del ARN utilizado es muy importante, teniendo en cuenta que todo el ADNc se utiliza para el paso posterior de la PCR, por lo tanto, las

reacciones de un solo paso pueden requerir mucho más ARN en sus muestras iniciales si está realizando múltiples amplificaciones. Generalmente, la PCR en tiempo real de un solo paso, es menos sensible que la PCR en tiempo real de dos pasos (168). Una desventaja que se puede obtener con la PCR en tiempo real de dos pasos es el uso de varios tubos hace que sea más lento, menos adaptable a la manipulación y al tener más pasos de pipeteo se expone a un mayor riesgo de contaminación. Su alto costo hace que sea un método difícil para que cualquier paciente con síntomas pueda acceder a un mejor y oportuno diagnóstico (168).

Por otra parte, la disponibilidad de métodos de diagnóstico para ZIKV, CHIKV y DENV en el país es muy limitada, ya que se debe tener en cuenta la región en donde se encuentra el paciente, la falta de infraestructura de laboratorios y costo de las pruebas. Además, se debe tener en cuenta que algunas de estas pruebas necesitan un personal altamente calificado para el procesamiento de la prueba, su lectura e interpretación debido a que se requiere una amplia experiencia. También, la accesibilidad de los laboratorios a las pruebas, porque algunos de los equipos son más costosos que otros, como es el caso de termocicladores de PCR en tiempo real en comparación con un lector de placas de ELISA. No obstante, la técnica de PCR en tiempo real ha sido implementada en diversas regiones debido a la contingencia del COVID-19, lo cual ha incrementado el número de laboratorios de molecular con equipos óptimos para la detección de otros agentes infecciosos virales, lo cual podría potenciar el uso de esta técnica en el país.

Respecto a la sensibilidad y especificidad de cada prueba anteriormente descrita, ELISA cuenta con una sensibilidad entre 90 a 99% y su especificidad de un 80 a 99% respectivamente (169–172). Posteriormente, IFI tiene una sensibilidad entre 87 a 93% y una especificidad entre 78 a 99%, sin embargo, al ser una prueba cualitativa no cuantifica los anticuerpos, esta técnica requiere equipo y entrenamiento especial (173). TMA tiene una sensibilidad de 89% hasta un 94,75% y una especificidad de 97% (174,175).

Sin embargo, uno de los métodos con mayor sensibilidad, especificidad es la PCR en tiempo real. Cuenta con una sensibilidad de un 90 a 99% y una especificidad de un 100% (176). La PCR en tiempo real puede considerarse una técnica de alto rendimiento siendo útil para la investigación, medicina forense, clínica, industria, entre otras, ya que cuenta con una gran sensibilidad para la detección y cuantificación de genes específicos en mezclas complejas de ADN. Sin embargo, existen factores involucrados en este método los cuales pueden producir resultados diferentes, uno

de ellos son los cebadores, ya que dependiendo de la calidad del cebador que se usará, proporcionará diferente sensibilidad y eficacia (123,129,177).

Hay que tener en cuenta que los valores mencionados anteriormente pueden variar de acuerdo con la muestra sujeta a estudio y el virus que se quiere detectar.

6. CONCLUSIONES

Finalizada la revisión bibliográfica exhaustiva sobre este tema, se evidencia la importancia epidemiológica y clínica de la transmisión de estos virus en los últimos cinco (5) años en Colombia, además, el diagnóstico de los mismos es sumamente importante para la detección rápida y oportuna del agente infeccioso impactando de manera positiva en el tratamiento del paciente y a su vez en la salud pública.

Entre las técnicas de diagnóstico para la detección de los virus ZIKV, DENV y CHIKV se destacan las inmunológicas y las moleculares, entre las cuales cada una proporcionan diferentes ventajas y desventajas a la hora de utilizarlas. ELISA e IFI brindan un resultado rápido, aunque existe un gran riesgo de tener una reactividad cruzada frente a otros flavivirus, aun así, este tipo de pruebas son más factibles por ser relativamente económicas. Por otra parte, hay poca disponibilidad de reactivos y equipos de TMA. Sin embargo, la PCR en tiempo real brinda resultados con una mayor especificidad y sensibilidad, aunque su costo es muy elevado a comparación de las anteriores técnicas. Las técnicas anteriormente descritas son importantes emplearlas a tiempo y realizar un buen manejo de estas para dar un diagnóstico oportuno al paciente y con ello facilitar el posible tratamiento.

La revisión elaborada a las cuatro (4) diferentes ciudades en Colombia brindan un panorama general en cuanto a las posibilidades de acceder a una prueba de diagnóstico, en donde Bogotá lleva una ventaja al contar con más laboratorios disponibles para la realización de las pruebas y se destacan las pruebas inmunológicas, a su vez, las pruebas moleculares son escasas en Cartagena, Cali y Medellín, en cuanto a su costo el valor es muy variado, porque la mayoría de los laboratorios no brinda una información concreta.

Finalmente, podemos decir que una de las técnicas de diagnóstico más empleada según la información obtenida es ELISA, debido a su accesibilidad a comparación de las demás pruebas, aunque la PCR en tiempo real presenta una mayor especificidad y sensibilidad en el diagnóstico

su costo es elevado debido al uso de reactivos, equipos y el personal capacitado para su realización. No obstante, el fortalecimiento de laboratorios moleculares para el diagnóstico del COVID-19 ha disminuido su costo y ampliado su accesibilidad, lo cual puede incrementar su uso a futuro en el diagnóstico de otros agentes infecciosos virales, como lo son ZIKV, DENV y CHIKV.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Kawiecki AB, Christofferson RC. Zika Virus–Induced Antibody Response Enhances Dengue Virus Serotype 2 Replication In Vitro. *J Infect Dis.* 1 de noviembre de 2016;214(9):1357-60.
2. Priyamvada L, Quicke K, Hudson W, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci.* 27 de junio de 2016;113:201607931.
3. Lanciotti R, Kosoy O, Laven J, Velez J, Lambert A, Johnson A, et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 1 de septiembre de 2008;14:1232-9.
4. Judice CC, Tan JLL, Parise PL, Kam Y-W, Milanez GP, Leite JA, et al. Efficient detection of Zika virus RNA in patients' blood from the 2016 outbreak in Campinas, Brazil. *Sci Rep.* 5 de marzo de 2018;8(1):4012.
5. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci.* 1 de agosto de 2017;114(31):8384-9.
6. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall A. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. *Virology.* 22 de octubre de 2013;10:311.
7. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 25 de abril de 2013;496(7446):504-7.
8. Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, et al. Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 11 de julio de 2013 [citado 29 de enero de 2021];7(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3708876/>
9. Callahan JD, Wu S-JL, Dion-Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, et al. Development and Evaluation of Serotype- and Group-Specific Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan) Assays for Dengue Virus. *J Clin Microbiol.* noviembre de 2001;39(11):4119-24.
10. Bréhin A-C, Rubrecht L, Navarro-Sanchez ME, Maréchal V, Frenkiel M-P, Lapalud P, et al. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. *Virology.* 5 de febrero de 2008;371(1):185-95.
11. Jin J, Liss NM, Chen D-H, Liao M, Fox JM, Shimak RM, et al. Neutralizing Monoclonal Antibodies Block Chikungunya Virus Entry and Release by Targeting an Epitope Critical to Viral Pathogenesis. *Cell Rep.* 22 de diciembre de 2015;13(11):2553-64.
12. Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* septiembre de 1952;46(5):509-20.

13. Lessler J, Chaisson LH, Kucirka LM, Bi Q, Grantz K, Salje H, et al. Assessing the global threat from Zika virus. *Science* [Internet]. 12 de agosto de 2016 [citado 20 de febrero de 2021];353(6300). Disponible en: <https://science.sciencemag.org/content/353/6300/aaf8160>
14. Pacheco O, Beltrán M, Nelson CA, Valencia D, Tolosa N, Farr SL, et al. Zika Virus Disease in Colombia - Preliminary Report. *N Engl J Med*. 6 de agosto de 2020;383(6):e44.
15. Musso D, Roche C, Nhan T-X, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. julio de 2015;68:53-5.
16. Hotta S. Experimental Studies on Dengue: I. Isolation, Identification and Modification of the Virus. *J Infect Dis*. 1952;90(1):1-9.
17. Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Stanaway JD. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect Dis*. 1 de agosto de 2016;16(8):935-41.
18. Historia evolutiva y dinámica espacio-temporal de los serotipos del virus del dengue en una región endémica de Colombia [Internet]. [citado 20 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0203090>
19. Castrillón JC, Castaño JC, Urcuqui S. Dengue en Colombia: diez años de evolución. *Rev Chil Infectol*. abril de 2015;32(2):142-9.
20. Romero SEG. INFORME DE EVENTO DENGUE, COLOMBIA, 2017. 2018;(03):22.
21. Morales J, <https://www.facebook.com/pahowho>. OPS/OMS Colombia - 2019, el año con más casos de dengue en la historia regional Los casos de dengue en las Américas superaron los 3 millones en 2019 | OPS/OMS [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2020 [citado 19 de marzo de 2021]. Disponible en: https://www.paho.org/col/index.php?option=com_content&view=article&id=3334:2019-el-año-con-más-casos-de-dengue-en-la-historia-regional-los-casos-de-dengue-en-las-americas-superaron-los-3-millones-en-2019&Itemid=487
22. Guzmán MG, Vázquez S. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. *Rev Cubana Med Trop*. diciembre de 2002;54(3):180-8.
23. Eivazzadeh-Keihan R, Pashazadeh-Panahi P, Mahmoudi T, Chenab KK, Baradaran B, Hashemzadeh M, et al. Dengue virus: a review on advances in detection and trends – from conventional methods to novel biosensors. *Microchim Acta*. 4 de mayo de 2019;186(6):329.
24. Houg HH, Hritz D, Kanesa-thasan N. Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence. *J Virol Methods*. abril de 2000;86(1):1-11.
25. Laoprasopwattana K, Kaewjungwad L, Jarumanokul R, Geater A. Differential diagnosis of Chikungunya, dengue viral infection and other acute febrile illnesses in children. *Pediatr Infect Dis J*. mayo de 2012;31(5):459-63.

26. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol.* junio de 2012;50(6):2047-52.
27. Thein S, La Linn M, Aaskov J, Aung MM, Aye M, Zaw A, et al. Development of a simple indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of immunoglobulin M antibody in serum from patients following an outbreak of Chikungunya virus infection in Yangon, Myanmar. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 de julio de 1992;86(4):438-42.
28. Chikungunya [Internet]. [citado 21 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>
29. Restrepo-Jaramillo BN. Infección por el virus del Chikungunya. *Rev CES Med.* 2014;28(2):313-24.
30. Uribe AG, Durán MEM, García OEP. INFORME QUINCENAL EPIDEMIOLOGICO NACIONAL. :25.
31. Villar LA, Rojas DP, Besada-Lombana S, Sarti E. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Colombia (2000-2011): A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 19 de marzo de 2015 [citado 21 de febrero de 2021];9(3). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4366106/>
32. Mattar S, Miranda J, Pinzon H, Tique V, Bolanos A, Aponte J, et al. Outbreak of Chikungunya virus in the north Caribbean area of Colombia: clinical presentation and phylogenetic analysis. *J Infect Dev Ctries.* 29 de octubre de 2015;9(10):1126-32.
33. Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog.* junio de 2007;3(6):e89.
34. Waggoner JJ, Ballesteros G, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Tellez Y, Sahoo MK, et al. Clinical evaluation of a single-reaction real-time RT-PCR for pan-dengue and chikungunya virus detection. *J Clin Virol.* 1 de mayo de 2016;78:57-61.
35. Taxonomía Historia - Taxonomía - ICTV [Internet]. [citado 18 de enero de 2022]. Disponible en: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202003123
36. Marano G, Pupella S, Vaglio S, Liembruno GM, Grazzini G. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. *Blood Transfus Trasfus Sangue.* marzo de 2016;14(2):95-100.
37. noerasuficientecondengueychiku.pdf [Internet]. [citado 7 de abril de 2021]. Disponible en: http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portaIIIG/home_148/recursos/seminarios/05042016/noerasuficientecondengueychiku.pdf

38. Scully C, Robinson A. Check before you travel: Zika virus--another emerging global health threat. *Br Dent J*. 11 de marzo de 2016;220(5):265-7.
39. Hills SL, Fischer M, Petersen LR. Epidemiology of Zika Virus Infection. *J Infect Dis*. 16 de diciembre de 2017;216(suppl_10):S868-74.
40. Paixão ES, Barreto F, da Glória Teixeira M, da Conceição N, Costa M, Rodrigues LC. History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review. *Am J Public Health*. 1 de abril de 2016;106(4):606-12.
41. Sarmiento-Ospina A, Vásquez-Serna H, Jimenez-Canizales CE, Villamil-Gómez WE, Rodríguez-Morales AJ. Zika virus associated deaths in Colombia. *Lancet Infect Dis*. 1 de mayo de 2016;16(5):523-4.
42. Rodríguez-Morales AJ, Willamil-Gómez WE. El reto de Zika en Colombia y América Latina: Una urgencia sanitaria. *Infectio*. abril de 2016;20(2):59-61.
43. Rojas DP, Dean NE, Yang Y, Kenah E, Quintero J, Tomasi S, et al. The epidemiology and transmissibility of Zika virus in Girardot and San Andres island, Colombia, September 2015 to January 2016. *Eurosurveillance*. 14 de julio de 2016;21(28):30283.
44. Alvis-Guzmán N, Zakzuk J, Vargas Moranth R, Alcocer Olaciregui AE, Parra Padilla D. Dengue, Chikunguña and Zika in Colombia 2015-2016. *RevMVZ Córdoba* 22Supl5994-6003 [Internet]. mayo de 2017 [citado 4 de julio de 2021]; Disponible en: <https://repositorio.cuc.edu.co/handle/11323/7260>
45. Méndez N, Oviedo-Pastrana M, Mattar S, Caicedo-Castro I, Arrieta G. Zika virus disease, microcephaly and Guillain-Barré syndrome in Colombia: epidemiological situation during 21 months of the Zika virus outbreak, 2015–2017. *Arch Public Health*. 2 de noviembre de 2017;75(1):65.
46. 2021_Boletin_epidemiologico_semana_3.pdf [Internet]. [citado 14 de marzo de 2022]. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2021_Boletin_epidemiologico_semana_3.pdf
47. Milby KM, Atallah AN, Rocha-Filho CR, Pinto ACPN, Rocha AP da, Reis FS de A, et al. SARS-CoV-2 and arbovirus infection: a rapid systematic review. *Sao Paulo Med J*. diciembre de 2020;138(6):498-504.
48. Zika virus: from pathogenesis to disease control | FEMS Microbiology Letters | Oxford Academic [Internet]. [citado 12 de julio de 2021]. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsle/article/363/18/fnw202/2197800?login=true> %20(https://academic.oup.com/jid/article/216/suppl_10/S935/4753686?login=true)
49. Barzon L, Trevisan M, Sinigaglia A, Lavezzo E, Palù G. Zika virus: from pathogenesis to disease control. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1 de septiembre de 2016 [citado 12 de julio de 2021];363(18). Disponible en: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw202>

50. Barreto-Vieira DF, Barth OM, Silva MAN da, Santos CC, Santos A da S, F Filho JB, et al. Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 11 de julio de 2016;111:532-4.
51. Wieland J, Frey S, Rupp U, Essbauer S, Groß R, Münch J, et al. Zika virus replication in glioblastoma cells: electron microscopic tomography shows 3D arrangement of endoplasmic reticulum, replication organelles, and viral ribonucleoproteins. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 12 de septiembre de 2021 [citado 13 de octubre de 2021]; Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02028-2>
52. Mohd Ropidi MI, Khazali AS, Nor Rashid N, Yusof R. Endoplasmic reticulum: a focal point of Zika virus infection. *J Biomed Sci*. 20 de enero de 2020;27(1):27.
53. Espinoza MM. Aspectos clínicos de la infección por el virusa zika. *An Fac Med*. 16 de mayo de 2017;78(1):79.
54. Enfermedad por el virus de Zika [Internet]. [citado 7 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
55. Del Carpio-Orantes L, Rangel FJ, García-Méndez S. Incidencia de síndrome de Guillain-Barré durante la oleada de zika del 2016 en un hospital de segundo nivel. *Neurología*. 1 de septiembre de 2017;35.
56. Acosta MI, Cañizá MJ, Romano MF, Araujo DEM. SINDROME DE GUILLAIN BARRE. 2007;4.
57. Taxonomía Historia - Taxonomía - ICTV [Internet]. [citado 18 de enero de 2022]. Disponible en: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202003081
58. Velandia ML, Castellanos JE. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. marzo de 2011;15(1):33-43.
59. 441942927002.pdf [Internet]. [citado 7 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4419/441942927002.pdf>
60. Bergamaschi G, Fassi EMA, Romanato A, D'Annessa I, Odinolfi MT, Brambilla D, et al. Computational Analysis of Dengue Virus Envelope Protein (E) Reveals an Epitope with Flavivirus Immunodiagnostic Potential in Peptide Microarrays. *Int J Mol Sci*. enero de 2019;20(8):1921.
61. Klein DE, Choi JL, Harrison SC. Structure of a Dengue Virus Envelope Protein Late-Stage Fusion Intermediate. *J Virol*. 15 de febrero de 2013;87(4):2287-93.
62. Martínez DP, Martínez BO, Remedios AA. Dinámica de la respuesta inmune en la infección por virus del dengue Dynamics of the immune response in dengue virus infection. 2018;9.

63. Virus del dengue de serotipo 1 (DENV-1) de Colombia: su contribución a la presentación del dengue en el departamento de Santander [Internet]. [citado 7 de abril de 2021]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572013000500004
64. Jeong YE, Kim YH, Cho JE, Han MG, Ju YR. Identification of Dengue Type 1 Virus (DENV-1) in Koreans Traveling Abroad. *Osong Public Health Res Perspect.* 1 de junio de 2011;2(1):34-40.
65. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India.* 1 de enero de 2015;71(1):67-70.
66. Gutierrez-Barbosa H, Medina-Moreno S, Zapata JC, Chua JV. Dengue Infections in Colombia: Epidemiological Trends of a Hyperendemic Country. *Trop Med Infect Dis.* diciembre de 2020;5(4):156.
67. Octubre 2020. Situación del Dengue en Colombia [Internet]. Fundación iO. 2020 [citado 12 de julio de 2021]. Disponible en: <https://fundacionio.com/octubre-2020-situacion-del-dengue-en-colombia/>
68. Minsalud hace un llamado a intensificar acciones contra el dengue [Internet]. [citado 19 de enero de 2022]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Minsalud-hace-un-llamado-a-intensificar-acciones-contra-el-dengue.aspx>
69. Bhatt P, Sabeena SP, Varma M, Arunkumar G. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Curr Microbiol.* 1 de enero de 2021;78(1):17-32.
70. Jiménez JB, Arias NS, Gómez MV. Patogénesis de la enfermedad por virus del dengue. Revisión de la literatura. *Rev Clínica Esc Med UCR-HSJD* [Internet]. 11 de mayo de 2016 [citado 7 de abril de 2021];6(2). Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/clinica/article/view/24335>
71. Islam R, Salahuddin M, Ayubi MS, Hossain T, Majumder A, Taylor-Robinson AW, et al. Dengue epidemiology and pathogenesis: images of the future viewed through a mirror of the past. *Virol Sin.* octubre de 2015;30(5):326-43.
72. Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev.* octubre de 2009;22(4):564-81.
73. Effect of modulation of unfolded protein response pathway on dengue virus infection - PubMed [Internet]. [citado 12 de julio de 2021]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26515795/>
74. Perera N, Miller JL, Zitzmann N. The role of the unfolded protein response in dengue virus pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2017;19(5):e12734.

75. Vargas CM, Plenge FO, Ognio LS, Arquíñigo LS, Ruiz KP. Dengue clásico y hemorrágico: Una enfermedad reemergente y emergente en el Perú. *Rev Medica Hered.* 2005;16(2):120-120.
76. Cabrera DC, Rivera RC. Clinical profile of dengue in patients from Yucatan. The useful of case definition criteria of World Health Organization. 2010;30:9.
77. Durán CA, Lanza TM, Plata JA. Fisiopatología y diagnóstico del dengue. *Rev Méd Hondur.* 2010;136-41.
78. Galicia IT, Poza DC, Becker I. Dengue en México: análisis de dos décadas. *Gac Médica México.* 2014;150(2):122-7.
79. Rajapakse S, Rodrigo C, Maduranga S, Rajapakse AC. Corticosteroids in the treatment of dengue shock syndrome. *Infect Drug Resist.* 22 de mayo de 2014;7:137-43.
80. Huy NT, Giang TV, Thuy DHD, Kikuchi M, Hien TT, Zamora J, et al. Factors Associated with Dengue Shock Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 26 de septiembre de 2013;7(9):e2412.
81. Taxonomía Historia - Taxonomía - ICTV [Internet]. [citado 18 de enero de 2022]. Disponible en: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202005087
82. Virus Del Chikungunya - ProQuest [Internet]. [citado 13 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.proquest.com/openview/dde7b2996df48a0cf46a98853c5816d0/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2027436>
83. Sahadeo N, Mohammed H, Allicock OM, Auguste AJ, Widen SG, Badal K, et al. Molecular Characterisation of Chikungunya Virus Infections in Trinidad and Comparison of Clinical and Laboratory Features with Dengue and Other Acute Febrile Cases. *PLoS Negl Trop Dis.* noviembre de 2015;9(11):e0004199.
84. Virus chikungunya: Características virales y evolución genética [Internet]. [citado 7 de abril de 2021]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522016000200011
85. Rodas JD, Kautz T, Camacho E, Paternina L, Guzmán H, Díaz FJ, et al. Genetic Characterization of Northwestern Colombian Chikungunya Virus Strains from the 2014–2015 Epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* 7 de septiembre de 2016;95(3):639-46.
86. med08115.pdf [Internet]. [citado 7 de abril de 2021]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/med/v54n1/med08115.pdf>
87. Voss JE, Vaney M-C, Duquerroy S, Vonnrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature.* diciembre de 2010;468(7324):709-12.

88. Law Y-S, Utt A, Tan YB, Zheng J, Wang S, Chen MW, et al. Structural insights into RNA recognition by the Chikungunya virus nsP2 helicase. *Proc Natl Acad Sci*. 7 de mayo de 2019;116(19):9558-67.
89. Actualización Epidemiológica [Internet]. [citado 19 de enero de 2022]. Disponible en: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:813SrsZMxH8J:https://www.paho.org/es/file/103224/download%3Ftoken%3Dy0N7PS8Y+&cd=13&hl=es&ct=clnk&gl=co>
90. Gasque P, Bandjee MCJ, Reyes MM, Viasus D. Chikungunya Pathogenesis: From the Clinics to the Bench. *J Infect Dis*. 15 de diciembre de 2016;214(suppl 5):S446-8.
91. Yap ML, Klose T, Urakami A, Hasan SS, Akahata W, Rossmann MG. Structural studies of Chikungunya virus maturation. *Proc Natl Acad Sci*. 26 de diciembre de 2017;114(52):13703-7.
92. Biology and pathogenesis of chikungunya virus | Nature Reviews Microbiology [Internet]. [citado 13 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2368#Glos2>
93. Couderc T, Lecuit M. Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. *Antiviral Res*. 1 de septiembre de 2015;121:120-31.
94. Gasque P, Couderc T, Lecuit M, Roques P, Ng LFP. Chikungunya Virus Pathogenesis and Immunity. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 1 de abril de 2015;15(4):241-9.
95. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis*. 1 de abril de 2017;17(4):e107-17.
96. Thiberville S-D, Moyen N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairede A, Gould EA, Roques P, et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*. septiembre de 2013;99(3):345-70.
97. Horcada ML, Díaz-Calderón C, Garrido L. Fiebre chikungunya. Manifestaciones reumáticas de una infección emergente en Europa. *Reumatol Clínica*. 1 de mayo de 2015;11(3):161-4.
98. Castro APCR de, Lima RA, Nascimento J dos S, Castro APCR de, Lima RA, Nascimento J dos S. Chikungunya: vision of the pain clinician. *Rev Dor*. diciembre de 2016;17(4):299-302.
99. Angarita Merchán M, Torres Caicedo MI, Díaz Torres AK. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Rev Habanera Cienc Médicas*. octubre de 2017;16(5):796-807.
100. J. Farfán BQM. BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 1 de noviembre de 2015;26(6):788-93.

101. Innovaciones en el diagnóstico molecular, técnicas y tecnologías [Internet]. [citado 26 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.catalogodelasalud.com/temas/Innovaciones-en-el-diagnostico-molecular,-tecnicas-y-tecnologias+115636>
102. Pereira-Palacio JC, Gaviria-Mejía LJ, Zea-Castrillón S, Jaramillo Arbelaez PE, Bedoya A. Descripción de pruebas moleculares en el diagnóstico del virus Zika en el periodo 2008-Febrero 2018. Revisión sistemática. Nova. 18 de septiembre de 2018;16(30):81-93.
103. Kurosaki Y, Martins DBG, Kimura M, Catena A dos S, Borba MACSM, Mattos S da S, et al. Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Sci Rep. 18 de octubre de 2017;7(1):13503.
104. Horlock C. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunology.
105. Estandarización de la prueba de Ensayo Inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG en sueros de humanos para el virus Phlebotomus fever_generalidades [Internet]. [citado 4 de marzo de 2022]. Disponible en: https://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/cruz_m_c/generalidades.htm
106. AllScience. ELISA: ¿Qué es? ¿En qué consiste? ¿Cuáles son los distintos tipos de este ensayo y en qué se diferencian? [Internet]. AllScience. [citado 18 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/elisa-que-es-en-que-consiste-cuales-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian>
107. Hernández Ramírez DF, Cabiedes J. Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. Reumatol Clínica. 1 de mayo de 2010;6(3):173-7.
108. Inmunofluorescencia directa vs indirecta | Abcam [Internet]. [citado 14 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>
109. Chhabra S, Minz R, Saikia B. Immunofluorescence in dermatology. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2012;78(6):677.
110. Ryu W-S. Chapter 4 - Diagnosis and Methods. En: Ryu W-S, editor. Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses [Internet]. Boston: Academic Press; 2017 [citado 14 de julio de 2021]. p. 47-62. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128008386000047>
111. Simonetti FR, Dewar R, Maldarelli F. 122 - Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection. En: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editores. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition) [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2015 [citado 14 de julio de 2021]. p. 1503-1525.e7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455748013001223>
112. Primeras pruebas diagnósticas para anticuerpos del virus Zika [Internet]. Labmedica.es. 2016 [citado 9 de septiembre de 2021]. Disponible en:

<https://www.labmedica.es/microbiologia/articles/294763343/primeras-pruebas-diagnosticas-para-anticuerpos-del-virus-zika.html>

113. Brentano ST, Mcdonough SH. Isothermal Amplification of RNA by Transcription-Mediated Amplification (TMA). En: Kessler C, editor. Nonradioactive Analysis of Biomolecules [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2000 [citado 14 de julio de 2021]. p. 374-80. (Springer Lab Manuals). Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-642-57206-7_31
114. Langabeer SE, Gale RE, Harvey RC, Cook RW, Mackinnon S, Linch DC. Transcription-mediated amplification and hybridisation protection assay to determine BCR-ABL transcript levels in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. marzo de 2002;16(3):393-9.
115. Niesters HGM, van Leeuwen WB. Quantitative Isothermal Molecular Amplification Techniques. En: van Pelt-Verkuil E, van Leeuwen WB, te Witt R, editores. *Molecular Diagnostics: Part 1: Technical Backgrounds and Quality Aspects* [Internet]. Singapore: Springer; 2019 [citado 14 de julio de 2021]. p. 321-37. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-981-13-1604-3_7
116. Transcription-Mediated Amplification - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [citado 12 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/transcription-mediated-amplification>
117. Hofmann WP, Dries V, Herrmann E, Gärtner B, Zeuzem S, Sarrazin C. Comparison of transcription mediated amplification (TMA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. abril de 2005;32(4):289-93.
118. Löfström C, Josefsen MH, Hansen T, Søndergaard MSR, Hoorfar J. 9 - Fluorescence-based real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technologies for high throughput screening of pathogens. En: Bhunia AK, Kim MS, Taitt CR, editores. *High Throughput Screening for Food Safety Assessment* [Internet]. Woodhead Publishing; 2015 [citado 18 de julio de 2021]. p. 219-48. (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857098016000095>
119. Maddocks S, Jenkins R. Chapter 4 - Quantitative PCR: Things to Consider. En: Maddocks S, Jenkins R, editores. *Understanding PCR* [Internet]. Boston: Academic Press; 2017 [citado 14 de abril de 2021]. p. 45-52. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128026830000046>
120. Trichomoniasis y Campylobacteriosis bovina: llegó la hora de la biotecnología .. Laboratorio 9 de Julio [Internet]. [citado 28 de agosto de 2021]. Disponible en: http://lab9dejulio.com.ar/informacion-tecnica/trichomoniasis-y-campylobacteriosis-bovina-llego-la-hora-de-la-biotecnologia_a387

121. Hoy MA. Chapter 8 - DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction: Molecular Biology Made Accessible. En: Hoy MA, editor. *Insect Molecular Genetics (Third Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2013 [citado 18 de julio de 2021]. p. 307-72. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124158740000081>
122. Green MR, Sambrook J, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. 3 p.
123. Aguilera P, Ruiz-Tachiquín M-E, Rocha M, Pineda B, Chanez-Cardenas M. PCR en tiempo real. En 2014. p. 175-201.
124. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 1 de enero de 2004;22(5):299-305.
125. 63617114013.pdf [Internet]. [citado 13 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617114013.pdf>
126. Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögreen B, Linz L, Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif*. 1 de junio de 2017;12:1-6.
127. Hussain B, Yüce M, Ullah N, Budak H. 3 - Bioconjugated nanomaterials for monitoring food contamination. En: Grumezescu AM, editor. *Nanobiosensors* [Internet]. Academic Press; 2017 [citado 18 de julio de 2021]. p. 93-127. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128043011000035>
128. Law JW-F, Ab Mutalib N-S, Chan K-G, Lee L-H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*. 12 de enero de 2015;5:770.
129. Wacker MJ, Godard MP. Analysis of One-Step and Two-Step Real-Time RT-PCR Using SuperScript III. *J Biomol Tech JBT*. septiembre de 2005;16(3):266-71.
130. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J Biomol Tech JBT*. septiembre de 2004;15(3):155-66.
131. Landry ML, St. George K. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Arch Pathol Lab Med*. 20 de octubre de 2016;141(1):60-7.
132. Charrel R, Leparç-Goffart I, Pas S, Lamballerie X, Koopmans M, Reusken C. State of knowledge on Zika virus for an adequate laboratory response. *Bull World Health Organ*. 10 de febrero de 2016;94.
133. Goncalves A, Peeling RW, Chu MC, Gubler DJ, de Silva AM, Harris E, et al. Innovative and New Approaches to Laboratory Diagnosis of Zika and Dengue: A Meeting Report. *J Infect Dis*. 13 de marzo de 2018;217(7):1060-8.

134. Jääskeläinen AJ, Korhonen EM, Huhtamo E, Lappalainen M, Vapalahti O, Kallio-Kokko H. Validation of serological and molecular methods for diagnosis of zika virus infections. *J Virol Methods*. 1 de enero de 2019;263:68-74.
135. Charrel RN, Leparç-Goffart I, Pas S, de Lamballerie X, Koopmans M, Reusken C. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. *Bull World Health Organ*. 1 de agosto de 2016;94(8):574-584D.
136. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. mayo de 2011;17(5):880-2.
137. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis*. febrero de 2015;21(2):359-61.
138. Brooks RB, Carlos MP, Myers RA, White MG, Bobo-Lenoci T, Aplan D, et al. Likely Sexual Transmission of Zika Virus from a Man with No Symptoms of Infection - Maryland, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2 de septiembre de 2016;65(34):915-6.
139. Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 22 de julio de 2016;65(28):716-7.
140. Deckard DT, Chung WM, Brooks JT, Smith JC, Woldai S, Hennessey M, et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus--Texas, January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 15 de abril de 2016;65(14):372-4.
141. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Lavezzo E, Trevisan M, Sgarabotto D, et al. Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. *Eurosurveillance*. 11 de agosto de 2016;21(32):30316.
142. Wang SM, Sekaran SD. Early Diagnosis of Dengue Infection Using a Commercial Dengue Duo Rapid Test Kit for the Detection of NS1, IGM, and IGG. *Am J Trop Med Hyg*. 7 de septiembre de 2010;83(3):690-5.
143. Dutra NR, de Paula MB, de Oliveira MD, de Oliveira LL, De Paula SO. The Laboratorial Diagnosis of Dengue: Applications and Implications. *J Glob Infect Dis*. 2009;1(1):38-44.
144. Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. julio de 2007;101(7):738-9.
145. Matheus S, Meynard J-B, Lacoste V, Morvan J, Deparis X. Use of Capillary Blood Samples as a New Approach for Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Clin Microbiol*. 1 de marzo de 2007;45(3):887-90.

146. Lee Y-F, Lien K-Y, Lei H-Y, Lee G-B. An integrated microfluidic system for rapid diagnosis of dengue virus infection. *Biosens Bioelectron.* 15 de diciembre de 2009;25(4):745-52.
147. Huhtamo E, Hasu E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, et al. Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *J Clin Virol.* 1 de enero de 2010;47(1):49-53.
148. CDCPackageInsert-spanish.pdf [Internet]. [citado 18 de abril de 2021]. Disponible en: https://www.cdc.gov/dengue/resources/rt_pcr/CDCPackageInsert-spanish.pdf
149. Grivard P, Le Roux K, Laurent P, Fianu A, Perrau J, Gigan J, et al. Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. *Pathol Biol.* 1 de diciembre de 2007;55(10):490-4.
150. Mardekian SK, Roberts AL. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *BioMed Res Int.* 5 de octubre de 2015;2015:e834371.
151. Lakshmi V, Neeraja M, Subbalaxmi MVS, Parida MM, Dash PK, Santhosh SR, et al. Clinical Features and Molecular Diagnosis of Chikungunya Fever from South India. *Clin Infect Dis.* 1 de mayo de 2008;46(9):1436-42.
152. Nimmannitya S, Halstead SB, Cohen SN, Margiotta MR. Dengue and Chikungunya Virus Infection in Man in Thailand, 1962–1964: I. Observations on Hospitalized Patients with Hemorrhagic Fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1 de noviembre de 1969;18(6):954-71.
153. Santiago GA, Vázquez J, Courtney S, Matías KY, Andersen LE, Colón C, et al. Performance of the Trioplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. *Nat Commun.* 11 de abril de 2018;9(1):1391.
154. de J. LINEAMIENTOS DE VIGILANCIA EN SALUD PÚBLICA, ENTOMOLOGICA Y DE LABORATORIO ANTE LA INTRODUCCION DEL VIRUS Chikungunya EN COLOMBIA. :15.
155. Rico-Mendoza A, Alexandra P-R, Chang A, Encinales L, Lynch R. Co-circulation of dengue, chikungunya, and Zika viruses in Colombia from 2008 to 2018. *Rev Panam Salud Pública* [Internet]. 7 de junio de 2019 [citado 21 de febrero de 2021];43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6548069/>
156. Ruiz LG, Gil DCQ, Gutiérrez MM. Actualización en diagnóstico del dengue: evolución de las técnicas y su aplicación real en la clínica. 2012;31.
157. Reddy V, Ravi V, Desai A, Parida M, Powers AM, Johnson BW. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. *J Med Virol.* noviembre de 2012;84(11):1771-8.

158. De La Cruz-Hernández S, Ludert J, Del Angel R. Diagnóstico Integral de la Infección por el Virus del Dengue: Un Requisito para una Mejor Vigilancia Epidemiológica de la Enfermedad. *MedLab*. 1 de enero de 2015;7:5-15.
159. Ospina MC. Dengue: diagnostico por el laboratorio. *Infectio* [Internet]. 27 de octubre de 2011 [citado 20 de enero de 2022];8(3). Disponible en: <http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/254>
160. ELISA: basic principles and types of ELISA assay | Abcam [Internet]. [citado 14 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.abcam.com/kits/elisa-principle>
161. Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LH, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 25 de noviembre de 2010;10(1):337.
162. Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *Eurosurveillance*. 21 de abril de 2016;21(16):30203.
163. Esbroeck MV, Meersman K, Michiels J, Ariën KK, Bossche DV den. Letter to the editor: Specificity of Zika virus ELISA: interference with malaria. *Eurosurveillance*. 26 de mayo de 2016;21(21):30237.
164. Niedrig M, Kürsteiner O, Herzog C, Sonnenberg K. Evaluation of an Indirect Immunofluorescence Assay for Detection of Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies against Yellow Fever Virus. *Clin Vaccine Immunol CVI*. febrero de 2008;15(2):177-81.
165. Lederer S, Lattwein E, Hanke M, Sonnenberg K, Stoecker W, Lundkvist Å, et al. Indirect immunofluorescence assay for the simultaneous detection of antibodies against clinically important old and new world hantaviruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(4):e2157.
166. Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. septiembre de 2014;31:535-46.
167. Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, Jerome KR. Tolerance of Droplet-Digital PCR vs Real-Time Quantitative PCR to Inhibitory Substances. *Clin Chem*. 1 de noviembre de 2013;59(11):1670-2.
168. one-step_vs_two-step_real-time_rt_pcr.pdf [Internet]. [citado 18 de julio de 2021]. Disponible en: https://www.bioline.com/pub/media/wysiwyg/support/product_guides/one-step_vs_two-step_real-time_rt_pcr.pdf
169. Flórez-Álvarez L, Cardona-Arias JA. Metanálisis sobre la utilidad de ELISA, PCR e inmunocromatografía en el diagnóstico de chikungunya. *Rev Panam Salud Pública*. 2017;1-9.

170. Clemen G, Angel J, Montes C, Tovar J, Osorio L. Contribución de la prueba rápida NS1 e IgM al diagnóstico de dengue en Colombia en el periodo pre-zika. *Infectio*. 19 de marzo de 2019;23(3):259.
171. Sergio LG, Liliana GH, Silvia JF, Patricia OA. DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE PRUEBAS RÁPIDAS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL DENGUE. 2013;8.
172. Pineda DJA. PREVALENCIA Y FACTORES DEL DENGUE CLÁSICO ESTUDIO PARA LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD POR INMUNOCROMATOGRAFÍA Y ELISA EN PACIENTES DEL HOSPITAL EL EMPALME. PROPUESTA DE MEDIDAS PREVENTIVAS 2012. :106.
173. Charo DAG, López JPO, Samayoa GJG. SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN. :104.
174. Sekaran SD, Soe HJ. Issues in contemporary and potential future molecular diagnostics for dengue. *Expert Rev Mol Diagn*. 4 de marzo de 2017;17(3):217-23.
175. Peters R, Stevenson M. Zika virus diagnosis: challenges and solutions. *Clin Microbiol Infect*. 1 de febrero de 2019;25(2):142-6.
176. Escalante-Maldonado O, Gavilán RG, García MP, Marcelo A, Pacheco E, Cabezas C, et al. Desarrollo y validación del método de amplificación isotérmica mediada en lazo para la detección del virus Zika. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2 de diciembre de 2019;36:442-7.
177. Panigrahi S, Velraj P, Subba Rao T. Chapter 21 - Functional Microbial Diversity in Contaminated Environment and Application in Bioremediation. En: Das S, Dash HR, editores. *Microbial Diversity in the Genomic Era* [Internet]. Academic Press; 2019 [citado 15 de abril de 2021]. p. 359-85. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128148495000216>