



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización molecular de patógenos asociados a casos de enfermedad febril aguda indiferenciada en Leticia y Villavicencio

Leidi Yulieth Carvajal Aristizabal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad Ciencias

Medellín, Colombia

2023

Caracterización molecular de patógenos asociados a casos de enfermedad febril aguda indiferenciada en Leticia y Villavicencio

Leidi Yulieth Carvajal Aristizabal

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Director (a):

Ph.D. Karl Adolf Ciuoderis Aponte

Codirector (a):

Ph.D Juan Pablo Hernández Ortiz

Línea de Investigación:

Biotecnología microbiana

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

CRS-TID center for research and surveillance of tropical and infectious diseases

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias

Medellín, Colombia

2023

“Si tienes un sueño y crees en él, corres el riesgo de que se convierta en realidad”

Walt Disney

Agradecimientos

A mi director, el Doctor Karl Ciuderis Aponte y a mi codirector, el Doctor Juan Pablo Hernández Ortiz, por su paciencia, apoyo y consejos, por compartir sus conocimientos invaluable para lograr el desarrollo exitoso de este proyecto.

Al Laboratorio Genómico One Health y sus integrantes: Laura Pérez, Isabel Moreno, Catalina Álvarez y Daniel Castaño, por el apoyo, asesorías y amistad brindadas durante la maestría.

A laboratorio Abbott y a la Coalición ante pandemias (APDC) por el apoyo de pruebas de laboratorio.

Agradecimientos muy especiales a mis padres por demostrarme que con respeto, disciplina y responsabilidad puedo alcanzar mis sueños, por ser ejemplo de grandeza y valentía. A mi hermana por su apoyo y motivación en cada momento del camino.

Resumen

Caracterización molecular de patógenos asociados a casos de enfermedad febril aguda indiferenciada en Leticia y Villavicencio

El síndrome febril agudo indiferenciado (EFAI) se refiere a un conjunto de enfermedades que, además de fiebre, se manifiestan con síntomas como dolor de cabeza, malestar general, falta de apetito, entre otras, lo que dificulta el diagnóstico. Estas enfermedades pueden estar asociadas a infecciones virales, bacterianas y parasitarias, por lo que su diferenciación requiere el uso de técnicas especializadas que son poco accesibles en las regiones más vulnerables. En este trabajo se diseñaron y validaron estrategias de detección molecular con PCR múltiple para virus como dengue, zika, chikunguña y oropouche, bacterias como *Leptospira* spp, *Rickettsia* spp, *Borrelia* spp, *Anaplasma* spp, *Brucella* spp y *Bartonella* spp y parásitos *Plasmodium* spp. Se tamizaron muestras de pacientes febriles de Leticia y Villavicencio entre enero de 2021 y mayo de 2022, usando una estrategia de pools. Se logró la validación exitosa de las técnicas PCR multiplex con eficiencias mayores a 90% y coeficientes de variación (CV) menores al 10%, sin perder sensibilidad respecto a la PCR singleplex. Se detectó la presencia de dengue (2.24% y 13.81%) y malaria (1.2% y 1.29%) en Villavicencio y Leticia respectivamente, pero sólo en Leticia se detectó oropouche (0.22%). Sin embargo, un alto porcentaje de casos fueron no identificados, lo cual demuestra el reto que representan las EFAI en nuestro país, pues sólo teniendo estrategias accesibles, confiables y rápidas, será posible identificar de forma oportuna las causas para ofrecer el tratamiento más adecuado, prevenir futuros brotes o epidemias por patógenos nuevos o poco estudiados.

Palabras clave: Bacterias, Virus, Parásitos, Enfermedad febril, Detección molecular, Leticia, Villavicencio.

Abstract

Molecular characterization of pathogens associated with cases of acute undifferentiated febrile illness in Leticia and Villavicencio

Acute undifferentiated febrile syndrome (AIFS) refers to a group of diseases that, in addition to fever, manifest with symptoms such as headache, general malaise, and lack of appetite, among others, which makes diagnosis difficult. These diseases can be associated with viral, bacterial, and parasitic infections, so their differentiation requires the use of specialized techniques that are not accessible in the most vulnerable regions. In this work, multiplex PCR molecular strategies were designed and validated for the detection of viruses such as dengue, zika, chikunguña, and oropouche, bacteria such as *Leptospira* spp, *Rickettsia* spp, *Borrelia* spp, *Anaplasma* spp, *Brucella* spp, and *Bartonella* spp, and parasites Plasmodium spp. Using a pooled strategy, samples of febrile patients from Leticia and Villavicencio were screened between January 2021 and May 2022. Successful validation of multiplex PCR tests was achieved with efficiencies greater than 90% and coefficients of variation (CV) less than 10%, without losing sensitivity with respect to singleplex PCR. The presence of dengue (2.24% and 13.27%) and malaria (1.2% and 1.4%) was detected in Villavicencio and Leticia respectively, but only in Leticia was oropouche detected (0.22%). However, a high percentage of cases were not identified, which demonstrates the challenge that EFAI represents in our country, since only by having accessible, reliable, and rapid strategies, it will be possible to identify the causes in a timely manner to identify the most appropriate treatment, prevent future outbreaks or epidemics by new or poorly studied pathogens.

Keywords: Bacteria, Virus, Parasites, Febrile illness, Molecular detection, Leticia, Villavicencio.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	15
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	16
Introducción y planteamiento del problema.....	18
1. Objetivos.....	22
1.1 Objetivo general	22
1.1.1 Objetivos específicos.....	22
2. Marco teórico.....	23
2.1 Síndrome febril agudo	23
2.1.1 Factores de transmisión de EFAI.....	24
2.2 Patógenos virales causantes de EFAI	25
2.2.1 <i>Flavivirus</i>	25
2.2.2 <i>Alphavirus</i>	26
2.2.3 <i>Bunyavirus</i>	27
2.3 Patógenos bacterianos causantes de EFAI	28
2.3.1 Espiroquetas – <i>Leptospira</i> spp.....	28
2.3.2 <i>Brucella</i> spp.....	29
2.3.3 <i>Bartonella</i> spp.....	30
2.3.4 <i>Rickettsia</i> spp	30
2.3.5 <i>Anaplasma</i> spp.....	31
2.4 Parásitos causantes de EFAI	31
2.4.1 <i>Plasmodium</i> spp.....	31
2.5 Etapas de la enfermedad febril infecciosa	32
2.5.1 Etapa 1: Incubación	32
2.5.2 Etapa 2: Aguda.....	33
2.5.3 Etapa 3: Convalecencia	33
2.6 Técnicas de detección de patógenos	34
2.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
2.6.2 Secuenciación	36
3. Metodología.....	38
3.1 Muestras clínicas.....	38
3.2 Técnicas moleculares.....	39

3.2.1	Extracción y pools de ácidos nucleicos	39
3.2.2	Estandarización y validación de PCR	40
3.2.3	Detección de virus.....	42
3.2.4	Detección de bacterias.....	43
3.2.5	Detección de parásitos.....	44
3.3	Análisis de datos.....	44
4.	Resultados y discusión	47
4.1	Muestras clínicas	47
4.2	Técnicas moleculares	49
4.2.1	Extracción y pools de ácidos nucleicos	49
4.2.2	Estandarización y validación de PCR	51
4.2.3	Detección de virus, bacterias y parásitos.....	55
4.2.4	Análisis estadístico.....	60
4.2.5	Propuesta de abordaje de EFAI	66
4.2.6	Propuesta de secuenciación metagenómica para abordaje de la EFAI	69
5.	Conclusiones y recomendaciones	73
5.1	Conclusiones	73
5.2	Recomendaciones	74
	Bibliografía	83

Lista de figuras

Figura 2-1: Etapas de la enfermedad infecciosa y diferentes formas de detección según el momento respecto al inicio de los síntomas. Nombre de la fuente: Adaptado de (68)	34
Figura 4-1: Distribución de las muestras por edad y sexo para Leticia y Villavicencio.	47
Figura 4-2: Comparación de la detección de muestras clínicas positivas para malaria de forma individual y en pool. A. Valor Ct de la muestra individual (azul) y en pool (verde). B. Diferencia entre los valores Ct de cada muestra, menores a 3 (verde) y mayores (rojo).	50
Figura 4-3: Comparación del valor Ct en la detección de dengue en muestras clínicas positivas de forma individual y en pools. A. Valor Ct de la muestra individual (azul) y en pool (amarillo). B. Diferencia entre los valores Ct de cada muestra, menores a 3 (verde) y mayores (rojo).	50
Figura 4-4: Síntomas de los participantes positivos para dengue y Malaria.	57
Figura 4-5: Síntomas de muestras positivas para anticuerpos IgM (A) y para otros antígenos (B).	59
Figura 4-6: Datos faltantes (Missing map) para cada una de las manifestaciones clínicas. Se muestran en negro los datos faltantes y en gris los datos presentes.	61
Figura 4-7: regresión logística multivariada para los síntomas posiblemente asociados con la infección por dengue. Se muestra el valor OR, el intervalo de confianza al 95% (IC 95%) y el nivel de significancia según el valor p (****' 0.001, ***' 0.01, **' 0.05 y .' 0.1)	63
Figura 4-8: esquema general de la propuesta metodológica para el abordaje de la EFAL.	69
Figura 4-9: esquema general de la propuesta de secuenciación metagenómica como estrategia de abordaje de EFAL.	71

Lista de tablas

Pág.

Tabla 3-1: Plásmidos utilizados en la validación de PCR.	41
Tabla 3-2: Lista de primers utilizados para la detección de patógenos virales asociados a EFAI.	42
Tabla 3-3: Lista de primers utilizados para la detección de patógenos bacterianos asociados a EFAI.	43
Tabla 3-4: Lista de primers utilizados para la detección de parásitos asociados a EFAI.	44
Tabla 3-5: definición, dimensiones y tipo de variables operativas incluidas en el estudio.	45
Tabla 4-1: Características demográficas y epidemiológicas de los participantes con enfermedad febril aguda indiferencia en Leticia y Villavicencio.	48
Tabla 4-2: Lista de patógenos para detección en PCR multiplex.	51
Tabla 4-3: Eficiencia y sensibilidad para PCR en tiempo real en ensayo individual y multiplex.	52
Tabla 4-4: Repetibilidad de los ensayos de validación de PCR en tiempo real singleplex y multiplex. Se muestra el coeficiente de variación entre las tres réplicas del mismo ensayo (Ensayo1) en el mismo momento.	53
Tabla 4-5: Reproducibilidad de los ensayos de validación de PCR en tiempo real singleplex y multiplex. Se muestra el coeficiente de variación entre el ensayo 1 y ensayo 2 en momentos diferentes.	54
Tabla 4-6: Resultados de detección de patógenos por PCR.	55
Tabla 4-7: Otros antígenos y anticuerpos (IgM) detectados. Se muestra la clasificación respecto a las muestras positivas para dengue, malaria o desconocidos.	58
Tabla 4-8: frecuencia de cada manifestación clínica respecto a casos positivos para dengue y malaria. Se incluye en porcentaje de positividad respecto a casos positivos totales y el valor p correspondiente para el análisis bivariado realizado. La casilla de % solo muestra el % positivo, pero este se debe contrastar con los otros porcentajes, que deben incluirse. Esta es la tabla a la que hacía referencia arriab de la comparación.	62
Tabla 4-9: comparación de las características generales de la secuenciación con Oxford Nanopore e illumina.	70

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
<i>bp</i>	Pares de bases	bp	Ecuación
<i>m</i>	Pendiente de una recta	$\frac{1}{\log(\# \text{ copias})}$	
<i>MW</i>	Peso molecular	$\frac{g}{mol*bp}$	Ecuación
<i>ng</i>	Nanogramos	ng	Ecuación
R^2	Coefficiente de correlación	1	

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
ε	Eficiencia	%	

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>CHIKV</i>	Virus chikunguña
<i>DENV</i>	Virus dengue
<i>ZIKV</i>	Virus Zika
<i>EFAI</i>	Enfermedad febril aguda indiferenciada
<i>LOD</i>	Límite de detección
<i>MAYV</i>	Virus mayaro

Abreviatura Término

<i>NGS</i>	Secuenciación de nueva generación
<i>OROV</i>	Virus oropouche
<i>PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>HIV</i>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<i>HBV</i>	Virus de la hepatitis B
<i>HCV</i>	Virus de la hepatitis C
<i>RT-PCR</i>	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa
<i>Ct</i>	Ciclo umbral

Introducción y planteamiento del problema

Una razón común para buscar atención médica en Colombia es la fiebre, lo cual plantea un desafío considerable para los profesionales de la salud y los sistemas de vigilancia, pues cuando una persona se presenta con un síndrome febril, este se puede asociar con una alta morbilidad y mortalidad (1). La fiebre puede tener causas de origen infeccioso o no infeccioso. Entre las fiebres de origen infeccioso está el síndrome de enfermedad febril aguda indiferenciada (EFAI), el cual se refiere a un grupo de enfermedades que son de difícil diagnóstico por la similitud de los síntomas, por lo que no se conoce la causa de la infección con sólo hacer el examen físico inicial o con las técnicas de laboratorio básicas. Debido a que las causas infecciosas de este síndrome son muy variadas, se dificulta el poder hacer un diagnóstico preciso y oportuno, así como dirigir el tratamiento más adecuado para cada caso (2). Entre las principales manifestaciones clínicas se encuentran síntomas inespecíficos como dolor de cabeza, mareo, pérdida de apetito, malestar general y mialgia (3).

Si bien son muchas las causas asociadas a la EFAI, aproximadamente el 90% de los casos se atribuyen a la infección por patógenos virales, bacterianos y parasitarios (4). La mayoría de estos patógenos son transmitidos por vectores como insectos, garrapatas y roedores. Debido a la ubicación geográfica y condiciones climáticas, Colombia es un país con las características propicias para la aparición de estos vectores y la propagación de las enfermedades que transmiten (5). Las EFAI afectan principalmente a las poblaciones más vulnerables, residentes de zonas rurales, barrios marginales o zonas de conflicto, por lo que se incluyen en el grupo de enfermedades desatendidas(6).

Debido a la reconocida situación de diseminación de *A. aegypti* y *Anopheles* spp. en Colombia, se da prioridad a la detección y vigilancia de enfermedades transmitidas por estos como dengue, zika, chikunguña, fiebre amarilla y malaria (7). Sin embargo, son muchos otros patógenos los que pueden

estar asociados a la EFAI y que son endémicos de zonas tropicales, como hantavirus, Arenavirus, *Rickettsia* spp, *Leptospira* spp, *Brucella* spp, *Leishmania* spp, *Trypanosoma cruzi*, entre otros. Incluso puede plantearse la posibilidad de nuevos patógenos causantes de EFAI que no han sido explorados.

En América Latina las EFAI han sido reconocidas como un gran reto y muchos esfuerzos han sido enfocados en determinar las etiologías asociadas como un mecanismo para su manejo y control. En los estudios que se han realizado, se han hecho pruebas para detectar patógenos como dengue, zika, chikunguña, hantavirus, virus respiratorios, *Leptospira* spp, malaria, *Rickettsia* spp, *Brucella* spp, mayaro y oropouche (8–13) y se han obtenido altos porcentajes de muestras con resultado indeterminado. Por ejemplo, se realizó un estudio en Ponce, Puerto Rico, para tamizar dengue, chikunguña, virus respiratorios y *Leptospira* spp donde el 48% de las muestras fueron indeterminadas (8); en Campo Grande, Brasil, se hizo un estudio para detectar dengue, zika, chikunguña y mayaro, con un 20,8% de muestras indeterminadas (9); en Recife, Brasil, se hizo un estudio similar con un 68,4% de muestras indeterminadas (10); en Puerto Maldonado, Perú, se hizo detección de dengue, zika, chikunguña y oropouche, con un 70,8% de casos indeterminados al final (11); en Río de Janeiro, Brasil se hizo detección de zika y chikunguña obteniendo un 40% de casos indeterminados (12) y en Piura, Perú, se realizó detección de dengue, zika y chikunguña con un 53,2% de casos indeterminados (13).

Estudios similares se han llevado a cabo en Colombia para determinar la etiología asociada a EFAI, como es el caso de Córdoba, donde se hizo un estudio para detectar dengue, *Leptospira* spp, hantavirus, malaria, *Rickettsia* spp, *Brucella* spp e influenza, donde el 35% de los casos fueron indeterminados (14); en Villa del Rosario se realizaron pruebas para detectar dengue, zika y chikunguña, obteniendo un 47,7% de casos indeterminados (15); en Villeta, Cundinamarca, se realizó un estudio para detectar dengue, *Leptospira* spp y *Rickettsia* spp, con un porcentaje de casos indeterminados de 53,8% (2) y en el Urabá Antioqueño se hizo el tamizaje para detectar dengue, *Leptospira* spp, *Rickettsia* spp, Arenavirus y hantavirus, con un 52,2% de casos indeterminados (7).

Es muy importante identificar la causa de la EFAI para dar una mejor atención a los pacientes mediante un diagnóstico y tratamiento adecuados, así como dar un enfoque específico a las medidas de prevención y control, generando un sistema de vigilancia activa que incluya la detección no sólo de patógenos conocidos, sino también de patógenos emergentes (16). El estar preparados para determinar con rapidez y precisión la etiología de la EFAI, permite a los sistemas de salud hacer una gestión adecuada y oportuna de posibles epidemias.

Con lo expuesto anteriormente, este trabajo se enfoca en el estudio de los casos de pacientes con EFAI a los cuales solo se les ha logrado hacer un diagnóstico clínico presuntivo, y por tanto es necesario recurrir a técnicas de laboratorio más específicas para establecer un diagnóstico preciso. Si bien la detección de los patógenos asociados a enfermedad febril puede hacerse mediante pruebas de antígenos y anticuerpos, este estudio se desarrolla sólo en la detección de los patógenos en la fase aguda, es decir, durante los primeros días de la infección en los cuales la probabilidad de detección del patógeno es más alta. Los patógenos se van a detectar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para genes específicos de virus como dengue, zika, Chikunguña y Oropouche, además de bacterias como *Rickettsia* spp, *Leptospira* spp, *Brucella* spp, *Borrelia* spp, *Anaplasma* spp, *Bartonella* spp y parásitos del género *Plasmodium* spp.

El estudio propuesto es retrospectivo observacional a partir de un repositorio de muestras recolectadas en Leticia y Villavicencio. El proyecto se divide en dos etapas, la primera incluye muestras de suero de pacientes recolectadas entre enero y octubre de 2021, mientras en la segunda etapa se incluyen muestras de sangre completa recolectadas entre octubre de 2021 y mayo de 2022. Es importante destacar que en el año 2021 aún se estaba afrontando la pandemia por el nuevo virus SARS-CoV-2, lo cual generó un gran impacto en la salud de nuestro país, pues todos los esfuerzos estaban enfocados en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, dejando en un segundo plano otras enfermedades causantes de enfermedad febril aguda y generando tal vez un mal diagnóstico o subregistro de los casos. Es por esto por lo que se quiere determinar qué proporción de estos casos de EFAI puede ser atribuida a infección por otros patógenos virales, bacterianos y parasitarios.

En muchos lugares del territorio colombiano se presentan las condiciones ambientales favorables para el mantenimiento de la transmisión endémica del dengue y otras enfermedades transmitidas por vectores de importancia. Se eligieron las ciudades de Leticia y Villavicencio por sus condiciones geográficas, climáticas y demográficas de interés, así como por la alta circulación de patógenos causantes de enfermedad febril. En el Departamento de Meta, el dengue es un problema grave de salud pública, y Villavicencio, su capital, es el foco de transmisión más importante del departamento (17). Este departamento ocupa el primer lugar del país con 17145 casos reportados anualmente. De forma similar, Leticia ocupa el 14o lugar entre municipios con más alta incidencia de dengue en el país, siendo el primero Villavicencio (18). A pesar de que se conoce la circulación de estos patógenos, muchos casos de enfermedad febril aguda no son correctamente diagnosticados, por lo que lograr establecer el perfil etiológico de estos casos, puede tener un impacto en la disminución de la morbilidad y mortalidad, y por lo tanto en la calidad de vida de la población.

Aunque se ha hecho un gran esfuerzo por establecer la etiología de la EFAl, este sigue siendo un tema de relevancia clínica y con gran potencial de estudio, por lo que deben ampliarse la búsqueda de patógenos incluidos en el tamizaje inicial, permitiendo de esta manera que se pueda disminuir cada vez más la cantidad de casos indeterminados (1). Además, en la búsqueda de literatura, no se encontraron estudios amplios para determinar la etiología asociada a la EFAl en Leticia y Villavicencio. Esto se convierte también en una motivación para llevar a cabo este trabajo y poder ofrecer conocimientos científicos actualizados que puedan ser aplicados, no sólo en las ciudades de estudio, sino también para dar prioridad a este tema en todo el país. Aunque el perfil etiológico de la enfermedad febril puede variar en cada lugar, la información obtenida sirve como base para estudios futuros.

Desde la biotecnología se puede hacer frente a esta situación, pues para la detección de este tipo de patógenos ya no es necesario hacer aislamientos o procesos que requieran mucho tiempo o mano de obra, sino que se cuenta con el desarrollo de técnicas moleculares específicas que permiten hacer una detección rápida y confiable de diferentes patógenos. Se cuenta con los conocimientos, herramientas y recursos necesarios para llevar a cabo la identificación de patógenos presentes en suero y sangre que pueden ser la posible causa de la enfermedad febril aguda indiferenciada, así como los canales de comunicación que permitan poner a disposición de las comunidades locales y nacionales los resultados obtenidos, de forma que se conviertan en un punto de partida para dar un enfoque más dirigido a la atención, prevención y control de este tipo de enfermedades. De esta manera, se puede lograr el fortalecimiento de las capacidades regionales, la generación de conocimiento técnico-científico y mejorar la vigilancia, manejo y control de la EFAl.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Caracterizar la asociación de patógenos virales, bacterianos y parasitarios con casos de EFAI en muestras de pacientes procedentes de dos ciudades en Colombia y describir su epidemiología.

1.1.1 Objetivos específicos

- Detectar por técnicas moleculares la presencia del genoma de patógenos virales, bacterianos y parasitarios en casos de EFAI.
- Estimar la proporción de casos de EFAI asociados a infección por patógenos virales, bacterianos y parasitarios.
- Establecer si existen factores epidemiológicos y clínicos potencialmente asociados con el riesgo de presentación de EFAI.
- Proponer un abordaje metodológico para el diagnóstico y detección de la causa infecciosa de la EFAI en Colombia.
- Proponer una línea base para futuros estudios metagenómicos y de descubrimiento de patógenos asociados con síndrome febril agudo en Colombia.

2. Marco teórico

2.1 Síndrome febril agudo

La fiebre es un aumento en la temperatura corporal por encima de los límites normales que se da como respuesta inflamatoria del organismo ante la agresión por diversas causas y que conlleva alteración de las funciones corporales y un alto gasto energético, lo cual no puede tolerarse por mucho tiempo (4). Cuando la fiebre se origina de forma brusca y no se ha identificado signos o síntomas relacionados con un foco infeccioso en menos de siete días de evolución, se identifica como enfermedad febril aguda indiferenciada (EFAI) (19). Además de fiebre se pueden presentar otros síntomas como dolor de cabeza, escalofríos, malestar general, mialgias, erupciones cutáneas dolor retro orbital, mareo, pérdida del apetito, entre otros (20).

La EFAI se asocia con una alta morbilidad y mortalidad, muchas veces por un diagnóstico incorrecto o tardío especialmente en países en desarrollo donde el acceso a las instalaciones y técnicas de diagnóstico específicas es más limitado (21). El diagnóstico presuntivo enfocado sólo en los síntomas da lugar a notificación excesiva de ciertas enfermedades como dengue, mientras la notificación de otras enfermedades menos estudiadas o conocidas es insuficiente. Si bien un alto porcentaje de casos de EFAI se atribuye a la infección por dengue (22) y malaria (23), el perfil etiológico de la EFAI se relaciona con diversas infecciones que pueden ser de origen viral, bacteriano y parasitario. Entre los patógenos virales principales están dengue, zika, chikunguña, encefalitis virales, hepatitis, hantavirus, arenavirus, fiebre amarilla, mayaro, oropouche, influenza, mientras que entre los patógenos bacterianos se encuentra *Leptospira* spp, *Brucella* spp, *Rickettsia* spp, *Bartonella* spp, *Anaplasma* spp, *Ehrlichia*, *Salmonella*, *Borrelia* spp, espiroquetas y para el caso de patógenos parasitarios se encuentra principalmente *Plasmodium* spp, *Trypanosoma cruzi*,

Theileria y *Babesia* (3)(6). Muchos de estos patógenos causantes de EFAI son transmitidos por vectores y se favorece su transmisión por diferentes factores.

2.1.1 Factores de transmisión de EFAI

La transmisión de patógenos causantes de EFAI se puede dar por vectores o por contacto persona-persona mediante secreciones o sangre infectada. Los mosquitos, garrapatas y roedores son los vectores de mayor transmisión, sin embargo, los animales domésticos, el ganado, los monos y primates también pueden actuar como reservorios intermediarios para diversas enfermedades (24).

La ubicación geográfica de Colombia favorece la diversidad biológica, climática, paisajística y cultural que posee. Las regiones se caracterizan por condiciones climáticas y ambientales diferentes dependiendo del ecosistema, lo cual incide en la salud de las personas por el entorno al que están expuestas y esto es clave para identificar factores multicausales para diversas enfermedades asociadas (25). Situaciones como el cambio climático, calentamiento global, los flujos acelerados de información e interrelaciones de mercancías y personas que se desplazan fácilmente a diversos ambientes en poco tiempo, favorece la dispersión de microorganismos e inciden en nuevas formas de adaptación por parte de los agentes patógenos los cuales generan resistencias e inmunidades no conocidas, cuya evolución puede generar epidemias e incluso pandemias. Esta dispersión de microorganismos se ve favorecida por la distribución de vectores (26).

Vectores como los mosquitos del género *Anopheles*, habitan en bosques y selvas, aunque se han adaptado a otros ambientes a medida que el ser humano los ha desplazado, mientras los del género *Aedes*, se asocian a condiciones que obligan al almacenamiento de agua que favorece su desarrollo y proliferación dentro y alrededor de viviendas en centros urbanos (5). En cuanto a los roedores, son hospederos naturales de la familia *Muridae* y tres subfamilias: *Murinae* (ratas y ratones del Viejo Mundo), *Arvicolinae* (topillos) y *Sigmodontinae* (ratas y ratones del Nuevo Mundo). Se ha encontrado una alta asociación evolutiva entre los roedores, hantavirus y arenavirus, cuya transmisión se da por saliva, orina y heces. Se puede dar el contagio por inhalación o por contacto directo con alimentos contaminados. Generalmente la aparición de enfermedad como hantavirus se atribuye a entornos rurales, pero algunas formas, producidas por el virus Seoul, se dan en ciudades (27).

2.2 Patógenos virales causantes de EFAI

2.2.1 *Flavivirus*

Los virus del género *Flavivirus* comprenden más de 60 especies, de las cuales 30 se sabe que causan enfermedades en los humanos. Son virus de RNA de una sola cadena de sentido positivo con un tamaño aproximado de 11 kb (28), poseen envuelta lipídica con proyecciones de glicoproteína M y E, esta última involucrada en la unión a los receptores de la célula huésped. Su genoma da lugar a 10 proteínas: proteína C, premembrana M, proteína E y 7 proteínas necesarias para la replicación: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. Se han adaptado a crecer en una amplia variedad de insectos y garrapatas. Se caracterizan por causar infecciones en el sistema nervioso central, fiebre hemorrágica y enfermedad febril aguda. Dentro de los más reconocidos se encuentran los virus dengue, zika, virus del oeste del Nilo, fiebre amarilla y virus de encefalitis japonesa(29).

La detección de este tipo de virus incluye el aislamiento viral debido a que los pacientes pueden estar viremicos y los títulos no son lo suficientemente altos para lograr la detección. Sin embargo, la RT-PCR se ha convertido en la técnica de elección para detectar la viremia, mientras que, cuando han transcurrido varios días desde el inicio de los síntomas, se prefiere la detección de anticuerpos IgM.

A continuación, se describen algunos de estos virus:

- **Dengue:** debido a las características clínicas inespecíficas, es difícil identificar en qué momento se dieron los primeros casos, sin embargo, en 1903 se probó que la infección estaba ligada al mosquito *A. aegypti* y en 1906 su etiología viral, aunque el aislamiento del virus se hizo en 1944. Se conocen cuatro serotipos (DENV-1 a DENV-4) según sus características antigénicas y genéticas. La mayoría de las infecciones por el virus dengue son subclínicas, siendo la fiebre la evolución clínica habitual, aunque en algunos pacientes se puede dar un síndrome más grave generalmente asociado a la inmunidad heteróloga (30). La infección suele ser asintomática o inespecífica, con síntomas como fiebre, malestar general, escalofríos, dolor de cabeza, dolor retroorbital, síntomas respiratorios de las vías altas, entre otros. Los tratamientos existentes están enfocados en la disminución y el monitoreo de los síntomas. La prevención se basa en el control de los mosquitos *A. aegypti*, eliminando los lugares de procreación, además se usan

estrategias combinadas de vigilancia del vector, tratamiento del área y monitorización. Aún no hay vacunas disponibles por la complejidad inmunológica de los serotipos (31).

- **Zika:** las primeras infecciones en humanos se informaron en 1977 en Java central, Indonesia, aunque el virus se aisló originalmente de un mono centinela en el bosque Zika de Uganda (32). Los síntomas que produce son no específicos y se caracteriza principalmente por fiebre, dolor de cabeza, erupción cutánea pronunciada y artralgia ocasional. En 2015 se informaron por primera vez complicaciones graves por zika, pues en Brasil, durante la epidemia que se dio en ese año, se encontró asociación entre las infecciones por zika y el aumento dramático en la microcefalia y el síndrome de Guillain-Barré (33). Estas complicaciones se dan por la capacidad del virus para cruzar la barrera placentaria humana e infectar el sistema nervioso central del feto en desarrollo, generando calcificaciones cerebrales, microcefalia y otras malformaciones congénitas. El síndrome de Guillain-Barré se da en adultos con síntomas de neuropatía y parálisis (32). El control de los mosquitos es el principal método de prevención para la infección por este virus.
- **Fiebre amarilla:** se produjo un brote en 1648 donde se identificó la enfermedad por primera vez, aunque la transmisión por el mosquito *A. aegypti* no se demostró hasta 1900. Theiler desarrolló una vacuna atenuada en 1930 que tuvo gran importancia en el control de la enfermedad en las áreas endémicas, aunque se siguen presentando brotes. Las infecciones se extienden con facilidad a causa de la migración, con la posible implicación de *A. aegypti* en áreas urbanas y en zonas secas donde los almacenamientos de agua proveen lugares para que los mosquitos críen (34). Durante la estación seca, los virus sobreviven en los huevos de los mosquitos infectados, que son resistentes a la desecación. Los síntomas pueden ser desde una gripe indiferenciada hasta una fiebre hemorrágica que causa mortalidad en el 50% de los casos. No se dispone de un tratamiento antiviral (35).

2.2.2 Alphavirus

Los *Alphavirus* de importancia clínica son transmitidos por artrópodos y se destacan chikunguña, mayaro, encefalitis equina oriental, encefalitis equina occidental y encefalitis equina venezolana. Los síntomas causados por la infección de estos virus incluyen sobre todo fiebre, exantema y artropatía, que aparecen abruptamente después de 2 a 10 días de incubación. Durante la fase temprana de la enfermedad, también se presentan fiebre, dolores musculares, malestar general y dolor de cabeza. Esto puede ir seguido de manifestaciones graves como petequias, púrpura, hematemesis y sangrado de las encías en una minoría con infecciones graves por el virus

chikunguña. Los síntomas articulares son severos y es difícil diferenciarlos de otras enfermedades inflamatorias de las articulaciones (36)

El género *Alphavirus* pertenece a la familia *Togaviridae*, son de cadena de RNA positiva y su estructura se compone por viriones con cubierta lipídica (37). El genoma contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican cuatro proteínas no estructurales (nsp1–4) y cinco proteínas estructurales (cápside, E3, E2, 6K y E1) (38). Los *Alphavirus* entran en las células por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor. Después de que la proteína de la cubierta E2 se une al receptor celular, la partícula vírica es englobada en una vesícula endocítica.

- **Chikunguña:** se caracteriza por manifestaciones artríticas invalidantes de la enfermedad. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es valiosa para la confirmación temprana de infección por chikunguña, sin embargo, es una detección que se da sólo en fase viremica y la detección posterior requiere el uso de técnicas serológicas para anticuerpos IgM (36). Aunque la enfermedad por chikunguña es autolimitada y no letal, más del 30 % de las personas infectadas desarrollarán una enfermedad crónica con dolor articular intenso persistente, tenosinovitis y poliartralgia incapacitante que puede durar de meses a años, lo que afecta negativamente la calidad de vida de una persona y la productividad socioeconómica. La falta de medicamentos específicos o vacunas autorizadas para tratar o prevenir la enfermedad chikunguña asociada con la presencia global del mosquito vector en áreas tropicales y templadas, representando una posibilidad de que el chikunguña se propague continuamente a diferentes territorios, hacen de este virus un agente de carga para la salud pública. En América del Sur, donde el virus del dengue es endémico y el virus del zika se introdujo recientemente, aún es necesario estimar el impacto de la expansión de las infecciones por chikunguña y la coinfección con otros arbovirus (39)

2.2.3 *Bunyavirus*

Bunyavirus se compone de más de 200 virus clasificados en diferentes géneros, principalmente *Orthobunyavirus* (como Oropouche, Bunyamwera, Bwamba, California, Simbu, entre otros), *Phlebovirus*, *Nairovirus* y hantavirus que se distinguen fácilmente por sus características genéticas, morfológicas, bioquímicas e inmunológicas. Se caracterizan por ser esféricos recubiertos por una membrana lipídica y contener tres segmentos de RNA de polaridad negativa que codifican para seis proteínas o menos, el ARN pequeño (segmento S) codifica una nucleoproteína viral, el ARN de tamaño medio (Segmento M) codifica dos proteínas de la cubierta

glicosiladas y se cree que el ARN grande (Segmento L) codifica una polimerasa viral presente en los virus con cubierta lipídica (40).

- **Oropouche:** se trata de un *Orthobunyavirus* (del grupo Simbu) que ha producido epidemias en pueblos y ciudades de Brasil, Panamá y Perú, aunque tiene también una distribución mucho más amplia en la selva. Se aisló por primera vez en 1955 en un trabajador forestal febril de Trinidad. La fase aguda de la enfermedad dura de 2 a 5 días, dando lugar al inicio de fiebre con escalofríos, cefalea, mialgias y a menudo vómitos y artralgias, incluso se han descrito casos de meningitis aséptica. La enfermedad es autolimitada, aunque puede haber astenia y artralgias prolongadas. Se desconoce el ciclo forestal natural, aunque en áreas urbanas la estación lluviosa da lugar a la reproducción de mosquitos hematófagos y las epidemias afectan a miles de seres humanos. El diagnóstico puede hacerse mediante detección de anticuerpos IgM y también están disponibles ensayos de RT-PCR. La forma más efectiva de prevenir y controlar el impacto de las epidemias por fiebre de oropouche, es mediante el control de los vectores. Este virus puede ser transmitido por varios vectores, por ejemplo, en el ciclo silvestre se ha encontrado en *Culicoides paraensis*, *Coquilletidia venezuelensis* y *A. serratus*, mientras que en el ciclo urbano se transmite por mosquitos *C. paraensis* y *Culex quinquefasciatus*, ambos muy comunes en los ambientes tropicales de Colombia (41).

2.3 Patógenos bacterianos causantes de EFAI

2.3.1 Espiroquetas – *Leptospira* spp

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de importancia global que se caracteriza por causar síndromes febriles indiferenciados que puede confundirse muchas veces con otras enfermedades endémicas de cada región. Se asocia con la exposición a orina de animales infectados, aunque se considera un problema latente de interés en cualquier población por el fenómeno de la globalización, los cambios climáticos, y las migraciones de animales y personas (42). Son bacterias móviles, aerobias obligadas que comprenden 21 especies, divididas en dos grupos, uno infeccioso que incluye patógenos y patógenos intermedios, y otro no infeccioso. El genoma se compone de dos cromosomas circulares uno grande y uno pequeño (cromosoma I 3500-4300 kb y cromosoma II 300-350 kb) (43). Se estima que el tiempo de incubación es de 10 días, iniciando la presentación de síntomas con fiebre súbita intermitente elevada seguida de síntomas inespecíficos como cefalea, escalofríos, temblores y mialgias, dolor abdominal; anorexia, náuseas y vómitos, diarrea, tos y

faringitis. La fase aguda dura de 5 a 7 días. Si bien la medición de anticuerpos IgM es una de las técnicas de detección más utilizada, la PCR se ha empezado a utilizar como estrategia de detección temprana en la fase aguda y puede realizarse en muestras de sangre, suero, orina y líquido cefalorraquídeo, aunque en la orina puede presentarse una carga muy alta del patógeno, así como otros compuestos que pueden inhibir la reacción (44). Para prevenir la transmisión, se debe reducir el contacto directo con animales posiblemente infectados y el contacto directo con el suelo y el agua contaminados por orina, así como medidas de control de los roedores(29).

2.3.2 *Brucella* spp

Las bacterias del género *Brucella* son cocobacilos gramnegativos pequeños, no esporulados y no encapsulados. Crecen en condiciones aerobias, aunque algunos de ellos requieren CO₂ suplementario para su crecimiento primario. Los microorganismos del género *Brucella* son patógenos intracelulares facultativos que pueden sobrevivir y multiplicarse en el interior de las células fagocitarias del huésped. Se han caracterizado numerosas proteínas de las membranas externa e interna, citoplásmicas y periplásmicas, algunas de las cuales parecen desempeñar una función en la virulencia y en la supervivencia intracelular (45). La brucelosis es una enfermedad zoonótica que se presenta más frecuentemente en los países que carecen de sistemas de salud pública eficaces y de programas de salud animal. La infección por *Brucella* spp genera síntomas inespecíficos como fiebre, sudoración profusa, malestar, anorexia, cefalea y lumbalgia. El inicio de la infección puede ser lento o agudo, y tiene lugar generalmente entre las 2 y 4 semanas desde la exposición al patógeno. En los pacientes no tratados durante largos períodos de tiempo es aparente un patrón de fiebre ondulante (46).

Debido a la inespecificidad de los síntomas, el diagnóstico debe estar acompañado de una historia clínica en la cual se identifiquen factores de riesgo. Muchos laboratorios utilizan sistemas automatizados de hemocultivo con monitorización continua, aunque también se pueden utilizar métodos serológicos para medición de anticuerpos IgM o técnicas moleculares como la PCR, considerando que las técnicas utilizadas deben ser debidamente validadas y estandarizadas para evitar la detección de falsos positivos o falsos negativos, además, se recomienda el uso combinado de pruebas para un diagnóstico definitivo. La prevención de la brucelosis humana depende de la eliminación de este patógeno en los animales, para lo cual se han desarrollado algunas vacunas, pero ninguna totalmente eficaz(29).

2.3.3 *Bartonella* spp

Las bacterias del género *Bartonella* spp son cocobacilos Gram negativos intracelulares facultativos y se ha encontrado una alta adaptación en los mamíferos con una alta persistencia en la sangre por la infección de los eritrocitos(47). Se han identificado 24 especies de *Bartonella* distribuidas ampliamente en la naturaleza, nueve de estas se relacionan con enfermedades en los seres humanos y tres los infectan frecuentemente. Las manifestaciones clínicas dependen de la especie y de las características del hospedero, puede presentarse enfermedad por arañazo de gato (CSD), la angiomatosis bacilar (BA) y, en algunos casos, como enfermedad febril aguda que aparece después de 15 a 25 días desde el contacto con el patógeno (48,49). Entre las técnicas para diagnóstico de *Bartonella* spp se encuentran métodos de cultivo bacteriológicos convencionales modificados, cocultivo con células endoteliales, técnicas inmunoserológicas o inmunocitoquímicas y/o amplificación del ADN. Si bien las técnicas de cultivo pueden ser acertadas, los requerimientos específicos y los tiempos requeridos para lograr el aislamiento, se convierten en un limitante para utilizarlo. En el caso de las pruebas serológicas, se requieren títulos altos de anticuerpos para lograr un resultado confiable, pues se han encontrado falsos negativos con algunas variantes genotípicas. Cuando se dispone de poca cantidad de muestra, la PCR resulta ser una buena opción con resultados sensibles y específicos. Puede hacerse la detección en tejido, suero y sangre completa (50,51). El tratamiento depende del tipo de infección y consiste generalmente en el uso de antibióticos (52).

2.3.4 *Rickettsia* spp

Las bacterias del género *Rickettsia* son bacilos Gram negativos intracelulares obligados que se caracterizan por tener un genoma pequeño, la infección se presenta como una EFAI que se acompaña de cefalea, mialgia y malestar general. Aunque también se pueden presentar manifestaciones cutáneas (erupciones y escaras), y a medida que se disemina la infección, se puede presentar exantema o en los casos graves, neumonía intersticial, meningoencefalitis, lesión renal aguda, insuficiencia multiorgánica y muerte (53). La detección de la infección por este patógeno se hace principalmente mediante pruebas serológicas, aunque el uso de inmunofluorescencia indirecta es cada vez más utilizada (54). La amplificación del DNA mediante técnicas moleculares (PCR) permite la detección de *Rickettsia* spp en muestras de sangre, plasma y tejidos (biopsias e hisopados de escaras), sin embargo, puede usarse sangre completa o suero con menor sensibilidad. La carga bacteriana y la etapa de la infección son factores que influyen en

el éxito de detección por este método (55). La identificación oportuna de la infección por *Rickettsia* spp es un factor clave para brindar el tratamiento adecuado, por lo que es importante contar con estrategias de detección junto con el análisis de signos clínicos y factores de riesgo. El tratamiento implica el uso de antibióticos en dosis que dependen de la etapa de la infección. No hay vacunas disponibles, por lo que es indispensable usar otras estrategias de prevención que eviten el contacto con vectores (53).

2.3.5 *Anaplasma* spp

Las bacterias del género *Anaplasma* spp son gramnegativas intracelulares obligadas, por lo que sobreviven y se propagan dentro de las células del huésped evadiendo las funciones de los neutrófilos. Se transmite por vectores como garrapatas y se ha encontrado que algunos mamíferos salvajes y domésticos pueden ser portadores. Además de los síntomas generales de la enfermedad febril, se pueden presentar otros como erupción, síntomas gastrointestinales o respiratorios. Algunos casos pueden incluso tener complicaciones potencialmente mortales. Se puede presentar coinfección con otros patógenos transmitidos por garrapatas. El periodo de incubación es de 1 o 2 semanas aproximadamente (56).

Para la detección de este patógeno se tienen en cuenta los signos clínicos e historial del paciente, y para confirmación pueden usarse diferentes métodos incluyendo pruebas serológicas, identificación de mórulas en sangre periférica, inmunohistoquímica para detección en tejidos, detección de DNA por PCR y aislamiento en cultivo. Cada método tiene sus ventajas según el caso, por ejemplo, el uso de PCR para detectar el DNA tiene una alta sensibilidad y especificidad, permitiendo además un diagnóstico en poco tiempo. Cuando se utiliza serología, el aumento del título de anticuerpos en 4 veces se considera positivo. La inmunohistoquímica se hace en muestras de pulmón, hígado, ganglios linfáticos, médula ósea y bazo. El tratamiento se enfoca en el uso de antibióticos (57).

2.4 Parásitos causantes de EFAI

2.4.1 *Plasmodium* spp

Los parásitos del género *Plasmodium* spp son protozoos unicelulares transmitidos por la picadura de mosquitos *Anopheles* spp hembra que causan malaria, una enfermedad infecciosa devastadora

para los humanos (58). Estos parásitos pertenecen al grupo Apicomplexa de protozoos, que se caracteriza morfológicamente por la presencia de un complejo especializado de orgánulos apicales implicados en la invasión de la célula huésped. La malaria se presenta como una enfermedad febril aguda con escalofríos y picos febriles de hasta 40°C; seguida de sudoración profusa que induce fatiga extrema y sueño. Se puede presentar también mialgia, dolor de cabeza, anorexia y tos, lo que hace que el diagnóstico sólo por signos clínicos no sea confiable. En ocasiones, los pacientes presentan síntomas gastrointestinales, síntomas respiratorios e ictericia. La malaria por *P. falciparum* es un cuadro que puede ser mucho más agudo y grave que la malaria causada por otras especies de *Plasmodium* spp (29).

El estándar de oro para el diagnóstico es un análisis microscópico de frotis de sangre gruesos y delgados, aunque también se considera el uso de pruebas rápidas en casos donde la microscopía no es accesible (59). Aunque las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) no han sido ampliamente utilizadas, la necesidad de un método rápido, específico y sensible, que permita un diagnóstico oportuno y que no requiere un alto volumen de muestra ha llevado a considerar su uso (60). Para el tratamiento, se tienen diferentes fármacos antipalúdicos cuyo uso debe iniciarse sólo después de lograr el diagnóstico específico (59). Un reto para el tratamiento es que estos parásitos han adquirido resistencia a cada uno de los fármacos antipalúdicos, especialmente *P. falciparum*. En la actualidad, los parásitos resistentes a los medicamentos prevalecen en las zonas donde el paludismo es endémico (61).

2.5 Etapas de la enfermedad febril infecciosa

El proceso infeccioso pasa por una serie de etapas que van desde la exposición del patógeno, su multiplicación y la recuperación de la infección (62). Cada una de ellas tiene características particulares que determinan la capacidad de detección del patógeno en cada momento y las técnicas más adecuadas según la etapa en la que se encuentre el paciente respecto al inicio de los síntomas. En la figura 2-1 se muestran las etapas de la infección y la forma de detección más adecuada. Son tres etapas principales como se describe a continuación:

2.5.1 Etapa 1: Incubación

Esta etapa hace referencia al tiempo que transcurre entre la exposición a un patógeno y el inicio de los síntomas. La duración varía mucho dependiendo del patógeno, siendo de días o incluso años. Las personas en esta etapa pueden portar una enfermedad sin presentar ningún síntoma, pero no

necesariamente significa que sea infecciosa, ya que el ser o no ser infecciosa durante la incubación depende del patógeno y de los días desde la exposición (63).

Se han hecho esfuerzos por lograr la detección de patógenos en esta etapa de la infección, pues esto permite una atención temprana del paciente y la toma de medidas rápidas como aislamiento y rastreo de contactos (64). Sin embargo, esto no siempre es exitoso y no funciona bien para todos los patógenos, pues un alto porcentaje de casos no logran ser detectados en esta etapa y pueden pasar como falsos negativos, lo cual puede empeorar el panorama de la infección.

2.5.2 Etapa 2: Aguda

En esta etapa se da la replicación o multiplicación activa del patógeno y alcanza la máxima carga en el paciente. Se incluye una fase inicial de síntomas leves conocida como prodromal y se van haciendo más pronunciados, incluyendo fiebre, dolor de cabeza, malestar general y falta de apetito. Los síntomas pueden llegar a ser muy pronunciados, tanto específicos del órgano afectado como en general debido a la fuerte reacción del sistema inmunitario (65). En esta etapa, debido a la cantidad de antígenos presentes, se puede realizar detección mediante PCR u otras pruebas moleculares como pruebas rápidas de antígeno o secuenciación (66,67). Al avanzar esta etapa, inicia la producción de anticuerpos IgM, que pueden ser también utilizados como método de detección con pruebas serológicas como la ELISA. Los tiempos específicos adecuados para cada método de detección depende del patógeno de interés, pero se hace una descripción general del desarrollo de la enfermedad y la respuesta a la infección.

2.5.3 Etapa 3: Convalecencia

Esta etapa se produce después de que el patógeno alcanza el punto máximo y la carga patogénica cae drásticamente. Es posible que algunos síntomas sigan estando presentes, pero no son tan fuertes como en la fase aguda de la enfermedad. El paciente se recupera gradualmente y vuelve a la normalidad, pero puede seguir siendo un foco de infección aunque se sienta mejor. En esta etapa, debido a que la cantidad de antígenos presentes es muy baja, la detección del patógeno se hace con métodos serológicos mediante medición de anticuerpos IgM por ELISA (67).

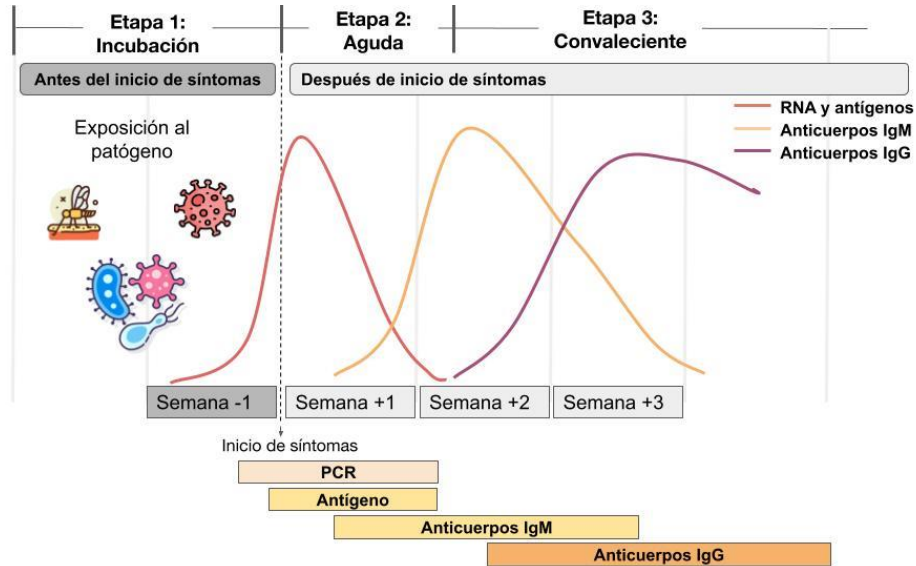


Figure 2-1: Etapas de la enfermedad infecciosa y diferentes formas de detección según el momento respecto al inicio de los síntomas. Nombre de la fuente: Adaptado de (68)

2.6 Técnicas de detección de patógenos

El contar con técnicas confiables de detección de patógenos es un factor clave en la toma de decisiones clínicas para el tratamiento del paciente afectado, por lo que la selección del tipo de prueba es crucial. El momento de la infección determina el tipo de prueba que debería utilizarse para lograr buenos resultados, como se observa en la figura 2-1, durante los primeros días desde el inicio de los síntomas las pruebas más adecuadas son las que se enfocan en la detección del genoma del patógeno o algunos antígenos particulares, este sería el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y pruebas rápidas de antígenos. Cuando el paciente refiere síntomas no recientes, lo más adecuado es recurrir a técnicas de medición de anticuerpos, específicamente los IgM, pues los anticuerpos IgG se producen muchos días después del inicio de los síntomas dando lugar a la respuesta inmune de memoria (69). Algunas técnicas más novedosas como la secuenciación han ganado fuerza en los últimos años como herramienta de detección oportuna de patógenos por la disminución de los costos y el aumento de la capacidad computacional.

2.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Cuando se busca hacer detección de patógenos en la fase aguda, la PCR es una buena opción, pues permite obtener resultados confiables, con alta sensibilidad y poco tiempo. Si bien las pruebas rápidas disminuyen aún más el tiempo de procesamiento, son menos sensibles y pueden requerir

de otras pruebas confirmatorias (70). Para garantizar que la PCR utilizada es adecuada para lo que se espera, se debe hacer un proceso de estandarización y validación, lo cual consiste en encontrar las mejores condiciones de amplificación y después validar su funcionamiento respecto a varios parámetros como la sensibilidad (límite de detección – LOD), eficiencia, linealidad y reproducibilidad (71).

Sensibilidad: se relaciona con el límite de detección y para calcularlo se utiliza un control positivo a partir del cual se hacen diluciones seriadas y se realiza en montaje con al menos tres réplicas en dos corridas diferentes. El límite de detección se encuentra en la última dilución en la cual se logre una amplificación positiva en todas las réplicas (72).

Eficiencia: se realizan diluciones seriadas del control positivo y se hace el montaje de la PCR por triplicado para después recopilar los resultados en una gráfica en la cual se ubica el logaritmo del número de copias en el eje horizontal, mientras el valor Ct se ubica en el eje y. Se hace una regresión lineal de los datos para obtener la ecuación de la recta. Con el valor de la pendiente se hace el cálculo de la eficiencia como se muestra en la ecuación 1. La pendiente debe estar entre -3.9 y -2.9 para una eficiencia aceptable entre 80% y 120% (72).

Ecuación 1: cálculo de la eficiencia de la PCR (73)

$$\varepsilon = 100 * (10^{-\frac{1}{m}} - 1)$$

Linealidad: permite identificar si la técnica utilizada se comporta de forma lineal, es decir que la respuesta del instrumento es proporcional a la cantidad de muestra utilizada. Esto se mide a partir del ensayo de eficiencia al hacer la regresión lineal, pues el coeficiente de correlación es el que permite evaluar esta característica. Se espera que este valor sea cercano a 1 para garantizar la linealidad de la prueba utilizada (72).

Reproducibilidad: para asegurarse de que los resultados obtenidos son reproducibles, la prueba debe realizarse al menos dos veces haciendo diluciones seriadas y con tres réplicas para cada dilución. Se calcula el coeficiente de variación entre ambos montajes para cada réplica y se espera obtener valores cercanos a cero (71).

Cuando se enfrenta una enfermedad de etiología desconocida, se puede recurrir a estrategias que permitan optimizar el tiempo y uso de recursos para encontrar una posible causa. Una opción es la multiplexación del ensayo de PCR, un método útil que permite la detección de más de un patógeno al tiempo. Para utilizar esta estrategia, es necesario comprobar la posible reactividad cruzada de

los conjuntos de cebadores y sondas para eliminar cualquier inhibición debida a problemas de coamplificación (74). Otra forma es hacer pools de muestras, pues de esta manera se logra hacer un tamizaje mayor, con menos recursos y en menos tiempo. Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada para detección de patógenos con baja prevalencia, tanto para la medición de anticuerpos como de antígenos sin afectar el resultado obtenido (75). En el caso de patógeno de alta prevalencia no es tan recomendable utilizar pools, pues es posible que un gran número de pools sean positivos para el patógenos en estudio y al individualizar las muestras, la optimización de tiempo y recursos va a ser muy baja (76).

2.6.2 Secuenciación

Debido al gran número de patógenos que pueden estar asociados a la EFAI, hay estrategias aún más actualizadas como la secuenciación de nueva generación (NGS), la cual permite partir de una muestra desconocida y hacer metagenómica para identificar el material genético presente y con la ayuda de programas bioinformáticos, se logra hacer la caracterización de microorganismos presentes posiblemente asociados con la EFAI (77). Si bien es una técnica prometedora por su alcance y sensibilidad, la selección de la estrategia y el análisis son complejos, por lo que no todas las muestras de pacientes con EFAI pueden abordarse mediante esta estrategia.

El rápido avance de las tecnologías biotecnológicas ha cambiado la forma en la que se abordan las enfermedades y su epidemiología. El uso generalizado de secuenciación durante la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2 para la vigilancia activa del virus, sus mutaciones, cambios en las manifestaciones clínicas y su susceptibilidad a las vacunas desarrolladas, es sólo un ejemplo de esto. La investigación se ha acelerado por la introducción de tecnologías digitales, reduciendo el costo de la secuenciación y aumentando el poder computacional, por lo que el uso de secuenciación como estrategia de salud pública ha generado cada vez más interés (78). Esto se conoce como epidemiología genómica o molecular, la cual permite mejorar la comprensión de la propagación de enfermedades y poder responder rápidamente a brotes y hacer una mejor preparación y manejo en tiempo real para posibles epidemias (79) acercándose a la medicina de precisión.

La secuenciación del genoma completo es un procedimiento de laboratorio que determina el orden de las bases en el genoma de un organismo en un solo proceso. Existen diferentes métodos y tecnologías de secuenciación que se han desarrollado a lo largo de los años, cada una con sus propias ventajas y limitaciones. Algunas de las técnicas de secuenciación más conocidas incluyen

la secuenciación de Sanger, la secuenciación de próxima generación (NGS) y la secuenciación de nanoporos (80).

La secuenciación de próxima generación (NGS) es una tecnología más reciente que ha revolucionado el campo de la genómica. Utiliza una amplia gama de plataformas y enfoques, como la secuenciación por síntesis, la secuenciación por ligadura y la secuenciación por amplificación, entre otros. Estas técnicas permiten la secuenciación masiva y paralela de millones de fragmentos de ADN o ARN, lo que acelera considerablemente el proceso de secuenciación y reduce los costos (81). La secuenciación de nanoporos, como la desarrollada por Oxford Nanopore Technologies, es otra tecnología emergente en el campo de la secuenciación. Utiliza nanoporos, pequeños canales o poros, a través de los cuales se pasa la molécula de ADN o ARN a medida que se secuencia. La secuencia se determina mediante la medición de las corrientes eléctricas generadas por los nucleótidos individuales mientras atraviesan el nanoporo. Esta tecnología se destaca por su portabilidad y la posibilidad de realizar secuenciación en tiempo real (82).

Si bien los pasos que se deben seguir para realizar la secuenciación dependen de la estrategia seleccionada, hay algunos pasos básicos como: preparación de la muestra y obtención del DNA, fragmentación del DNA y preparación de las librerías, cargar la muestra e iniciar la secuenciación y finalmente, realizar el análisis bioinformático. Durante este proceso, es de gran importancia garantizar la correcta manipulación de la muestra, así como incluir controles que permitan verificar la calidad de la secuenciación realizada (83).

3. Metodología

3.1 Muestras clínicas

El laboratorio genómico One Health de la Universidad Nacional de Colombia cuenta con una colección de 2757 muestras de pacientes febriles que fueron recolectadas entre enero de 2021 y mayo de 2022. De las cuales 928 (33.7%) muestras eran procedentes de Leticia y 1829 (66.3%) de Villavicencio. Las muestras fueron recolectadas en el marco de un proyecto macro entre el Laboratorio Genómico One Health y Abbott Laboratories para la detección de patógenos virales, bacterianos y parasitarios en pacientes de Leticia y Villavicencio con enfermedad febril aguda indiferenciada, así como el monitoreo de patógenos nuevos y emergentes. Dentro de los criterios de inclusión, se tuvo en cuenta que fueran personas mayores de 10 años que tuvieran fiebre (temperatura oral, axilar, timpánica o rectal $\geq 37,5$ °C) o hubiesen tenido fiebre en los últimos 6 días previos a la consulta médica sin un foco infeccioso identificable, acompañada de síntomas compatibles con EFAI, y que dieran consentimiento para proveer muestras biológicas, en el momento de su incorporación voluntaria al estudio.

Fueron criterios de exclusión el tener un foco identificable de infección, como: otitis media, sinusitis, faringitis purulenta, celulitis, infección del tracto urinario, absceso dental, artritis séptica, enfermedad pélvica inflamatoria o peritonitis; así como personas que tuvieran una condición grave que impidiera dar consentimiento voluntario o que padecieran algún tipo de condición de salud de alto riesgo para la obtención de sangre venosa y/o hisopado nasal; y/o que no dieran su consentimiento para la participación en el estudio. Posterior al proceso de consentimiento informado de los pacientes se colectaron muestras clínicas y datos epidemiológicos. Las muestras de estos pacientes fueron refrigeradas y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su uso. Estos pacientes también dieron su consentimiento para utilizar sus muestras remanentes en estudios futuros.

A estas muestras se les realizó un tamizaje inicial para la detección de patógenos como Influenza, Chagas, SARS-CoV-2, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C y VIH, utilizando técnicas moleculares o inmunoensayos. Los resultados se almacenaron en una base de datos, además de los síntomas que presentaba cada participante, incluyendo: dolor de cabeza, dolor muscular, dolor de huesos, odinofagia, dolor retro-orbital, ojos rojos, escalofríos, dolor abdominal, debilidad, erupción cutánea, mareo, vómito, equimosis/hemorragia, petequias, tos, rinorrea, dificultad respiratoria y anosmia/ageusia.

Debido a que algunos de los patógenos de interés para este proyecto son intracelulares, para tener una mayor sensibilidad en la detección, se requería el uso de sangre entera. Sin embargo, entre enero y octubre de 2021 sólo se tenía muestra de suero por lo que se incluyeron 1270 (45.2%) participantes de Villavicencio y 611 (21.7%) participantes de Leticia con muestra de suero, mientras 609 (21.6%) participantes de Villavicencio y 317 (11.3%) de Leticia fueron incluidos con muestra de sangre entera.

3.2 Técnicas moleculares

3.2.1 Extracción y pools de ácidos nucleicos

Para la extracción de ácidos nucleicos a partir de las muestras correspondientes, se utilizó el kit MagMAX Viral/Pathogen (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S) mediante el sistema automatizado KingFisher Flex (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizaron 200 ul de muestra de suero o sangre según corresponde, con elución en 60 ul de buffer. El eluido obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso.

Se realizaron pools de RNA/DNA a partir del material genético obtenido, para esto se agruparon 5 muestras adicionando 15 ul de cada una. La agrupación de las muestras fue de forma secuencial hasta completar el total de muestras, teniendo en cuenta el código de cada muestra y fecha de colección. Para establecer el tamaño del pool se consideró una especificidad individual de la prueba de 95% y una prevalencia de los patógenos de 5% (84).

Para verificar cómo el hacer pools de muestras puede afectar la capacidad de detección de los patógenos de interés tanto de DNA como de RNA, se realizó la detección de Malaria y dengue, individual y en pool, en muestras previamente identificadas como positivas. Se hizo el montaje de

la prueba y se hizo una comparación de los resultados por presencia/ausencia del patógeno y por valores Ct.

3.2.2 Estandarización y validación de PCR

Las técnicas moleculares (PCRs) utilizadas fueron estandarizadas y validadas utilizando controles positivos para cada patógeno. En este caso se tenían plásmidos con los genes de interés para cada patógeno (como se muestra en la tabla 3-1) o aislamientos de virus de referencia. La estrategia metodológica incluyó los siguientes pasos:

Estandarización, multiplexación y reactividad cruzada: para establecer las condiciones de la PCR se utilizó la información del artículo de referencia correspondiente para cada set de primers como punto de partida, pero también se realizó una optimización variando la concentración de primers y sondas, así como el volumen de reacción, seleccionando el buffer y enzima de reacción adecuados y modificando la temperatura de annealing cuando era necesario. Para el proceso de estandarización se utilizó el control positivo correspondiente (plásmido o virus control). Una vez se seleccionaron las variables adecuadas para la amplificación, se realizó el proceso de validación donde se evaluó la especificidad, sensibilidad, eficiencia, linealidad y reproducibilidad del protocolo establecido. En los casos en los que la validación no fue exitosa, se ajustaron los parámetros de la estandarización para volver a validar. En la estandarización también se esperaba lograr el montaje de PCR multiplex cuando fuera posible, por lo que se hizo un análisis *in silico* previo de reactividad cruzada entre los patógenos de interés mediante alineamiento, así como el análisis de la formación de heterodímeros de primers y la cercanía de la temperatura de annealing para el ajuste del perfil térmico.

Linealidad, eficiencia y sensibilidad: para evaluar la eficiencia, se realizaron 8 diluciones seriadas con base 10 a partir del control positivo y se realizó el montaje de la PCR por triplicado para cada dilución. Se realizó una gráfica con los valores Ct obtenidos para cada dilución, ubicando en el eje x el logaritmo del número de copias (el número de copias para los plásmidos se calcula con la ecuación 2) y en el eje y el valor Ct correspondiente, se realizó la regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y el valor de la pendiente con la cual se realiza el cálculo de la eficiencia con la ecuación 1. En el caso de ensayos multiplex se incluyeron todos los objetivos para ver si hay competencia entre ellos. La linealidad para cada ensayo se obtuvo con el coeficiente de determinación (R^2) al realizar la regresión lineal para obtener la ecuación de la recta.

Ecuación 2: cálculo del número de copias para el plásmido

$$\text{Número copias} = \text{concentración} * \frac{0,000000001g}{1 ng} * MW * \frac{\text{No moléculas}}{mol} * \frac{1 copia}{\text{longitud plásmido}}$$

Donde:

Concentración: se refiere a la concentración de plásmido en cada dilución (ng/ul)

MW: peso molecular promedio estimado de cada base (650 g/mol*bp)

Número de moléculas/mol: número de Avogadro (6,14*10²³ moléculas/mol)

Longitud del plásmido: número de bases en el plásmido utilizado (bp)

Para evaluar la sensibilidad, se realizaron 8 diluciones seriadas con base 10 del control positivo (plásmido o aislamiento viral) y se adicionó cada muestra por triplicado. La última dilución en la cual todas las réplicas fueron positivas se consideró como el límite de detección.

Repetibilidad y reproducibilidad: La repetibilidad dentro de cada ensayo se evaluó al adicionar cada dilución por triplicado y calcular el coeficiente de variación intraensayo. Para evaluar la reproducibilidad, se realizó un segundo montaje de la curva estándar con 7 diluciones seriadas y por triplicado. Se hizo la comparación de cada dilución con el primer montaje para calcular el coeficiente de variación interensayo.

Tabla 3-1: Plásmidos utilizados en la validación de PCR.

Plásmido	Objetivo	Tamaño Plásmido
4	<i>Leptospira</i> spp <i>Brucella</i> spp	1946 bp
7	<i>Rickettsia</i> spp <i>Borrelia</i> spp <i>Bartonella</i> spp	493 bp
8	<i>Anaplasma</i> spp <i>Plasmodium</i> spp	499 bp

3.2.3 Detección de virus

Para la detección de patógenos virales, se utilizaron los primers descritos por otros autores como se muestra en la Tabla 3-2, donde también se indica el gen objetivo, el tipo de PCR a utilizar y el tamaño del fragmento amplificado.

Tabla 3-2: Lista de primers utilizados para la detección de patógenos virales asociados a EFAI.

Patógeno	Primers	Secuencia 5´-3´	Gen objetivo	Tipo de PCR	Tamaño del fragmento (bp)	Ref.
Oropuche	OPV_L2_20F24	CRATAAACCGRACAATAAATTGGA	Segmento L	Tiempo real		(85)
	OPV_L2_115R2	GTGCTTTTGAACAGAARTGTGA				
	OPV_L2_P82U2	TEX615-CAAACAAARATTGARCCATGG				
Dengue	DENV-1, -2, -3 F	CAGATCTCTGATGAACAACCAACG	Poliproteína	Tiempo real	85	(86)
	DENV-2 F C → T	CAGATCTCTGATGAATAACCAACG				
	DENV-3 F C → T	CAGATTTCTGATGAACAACCAACG				
	DENV-4 F	GATCTCTGGAAAAATGAAC				
	DENV-1, -3 R	TTTGAGAATCTCTTCGCCAAC				
	DENV-2 R A → G	AGTTGACACGCGGTTTCTCT				
	DENV-2 R A → G	AGTCGACACGCGGTTTCTCT				
	DENV-4 R	AGAATCTCTTCACCAACC				
	DENVA P (FAM)	CTCGCGGTTTCAGCATAT				
	DENVB P (FAM)	CTCTCGGTTTCAGCATAT				
	DENVC P (FAM)	CTCTCACGTTTCAGCATATTG				
DENV D P (FAM)	CTCACGCGTTTCAGCATAT					
Zika	ZIKV Forward	CAGCTGGCATCATGAAGAAYC	Poliproteína	Tiempo real	100	(86)
	ZIKV Reverse 1	CACTTGTCCCATCTTCTTCTCC				
	ZIKV Reverse 2	CACCTGTCCCATCTTTTCTCC				
	ZIKV Probe	CYGTTGTGGATGGAATAGTGG				
Chikunguña	CHIKV F	CATCTGCACYCAAGTGTACCA			96	

CHIKV R	GCGCATTTCGCTTCGTAATG	Poliproteína	Tiempo real	(86)
CHIKV P	GCGGTGTACACTGCCTGTGACYG C			

3.2.4 Detección de bacterias

Para la detección de patógenos bacterianos, se utilizaron los primers descritos por otros autores como se muestra en la Tabla 3-3, donde también se indica el gen objetivo, el tipo de PCR a utilizar y el tamaño del fragmento amplificado.

Tabla 3-3: Lista de primers utilizados para la detección de patógenos bacterianos asociados a EFAI.

Patógeno	Primers	Secuencia 5'-3'	Gen objetivo	Tipo de PCR	Tamaño del fragmento (bp)	Ref.
<i>Brucella</i> spp	Bruc BCSP1163F	TCTTTGTGGGCGGCTATCC	Cromosoma 1	Tiempo real	55 bp	(87)
	Bruc BCSP1199R	CCGTTTCGAGATGGCCAGTT				
	Bruc BCSPTqP	FAM-ACGGGCGCAATCT-BHQ				
<i>Leptospira</i> spp	Lept 16s F	CGGGAGGCAGCAGTTAAGAA	16 S	Tiempo real	197 bp	(88)
	Lept 16s R	AACAACGCTTGCACCATACG				
	Lept 16S P	FAM-TGAAGCAGCGACGCCGCGTG				
<i>Rickettsia</i> spp	RKND03_F	GTGAATGAAAGATTACACTATTTAT	gltA (CS)	Tiempo real	165 bp	(89)
	RKND03_R	GTATCTTAGCAATCATTCTAATAGC				
	RKND03_P	CTATTATGCTTGCRGCTGTYGGTT C				
<i>Borrelia</i> spp	Bcroci_glpQ_F	CCTTGGATACCCCAAATYAT	glpQ	Tiempo real	109 bp	(89)
	Bcroci_glpQ_R	GGYAATGMRTCAATTCTAAA				
	Bcroci_glpQ_P	ATGGRSAAATSACAGGTCTTA				
<i>Bartonella</i> spp	(Barto_ ssrA-F)	GCTATGGTAATAAATGGACAATGA AATAA	ssrA (tmRNA)	Tiempo real	295 bp	(89)
	(Barto_ ssrA-R)	GCTTCTGTTGCCAGGTG				
	(Barto_ ssA-P)	CGTCGCAGRTYTAAGCGGGT				
<i>Anaplasma</i> spp	TtAna_F	TGACAGCGTACCTTTTGCAT	23S	Tiempo real	190 bp	(90)
	TtAna_R	GTAACAGGTTCCGGTCCTCCA				
	TtAna_P	GGATTAGACCCGAAACCAAG				

3.2.5 Detección de parásitos

Para la detección de parásitos, se utilizaron los primers descritos por otros autores como se muestra en la Tabla 3-4, donde también se indica el gen objetivo, el tipo de PCR a utilizar y el tamaño del fragmento amplificado.

Tabla 3-4: Lista de primers utilizados para la detección de parásitos asociados a EFAI.

Patógeno	Primers	Secuencia 5´-3´	Gen objetivo	Tipo de PCR	Tamaño del fragmento (bp)	Ref.
<i>Plasmodium</i>	Mal_Uni_F	GCTCTTTCTTGATTTCTTGGATG	18S	Tiempo real		(91)
	Mal_Uni_R	AGCAGGTTAAGATCTCGTTTCG				
	Mal_Uni_Probe	FAM-ATGGCCGTTTTAGTTCGTG-BHQ1				

3.3 Análisis de datos

Este estudio fue retrospectivo descriptivo y se realizó un análisis epidemiológico en el cual se identificaron los patógenos asociados con los casos de enfermedad febril, estimando su frecuencia y las tendencias en la población. Los resultados obtenidos fueron tabulados utilizando una hoja de cálculo de Microsoft Excel (microsoft office standard 2021). Posteriormente se realizó el análisis descriptivo de las variables estudiadas, incluyendo la edad, sexo, ocupación y nivel de educación. Se emplearon resúmenes gráficos y tablas de acuerdo con el tipo de variable. Se estimaron las medidas epidemiológicas de frecuencia de la enfermedad básicas expresadas como una proporción. La seroprevalencia para la población estudiada se calculó utilizando la fórmula $P = CP/TP$, donde P es la prevalencia, CP es el número de casos positivos y TP es el número total de individuos en el estudio.

Para identificar las manifestaciones clínicas asociadas a la presentación de la infección por los diferentes patógenos, se realizó una regresión logística multivariada. Inicialmente se evaluaron los datos faltantes en cada una de las variables, las variables con porcentaje de datos faltantes mayor a 20%, se eliminaron del análisis y para las que tenían un porcentaje de datos faltantes menor a 20%, se realizó una imputación de datos mediante un método de imputación no paramétrico con un proceso iterativo usando el paquete missForest de RStudio, con un ntree=100. Después se hizo un análisis bivariado por la prueba de chi-cuadrado o exacta de Fisher para variables categóricas,

donde se seleccionaron las variables con un valor $p < 0.2$ que serían posteriormente incluidas en un análisis multivariado de regresión logística. Para la regresión logística multivariada, se utilizaron las variables previamente seleccionadas con el análisis bivariado y se hizo un modelo con estrategia “stepwise” para elegir el mejor modelo respecto al criterio de información Akaike (AIC). Se utilizó el software de RStudio (2023.03.2-454.pro2) para los análisis estadísticos y Python para realizar figuras. Las variables operativas incluidas en el análisis de datos se muestran en la tabla 3-5. Con los resultados obtenidos, se realizó una propuesta metodológica para el abordaje de la EFAI y una propuesta metodológica para la secuenciación metagenómica como estrategia de abordaje de la EFAI.

Tabla 3-5: definición, dimensiones y tipo de variables operativas incluidas en el estudio.

Variable	Definición	Dimensiones	Tipo de variable	Técnica o instrumento
Infección viral, bacteriana o parasitaria.	Detección molecular de dengue, zika, Chikunguña, Oropouche, <i>Leptospira</i> spp, <i>Rickettsia</i> spp, <i>Borrelia</i> spp, <i>Brucella</i> spp, <i>Bacronella</i> spp, <i>Anaplasma</i> spp y <i>Plasmodium</i> spp en muestras de suero y sangre.	Positivo Negativo	Cualitativa	Pruebas PCR y RT-PCR
Proporción de individuos infectados	Medida de porcentaje	Número de casos	Cuantitativa	Observación directa o encuesta
Variables demográficas	Edad, sexo, ciudad, nivel de estudios, ocupación	Respuesta abierta de cada participante	Cualitativa/ cuantitativa	Observación directa o encuesta
Manifestaciones clínicas	Dolor de cabeza, dolor de huesos, dolor muscular, debilidad, vómito, diarrea, erupción cutánea, escalofríos, hemorragia, dolor retroorbital, ojos rojos, entre otras.	Si No	Cualitativa	Observación directa o encuesta

Identificación de sesgos y control:

Sesgo de selección: se puede tener una estimación de la posible asociación de infecciones virales bacteriana y parasitarias con los casos de EFAI diferente del que se obtendría en la población objetivo. Esto se debe a las diferencias de las características de los sujetos incluidos en el estudio y los que no se incluyeron. En este caso, se incluyeron pacientes que acudieron al centro de salud en búsqueda de atención médica, por lo que aquellos pacientes que presentan EFAI pero no están lo suficientemente enfermos para acudir al centro de salud, no son incluidos en el estudio. Pueden

presentarse otros motivos como la distancia del centro de salud, el costo de desplazarse, entre otros.

Sesgo de información: se puede presentar una clasificación incorrecta de los sujetos en alguna de las categorías, variables o atributos, asignando una diferente a la que debería haberse asignado. Se pueden presentar sesgo de recuerdo cuando se hacen preguntas de exposición especialmente si es una medición de alta variabilidad. También puede tenerse sesgo por los instrumentos utilizados por ejemplo al medir la temperatura que es una variable importante dentro de los criterios de inclusión. Si el entrevistador no ha sido correctamente entrenado, este también puede generar un sesgo al inducir algún tipo de respuesta en los participantes. Para controlar este sesgo, se utilizaron protocolos rigurosos en la recolección de la información con el personal debidamente capacitado. Además, se utilizaron herramientas de medición con los adecuados criterios de precisión y consistencia.

Sesgo de confusión o mezcla de efectos: frente a la presencia de variables de confusión, que pueden estar relacionadas de forma indirecta con la EFAI, se puede sobreestimar, subestimar, o incluso, revertir el sentido de la asociación de una variable con la presentación de una infección. Esto se puede evitar en el diseño, pero no siempre es posible, por lo que debe controlarse durante los análisis estadísticos identificando estas posibles variables.

4. Resultados y discusión

4.1 Muestras clínicas

En el periodo de estudio de casos de enfermedad febril aguda indiferenciada, se encontraron 2807 muestras, de las cuales 1879 (66.9%) corresponden a Villavicencio y 928 (33.1%) a Leticia. Como se muestra en la Figura 4-1, tanto en Leticia como en Villavicencio se tuvo un mayor porcentaje de mujeres que de hombres, siendo más evidente la diferencia en Leticia. Al hacer la distribución por edades, se observó que el grupo con mayor representación fue el comprendido entre 26 y 35 años tanto en Leticia (27.6%) como en Villavicencio (32.9%). En Villavicencio se observa una poca cantidad de muestra en edades tempranas <18 años y edades avanzadas >60 años.

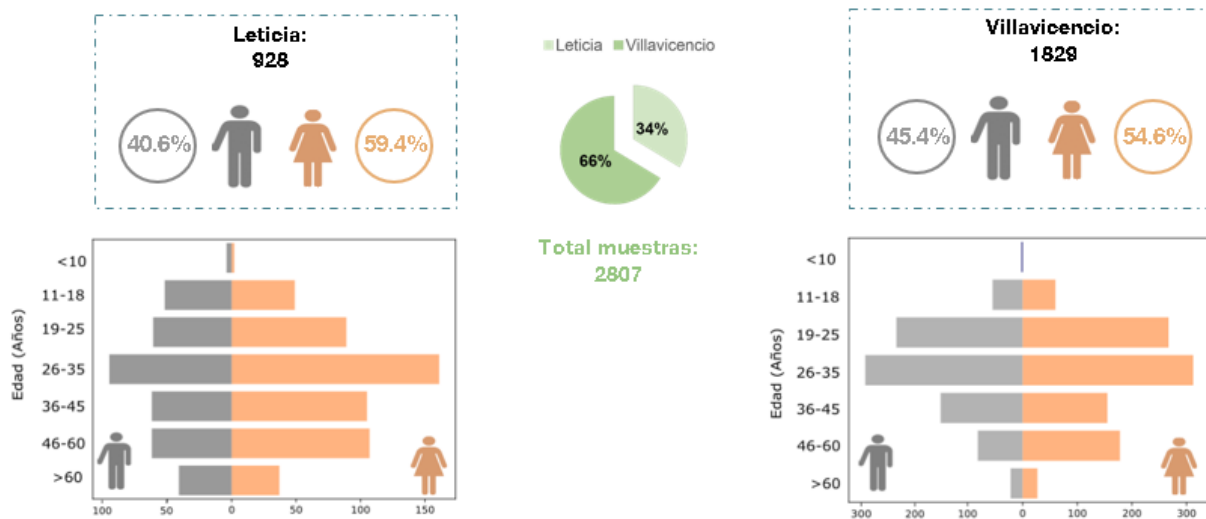


Figura 4-1: Distribución de las muestras por edad y sexo para Leticia y Villavicencio.

Al hacer un análisis de otras características demográficas y epidemiológicas, se encontró que para ambas ciudades el mayor porcentaje de participantes tienen un nivel secundario de escolaridad

(40.6% Leticia y 53.7% Villavicencio), seguido de nivel técnico (26.3% Leticia y 23.8% Villavicencio). En cuanto a la ocupación, en Leticia los mayores porcentajes corresponden a empleados (55.3%), Independiente (14.1%) y estudiante (13%). En Villavicencio, un alto porcentaje corresponde a participantes independientes (17.6%), empleados (23.8%) y amas de casa (21.2%). La información se muestra en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1: Características demográficas y epidemiológicas de los participantes con enfermedad febril aguda indiferencia en Leticia y Villavicencio.

Variable		Leticia		Villavicencio	
		Número	%	Número	%
Sexo	Femenino	549	59.4	999	54.6
	Masculino	375	40.5	830	45.4
Escolaridad	Secundaria	375	40.6	981	53.7
	Técnico	243	26.3	435	23.8
	Primaria	134	14.5	101	5.5
	Universitario	119	12.9	80	4.4
	Especialización	33	3.6	0	0.0
	Ninguno	15	1.6	50	2.7
	Maestría	4	0.4	1	0.1
	Básica secundaria	0	0.0	171	9.4
	Estudiante	0	0.0	6	0.3
Posgraduado	0	0.0	2	0.1	
Ocupación	Empleado	510	55.3	435	23.8
	Independiente	130	14.1	504	27.6
	Estudiante	120	13.0	214	11.7
	Ama de casa	98	10.6	387	21.2
	Desempleado	47	5.1	259	14.2
	Pensionado	13	1.4	5	0.3
	Otro	5	0.5	4	0.2
	Clérigo o similar	0	0.0	2	0.1
	Militar	0	0.0	6	0.3
	Policía	0	0.0	11	0.6

4.2 Técnicas moleculares

4.2.1 Extracción y pools de ácidos nucleicos

El uso de pools como estrategia de detección molecular se ha considerado para patógenos con una baja prevalencia, pues permite hacer tamizaje de una gran cantidad de muestras disminuyendo el tiempo de procesamiento y los reactivos utilizados. Cuando la prevalencia es mayor al 5%, esta estrategia no es la adecuada, pues al individualizar las muestras para identificar cuál es positiva, se pueden generar más gastos y tomar más tiempo. Sin embargo, se presenta un efecto dilución al hacer el pool y para conocer su efecto en la detección de los patógenos, se usaron 25 muestras positivas a malaria para evaluar el efecto en muestras de DNA y se comparó el valor Ct individual y en pool. Como se observa en la Figura 4-2, si hay un aumento en el valor Ct del pool respecto a la muestra individual. La diferencia de este valor Ct es variable, encontrando que en algunos casos la diferencia puede ser menor a 1.5, mientras en otros puede llegar a ser cercana a 4, pero la mayoría de las muestras presentan una diferencia de 1.5 a 3 unidades.

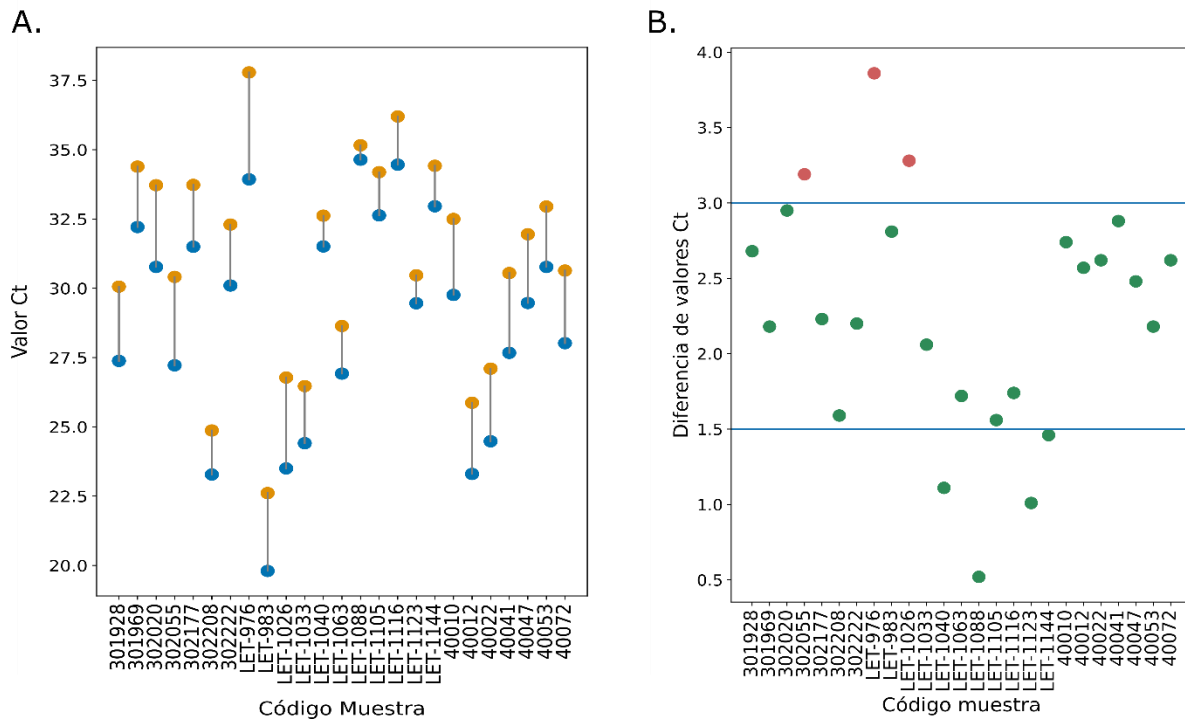


Figura 4-2: Comparación de la detección de muestras clínicas positivas para malaria de forma individual y en pool. **A.** Valor Ct de la muestra individual (azul) y en pool (verde). **B.** Diferencia entre los valores Ct de cada muestra, menores a 3 (verde) y mayores (rojo).

Para considerar el posible efecto del uso de pools sobre patógenos de RNA, se hizo el mismo análisis con muestras positivas para dengue. Se encontró que la diferencia en los valores Ct del pool respecto a la muestra individual varía entre 1.5 y 4, aunque se encontró una muestra con una diferencia mayor a 4 y dos muestras con una diferencia cercana a cero. Estas diferencias podrían deberse principalmente a la mayor sensibilidad del RNA a la degradación, por lo que el realizar una buena manipulación de las muestras y de los pools es indispensable para evitar la pérdida de sensibilidad del método de detección y de la estrategia en el uso de pools. Los resultados se muestran en la Figura 4-3.

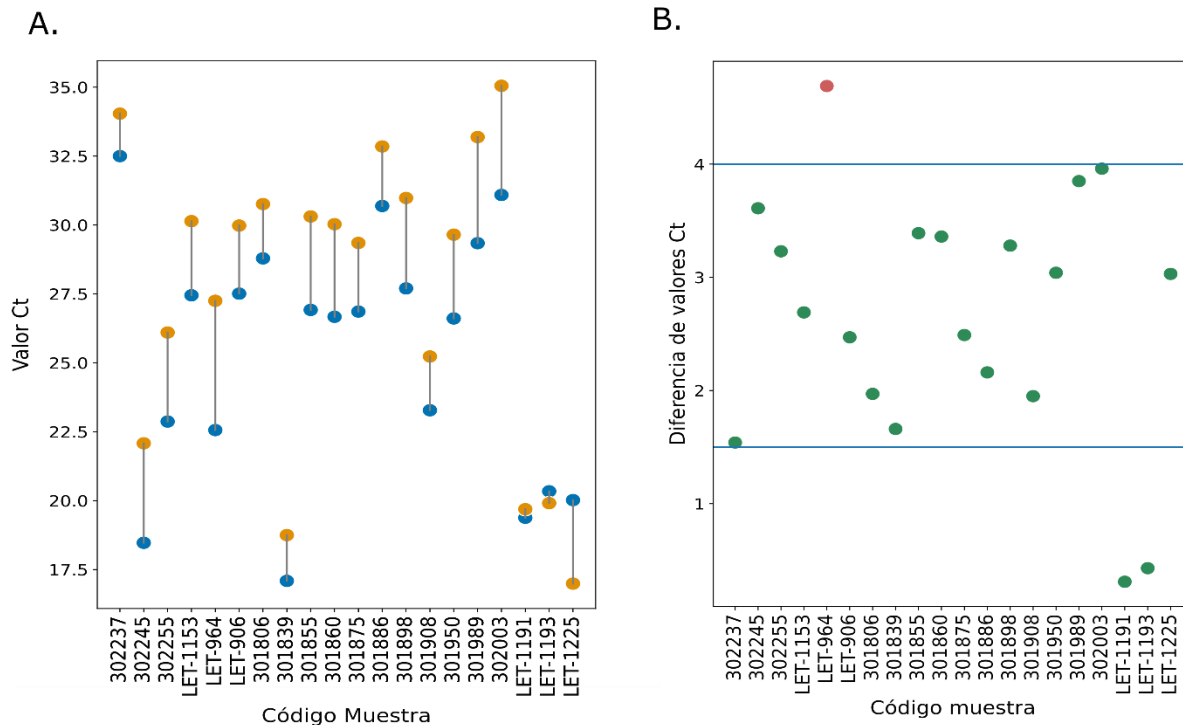


Figura 4-3: Comparación del valor Ct en la detección de dengue en muestras clínicas positivas de forma individual y en pools. **A.** Valor Ct de la muestra individual (azul) y en pool (amarillo). **B.** Diferencia entre los valores Ct de cada muestra, menores a 3 (verde) y mayores (rojo).

4.2.2 Estandarización y validación de PCR

- **Estandarización, multiplexación y reactividad cruzada**

Al realizar el análisis de los primers para la detección de patógenos por PCR multiplex, se tuvieron en cuenta tres aspectos principales: el tipo de material genético al que estaba dirigido, la temperatura de anidamiento y la posible reactividad cruzada, esta última se evaluó mediante alineamiento en blastn (92) con los patógenos de interés (Resultados no mostrados). Finalmente se seleccionaron cuatro grupos, en el primero se incluyó *Leptospira* spp, *Rickettsia* spp y *Borrelia* spp, en el segundo *Anaplasma* spp, *Bartonella* spp y *Brucella* spp, en el tercero Oropouche con el control interno de RNAsa P y en el cuarto se incluyó dengue, zika y chikunguña. Para evitar la pérdida de sensibilidad, se agruparon máximo 3 patógenos de interés. En la Tabla 4-2 se muestran los patógenos incluidos en la multiplexación, así como la temperatura de annealing correspondiente.

Tabla 4-2: Lista de patógenos para detección en PCR multiplex.

Patógeno	DNA/RNA	T annealing	Multiplex
<i>Leptospira</i> spp	DNA	50°C	1
<i>Rickettsia</i> spp	DNA	50°C	
<i>Borrelia</i> spp	DNA	50°C	
<i>Anaplasma</i> spp	DNA	60°C	2
<i>Bartonella</i> spp	DNA	60°C	
<i>Brucella</i> spp	DNA	60°C	
Oropouche	RNA	55°C	3
RNAsa P	RNA	55°C	
Dengue	RNA	55°C	4
Zika	RNA	55°C	
Chikunguña	RNA	55°C	

- **Linealidad, eficiencia y sensibilidad**

La validación de las técnicas moleculares demostró el nivel de confiabilidad y sensibilidad para la detección de patógenos asociados a casos de EFAI. En la Tabla 4-3 se muestran los resultados de la validación de la PCR en tiempo real. Como estrategia de optimización de reactivos, tiempo y muestra, algunos patógenos se agruparon en una sola reacción de PCR multiplex, por lo que se muestran los resultados de la amplificación individual y multiplex. Para todos los patógenos de interés, se alcanzó el criterio mínimo de aceptación con una eficiencia entre 90% y 110%, así como un coeficiente de determinación (R^2) > 0.98 (71) (Ver anexos A, B y C). Cuando se trata de PCRs cualitativas como las descritas en este caso, algunos autores proponen aumentar el criterio de aceptación hasta 80% y 120%, sin embargo, no fue necesario usar ese criterio en este caso ya que se alcanzó el propuesto inicialmente.

Cuando se usa este tipo de estrategia, es importante verificar que no hay variación en la sensibilidad por una posible competencia, inhibición o reactividad cruzada de los primers. Es por esto que se compara la eficiencia y sensibilidad de la PCR individual respecto a la multiplex (Ver anexos D y E). Como se observa en la Tabla 4-3, la diferencia en la eficiencia entre ambos ensayos no supera el 10% en ninguno de los casos, siendo la mayor diferencia en dengue con una disminución de 9 unidades respecto a la PCR individual, aunque esto indica una pérdida en la eficiencia de la PCR al usar la estrategia de multiplexación, se observa que en la PCR multiplex se sigue superando la eficiencia de 90%, conservando los criterios de aceptación. Además, se recomienda que la diferencia en la eficiencia de la PCR singleplex respecto a la multiplex, no supere el 15%, pues en este caso se estaría en un alto riesgo de competencia entre los genes objetivos de la PCR (71).

Se observa una situación similar con *Brucella* spp donde se tiene una diferencia de 7.29 %, zika con 6.60%, RNAsa P con 6.05% y Chikunguña con 5.48%, lo cual es de esperarse por la competencia de los genes objetivos en la amplificación, sin embargo, la diferencia no supera en ningún caso el 15 % y la eficiencia sigue siendo superior a 90% (71). Cabe resaltar también que, aunque disminuye la eficiencia al usar la estrategia de multiplexación, el número de copias detectado se mantiene para ambos ensayos en todos los patógenos de interés indicando que no hay pérdida de la sensibilidad en estos casos. Sólo para *Anaplasma* spp y *Bartonella* spp se observó una disminución en el número de copias detectadas correspondiente a un factor de dilución.

Tabla 4-3: Eficiencia y sensibilidad para PCR en tiempo real en ensayo individual y multiplex.

Individual	Multiplex
------------	-----------

Patógeno	R ²	Eficiencia (%)	LOD (número copias)	R ²	Eficiencia (%)	LOD (número copias)	%CV	Diferencia Eficiencia
<i>Leptospira</i> spp	1.000	92.0	159.5	1.000	93.1	159.5	0.84	1.18
<i>Rickettsia</i> spp	0.999	91.6	228.33	1.000	91.3	228.33	1.08	0.32
<i>Borrelia</i> spp	0.999	94.5	22.83	1.000	94.2	22.83	0.54	0,32
<i>Anaplasma</i> spp	0.994	96.45	22.79	0.999	94.9	227.91	1.15	1.63
<i>Bartonella</i> spp	1.000	97.2	22.83	0.994	98.4	228.33	2.09	1.22
<i>Brucella</i> spp	0.998	101.89	159.5	0.999	97.6	159.5	5.09	4.40
<i>Plasmodium</i> spp	0.996	97.6	22.79	-	-	-		
Oropuche	0.999	91.3	1.35 PFU/ml	0.999	91.3	1.35 PFU/ml	0	0
RNAsa P	1.000	105.35	228.33	0.999	99.3	228.33	4.18	6.09
Dengue	0.993	101.3	0.01 PFU/ml	1,000	92.3	0.01 PFU/ml	6.57	8.92
Zika	1.000	98.8	0.50 PFU/ml	0.997	105.4	0.50 PFU/ml	4.57	6.26
Chikunguña	0.998	96.8	1.00 PFU/ml	0.992	91.32	1.00 PFU/ml	4.12	6.00

- **Repetibilidad y reproducibilidad**

Para evaluar la repetibilidad del ensayo, se calculó el porcentaje del coeficiente de variación entre las tres réplicas de cada dilución del control positivo correspondiente. Como se muestra en la Tabla 4-4, los valores de coeficiente de variación no superan el 10% para ninguna dilución en ninguno de los patógenos en PCR singleplex, siendo el valor más alto en la segunda dilución de *Plasmodium* spp con 5.4%. De forma similar, en la PCR multiplex no se observan valores mayores a 10%, siendo dengue el de valor más alto con 6.1%. Estos coeficientes de variación indican que la prueba tiene una buena repetibilidad dando mayor confiabilidad a las técnicas validadas.

Tabla 4-4: Repetibilidad de los ensayos de validación de PCR en tiempo real singleplex y multiplex. Se muestra el coeficiente de variación entre las tres réplicas del mismo ensayo (Ensayo1) en el mismo momento.

Dilución	Individual												Multiplex											
	Patógeno (CV%)																							
	Leptospira spp	Rickettsia spp	Borrelia spp	Anaplasma spp	Bartonella spp	Brucella spp	Plasmodium spp	Oropuche	RNAasa P	Dengue	Zika	Chikunguña	Leptospira spp	Rickettsia spp	Borrelia spp	Anaplasma spp	Bartonella spp	Brucella spp	Plasmodium spp	Oropuche	RNAasa P	Dengue	Zika	Chikunguña
10 ⁻¹	2.6	0.3	3.8	2.3	2.8	0.7	1.9	1.3	0.6	2.4	0.5	0.8	2.1	1.2	4.8	1.7	2.5	0.7	-	1.4	0.5	6.1	5.9	2.5
10 ⁻²	0.5	1	2.4	4.6	0.7	0.5	5.4	1	0.2	2.3	0.5	0.5	0.6	1.1	1.4	4.9	4.4	0.8	-	2.4	0.3	1.2	1	0.8
10 ⁻³	0.6	0.5	0.5	0.4	0.5	0.9	1.3	0.4	0.3	0.6	0.7	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	3.1	0.5	-	1.7	0.4	0.6	0.4	0.2
10 ⁻⁴	0.7	0.9	0.9	0.7	0.1	0	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3	2.3	0.5	0.3	0.2	0.9	3.7	0.3	-	0.6	0.7	1.6	0.3	1.9
10 ⁻⁵	1.5	0.7	0.6	0.1	0.8	0.5	0.4	4.2	1.1	1.5	0.7	0.4	1.7	1.2	1	0.4	1.9	0.1	-	1.5	0.5	0.6	0.5	0.6
10 ⁻⁶	0.5	0.2	0.5	0.3	0.6	0.6	0.2	1.7	-	0.3	0.7	1.7	0.8	1	0.7	0.4	2.5	0.5	-	2.5	-	0.2	1.3	1.5
10 ⁻⁷	1.3	0.9	1.2	2	1.3	1.4	1	-	-	0.5	3.8	-	1.7	1.2	1.2	0.6	0.9	0.5	-	-	-	1.6	1.5	-
10 ⁻⁸	-	2	-	1.1	0.8	-	-	-	-	-	-	-	8.7	0.9	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Para verificar la reproducibilidad del ensayo, se calculó el porcentaje de coeficiente de variación, pero en este caso se hizo al repetir el mismo ensayo en un momento diferente. Como se observa en la Tabla 4-5, los porcentajes de coeficiente de variación no superaron el 10% en ninguno de los casos, indicando que la PCR es reproducible bajo las condiciones establecidas.

Tabla 4-5: Reproducibilidad de los ensayos de validación de PCR en tiempo real singleplex y multiplex. Se muestra el coeficiente de variación entre el ensayo 1 y ensayo 2 en momentos diferentes.

Dilución	Individual												Multiplex											
	Patógeno (CV%)																							
	Leptospira spp	Rickettsia	Borrelia spp	Anaplasma spp	Bartonella spp	Brucella spp	Plasmodium spp	Oropuche	RNAasa P	Dengue	Zika	Chikunguña	Leptospira spp	Rickettsia	Borrelia spp	Anaplasma spp	Bartonella spp	Brucella spp	Plasmodium spp	Oropuche	RNAasa P	Dengue	Zika	Chikunguña
10 ⁻¹	0.3	0.6	0.2	2	2.5	0.3	0.5	4.2	1.3	2.2	0.1	1.3	0.5	0.3	0.2	5.5	2.6	1.6	-	2.3	0.2	0.7	0.4	0.2
10 ⁻²	0.4	0.2	0.3	1.8	0.8	1.4	2.6	4	1.2	0.9	0	0.2	1.8	0.2	2.8	1	2.9	0.6	-	1.6	0.8	0.4	0.1	0.4
10 ⁻³	1.3	1.6	1	3.3	0.3	3	1.4	4.3	0.7	0.4	0	0.1	2.6	0.1	2.7	6.3	0.6	0.7	-	3.7	0.1	0.2	0.1	0.2
10 ⁻⁴	1	0.1	0.8	0	0.6	0.5	0.4	4.4	1.2	0.2	0.2	0.5	2.1	0.4	1.3	1.9	2	0.7	-	2.3	0	0	0	0.2
10 ⁻⁵	0.8	3.4	1.2	0.5	0.5	0.8	0.4	4.1	3	0.3	0.3	0.7	1	0.5	1.2	2.1	0.9	0.6	-	1.1	1.7	0	0.3	0.1
10 ⁻⁶	0.1	0.4	1.2	0.4	1.9	0.4	0.2	3.3	-	0.4	0.1	0.7	1.3	0.5	1.2	2.1	0.9	0.5	-	3	-	0	0.4	0.1

10⁻⁷	0.4	1.5	0.1	2.1	2.5	1.9	0.2	-	-	2.5	0.3	-	1.9	1.1	0.6	2.2	1.9	1.4	-	-	-	0.1	0.4	-
10⁻⁸	-	0.2	-	0.4	3.2	-	-	-	-	-	-	-	0.1	1.4	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2.3 Detección de virus, bacterias y parásitos

Se procesaron 1829 muestras de Villavicencio y 927 muestras de Leticia. Al realizar el tamizaje para la detección de los patógenos de interés, se encontró que para Villavicencio 22 muestras fueron positivas para Malaria (1.2%) y 41 para dengue (2.24%). En las muestras de Leticia se encontró una situación similar, pues 12 muestras fueron positivas para Malaria (1.29%) y 128 fueron positivas para dengue (13.81%), pero además se detectaron dos muestras positivas para oropouche (0.22%). Los resultados se muestran en la Tabla 4-6.

Leticia y Villavicencio son ciudades con una ubicación geográfica y características climáticas que favorecen la diversidad de vectores y su diseminación, lo cual tiene un gran impacto en las enfermedades que transmiten. Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos, pues dengue y Malaria se encuentran en la lista de agentes causales de enfermedades tropicales y que, debido al alto riesgo de la población colombiana para enfermar por esta causa, se han convertido en un grave problema de salud pública. En Leticia se detectó además la presencia de oropouche, un virus también transmitido por mosquitos y que, aunque se ha reportado su circulación en Colombia mediante pruebas serológicas, no ha sido lo suficientemente estudiado para conocer su verdadero impacto en la salud de nuestro país.

Tabla 4-6: Resultados de detección de patógenos por PCR.

	Villavicencio	Leticia
Total muestras	1829	927
Dengue	41 (2.24%)	128 (13.81%)
Malaria	22 (1.20%)	12(1.29%)
Oropouche	0 (0%)	2 (0.22%)
Indeterminados	1766 (96.55)	782 (84.36%)

Al hacer un análisis de los síntomas de los participantes que fueron positivos para dengue y Malaria, queda nuevamente en evidencia la dificultad de la identificación de patógenos causantes de EFAI solamente por síntomas clínicos, pues la similitud es muy alta. Como se observa en la Figura 4-4 ,

en el 93.3% de casos de dengue, se presentó dolor de cabeza, mientras para Malaria se presentó en el 97% de los casos. Algo muy similar ocurre con el dolor muscular, escalofríos, dolor de huesos, debilidad, mareo, dolor retroorbital, dolor abdominal y vómito. Sólo se presentaron algunas diferencias en la erupción cutánea que tuvo un porcentaje de 25.6% en dengue y 0% en Malaria, Odonofagia tuvo 21.4% en dengue y 11.2% en Malaria, ojos rojos tuvo 25.0% en dengue y 14.7% en Malaria y la tos se presentó en 16.7% de casos de dengue y 8.8% de Malaria. Estos últimos síntomas podrían servir un poco como diferenciadores para estas enfermedades, sin embargo, no podrían usarse de forma definitiva porque no todos los pacientes presentaron los mismos síntomas. Con estos resultados se observa que no es suficiente con hacer un diagnóstico sólo con síntomas, pues este puede ser incorrecto y llevar a un tratamiento no adecuado para el paciente.

A pesar de hacer el tamizaje para otros virus como zika y Chikunguña, y para bacterias como *Leptospira* spp, *Rickettsia* spp, *Borrelia* spp, *Anaplasma* spp, *Brucella* spp y *Bartonella* spp, no se obtuvieron resultados positivos, por lo que un alto porcentaje de muestras fueron indeterminadas (96.56% en Villavicencio y 85.11% en Leticia). Esto puede deberse a diferentes motivos, por ejemplo, el tipo de muestra utilizado para la detección, pues para el caso de *Leptospira* spp se puede hacer detección en suero solo durante los primeros días de la infección, pero se ha observado una mayor carga del patógeno en orina hasta tres semanas después de iniciada la infección. Otras de las bacterias tamizadas son intracelulares, por lo que se detectan más fácilmente en sangre, pero como se describió previamente, una parte del tamizaje se realizó en suero porque no se tenía sangre de las muestras recolectadas inicialmente.

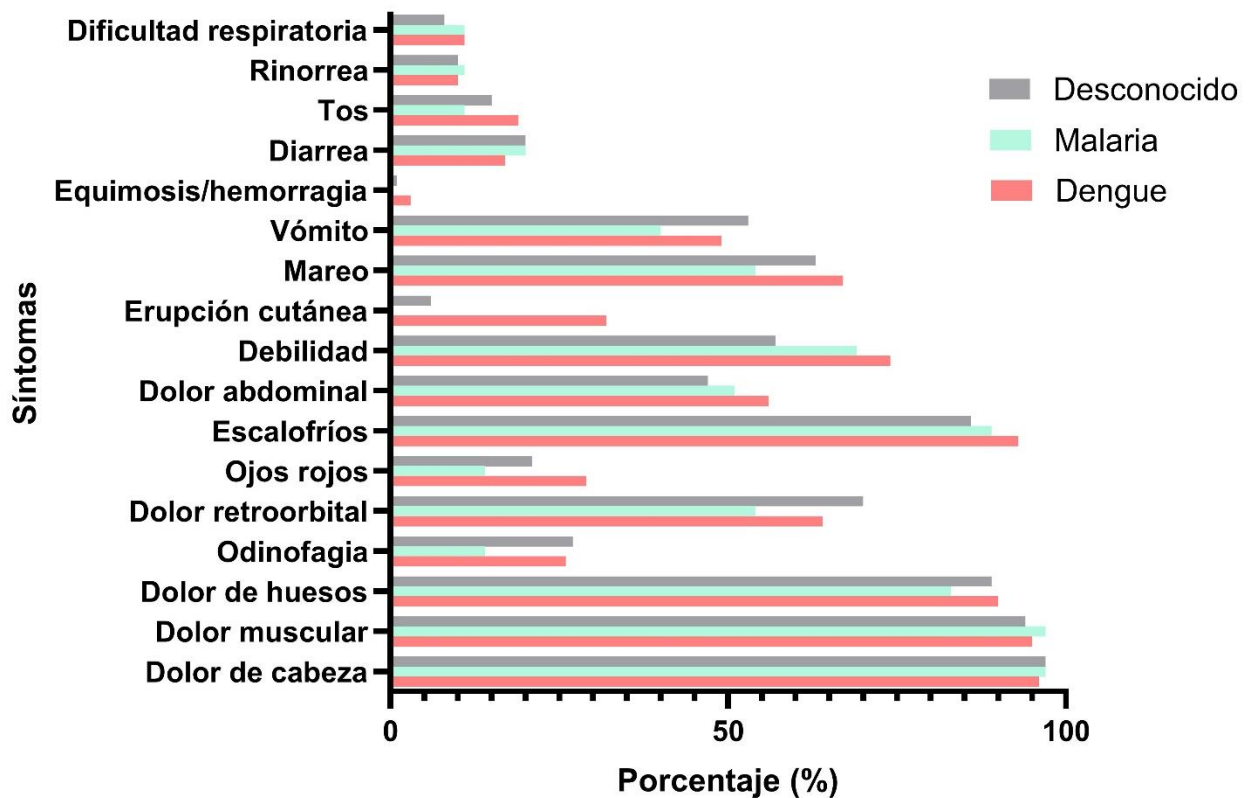


Figura 4-4: Síntomas de los participantes positivos para dengue y Malaria.

Hay muchos otros patógenos que pueden estar asociados a casos de EFAI y que no fueron incluidos en este proyecto, como hantavirus, Arenavirus, Fiebre Amarilla, otros arbovirus y virus respiratorios como influenza, parainfluenza, virus sincitial respiratorio, entre otros. Además, es importante resaltar el hecho de que el tiempo en el cual se enmarca el desarrollo de este proyecto, coincide con la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2, lo cual tuvo un gran impacto en la salud pública del país. Debido a la estrategia de captación de pacientes utilizada en el proyecto, no era posible conocer inicialmente si el paciente era positivo o no para este virus. Además, el tener síntomas respiratorios tampoco fue un criterio de exclusión para el estudio pues en infecciones por virus como dengue, se pueden presentar síntomas como tos, rinorrea y congestión nasal. Es por esto que, tratando de identificar los posibles patógenos asociados a los casos de EFAI que siguen siendo indeterminados, se hizo un análisis con los resultados de pruebas de antígeno y serológicas previamente realizadas y reportadas en la base de datos del proyecto.

Al analizar los resultados para otros antígenos en Leticia y Villavicencio (PCR y pruebas rápidas), se identificaron 244 (9.58%) muestras positivas, de las cuales 102 (4.00%) correspondían a HIV, 72 (2.83%) correspondían a SARS-CoV-2 y 70 (2.75%) a HBV. Además, se identificaron 473 (18.6%) muestras con IgM positivo, 308 (12.09%) correspondientes a dengue, 96 (3.77%) a SARS-CoV-2, 29 (1.12%) corresponden a chagas, 28 (1.1%) a dengue y SARS-CoV-2, y 12 (0.47%) a chagas y dengue (Ver Tabla 4-7).

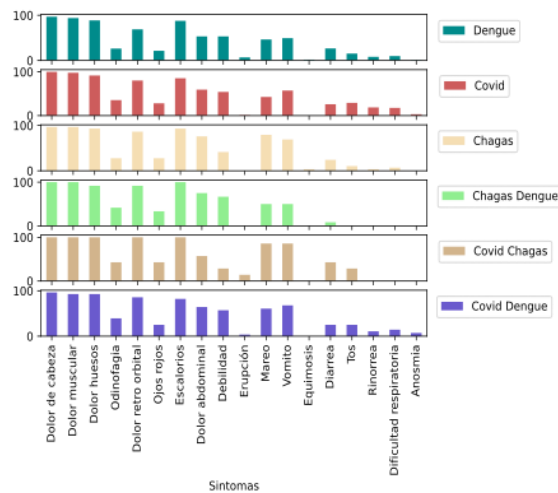
Tabla 4-7: Otros antígenos y anticuerpos (IgM) detectados. Se muestra la clasificación respecto a las muestras positivas para dengue, malaria o desconocidos.

Prueba	Dengue (169)	Malaria (34)	Desconocidos (2547)	No tested
Antígeno HIV	4	0	102	85
Antígeno SARS-CoV-2	2	0	72	2425
Antígeno HBV	4	0	70	126
RT-PCR DENV	169	0	0	0
RT-PCR Malaria	0	34	0	0
IgM Dengue	56	5	308	50
IgM COVID	2	0	96	185
IgM Chagas	0	0	29	849
IgM Dengue y covid	4	2	28	N/A
IgM Chagas y Dengue	1	0	12	N/A

Al hacer un análisis de los síntomas de los casos de anticuerpos IgM positivos, los resultados son similares a lo que se observó previamente con dengue y Malaria (Ver Figura 4-5), algunos síntomas como dolor de cabeza, dolor muscular, dolor de huesos, dolor retroorbital, escalofríos, mareo y vómito, se mantienen para dengue, COVID-19 y chagas. Aunque se esperaría que la combinación de síntomas como tos, rinorrea y dificultad respiratoria se presentaran más en los casos positivos para COVID-19, se observó que esta combinación también se presenta en dengue, por lo que, si estos fueran los patógenos asociados a la EFAI, no podría hacerse la diferenciación sólo por estos síntomas. Sin embargo, al ser positivos para anticuerpos IgM, no es posible especificar el tiempo en el cual se presentó la infección, por lo que no se puede descartar la presencia de un nuevo patógeno causando enfermedad en fase aguda. En este caso, como se muestra en la Tabla 4-7, se realizó prueba de anticuerpos IgM para dengue en 2703 muestras obteniendo 380 positivas, de las cuales solo 30 fueron IgM positivos para dengue y positivos por PCR, mientras los 350 restantes no fueron detectadas por PCR. Es posible que, por el tiempo de toma de la muestra, ya algunos patógenos no puedan ser detectados por antígeno y una posible estrategia para disminuir el número

de casos indeterminados, podrían ser las pruebas de seroconversión con muestras tomadas en diferentes momentos. Esta estrategia combinada permitiría una mayor comprensión de la enfermedad febril aguda indiferenciada en Colombia.

A.



B.

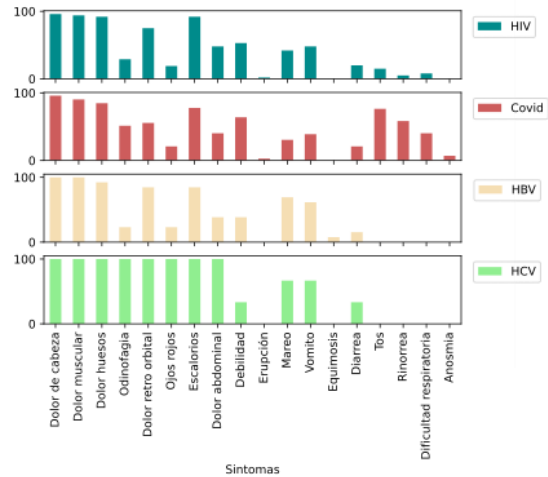


Figura 4-5: Síntomas de muestras positivas para anticuerpos IgM (A) y para otros antígenos (B).

Haciendo un análisis similar para las muestras que fueron positivas para otros antígenos, se observa que los síntomas respiratorios son mucho más evidentes para los casos de COVID-19 con un alto porcentaje de tos, rinorrea, dificultad respiratoria y un pequeño porcentaje de anosmia. La detección de COVID-19 se hizo por el marco de la pandemia causada por este virus, sin embargo, hay muchos otros virus respiratorios que podrían estar asociados a los casos de EFAI y que no fueron incluidos. Entre los antígenos previamente reportados, se encontró también HIV, y aunque este es un virus que causa infección crónica, se ha reportado también la presentación de síntomas en fase aguda incluyendo fiebre, dolores, náuseas y vómito, erupción cutánea entre otras. En zonas donde hay enfermedades endémicas comunes con dengue, un alto porcentaje de casos de HIV pasan desapercibidos por la presencia de síntomas inespecíficos. Pero teniendo en cuenta que el recibir tratamiento antirretroviral durante la infección aguda disminuye la carga viral, reduciendo la transmisión e infectividad y además, evitar la disminución de células CD4, es importante hacer un diagnóstico oportuno de la enfermedad (93) . En este caso, las muestras positivas para HIV presentaron síntomas como dolor de cabeza, dolor muscular, dolor de huesos, dolor retroorbital,

mareo y vómito, como se reporta en la literatura, además se presentó un menor porcentaje de odinofagia, ojos rojos, dolor abdominal, debilidad y diarrea. La cantidad de casos positivos para HIV equivalen a 4.5% en Villavicencio y 1.7% en Leticia, lo cual justifica tener un enfoque de diagnóstico de este virus para ambas ciudades. Además de ser por sí mismo causante de enfermedad febril aguda indiferenciada, la presencia de HIV puede aumentar la tasa de coinfecciones oportunistas como *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans*, virus de la hepatitis B (HBV) y *P. falciparum* (94), algunos de los cuales pueden tener un cuadro de enfermedad febril.

Si bien se reporta una fase aguda de infección por hepatitis B que se caracteriza por la presencia de síntomas inespecíficos como fatiga, mialgias, náuseas y, con poca frecuencia, ictericia (95)(96), no puede asegurarse su asociación en los casos de EFAI positivos por PCR, pues se ha encontrado que, aunque el paciente se recupere de la infección aguda, los rastros del virus de la hepatitis B a menudo son detectables en la sangre mediante PCR durante muchos años después de la recuperación clínica (97). Sin embargo, es importante detectar la presencia de este virus en los pacientes con EFAI por las posibles complicaciones adicionales que pueden presentar. Por ejemplo, se ha reportado un riesgo mayor de complicaciones hepáticas en casos de dengue que presentan coinfección con hepatitis B, requiriendo una mayor vigilancia clínica en esta situación (98).

Resultados similares se han encontrado en la coinfección de hepatitis B y *Clonorchis sinensis*, un parásito que puede adquirirse con la ingesta de pescados y que infecta el hígado, situación que puede verse agravada con la presencia de hepatitis B (99). No sólo la hepatitis B es un tipo de Infección del hígado que debe tenerse en cuenta cuando se estudian los casos de EFAI, pues en países tropicales como Colombia, algunos de los patógenos asociados a EFAI llevan al paciente a presentar síntomas como fiebre, ictericia y alteración de enzimas hepáticas, muy similares a los presentados durante una hepatitis aguda (100).

4.2.4 Análisis estadístico

Los resultados del tamizaje de los casos de EFAI mostraron una mayor proporción de casos de dengue y malaria, tanto en Leticia (13.81% y 1.29%) como en Villavicencio (2.24% y 1.20%). Y aunque se detectaron algunos casos de oropouche en Leticia, no fueron suficientes para hacer un análisis epidemiológico completo, por lo que se hizo el análisis sólo para los casos de dengue y malaria. Al realizar el análisis de datos faltantes, se encontró que para rinorrea y dificultad respiratoria se tenía un porcentaje de datos faltantes de 28%, mientras que, para cianosis, petequias, Anosmia y ageusia, ictericia y sitio de equimosis, el porcentaje de datos faltantes fue

mayor al 70%, por lo que estas variables fueron excluidas del análisis. Para las demás variables, el porcentaje de datos faltantes fue menor al 20% y se realizó la imputación de datos antes de continuar con el análisis, para este se utilizó un ntree=100 y se obtuvo un valor PFC de 0.157. En la Figura 4-6 se muestran los datos faltantes de cada variable con sus respectivos porcentajes.

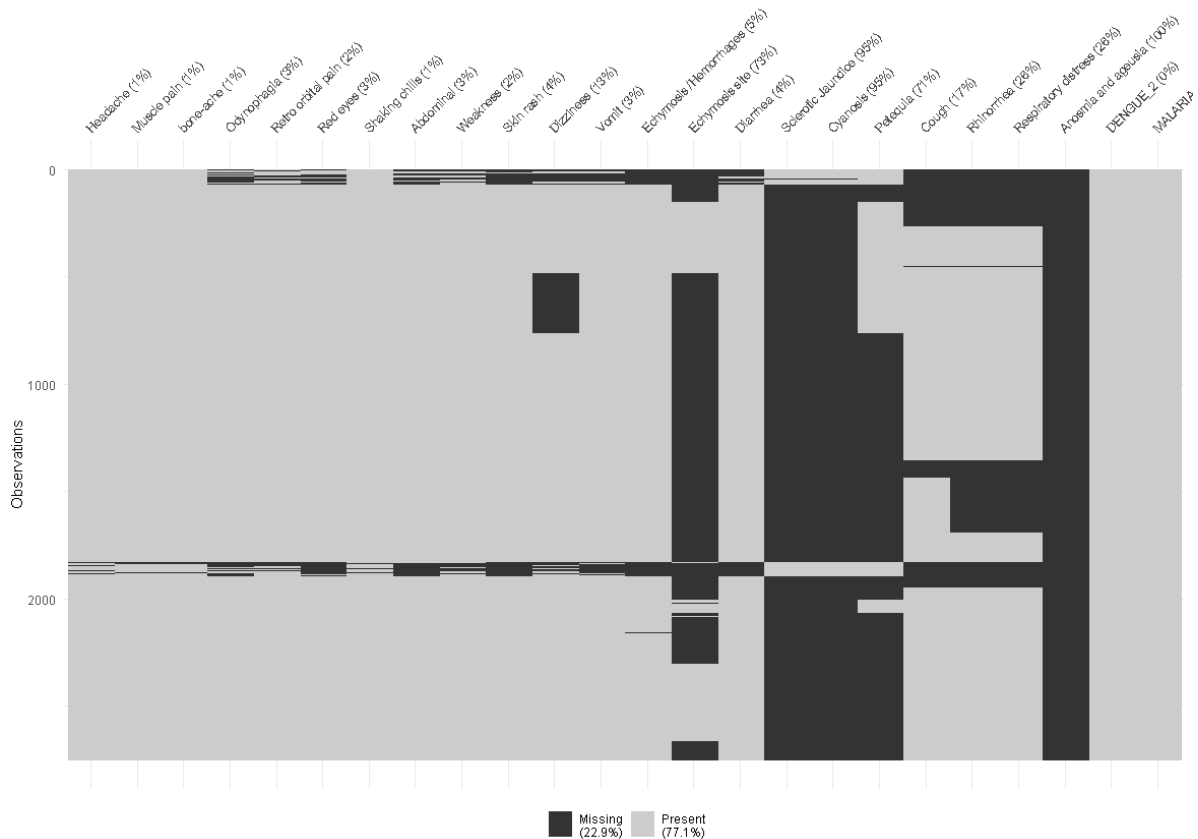


Figura 4-6: Datos faltantes (Missing map) para cada una de las manifestaciones clínicas. Se muestran en negro los datos faltantes y en gris los datos presentes.

Después de hacer la imputación de datos, se realizó el análisis bivariado tanto para dengue como para malaria en comparación con el resto de las muestras indeterminadas. Al realizar el análisis bivariado de cada una de las manifestaciones clínicas de dengue y respecto a las demás muestras, se encontró que las que tenían una mayor asociación con valor $p < 0.2$ fueron la debilidad, erupción cutánea, tos, dolor retroorbital, ojos rojos, vómito, odinofagia, escalofrío, dolor abdominal,

hemorragias y mareo como se muestra en la Tabla 4-8, por lo que estas fueron las variables que se incluyeron para el análisis multivariado.

Tabla 4-8: frecuencia de cada manifestación clínica respecto a casos positivos para dengue y malaria. Se incluye en porcentaje de positividad respecto a casos positivos totales y el valor p correspondiente para el análisis bivariado realizado.

		Dengue					Malaria				
		SI	NO	Total	%	Valor P	SI	NO	Total	%	Valor P
Dolor de cabeza	SI	161	2391	2552	95.3	0.5497	35	2391	2426	97.2	0.4338
	NO	8	79	87			1	79	80		
Dolor de huesos	SI	152	2199	2351	89.9	0.2057	30	2199	2229	83.3	0.4198
	NO	17	271	288			6	271	277		
Odinofagia	SI	49	661	710	29	0.0107	6	661	667	16.7	0.0015
	NO	120	1809	1929			30	1809	1839		
Ojos rojos	SI	53	511	564	31.4	0.0032	5	511	516	13.9	0.0215
	NO	116	1959	2075			31	1959	1990		
Dolor abdominal	SI	53	511	564	31.4	0.0713	5	511	516	13.9	0.2894
	NO	116	1959	2075			31	1959	1990		
Debilidad	SI	124	1347	1471	73.4	0	25	1387	1412	69.4	0.0005
	NO	45	1083	1128			11	1083	1094		
Erupción cutánea	SI	54	137	191	32	0	0	137	137	0	0.0005
	NO	115	2333	2448			36	2333	2369		
Equimosis	SI	5	32	37	3	0.875	0	32	32	0	0.6432
	NO	164	2438	2602			36	2438	2474		
Diarrea	SI	34	526	560	20.1	0.9291	7	526	533	19.4	0.9515
	NO	135	1944	2079			29	1944	1973		
Dolor muscular	SI	159	2319	2478	94.1	0.8884	35	2319	2354	97.2	0.6762
	NO	10	151	161			1	151	152		
Mareo	SI	113	1546	1659	66.9	0.1302	20	1546	1566	55.6	0.6607
	NO	56	924	980			16	924	940		
Escalofríos	SI	156	2106	2262	92.3	0.0229	32	2106	2138	88.9	0.4653
	NO	13	364	377			4	364	368		
Tos	SI	44	365	409	26	0	5	365	370	13.9	0.0005
	NO	125	2105	2230			31	2105	2136		
Dolor retro orbital	SI	107	1752	1859	63.3	0.0001	19	1752	1771	52.8	0.0005
	NO	62	718	780			17	718	735		

Vómito	SI	83	1318	1401	49.1	0.0069	14	1318	1332	38.9	0.02
	NO	86	1152	1238			22	1152	1174		

Una vez identificadas las variables con mayor asociación mediante el análisis bivariado, se realizó el análisis de regresión logística multivariada, donde se encontró que la erupción cutánea está significativamente asociada con los casos de dengue con un valor OR de 6.655 (IC 95%, 4.417-9.955), seguido por escalofríos, ojos rojos, debilidad y tos, como se muestra en la Figura 4-7. El dolor retroorbital, la odinofagia y el vómito resultaron ser variables significativamente asociadas de forma negativa con dengue, sin embargo, no se pueden interpretar como factores protectores sino como un posible efecto por ser variables altamente sensibles, pero no específicas del dengue, pues en otras infecciones similares por zika, chikunguña o incluso SARS-CoV-2 e Influenza se pueden presentar estos síntomas. En un estudio publicado en el 2021, se encontró algo similar con la asociación de dengue con la erupción cutánea, sin embargo, se encontró también una correlación negativa entre la presentación de dengue y síntomas como dolor de huesos, rinorrea, náuseas y diarrea (101), mostrando nuevamente que, a pesar de que hay manifestaciones clínicas que pueden ser características en la presentación de dengue, no necesariamente se puede hacer una correlación ya que no son específicas.

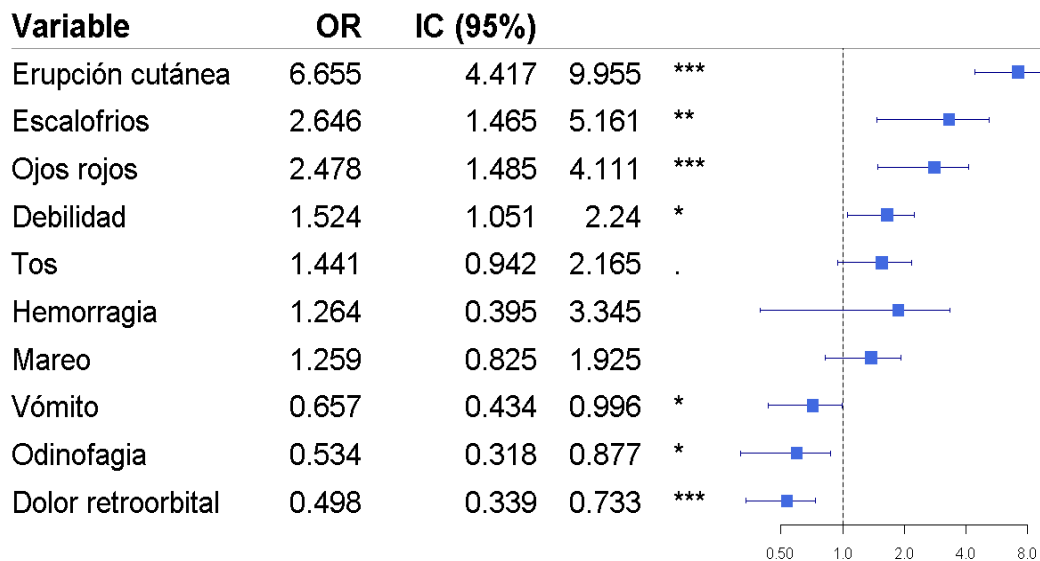


Figura 4-7: regresión logística multivariada para los síntomas posiblemente asociados con la infección por dengue. Se muestra el valor OR, el intervalo de confianza al 95% (IC 95%) y el nivel de significancia según el valor p (‘***’ 0.001, ‘**’ 0.01, ‘*’ 0.05 y ‘.’ 0.1)

Dentro de las variables que fueron inicialmente incluidas en el análisis multivariado, se encontraban hemorragia y mareo, sin embargo, al hacer el método de “stepwise”, estas variables fueron eliminadas dejando en el modelo final solo erupción cutánea, dolor retroorbital, escalofríos, ojos rojos, debilidad, odinofagia y tos. El mejor modelo fue seleccionado con el AIC, teniendo un valor inicial de 1143 y el final de 1141. Para hacer el diagnóstico temprano de dengue se han evaluado características como la prueba de torniquete positiva, ausencia de rinorrea, artralgias, ausencia de diarrea y también realización de cuadro hemático para recuento de leucocitos y plaquetas (102). Si bien con estos criterios se logra hacer un diagnóstico presuntivo inicial, la sensibilidad y especificidad no es tan alta, por lo que se ha planteado la necesidad de utilizar una estrategia combinada con otras técnicas de detección especializadas. En este estudio, no se incluyó el análisis de la evaluación médica para la prueba de torniquete ni el uso de pruebas de laboratorio para recuento de leucocitos y plaquetas, cuya información podría ser valiosa para el análisis de resultados.

Al hacer el mismo análisis para los casos de malaria, se encontró que las manifestaciones clínicas más relacionadas con la presentación de esta infección fueron dolor retroorbital, debilidad, erupción cutánea, tos, odinofagia, vómito y ojos rojos, con un valor $p < 0.2$ como se muestra en la Tabla 4-8. Sin embargo, al hacer el análisis multivariado de regresión logística con estas variables previamente seleccionadas, no se encontró que alguna de estas estuviera significativamente asociada con la presentación de la enfermedad. Aunque la fiebre, las náuseas y vómito se han identificado como síntomas significativos para el diagnóstico de malaria, en este caso no se tuvo la significancia estadística para una posible correlación. En algunos estudios se ha reportado la importancia de la duración de la fiebre para hacer el diagnóstico de malaria, sin embargo, en este caso no se contaba con la información para incluirlo en el análisis y la fiebre tampoco es una variable diferenciadora ya que todas las muestras colectadas e incluidas en el análisis tenían fiebre. Otro aspecto para resaltar es el número de casos de malaria, pues mientras en dengue se observó una prevalencia de 5.9%, para malaria sólo fue de 1.3%, es posible que el tamaño de la muestra no proporcione suficiente información sobre el comportamiento de la enfermedad y su relación con las manifestaciones clínicas analizadas.

Aunque inicialmente se esperaba que el porcentaje de casos indeterminados fuera alto, se esperaba lograr la detección de algún patógeno en al menos el 50% de los casos teniendo en cuenta las

publicaciones previas que se encontraron donde se desarrollaron proyectos similares, sin embargo, el porcentaje de indeterminados fue mucho mayor. Al hacer un análisis de los estudios similares realizados en Latinoamérica, se encontró que el tipo de prueba utilizada y la inclusión de patógenos respiratorios en el tamizaje, puede disminuir el número de casos indeterminados.

En el caso de Puerto Rico, por ejemplo, se tomaron muestras de sangre y oro-faríngeas, se realizaron pruebas PCR y de anticuerpos, con lo cual se pudo identificar algún patógeno en el 54.8% de los casos. Cabe resaltar que el mayor porcentaje de patógenos identificados correspondía a virus respiratorios (22.2%), seguido de chikunguña (18%) y dengue (1.8%) (8). En el estudio realizado en Brasil en el 2018, se logró la identificación de algún patógeno en el 79% de los casos, incluyendo pruebas PCR y anticuerpos IgM para dengue, zika y chikunguña (9). Cuando se hizo detección por PCR, el porcentaje de casos indeterminados es mayor que si se incluyen pruebas para detección de anticuerpos IgM, además, en un alto porcentaje de casos se puede identificar infección por virus respiratorios, por lo que incluir en el tamizaje este tipo de patógenos puede disminuir en un alto porcentaje el número de casos indeterminados. Esto concuerda con los resultados obtenidos, pues usando PCR se identificaron pocos casos positivos, pero al hacer el análisis de resultados de anticuerpos IgM se observó un mayor porcentaje de casos positivos.

En Perú se realizó un estudio en el 2017 donde se tomaron sueros de 139 pacientes para tamizaje de arbovirus por PCR, donde se encontró circulación de chikunguña (9.4%), oropouche (8.6%), dengue (6.5%) y zika (5%). En este caso, al hacer el análisis de los síntomas se concluyó que no era posible hacer diferenciación etiológica solo con las características clínicas y se resaltó la importancia de usar técnicas moleculares para mejorar la vigilancia de arbovirus, incluyendo la detección de oropouche (11). Teniendo en cuenta que en Leticia se detectaron casos de oropouche y que Perú limita con esta región, se vuelve aún más relevante el avanzar en la detección específica de los patógenos causantes de EFAI en nuestro país, para así lograr entender el impacto en la salud pública que puede tener la circulación de este virus. En este estudio se logró la detección de patógenos en el 29.5% de las muestras, pues sólo se hizo detección por PCR.

En los estudios similares realizados en Colombia, se ha encontrado la circulación de diferentes patógenos asociados a casos de EFAI. En Córdoba en 2017, se publicó un estudio en el que se tamizaron X muestras con pruebas de antígenos y de anticuerpos mediante evaluación de seroconversión. En este caso se identificaron el 69% de los casos incluyendo *Leptospira spp.* (27%), dengue (26%), hantavirus (4%), malaria (4%), *Rickettsia spp.* (2%), Hepatitis A (1%) y *Brucella spp.* (1%), con lo que se resalta el hecho de que el 27% de los casos fueron positivos para *Leptospira*

spp., pues la administración de antibióticos de forma oportuna podría ser crucial para disminuir la mortalidad por esta enfermedad y eso puede lograrse haciendo un diagnóstico oportuno (14). En este estudio si se logró la detección de casos de *Rickettsia spp.* y *Brucella spp.*, lo cual puede estar también relacionado con el tipo de prueba utilizada. Además, se detectó la circulación de hantavirus, el cual no fue incluido en el tamizaje de este proyecto, pero definitivamente podría incluirse en nuevos estudios.

En otro estudio publicado en el 2018, se realizaron pruebas PCR a 157 muestras para la detección de dengue, zika y chikunguña, donde se pudo identificar uno o más patógenos en el 52.3% de los casos, donde 21,02% fueron positivos para dengue, 29,94% para chikunguña y 18,47% para zika (15). En este caso se logró la detección de un mayor porcentaje de casos positivos, probablemente por la época en la que se tomaron las muestras y la circulación de chikunguña y zika.

4.2.5 Propuesta de abordaje de EFAI

Un abordaje metodológico para detección de patógenos asociados a casos de síndrome febril agudo indiferenciado requiere una visión amplia de los posibles patógenos involucrados, por lo que el tener una estrategia combinada de técnicas moleculares y serológicas sería ideal. Es por esto que, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este proyecto, se propone el siguiente abordaje metodológico para los casos de EFAI:

1. **Evaluación clínica del paciente:** debe hacerse una evaluación detallada, donde se logren identificar manifestaciones clínicas relevantes y se confirme que se trata de una enfermedad febril no localizada. Debe recopilarse información sobre la duración de la fiebre y antecedentes epidemiológicos relevantes. Durante este estudio se presentó una limitación en el análisis de los resultados por datos faltantes, que a nivel epidemiológico pueden ser cruciales para entender la dinámica de la enfermedad.
2. **Toma de muestras:** una vez identificados los síntomas, recolectar las muestras clínicas adecuadas, si tiene algún síntoma respiratorio, incluir hisopado, sino sólo muestra de sangre. El personal encargado de la toma de muestras debe estar debidamente capacitado, utilizar métodos estandarizados y con técnicas de asepsia, incluyendo el uso de materiales estériles. Esto evita contaminaciones cruzadas y garantiza la calidad de la muestra.

3. **Pruebas rápidas:** inicialmente, se puede realizar un tamizaje con pruebas rápidas comerciales para patógenos específicos de importancia local, como dengue, zika, Chikunguña y malaria. Si el paciente no presenta más de 5 días desde el inicio de síntomas, realizar sólo pruebas rápidas de antígeno, pero si superó ese tiempo, deben incluirse también pruebas rápidas para medición de anticuerpos IgM. El personal debe estar debidamente capacitado para el uso e interpretación de cada prueba rápida.
4. **Microscopía:** otra forma de acceder rápidamente a una posible identificación del patógeno es realizando microscopía en sangre, para detectar por ejemplo parásitos o microorganismos visibles.

El realizar pruebas rápida y microscopia, permite tener un primer tamizaje de las muestras para tratar de hacer una identificación rápida del agente infeccioso, sin embargo, su sensibilidad es baja y será necesario recurrir a técnicas más especializadas. Es por esto que, una vez realizado este primer tamizaje, se deben realizar alícuotas de las muestras y rápidamente almacenarlas para análisis posteriores. El garantizar la calidad de la muestra es clave para tener un buen abordaje de la EFAI.

5. **Extracción de ácidos nucleicos:** utilizar kits comerciales para la extracción simultánea de DNA y RNA. En caso de que se quieran utilizar métodos de extracción *in house* por ser más económicos o estar más fácilmente disponibles localmente, se debe hacer una estandarización y validación previa para garantizar la confiabilidad. Inmediatamente finalizada la extracción, realice pools de RNA/DNA mezclando máximo 5 muestras con volúmenes iguales. Utilice sólo una parte de la muestra para el pool y almacene el RNA/DNA individual para análisis posteriores. En el caso de patógenos con alta prevalencia (>5%), no se recomienda usar la estrategia de pools para la PCR, pues implica más costos y más tiempo.
6. **Amplificación por PCR:** para tratar de disminuir un poco los costos de la PCR, se pueden diseñar primers específicos para los patógenos de interés y hacer la estandarización y validación *in house*. Sin embargo, sería recomendable que de forma centralizada se hiciera el diseño y validación de estas técnicas y posteriormente sean transmitidas a las diferentes regiones para su utilización, de esta manera se tienen un mejor control de la confiabilidad de las técnicas utilizadas. Para optimizar el uso de reactivos y el tiempo, se puede considerar el uso de PCR multiplex para detectar varios patógenos en una sola reacción. En este

estudio se presentaron algunas opciones de primers (la mayoría obtenidos de la literatura) y la multiplexación con su respectiva validación. En este tamizaje molecular pueden incluirse patógenos conocidos que probablemente circulan en la región, en este proyecto se proponen algunos, pero esto dependerá del análisis epidemiológico específico.

Nota: aunque VIH no es considerado como un principal causante de EFAI, se sabe que cuando se presentan los síntomas por primera vez si se da como un cuadro febril y por la alta prevalencia encontrada tanto en Leticia como en Villavicencio, es recomendable incluirlo dentro de las pruebas de rutina. Además, el identificar la infección por VIH de forma oportuna, permitiría ofrecer un mejor tratamiento, disminuir el número de contagios e identificar posibles coinfecciones favorecidas por el estado inmune del paciente.

7. **Pruebas serológicas – IgM:** además de las pruebas rápidas de anticuerpos inicialmente incluidas en el tamizaje, incluir otras pruebas serológicas como ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) para detectar la presencia de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes. Si bien esta no es una prueba definitiva para identificar una infección actual, sirve de apoyo para la identificación al complementarse con otras pruebas.
8. **Análisis de resultados:** analizar los resultados de las técnicas moleculares y serológicas de manera integrada. La correlación de los resultados de la PCR y las pruebas serológicas, permite identificar la infección por un patógeno específico y determinar el estado de la infección (infección activa o pasada).
9. **Secuenciación:** si después de realizar todas las pruebas, algunas muestras siguen con resultado indeterminado, se debe recurrir a técnicas más actualizadas como la secuenciación, de esta manera se puede lograr un panorama más amplio y una mayor posibilidad de identificar el patógeno asociado a la infección. En la sección 4.2.6 se muestra una estrategia general de secuenciación metagenómica para manejo de la EFAI.
10. **Sistema de vigilancia:** la información recopilada debe acoplarse al sistema de vigilancia epidemiológica local y nacional para monitorear y reportar los casos y los patógenos detectados. Los resultados deben llegar a las autoridades de salud para la mejor comprensión de la situación epidemiológica y la toma de decisiones adecuadas para su manejo y control.

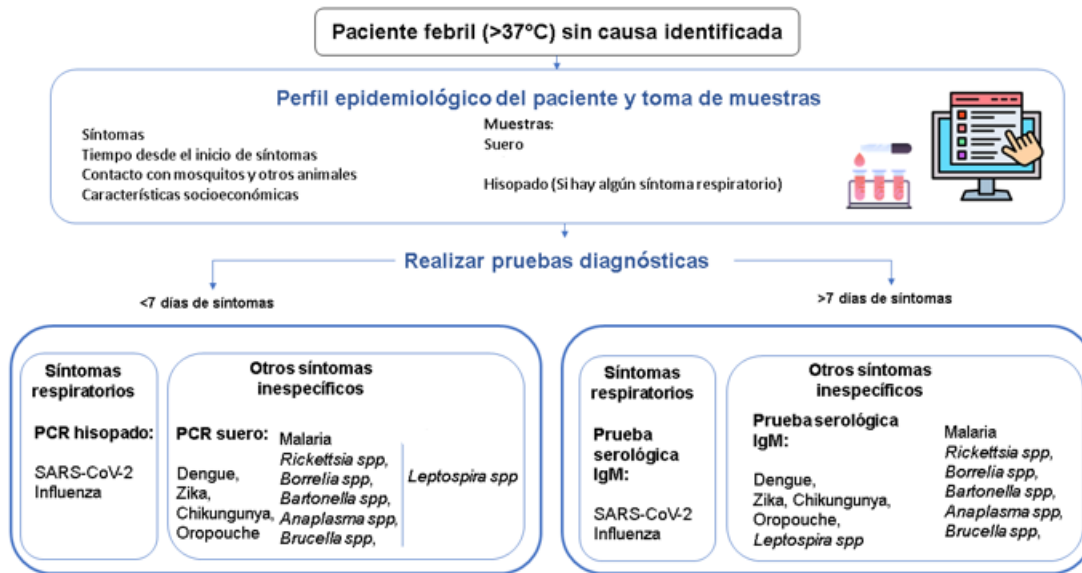


Figura 4-8: esquema general de la propuesta metodológica para el abordaje de la EFAI.

4.2.6 Propuesta de secuenciación metagenómica para abordaje de la EFAI

Dentro de la propuesta de abordaje de la EFAI, se presentó la posibilidad de utilizar la secuenciación en las muestras indeterminadas. Aunque por años la secuenciación ha sido considerada una prueba costosa y poco accesible, la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2 demostró que esto ha cambiado. Sin embargo, en esta propuesta no se busca hacer secuenciación de todas las muestras por las dificultades técnicas y económicas que esto implica, sino sólo aquellas muestras que definitivamente no logran ser identificadas en el tamizaje inicial. Esto permitirá detectar patógenos reemergentes, poco estudiados o nuevos, permitiendo una mejor preparación frente a la amenaza de brotes o epidemias que puedan poner en riesgo la salud de la población.

Existen diferentes metodologías de secuenciación, siendo illumina (San Diego, California) y Oxford Nanopore Technologies (Oxford, Reino Unido) dos de las más utilizadas por sus diferentes ventajas. En el caso de Oxford Nanopore, se obtienen resultados confiables en poco tiempo, además de ofrecer un sistema portable apropiado para secuenciación en campo. Mientras con illumina, se tiene una mayor precisión de la secuencia, pero requiere más tiempo y usa equipos más grandes, en la tabla 4-7 se muestra una comparación de ambas tecnologías. Para el objetivo de esta propuesta que es poder utilizar la secuenciación como herramienta de abordaje de la EFAI, el uso de la

tecnología de Oxford Nanopore parece ser prometedora, pues es un sistema más fácil de llevar a las zonas apartadas donde se pueden presentar estos casos. Sin embargo, si se quieren resultados de mayor precisión para evaluar por ejemplo mutaciones en un patógenos y su posible efecto en la virulencia o resistencia a medicamentos, el uso de illumina sería más adecuado. Es por esto que se presentan ambas opciones para ser utilizadas según el objetivo y la disponibilidad de los equipos en cada región.

Tabla 4-9: comparación de las características generales de la secuenciación con Oxford Nanopore e illumina.

	Oxford Nanopore	illumina
Precisión	Resultados confiables	Mayor precisión
Rapidez	Mayor rapidez	Más tiempo de ejecución
Portabilidad	Portátil y compacto (MinION)	Equipos más grandes
Longitud de lectura	Fragmentos largos	Fragmentos cortos
Costos	Más costo por muestra	Menos costo por muestra, pero más suministros e infraestructura requeridos
Flexibilidad	Versátil	Versátil
Tiempo	15 horas	40 horas

Hay algunos factores importantes para tener en cuenta en cada paso. En el caso de la muestra, es importante garantizar la estabilidad del material genético, por lo que se debe hacer una correcta manipulación, almacenamiento y transporte. El hacer depleción del material genético del huésped o enriquecimiento de la muestra, son también estrategias muy útiles cuando se hace secuenciación metagenómica, pues, aunque mediante técnicas de computación pueden eliminarse las secuencias del huésped, se limita la capacidad de detección de microorganismos por un consumo innecesario con el genoma humano. El hacer un enriquecimiento dirigido aumenta la cantidad de DNA, pero limita los microorganismos que pueden ser detectados.

Algunas estrategias como filtración de la muestra seguido de tratamiento con DNAsas, han demostrado una mejora en la cantidad de DNA microbiano detectado (103).

Otro aspecto importante cuando se realiza secuenciación metagenómica es el uso de controles positivos y negativos como control de calidad de la corrida. Al ser métodos tan sensibles, si se presenta alguna contaminación durante el montaje, se encontrará en los resultados y el control negativo permite identificar esas posibles contaminaciones para eliminarlas del análisis. En la figura 4-9 se muestra un esquema general de la metodología de secuenciación metagenómica propuesta.

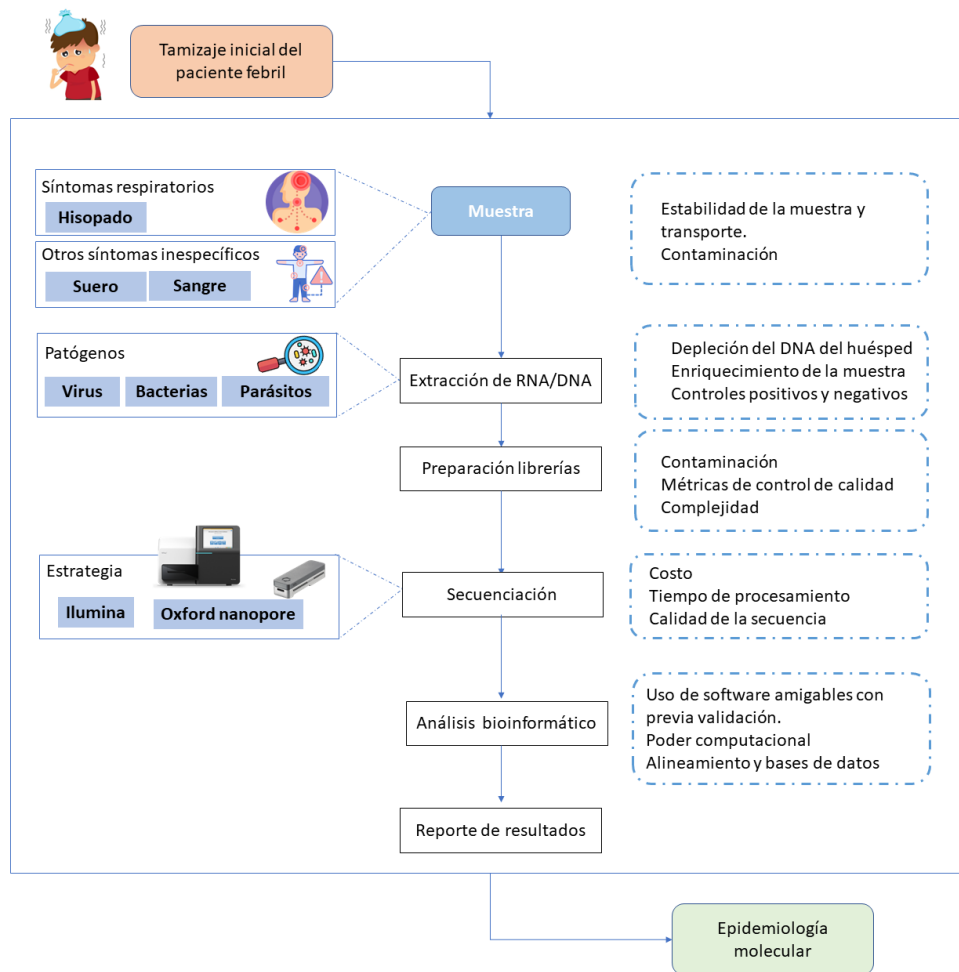


Figura 4-9: esquema general de la propuesta de secuenciación metagenómica como estrategia de abordaje de EFAI.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Para realizar la detección de patógenos asociados a EFAI en muestras procedentes de Leticia y Villavicencio, se hizo la validación previa de las pruebas moleculares PCR tanto en formato singleplex como multiplex, con lo cual se pudo evidenciar la posibilidad de utilizar de forma confiable la detección singleplex, conociendo el límite de detección de cada prueba, así como la linealidad, eficiencia y reproducibilidad. Posteriormente, se realizó la caracterización de casos de EFAI en muestras de pacientes procedentes de Leticia y Villavicencio, encontrando una asociación entre la presentación de la enfermedad con infecciones virales por dengue y oropouche, y parasitarias por malaria, detectadas por técnicas moleculares. Se estimó que la proporción de casos de dengue en Leticia fue de 13.81% y en Villavicencio fue de 2.24%, mientras que para malaria fue de 1.29% en Leticia y 1.2% en Villavicencio. Los casos de oropouche se presentaron solo en Leticia en una baja proporción (0.22%), pero hace evidente la importancia de estudiar más el impacto que puede tener este virus en nuestro país y poder hacer un manejo oportuno de los casos.

Además, se hizo la caracterización epidemiológica de los casos, encontrando que en ambas ciudades se tuvo una mayor proporción de pacientes femeninos que masculinos. Además, en el nivel de escolaridad se encontró un mayor porcentaje de nivel secundaria seguido de técnico y en la ocupación, el mayor porcentaje correspondió a empleados e independientes. En el análisis epidemiológico relacionado con los síntomas, se encontró que la erupción cutánea, los escalofríos, los ojos rojos y la debilidad son las variables significativamente asociadas con la presentación de dengue. Al hacer el mismo análisis para Malaria, no se logró identificar ningún síntoma o manifestación significativamente asociado con esta infección. Cabe resaltar que el número de casos positivos para Malaria fue menor, lo cual pudo limitar el análisis estadístico.

Si bien durante el planteamiento de la propuesta se esperaba tener un alto porcentaje de casos indeterminados, este fue mayor al esperado, lo cual resultó ser un reflejo del gran reto que representan las EFAIs para la salud pública y debe ser una motivación adicional para seguir generando estrategias que aborden esta problemática. Fue por esto que se elaboró la propuesta de abordaje de EFAI y una estrategia como línea base para futuros estudios metagenómicos para detección y descubrimiento de patógenos asociados con el síndrome febril agudo en Colombia.

5.2 Recomendaciones

Si bien en este proyecto se presentó una propuesta con el uso de técnicas moleculares por su sensibilidad y accesibilidad, el número de patógenos propuestos fue limitado por recursos y tiempo, sin embargo, se podrían incluir otros patógenos en futuros estudios, incluyendo por ejemplo virus respiratorios que, en algunos casos pueden presentarse con un síndrome febril no identificado. Además, teniendo en cuenta el ciclo de la infección, es posible que no en todos los casos se logre hacer detección de los antígenos y una estrategia complementaria muy útil podría ser incluir técnicas serológicas para medir anticuerpos IgM como se ha hecho en otros estudios similares.

Otra herramienta para considerar es el uso de secuenciación, pues, aunque es un poco más costosa y compleja, con la pandemia generada por el SARS-CoV-2 se demostró que puede hacerse más accesible y la información que entrega es valiosa, no sólo en términos de presencia o ausencia de un patógeno particular, sino sobre su genoma y posible resistencia a medicamentos. Al tener una estrategia efectiva de selección de los casos apropiados para ser secuenciados, se puede lograr un abordaje más amplio de los casos de EFAI, identificando oportunamente patógenos nuevos o poco conocidos y evitando la distribución descontrolada que lleva a epidemias o pandemias con un impacto incluso mayor sobre la salud pública y la economía.

A. Anexo: Curvas estándar de validación PCR multiplex *Leptospira* spp, *Rickettsia* spp y *Borrelia* spp.

Figura A-1: Curvas estándar para ensayo de PCR singleplex y multiplex de *Leptospira* spp, *Rickettsia* spp y *Borrelia* spp. Se muestra la ecuación de la curva estándar, la eficiencia (ϵ) y linealidad (R^2), así como las curvas de amplificación de PCR. **A.** *Leptospira* spp singleplex. **B.** *Leptospira* spp multiplex. **C.** *Rickettsia* spp singleplex. **D.** *Rickettsia* spp multiplex. **E.** *Borrelia* spp singleplex. **F.** *Borrelia* spp multiplex.

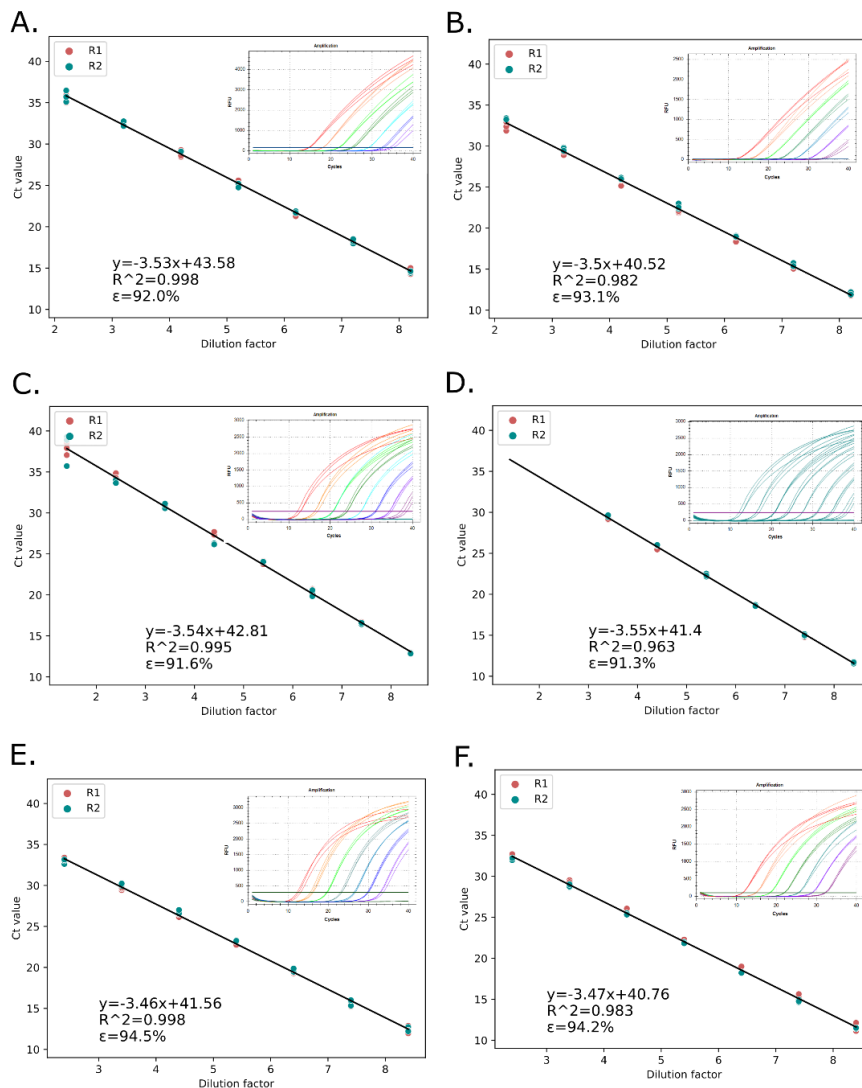
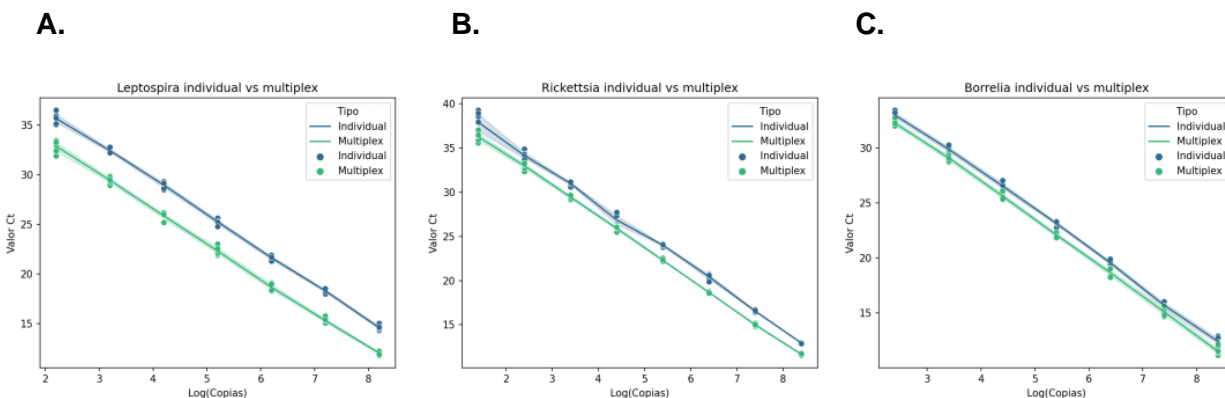


Figura A-2: Comparación de las curvas estándar para ensayo de PCR singleplex y multiplex de A. *Leptospira* spp, B. *Rickettsia* spp y C. *Borrelia* spp.



B. Anexo: Curvas estándar de validación PCR multiplex *Anaplasma* spp, *Brucella* spp y *Bartonella* spp.

Figura B-1: Curvas estándar para ensayo de PCR singleplex y multiplex de *Anaplasma* spp, *Brucella* spp y *Bartonella* spp. Se muestra la ecuación de la curva estándar, la eficiencia (ϵ) y linealidad (R^2), así como las curvas de amplificación de PCR. A. *Anaplasma* spp singleplex. B. *Anaplasma* spp multiplex. C. *Brucella* spp singleplex. D. *Brucella* spp multiplex. E. *Bartonella* spp singleplex. F. *Bartonella* spp multiplex.

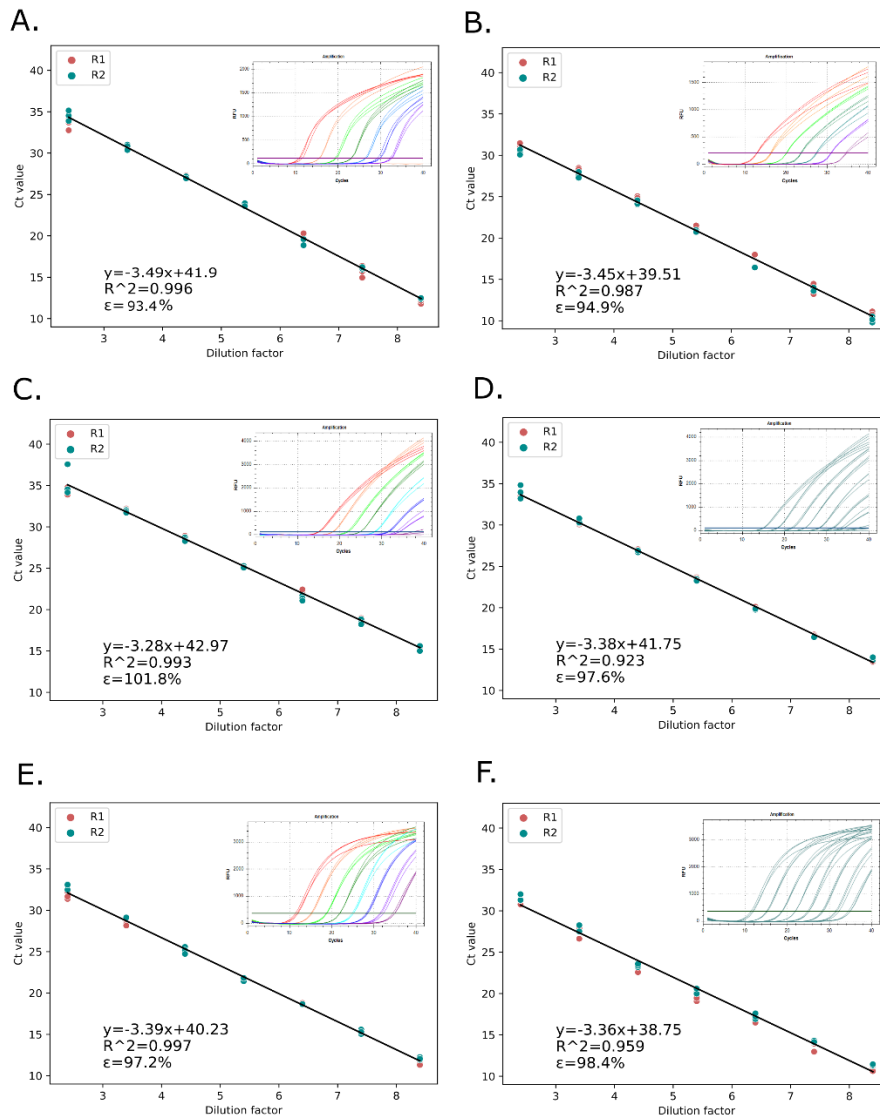
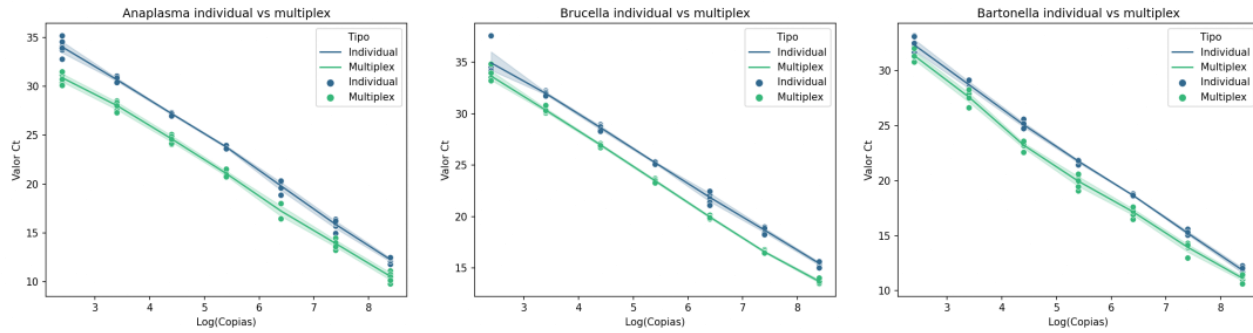


Figura B-2: Comparación de las curvas estándar para ensayo de PCR singleplex y multiplex de **A.** *Anaplasma* spp, **B.** *Brucella* spp y **C.** *Bartonella* spp.

A.

B.

C.



C. Anexo: Curvas estándar de validación PCR multiplex oropouche y RNAsa P.

Figura C-1: Curvas estándar para ensayo de PCR singleplex y multiplex de oropouche y RNAsa P. Se muestra la ecuación de la curva estándar, la eficiencia (ϵ) y linealidad (R^2), así como las curvas de amplificación de PCR. **A.** RNAsa P singleplex. **B.** RNAsa P multiplex. **C.** oropouche singleplex. **D.** Oropouche multiplex.

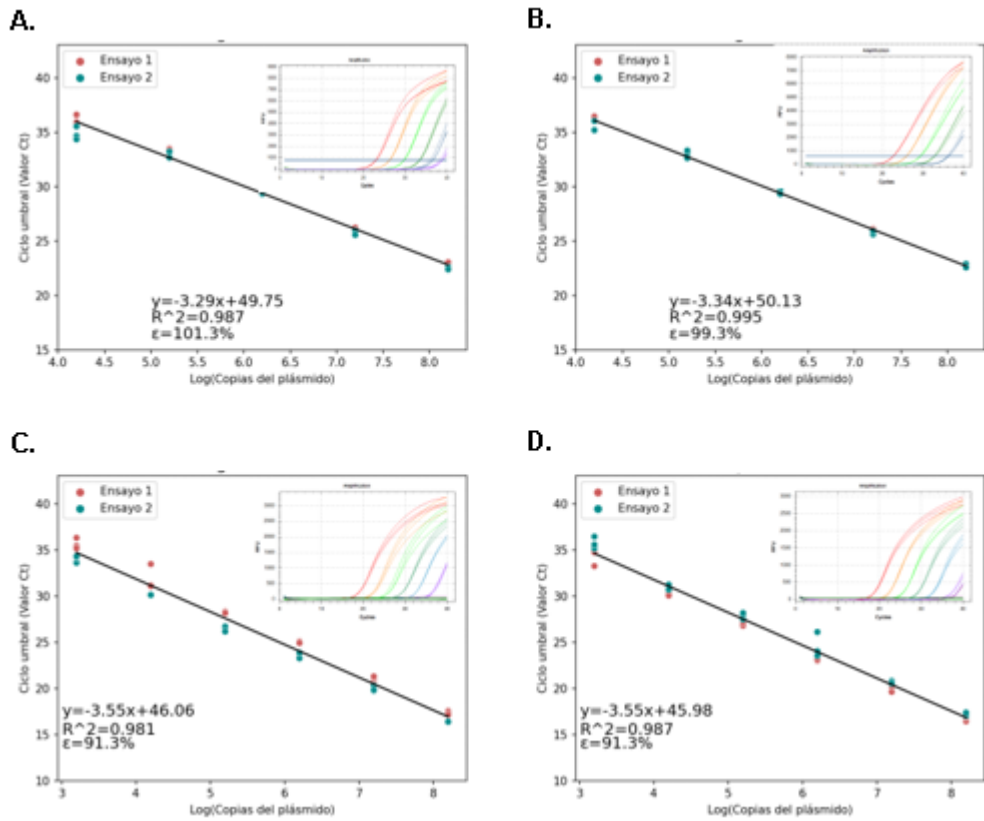
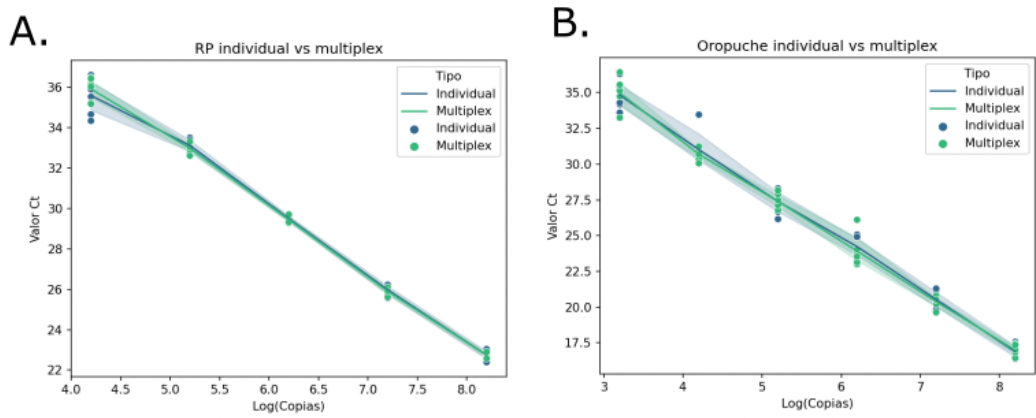


Figura C-2: Comparación de las curvas estándar para ensayo de PCR singleplex y multiplex de **A. RNAsa P** y **B. Oropouche**.



D. Anexo: Curvas estándar de validación PCR multiplex dengue, zika y Chikunguña.

Figura D-1: Curvas estándar para ensayo de PCR singleplex y multiplex de dengue, zika y Chikunguña. Se muestra la ecuación de la curva estándar, la eficiencia (ϵ) y linealidad (R^2), así como las curvas de amplificación de PCR. **A.** Dengue singleplex. **B.** Dengue multiplex. **C.** zika singleplex. **D.** zika multiplex. **E.** Chikunguña singleplex. **F.** Chikunguña multiplex.

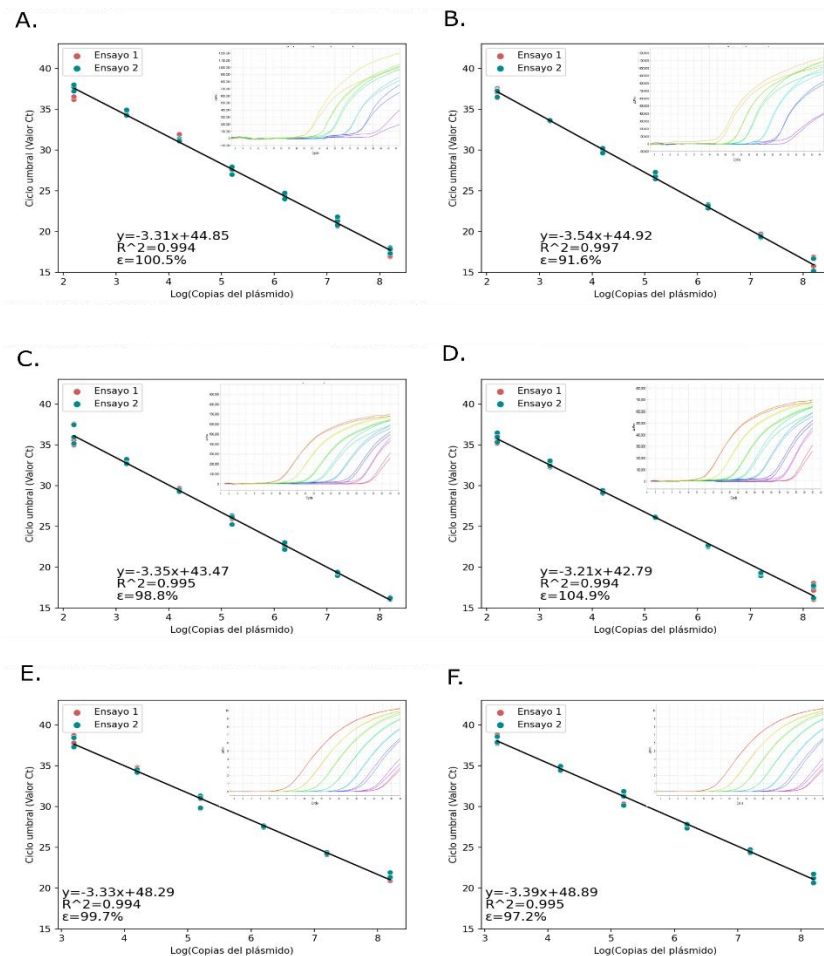
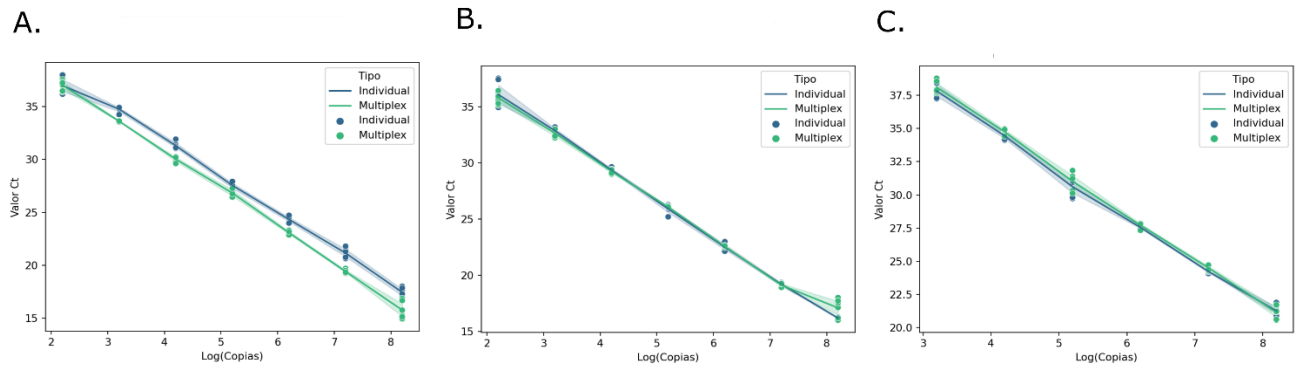
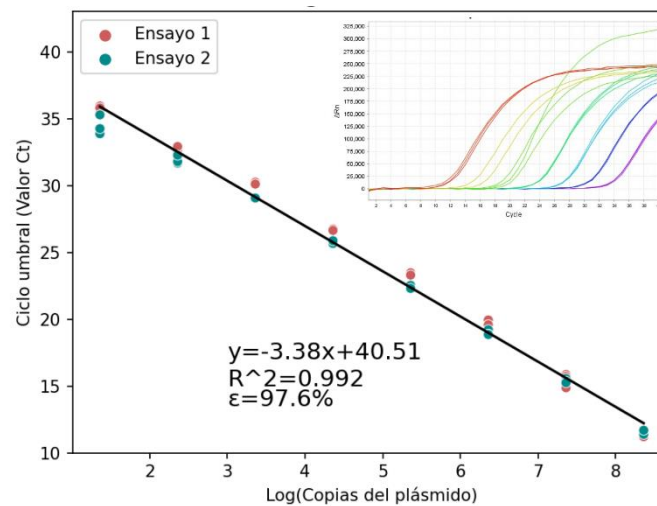


Figura D-2: Comparación de las curvas estándar para ensayo de PCR singleplex y multiplex de **A.** Dengue, **B.** zika y **C.** Chikunguña.



E. Anexo: Curvas estándar de validación PCR *Plasmodium* spp.

Figura D-1: Curvas estándar para ensayo de PCR singleplex para detección de *Plasmodium* spp. Se muestra la ecuación de la curva estándar, la eficiencia (ϵ) y linealidad (R^2), así como las curvas de amplificación de PCR.



F. Anexo: listado de publicaciones relacionadas con el proyecto realizado (publicadas y en proceso)

1. Coautora en el artículo publicado en el año 2022 en la revista "Emerging microbes and infections" titulado "Oropouche virus as an emerging cause of acute febrile illness in Colombia". DOI: 10.1080/22221751.2022.2136536
2. Autora principal del artículo en proceso titulado "Real-time multiplex PCR assays for simultaneously detecting six neglected bacterial pathogens". El artículo ya fue terminado, pero está en revisión así que no se ha sometido a la revista. Se espera hacer la publicación en la revista "American Journal of Tropical Medicine and Hygiene".
3. Coautora del artículo en proceso titulado "Comparative analysis of different in-house viral RNA extraction methods for downstream molecular testing". Se encuentra en revisión para ser posteriormente sometido a la revista "BioTechniques".

Bibliografía

1. Manock SR, Jacobsen KH, De Bravo NB, Russell KL, Negrete M, Olson JG, et al. Etiology of acute undifferentiated febrile illness in the Amazon basin of Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;81(1):146-51.
2. Faccini-Martínez ÁA, Ramírez-Hernández A, Barreto C, Forero-Becerra E, Millán D, Valbuena E, et al. Epidemiology of Spotted Fever Group Rickettsioses and Acute Undifferentiated Febrile Illness in Villeta, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 9 de septiembre de 2017;97(3):782.
3. Misión Internacional de Sabios 2019. Propuestas y desafíos para la salud y la vida. Una visión desde la Misión. Garantizar una vida saludable y promover el bienestar de todos los colombianos en todas las edades. Vol. 2, Misión SABIOS Colombia, 2019. © Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación. Bogotá: Vicepresidencia de la República de Colombia, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación; 2020.
4. Gutiérrez C, Montes Lluch M. Fiebre de origen desconocido. 2007.
5. Tercero Gutiérrez MJ, Olalla Herbosa R. Enfermedades tropicales transmitidas por vectores. Medidas preventivas y profilaxis. *OFFARM*. junio de 2008;27(6).
6. Crump JA, Gove S, Parry CM. Management of adolescents and adults with febrile illness in resource limited areas. *BMJ*. 8 de agosto de 2011;343(aug08 2):d4847-d4847.
7. Arroyave E, Londoño AF, Quintero JC, Agudelo-Flórez P, Arboleda M, Díaz FJ, et al. Etiología y caracterización epidemiológica del síndrome febril no palúdico en tres municipios del Urabá antioqueño, Colombia. *Biomedica*. 2013;33(SUPPL.1):99-107.
8. Tomashek KM, Lorenzi OD, Andújar-Pérez DA, Torres-Velásquez BC, Hunsperger EA, Muñoz-Jordan JL, et al. Clinical and epidemiologic characteristics of dengue and other etiologic agents among patients with acute febrile illness, Puerto Rico, 2012-2015. *PLoS Negl Trop Dis*. 13 de septiembre de 2017;11(9).
9. Azeredo EL, dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. *PLoS Curr*. 2018;10.
10. Magalhaes T, Braga C, Cordeiro MT, Oliveira ALS, Castanha PMS, Maciel APR, et al. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 6 de noviembre de 2017;11(11).

11. Alva-Urcia C, Aguilar-Luis MA, Palomares-Reyes C, Silva-Caso W, Suarez-Ognio L, Weigl P, et al. Emerging and reemerging arboviruses: A new threat in Eastern Peru. *PLoS One*. 1 de noviembre de 2017;12(11).
12. Cabral Castro MJ, Cavalcanti MG, Peralta RHS, Peralta JM. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. *J Clin Virol*. 1 de septiembre de 2016;82:108-11.
13. Sánchez-Carbonel J, Tantaléan-Yépez D, Aguilar-Luis MA, Silva-Caso W, Weigl P, Vásquez-Achaya F, et al. Identification of infection by Chikungunya, Zika, and Dengue in an area of the Peruvian coast. Molecular diagnosis and clinical characteristics. *BMC Res Notes*. 14 de marzo de 2018;11(1).
14. Mattar S, Tique V, Miranda J, Montes E, Garzon D. Undifferentiated tropical febrile illness in Cordoba, Colombia: Not everything is dengue. *J Infect Public Health*. 1 de septiembre de 2017;10(5):507-12.
15. Carrillo-Hernández MY, Ruiz-Saenz J, Villamizar LJ, Gómez-Rangel SY, Martínez-Gutierrez M. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. *BMC Infect Dis*. 30 de enero de 2018;18(1).
16. Bressan C da S, Teixeira M de LB, Gouvêa MIF da S, de Pina-Costa A, Santos HFP, Calvet GA, et al. Challenges of acute febrile illness diagnosis in a national infectious diseases center in Rio de Janeiro: 16-year experience of syndromic surveillance. *PLoS Negl Trop Dis*. 3 de abril de 2023;17(4).
17. Sánchez Lerma L, Pérez Gutiérrez N, Pavas Escobar NC. Dengue:: una causa frecuente de síndrome febril agudo en el Departamento de El Meta, Colombia TT - Dengue:: a common cause of febrile syndrome in Meta State, Colombia. *Rev habanera cienc méd*. 2017;16(2):256-67.
18. Manrique Sánchez J, Avilla GA, Rodriguez Reyes A, Díaz J, Tangarife V, Rivera D, et al. *Boletín Epidemiológico Semanal*. Semana 52. 2019.
19. Red Nacional Laboratorios En Salud Publica C DE, Nacional de Salud I. Manual de procedimientos enfoque sindrómico para el diagnóstico de laboratorio durante brotes . Ministerio de salud, Instituto Nacional de Salud . 2005;
20. Cortés JA, Romero-Moreno LF, Aguirre-León CA, Pinzón-Lozano L, Cuervo SI. Enfoque clínico del síndrome febril agudo en Colombia. *Infectio*. 2017;21(1):39-50.
21. Wangdi K, Kasturiaratchi K, Nery SV, Lau CL, Gray DJ, Clements ACA. Diversity of infectious aetiologies of acute undifferentiated febrile illnesses in south and Southeast Asia: A systematic review. *BMC Infect Dis*. 4 de julio de 2019;19(1):1-17.
22. Mattar S, Montero A J, González T M, Mattar S, Montero A J, González T M. La historia del dengue aún no termina. *Rev MVZ Cordoba*. 2019;24(2):7177-9.

23. OPS. Situación de la Malaria en la Región de las Américas, 2000-2016. Informe anual. 2016.
24. Mattar S, Alvis N, Gonzalez M. Haemorrhagic Fevers Transmitted by Vectors in the Neotropics. *Current Topics in Public Health*. 2013;(June 2014).
25. Minsalud. Geografía Y Salud En Colombia. :27-46.
26. León R, Aragón V. Zoonosis emergentes y reemergentes y principios básicos de control de zoonosis. *Revista de Medicina Veterinaria* N°. 2009;17.
27. Gegúndez MI, Lledó L. Infección por hantavirus y otros virus transmitidos por roedores. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1 de octubre de 2005;23(8):492-500.
28. Zhao R, Wang M, Cao J, Shen J, Zhou X, Wang D, et al. Flavivirus: From structure to therapeutics development. *Life*. 2021;11(7):1-25.
29. 'Bennett JE', 'Dolin R, 'Blaser MJ'. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 1.^a ed. Barcelona: Elsevier; 2020. 2013-2040 p.
30. Schaefer TJ, Panda PK, Wolford RW. Dengue Fever. *BMJ Best Practice*. 22 de abril de 2022;5-6.
31. Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne S. DENGUE VIRAL INFECTIONS. *Indian J Dermatol*. 1 de enero de 2010;55(1):68.
32. Li M, Zhang D, Li C, Zheng Z, Fu M, Ni F, et al. Characterization of Zika Virus Endocytic Pathways in Human Glioblastoma Cells. *Front Microbiol*. 6 de marzo de 2020;11:242.
33. Lahon A, Arya RP, Kneubehl AR, Vogt MB, Dailey Garnes NJM, Rico-Hesse R. Characterization of a Zika Virus Isolate from Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 21 de septiembre de 2016;10(9):e0005019.
34. Simon L V., Hashmi MF, Torp KD. Yellow Fever. *Handbook of Zoonoses, Second Edition, Section B: Viral Zoonoses*. 16 de febrero de 2022;111-24.
35. McGuinness I, Beckham JD, Tyler KL, Pastula DM. An Overview of Yellow Fever Virus Disease. *Neurohospitalist*. octubre de 2017;7(4):157.
36. Atukorala I, Chang T. Musculoskeletal Disorders. *Manson's Tropical Diseases: Twenty-Third Edition*. 1 de enero de 2014;1027-1037.e2.
37. ViralZone. Alphavirus. [citado 15 de agosto de 2021]. Alphavirus ~ ViralZone. Disponible en: https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species
38. Cappuccio L, Maisse C. Infection of Mammals and Mosquitoes by Alphaviruses: Involvement of Cell Death. *Cells*. 5 de diciembre de 2020;9(12).

39. Cunha MS, Costa PAG, Correa IA, de Souza MRM, Calil PT, da Silva GPD, et al. Chikungunya Virus: An Emergent Arbovirus to the South American Continent and a Continuous Threat to the World. *Front Microbiol.* 26 de junio de 2020;11:1297.
40. Shope R. *Bunyaviruses - Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
41. Mattar S, González M. Oropuche virus: A virus present but ignored. *REVISTA MVZ CÓRDOBA.* septiembre de 2015;
42. Céspedes M. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* diciembre de 2005;22(4).
43. Romero Vivas CM, Falconar AK. *Leptospira* spp. y leptospirosis humana. *Revista Salud Uninorte.* 1 de enero de 2016;32(1):123-43.
44. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Van De Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol.* 1 de agosto de 1995;43(2):110-4.
45. Alton GG, Forsyth JRL. *Brucella*. *Molecular Medical Microbiology: Second Edition.* 1 de enero de 1996;3:1781-8.
46. Brucellosis | CDC [Internet]. 2012 [citado 5 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/brucellosis/symptoms/index.html>
47. Biswas S, Rolain JM. Bartonella infection: treatment and drug resistance. *Future Microbiol [Internet].* 6 de diciembre de 2010 [citado 4 de junio de 2022];5(11):1719-31. Disponible en: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb.10.133>
48. Mogollon-Pasapera E, Otvos L, Giordano A, Cassone M. Bartonella: emerging pathogen or emerging awareness? *International Journal of Infectious Diseases.* 1 de enero de 2009;13(1):3-8.
49. Iralu J, Bai Y, Crook L, Tempest B, Simpson G, McKenzie T, et al. Rodent-associated Bartonella Febrile Illness, Southwestern United States - Volume 12, Number 7—July 2006 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* *Emerg Infect Dis.* 2006;12(7):1081-6.
50. Johnson G, Ayers M, McClure SCC, Richardson SE, Tellier R. Detection and Identification of Bartonella Species Pathogenic for Humans by PCR Amplification Targeting the Riboflavin Synthase Gene (ribC). *J Clin Microbiol.* 1 de marzo de 2003;41(3):1069.
51. Gomes C, Martinez-Puchol S, Pons MJ, Bazán J, Tinco C, del Valle J, et al. Evaluation of PCR Approaches for Detection of Bartonella bacilliformis in Blood Samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 9 de marzo de 2016;10(3).

52. Vega L, Ariza A. Medicina Interna México. 2008 [citado 5 de junio de 2022]. p. 217-23 Bartonellosis: current clinical spectrum of an old pathogen. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=19615>
53. Blanton LS. The Rickettsioses: A Practical Update. *Infect Dis Clin North Am*. 1 de marzo de 2019;33(1):213.
54. Portillo A, De Sousa R, Santibáñez S, Duarte A, Edouard S, Fonseca IP, et al. Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp. <https://home.liebertpub.com/vbz>. 1 de enero de 2017;17(1):23-32.
55. Paris DH, Dumler JS. State of the art of diagnosis of rickettsial diseases: the use of blood specimens for diagnosis of scrub typhus, spotted fever group rickettsiosis, and murine typhus. *Curr Opin Infect Dis*. 2016;29(5):433.
56. CDC. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Vector-Borne Diseases (DVBD). 2019 [citado 21 de junio de 2022]. Signs and Symptoms | Anaplasmosis | CDC. Disponible en: <https://www.cdc.gov/anaplasmosis/symptoms/index.html>
57. Factsheet on Human granulocytic anaplasmosis. European Centre for Disease Prevention and Control.
58. Garrido-Cardenas JA, Cebrián-Carmona J, González-Cerón L, Manzano-Agugliaro F, Mesa-Valle C. Analysis of Global Research on Malaria and *Plasmodium vivax*. *Int J Environ Res Public Health*. 1 de junio de 2019;16(11).
59. Zekar L, Sharman T. *Plasmodium Falciparum* Malaria. *StatPearls*. 11 de agosto de 2021;
60. Mahajan B, Zheng H, Pham PT, Sedegah MY, Majam VF, Akolkar N, et al. Polymerase chain reaction–based tests for pan-species and species-specific detection of human *Plasmodium* parasites. *Transfusion (Paris)*. 1 de septiembre de 2012;52(9):1949-56.
61. Sato S. *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J Physiol Anthropol*. 1 de diciembre de 2021;40(1).
62. CDC [Internet]. [citado 5 de junio de 2022]. Principles of Epidemiology | Lesson 1 - Section 9. Natural History and Spectrum of Disease. Disponible en: <https://www.cdc.gov/csels/dsepd/ss1978/lesson1/section9.html>
63. van Seventer JM, Hochberg NS. Principles of Infectious Diseases: Transmission, Diagnosis, Prevention, and Control. En: *International Encyclopedia of Public Health*. 2.^a ed. Elsevier; 2017. p. 22-39.

64. Davis S, Milechin L, Patel T, Hernandez M, Ciccarelli G, Samsi S, et al. Detecting Pathogen Exposure During the Non-symptomatic Incubation Period Using Physiological Data: Proof of Concept in Non-human Primates. *Front Physiol.* 3 de septiembre de 2021;12:1173.
65. Rai KR, Shrestha P, Yang B, Chen Y, Liu S, Maarouf M, et al. Acute Infection of Viral Pathogens and Their Innate Immune Escape. *Front Microbiol.* 22 de junio de 2021;12.
66. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 1 de agosto de 2013;46(4):245-52.
67. Muller DA, Depelsenaire ACI, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis.* 1 de marzo de 2017;215(suppl_2):S89-95.
68. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA.* 9 de junio de 2020;323(22):2249-51.
69. Neagu M, Constantin C, Surcel M. Testing Antigens, Antibodies, and Immune Cells in COVID-19 as a Public Health Topic—Experience and Outlines. *Int J Environ Res Public Health.* 1 de diciembre de 2021;18(24).
70. Kabir MA, Zilouchian H, Younas MA, Asghar W. Dengue Detection: Advances in Diagnostic Tools from Conventional Technology to Point of Care. *Biosensors (Basel).* 1 de julio de 2021;11(7).
71. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends Food Sci Technol.* 1 de junio de 2014;37(2):115-26.
72. Smith M. Validating Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays. *Encyclopedia of Virology.* 2021;35.
73. Stordeur P, Poulin LF, Craciun L, Zhou L, Schandene L, De Lavareille A, et al. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *J Immunol Methods.* 2002;259:55-64.
74. Smith M. Validating Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays. *Encyclopedia of Virology.* 2021;(January):35-44.
75. Taylor SM, Juliano JJ, Trottman PA, Griffin JB, Landis SH, Kitsa P, et al. High-Throughput Pooling and Real-Time PCR-Based Strategy for Malaria Detection. *J Clin Microbiol.* febrero de 2010;48(2):512.
76. Grobe N, Cherif A, Wang X, Dong Z, Kotanko P. Sample pooling: burden or solution? *Clinical Microbiology and Infection.* 1 de septiembre de 2021;27(9):1212-20.
77. Geng S, Mei Q, Zhu C, Fang X, Yang T, Zhang L, et al. Metagenomic next-generation sequencing technology for detection of pathogens in blood of critically ill patients. *International Journal of Infectious Diseases.* 1 de febrero de 2021;103:81-7.

78. Hill V, Ruis C, Bajaj S, Pybus OG, Kraemer MUG. Progress and challenges in virus genomic epidemiology. *Trends Parasitol.* 1 de diciembre de 2021;37(12):1038-49.
79. Ladner JT, Grubaugh ND, Pybus OG, Andersen KG. Precision epidemiology for infectious disease control. *Nat Med.* 1 de febrero de 2019;25(2):206.
80. Whole Genome Sequencing | CDC [Internet]. [citado 22 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/wgs.html>
81. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet.* 8 de enero de 2010;11(1):31-46.
82. Goodwin S, Gurtowski J, Ethe-Sayers S, Deshpande P, Schatz MC, McCombie WR. Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome. *Genome Res.* noviembre de 2015;25(11):1750-6.
83. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 2016 17:6. 17 de mayo de 2016;17(6):333-51.
84. Calculating PAS from w, R, and N.
85. Ciuoderis KA, Berg MG, Perez LJ, Hadji A, Perez-Restrepo LS, Aristizabal LC, et al. Oropouche virus as an emerging cause of acute febrile illness in Colombia. *Emerg Microbes Infect.* 31 de diciembre de 2022;11(1):2645-57.
86. Waggoner JJ, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Ballesteros G, Davila MJV, Tellez Y, et al. Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Emerg Infect Dis.* 1 de julio de 2016;22(7):1295.
87. Bounaadja L, Albert D, Chénais B, Hénault S, Zygmunt MS, Poliak S, et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, bcsp31 and per target genes. *Vet Microbiol.* 28 de mayo de 2009;137(1-2):156-64.
88. Waggoner JJ, Abeynayake J, Balassiano I, Lefterova M, Sahoo MK, Liu Y, et al. Multiplex Nucleic Acid Amplification Test for Diagnosis of Dengue Fever, Malaria, and Leptospirosis. Caliendo AM, editor. *J Clin Microbiol.* junio de 2014;52(6):2011-8.
89. Dahmana H, Granjon L, Diagne C, Davoust B, Fenollar F, Mediannikov O. Rodents as Hosts of Pathogens and Related Zoonotic Disease Risk. *Pathogens.* 10 de marzo de 2020;9(3):202.
90. Diaz MH, Bai Y, Malania L, Winchell JM, Kosoy MY. Development of a Novel Genus-Specific Real-Time PCR Assay for Detection and Differentiation of *Bartonella* Species and Genotypes. *J Clin Microbiol.* mayo de 2012;50(5):1645-9.

91. Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Saunders D, Ockenhouse CF. Multiplex qPCR for Detection and Absolute Quantification of Malaria. *PLoS One*. 29 de agosto de 2013;8(8):71539.
92. Madden TL, Busby B, Ye J. Reply to the paper: Misunderstood parameters of NCBI BLAST impacts the correctness of bioinformatics workflows. Hancock J, editor. *Bioinformatics*. 1 de agosto de 2019;35(15):2699-700.
93. Verrall AJ, Lye DC, Pada S, Smitasin N, Lee CK, Khoo MJ, et al. High yield of HIV testing in dengue-like febrile illness in Singapore. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(8):1-4.
94. Chang CC, Crane M, Zhou J, Mina M, Post JJ, Cameron BA, et al. HIV and co-infections. *Immunol Rev*. 2014;254(1):114-42.
95. Waggoner JJ, Abeynayake J, Balassiano I, Lefterova M, Sahoo MK, Liu Y, et al. Multiplex nucleic acid amplification test for diagnosis of dengue fever, malaria, and leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):2011-8.
96. Zhou K, Terrault N. Opioid use disorder and Chronic Hepatitis B. En: *The Opioid Epidemic and Infectious Diseases*. Elsevier; 2021. p. 97-123.
97. HABER B. Viral Hepatitis. En: *Pediatric Gastroenterology*. Elsevier; 2008. p. 289-97.
98. Tietcheu BRG, Babai CN, Ngakou A. Seroprevalence, risk factors and impact of dengue fever/hepatitis B coinfection on liver function parameters in Cameroonian patients. *Clin Exp Hepatol*. 2022;8(2):161-9.
99. Dong H, Zhao L, Sun H, Shang M, Lv G, Yu X, et al. Coinfection of *Clonorchis sinensis* and hepatitis B virus: clinical liver indices and interaction in hepatic cell models. *Parasit Vectors*. 12 de diciembre de 2022;15(1):460.
100. Kumar A, Arora A. Liver involvement in common febrile illnesses. *Curr Med Res Pract*. septiembre de 2018;8(5):170-6.
101. Khosavanna RR, Kareko BW, Brady AC, Booty BL, Nix CD, Lyski ZL, et al. Clinical Symptoms of Dengue Infection among Patients from a Non-Endemic Area and Potential for a Predictive Model: A Multiple Logistic Regression Analysis and Decision Tree. *Am J Trop Med Hyg*. 6 de enero de 2021;104(1):121-9.
102. Díaz FA, Martínez RA, Villar LA. Criterios clínicos para diagnosticar el dengue en los primeros días de enfermedad. *Biomédica*. 1 de marzo de 2006;26(1):22.
103. Shi Y, Wang G, Lau HCH, Yu J. Metagenomic Sequencing for Microbial DNA in Human Samples: Emerging Technological Advances. *Int J Mol Sci*. 16 de febrero de 2022;23(4):2181.