

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
ESCUELA DE BIOANALISIS CLINICO

UNAN-León



Evaluación de un Kit inmunocromatográfico para la detección de antígenos NS1 del dengue en el brote epidémico de Agosto 2009 a Enero del 2010 en la ciudad de Managua.

Autor: Br. Magelda Montoya Cruz.

Br. Rolando García Mairena.

Tutor: Dr. Angel Balmaseda. M.D MSc.

Asesor: Dr. Filemón Bucardo. PhD.

01, Noviembre del 2011



INTRODUCCION

En el mundo actual el diagnóstico del dengue es una de las prioridades en la esfera del diagnóstico dada la alta incidencia de esta enfermedad re-emergente. Se transmite a través del piquete del mosquito hembra *Aedes aegypti* infectado con el virus dengue. (1, 9)

Dentro del sistema integrado de vigilancia epidemiológica del dengue el diagnóstico de rutina se hace a través de la detección de anticuerpos IgM en muestras convalecientes y PCR en muestras agudas. Además de estas técnicas de rutina se realizan otros procedimientos para fines de investigación; tales como aislamiento viral, ELISA inhibición, Ensayos por neutralización de anticuerpos e inhibición de la hemaglutinación. El tiempo que toma confirmar un caso positivo desde que es tomada la muestra al paciente, hasta que el resultado se encuentra disponible en Vigilancia Epidemiológica es de aproximadamente 7 días, esto a través de los métodos tradicionales tales como ELISA captura IgM con muestras que deben tener más de 5 días desde iniciados los síntomas y la PCR con muestras en los 1ros 5 días de la enfermedad. Esto hace ver la necesidad de tener dentro del sistema integrado de diagnóstico una prueba rápida la cual tenga muy buena sensibilidad y especificidad para realizar una detección temprana y una correcta intervención epidemiológica en un brote epidémico.

La proteína no estructural NS1 del virus dengue la cual aparece en la fase aguda de la enfermedad, lo que la convierte en un marcador inmunológico temprano y se puede detectar a través de uno de los kit que existen en el medio el cual es SD Dengue EDEN NS1 Ag (Standard diagnostic, INC) el cual se esta evaluando en esta investigación y que sostiene la incógnita científica de este estudio la cual es constatar si este kit inmunocromatográfico tiene la sensibilidad y especificidad necesaria para brindar un diagnóstico de calidad de dengue en un brote epidémico.

Históricamente las pruebas rápidas han ocupado un papel fundamental en el diagnóstico de las enfermedades por las facilidades que presenta su uso e interpretación. En Nicaragua el uso de pruebas rápidas ha sido integrado al diagnóstico de patologías tales como HIV, Influenza y Malaria generando beneficios en el diagnóstico precoz. De esta manera surge la necesidad de dar una respuesta diagnóstica rápida en dengue la cual pueda ser implementada tanto en áreas rurales



como urbanas para facilitar el manejo de los pacientes con una prueba rápida altamente específica y sensible que nos genere resultados rápidos y seguros los cuales nos darán evidencia en un primer plano de la situación epidemiológica del país.

Guzmán y et. al 2006 realizaron un estudio el cual demostró que la sensibilidad y especificidad de un kit comercial de diagnóstico va a estar influenciado por diferentes factores tales como la relación de fecha de inicio de síntomas y la fecha de toma de muestras y serotipo circulante ya que en las muestras del estudio los países tales como Nicaragua y Venezuela donde el serotipo circulante era dengue 2 el Kit Pan-E dengue Early ELISA de Pan-Bio resultó tener menor sensibilidad diagnóstica. En cuanto al número de días que la muestra tuviera aun encontrándose en fase aguda demostró ser importante ya que entre menor era la cantidad de días demostraron mayor especificidad y sensibilidad los Kit comerciales evaluados.

Este estudio trata de evaluar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba rápida SD diagnostic Dengue EDEN NS1 Ag, con muestras clínicas sospechosas de dengue del brote epidémico de la temporada del año 2009 las cuales se encuentran en la fase aguda, 6to y 7mo día de la enfermedad utilizando como técnica de referencia la RT-PCR.



ANTECEDENTES

Históricamente las pruebas rápidas han ocupado un papel fundamental en el diagnóstico de las enfermedades por las facilidades que presenta su uso e interpretación. En Nicaragua el uso de pruebas rápidas ha sido integrado al diagnóstico de patologías tales como HIV, Influenza y Malaria generando beneficios en el diagnóstico precoz.

El diagnóstico del dengue en Nicaragua está basado en la detección de anticuerpos IgM a través de un ELISA de captura en muestras en fase convalescente y la detección de los serotipos del virus a través de RT-PCR en muestras en fase aguda. A nivel nacional se cuenta con 7 laboratorios descentralizados en diferentes departamentos del país en los que se realiza ELISA IgM con ellos se ha tratado de dar respuesta rápida al diagnóstico de dengue.

Guzmán y et. al 2006 realizaron un estudio con muestras de seis países incluyendo Tailandia, Vietnam, Malasia, Nicaragua, Cuba y Venezuela del proyecto del Denco en el que se trato de evaluar la sensibilidad y especificidad de dos Kit ELISA disponibles comercialmente los cuales detectan la proteína estructural NS1 a los que nos referiremos como Kit A para Pan-E Dengue Early ELISA de Pan-bio y Kit B para Platelia Dengue NS1 de Bio-rad. Los resultados del estudio reflejaron que la sensibilidad del kit B fue de 62% y del kit A con 50% esto en casos confirmados de dengue. La sensibilidad variaba según la región geográfica con ensayos más sensibles en las muestras provenientes de pacientes de Asia a diferencia de las muestras de origen Americano las cuales reportaban menor sensibilidad. El análisis del estudio reflejó que la sensibilidad aumentaba en muestras que se encontraron en los 1ros 4 días de la enfermedad. El kit A y el kit B demostraron tener 100% de especificidad en pacientes febriles con evidencia clínica de dengue en fase aguda pero las muestras de los pacientes los cuales tenían otros diagnósticos confirmados como encefalitis japonesa o fiebre amarilla el kit B fue más específico (100%) que el kit A (90%). (6)



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Podría la prueba rápida SD EDEN Dengue NS1 Ag ser considerada una herramienta diagnóstica de alta especificidad y sensibilidad en el diagnóstico temprano del dengue?



JUSTIFICACIÓN

El Dengue es una enfermedad endémica en Nicaragua. Balmaseda y et. al 2010, demostraron a través de estudios de RT - PCR la circulación de los cuatro serotipos en diferentes momentos y en algunas temporadas de manera conjunta 2 o más serotipos. A nivel nacional nos hemos enfrentado a diferentes epidemias las cuales han dejado rastros fatales. Esto evidencia la necesidad de dar una respuesta inmediata y un diagnóstico que sea seguro pero además rápido, ya que no se tendría que esperar el tiempo en el que incurre un ELISA o una PCR para realizar una intervención temprana. El diagnóstico precoz de laboratorio y un análisis clínico concreto ante la sospecha de dengue generara una mejor asistencia ante un brote epidémico cuya información puede ser ocupada para las intervenciones de mitigación y prevención de la enfermedad. Es por ello que contar con una prueba rápida de alta sensibilidad y especificidad se convierte en una importante herramienta diagnóstica.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la sensibilidad y especificidad del kit inmucromatografico SD Dengue NS1 Ag en un brote epidémico utilizando como técnica de referencia la RT –PCR.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar un panel de sueros control que contenga muestras positivas de los cuatro serotipos dengue y positivas para leptospira.
- Determinar la Especificidad, Sensibilidad, Valor Predictivo Positivo, Valor Predictivo Negativo e Índice Kappa del kit SD dengues NS1 Ag en muestras clínicas sospechosas de dengue.
- Valorar la utilidad diagnóstica del kit SD dengue NS1 Ag en un brote epidémico con el diagnóstico integral de la enfermedad a través de RT-PCR.



MARCO REFERENCIAL

Situación actual del dengue

El Virus del dengue ocasiona una enfermedad viral con un espectro clínico amplio, causada por un virus que es transmitido a los humanos por la picadura de un mosquito infectado. El mosquito *Aedes aegypti* es el transmisor o vector, originario de África e introducido en América a través del tráfico de esclavos. Este mosquito posee hábitos domésticos y por su morbi-mortalidad representa un importante problema de salud pública. (15)

Los cambios demográficos, como el rápido crecimiento urbano y sin planificar, la migración rural-urbana y el aumento de la población en las zonas que carecen de una infraestructura adecuada desempeñan un papel importante en la transmisión de enfermedades y la propagación de patógenos dañinos en zonas no afectadas anteriormente. La temperatura y la precipitación fluvial también afectan la introducción y la diseminación del vector especialmente las precipitaciones son importantes en las enfermedades transmitidas por vectores ya que esto afecta la densidad de los mosquitos hembras por tener mayores lugares para reproducirse. En términos de morbilidad y Mortalidad, la fiebre del dengue y el dengue hemorrágico (DH) / síndrome de choque por dengue (SCD) han sido llamados los más importantes enfermedades virales transmitidas por un artrópodo. (2)

Con respecto a la incidencia de este arbovirus, en menos de 20 años, la región se ha transformado de hipoendémica a hiperendémica en muchos países de las zonas tropicales del continente americano, con varios serotipos del virus en circulación. Anualmente, se presentan más de 50 millones de casos en el mundo, de los que aproximadamente 400,000 son de dengue hemorrágico y 25,000 fallecen a causa de esta enfermedad. En el hemisferio occidental las epidemias de dengue durante los últimos 200 años han ocurrido periódicamente y en los últimos 20 su transmisión y la frecuencia en las epidemias han aumentado considerablemente en la mayoría de los países, sobre todo en las áreas tropicales de las Américas. En la actualidad, la enfermedad se extiende también a muchos países tropicales de Asia y África, en muchos de ellos



con un comportamiento endémico. El DHS ha surgido produciendo epidemias en muchos países de la región. (9)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que este virus constituye una amenaza para el 40% de la población mundial (aproximadamente 2,500 millones de personas) que habitan en más de 100 países tropicales y sub-tropicales expuestos al dengue. En 1998, la OMS consideró al dengue, como la décima causa de muerte en el mundo por enfermedades infecciosas. Los menores de 15 años son las principales víctimas de este padecimiento (aproximadamente 95% de infecciones). En América se ha observado un aumento de la circulación del virus de dengue, así como también de la incidencia de casos de fiebre hemorrágica, y es probable que la magnitud del problema del dengue / dengue hemorrágico en las Américas siga aumentando debido a un incremento de la población de *Aedes aegypti*. (9)

Esto se atribuye a varios factores:

- 1- El dengue es una enfermedad fundamentalmente urbana, donde el combate del vector depende de la mano de obra, y existen dificultades operacionales en las ciudades cuando intentan poner en juego un plan de control sistemático.
- 2- El proceso creciente de urbanización con aumento de la densidad poblacional en las ciudades, genera mayor posibilidad de transmisión del virus.
- 3- La producción cada vez mayor de recipientes descartables provee abundantes criaderos potenciales del vector.

La reinfestación de la mayor parte de América tropical por *Aedes aegypti*, su resistencia a los insecticidas y la ausencia de una vacuna eficaz para el humano completan el cuadro favorable a la difusión de la infección.



Las estrategias de control que han funcionado en el pasado cuando el vector se eliminó en la mayoría de las Américas, ya no son aplicables a la realidad de la situación socio-demográfica, económica y política de estos países, por tanto, las estrategias de control tendrán que adoptar un enfoque más integrado, incorporando y recalando la estratificación epidemiológica de las actividades de control, la comunicación social, la educación sanitaria y la motivación comunitaria con base en apropiación del problema para prevenir y controlar el dengue. La participación comunitaria es un requisito fundamental para el éxito y sostenibilidad del programa de control del dengue. Las epidemias originan grandes costos de hospitalización, asistencia a enfermos y campañas de emergencia para el control de vectores. El dengue es básicamente un problema de saneamiento doméstico. (3)

Virus del dengue

Morfología y Biología: La partícula viral del Dengue es de forma esférica y mide entre 30 y 50 nm. Tiene una envoltura formada por proteínas (proteína Envoltura, principalmente, y proteína de Membrana) que cubre completamente la superficie del virus. El material genético se encuentra protegido por una nucleocápside circular de simetría icosaédrica. (15)

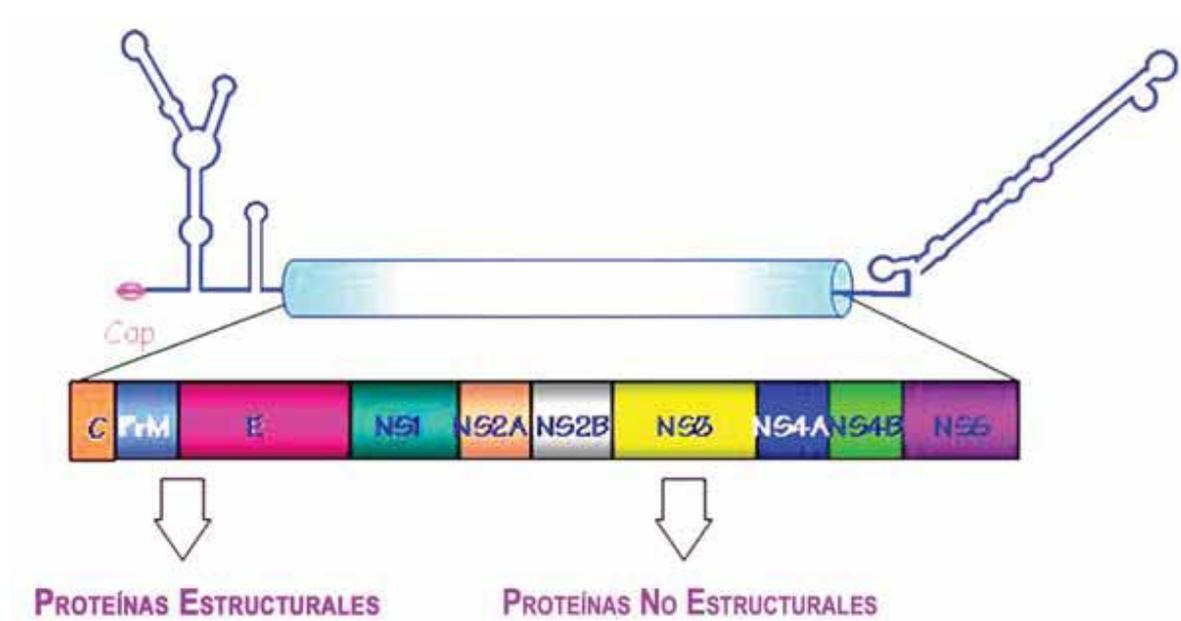
Entre la envoltura y la nucleocápside se encuentra una bicapa lipídica, cuyos lípidos se derivan de la membrana celular del hospedero. El genoma está compuesto por una sola molécula de ARN (ácido ribonucleico) de cadena sencilla lineal, de sentido positivo y de alta variabilidad genómica. Este virus no es estable en el ambiente, fácilmente son inactivados por el calor, desecación y los desinfectantes que contengan detergentes o solventes lipídicos. El virus de dengue ha sido agrupado en base a criterios clínicos, biológicos, inmunológicos y moleculares en cuatro serotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4; cada serotipo crea inmunidad específica para toda la vida contra la reinfección del mismo serotipo (homólogo), así como una inmunidad cruzada de corto plazo contra los otros tres serotipos, la cual puede durar varios meses. (15)

Los cuatro serotipos son capaces de producir infección asintomática, enfermedad febril y cuadros severos que pueden conducir hasta la muerte. Algunas variantes genéticas dentro de cada serotipo parecen ser más virulentas o tener mayor potencial epidémico que otras. (15)



Agente etiológico: El agente causal es un virus de la familia Flaviviridae: arbovirus (arthropod-borne) similar al de la Fiebre Amarilla. Se trata de virus envueltos (sensibles por tanto a la destrucción por agentes físicos y químicos), de 40-50 nm de diámetro, con cápside icosaédrica y genoma de RNA monocatenario, no segmentado, de polaridad positiva. Este opera directamente como RNA mensajero policistrónico. (4)

El virus adhiere a las células eucariotas, ingresa a ellas por viropexis, se replica en el citoplasma y se ensambla en el retículo endoplásmico. Su genoma codifica una poliproteína que es luego procesada en 10 polipéptidos: 3 estructurales (una proteína de nucleocápside C, una membranosa prM y una glicoproteína de envoltura E: hemaglutinante y de adherencia) y 7 no estructurales, de los cuales destacamos NS1, que puede inducir, como E, una respuesta inmune protectora. (4)





Evolución del virus dengue: Lo que es menos claro es donde se originó el DEN-V , se sugiere un origen africano, principalmente porque muchos de los más diversos mosquitos que transportan flavivirus están distribuidos exclusivamente en África y, a menudo, infectan a primates, la historia evolutiva del virus del dengue, parece ser reciente. Hasta hace unos pocos cientos de años atrás el dengue era fundamentalmente una enfermedad selvática, constituyéndose ahora uno de los únicos arbovirus que ha logrado una adaptación no selvática. Una pregunta obligada con relación al virus del dengue es .Por que el virus existe como cuatro serotipos? (8)

Según la hipótesis planteada por Holmes esto puede explicarse de dos maneras.

- La más aceptada es que el DEN-V se separó en cuatro linajes distintos debido a divisiones ecológicas o geográficas (alopátricas) en diferentes poblaciones de primates, de modo que los cuatro serotipos evolucionaron independientemente. (8)
- Alternativamente, el DEN-V pueden haber evolucionado de un único virus (dentro de una misma población) debido a que la presencia de los cuatro serotipos antigénicamente diferentes facilitó la transmisión viral a través del fenómeno de ampliación dependiente de anticuerpos En virtud de este modelo, la selección natural favorece a los virus con un grado de disimilitud antigénica que maximiza la ampliación dependiente de anticuerpos, lo que facilita su transmisión recíproca. (8)

Serotipos del virus: El dengue es un arbovirosis ocasionado por cualquiera de los cuatro serotipos diferentes del virus (Denv-1, Denv-2, Denv-3 y Denv-4), estrechamente relacionados, pero serológicamente distintos. Dentro de cada serotipo hay varias cepas y genotipos, que probablemente son más o menos virulentas, pero los factores de virulencia no son totalmente conocidos. Por ejemplo el Denv-2 presenta 2 genotipos (el del sudeste asiático y el americano) el primero asociado al dengue hemorrágico y el segundo al dengue benigno. Cada serotipo crea inmunidad específica a largo plazo contra el mismo serotipo (homólogo), de por vida. Y aún



cuando son antigénicamente similares, la infección por un serotipo, no produce inmunidad contra los otros serotipos, sólo produce inmunidad parcial, o sea, no proveen inmunidad cruzada. (9)

Los cuatro serotipos son capaces de producir infección asintomática, enfermedad febril y cuadros graves que pueden conducir hasta la muerte, dada la variación genética en cada uno de los cuatro serotipos. Algunas variantes genéticas parecen ser más virulentas o tener mayor potencial epidémico. Los cuatro serotipos del virus del dengue son de amplia distribución en diversos países: Filipinas, sudeste Asiático, India, islas del Pacífico, Nueva Guinea, Australia septentrional, Grecia, Malasia y Tailandia. En América, se describe desde el Sur de EE.UU hasta la Argentina, habiéndose descrito en forma epidémica en Cuba, Centroamérica, Trinidad y Colombia. (9)

Patogenia: En 1987, Kourí y colaboradores publicaron su hipótesis integral que explica la aparición de las formas graves de la enfermedad. Con anterioridad se habían presentado dos hipótesis que se excluían mutuamente: la infección secuencial de serotipos diferentes y la de una relación entre la gravedad de la enfermedad y la virulencia de la cepa. El factor de riesgo principal de sufrir DH es tener una segunda infección con un serotipo diferente del que causó la infección primaria. También se ha logrado consenso en que tener menos de 15 años de edad es un factor de riesgo de DH y se han propuesto otros, entre ellos el ser de la raza blanca y sufrir de enfermedades crónicas como el asma, la diabetes y la anemia de células falciformes. (14)

En el curso de la infección primaria, el virus penetra en la célula diana mediante su unión a un receptor celular y se producen anticuerpos neutralizantes capaces de proteger por largo tiempo contra la reinfección con ese mismo serotipo y durante sólo 2–3 meses contra los otros serotipos. (14)

En cambio, durante una infección secundaria con un serotipo heterólogo se forman complejos virus anticuerpos que penetran en las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos) gracias a la unión del fragmento constante de la inmunoglobulina — que forma parte del inmunocomplejo— a los receptores celulares del tipo gamma. Como



consecuencia se infecta un mayor número de células y se favorece la diseminación viral. Este fenómeno se conoce como amplificación dependiente de anticuerpos. La activación de los linfocitos T y la producción de citocinas son también factores importantes en la patogenia del DHF. En la actualidad se sabe que después de una infección primaria se producen clones de células T CD4+ y CD8+ efectoras y con memoria que son específicas para el serotipo infectante, aunque capaces de reconocer los restantes serotipos. En el curso de una segunda infección se activan los clones con memoria frente al nuevo serotipo y así se desencadena la respuesta inmunitaria. En los casos de DH se exagera la activación y liberación de citocinas, lo que se relaciona con la mayor gravedad del cuadro clínico. También se ha demostrado que en los pacientes con DH se activa el sistema del complemento y en los casos graves se pueden detectar concentraciones elevadas de las proteínas C3 y C1q. Se plantea que los complejos virus-anticuerpos circulantes podrían ser los que activan la reacción en cascada del complemento. Es posible que el DH se acompañe de reacciones autoinmunitarias. Esto puede deberse a la presencia de anticuerpos contra la proteína viral E y contra la proteína viral NS1 (con reactividad cruzada con algunos factores de la coagulación y con las plaquetas, respectivamente). Estos anticuerpos pueden desempeñar un papel importante en el mecanismo patogénico durante la infección secundaria. Otro factor que se debe tomar en cuenta al analizar el complejo mecanismo patogénico del DH es la virulencia de la cepa infectante. En este sentido se ha reconocido la asociación de algunos genotipos, como los serotipos Den 2 y Den 3 de origen asiático con casos y epidemias de DH. Recientemente se demostró que los enfermos con dengue presentan una menor carga viral que los enfermos con DH. Nuevos estudios han demostrado la presencia de componentes determinantes de virulencia en la proteína E y en el extremo 3' del genoma viral. El conocimiento de los mecanismos patogénicos de esta enfermedad ayudará a identificar los factores de riesgo de las formas más graves, a mejorar el tratamiento de los pacientes y a abordar más adecuadamente el desarrollo de nuevos fármacos antivirales y vacunas. (15)

Inmunidad: Estudios de casos realizados por Halstead reporta que DHS/SCD, es 15 a 80 veces más frecuente en una infección secundaria posiblemente asociado con la existencia de anticuerpos específicos contra el dengue. La infección por un serotipo de dengue brinda inmunidad homóloga de larga duración, pero sólo hay protección cruzada transitoria contra el resto de los serotipos, por lo que el individuo infectado por un serotipo pronto será susceptible a



ser infectado por otro serotipo. Diversos factores de la inmunidad están involucrados en la respuesta del organismo contra el DEN-V. La glicoproteína E es el principal componente de la superficie externa del virus dengue y es el elemento dominante en la respuesta por anticuerpos en la infección por dengue. Los anticuerpos contra la glicoproteína E han demostrado inhibir la unión viral a las células y neutralizar la infectividad viral in vitro. La transferencia pasiva de anticuerpos contra la glicoproteína E protege a ratones de le virus dengue. La proteína NS1 si bien no es un componente del virion, también es un objetivo importante de anticuerpos contra el DEN-V. La proteína NS1 se expresa en la superficie de las células infectadas y también se secreta en la circulación como un multímero soluble. Los anticuerpos contra NS1 pueden desencadenar activación del complemento mediada por lisis de células infectadas por virus dengue y han demostrado proteger a ratones contra el virus dengue. Un anticuerpo monoclonal dirigido contra la pre-proteína M también ha demostrado proteger a ratones contra el virus dengue; sin embargo, el mecanismo de esta protección y su importancia para la inmunidad protectora natural son inciertos. Al igual que ocurre con otros virus, la respuesta de leucocitos CD4, CD8 al virus dengue se dirige contra varias proteínas virales, aunque la proteína NS3 parece ser más inmunogénica. La respuesta de las células T al virus dengue varía en su capacidad para reconocer serotipos diferentes del virus dengue, dependiendo del grado de homología en un determinado epítipo. Sin embargo reactividad cruzada con varios serotipos es común, especialmente en epítipos. La reacción por linfocitos CD4 Y CD8 produce predominantemente altos niveles de IFN- γ , así como TNF- α , TNF- β , y quimiocinas incluyendo la proteína inhibidora de macrófagos-1 β . En la medida que estas respuestas inmunes contribuyen a la protección a largo plazo la inmunidad natural de la infección primaria contra virus dengue no ha sido plenamente definido. (2)

Ciclo de Transmisión: Aunque solo las hembras adultas del mosquito *Aedes aegypti* están directamente involucradas en la transmisión del dengue, un aumento en el número de hembras de los mosquitos adultos, aumenta las probabilidades de que un mosquito adquiera un patógeno y que éste se transmita a un segundo huésped susceptible. Después de que la hembra del mosquito se alimenta de una persona virémica, se produce la replicación viral en el mosquito durante 1– 2 semanas (período de incubación extrínseco) antes de que pueda transmitir el virus en

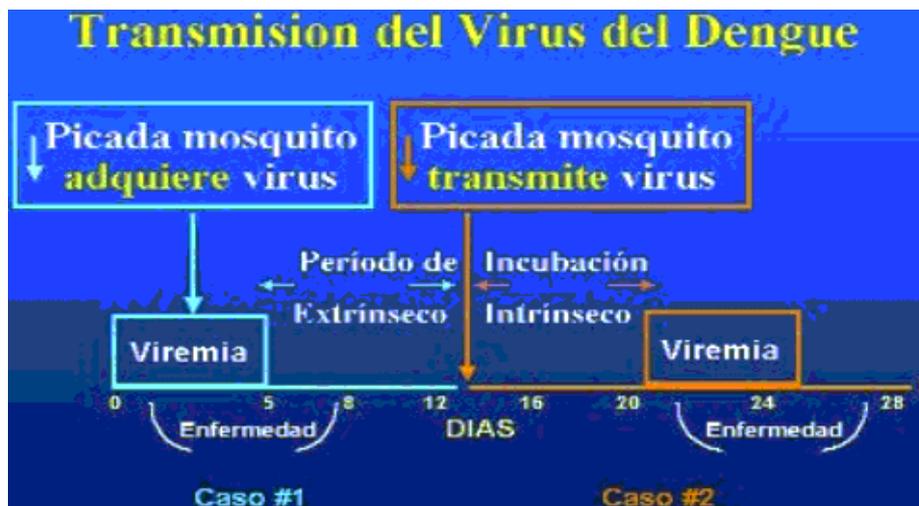


subsiguientes intentos de alimentarse. Los intentos de alimentarse pueden ocurrir varias veces en un día a lo largo del período de vida del mosquito que es de 1-4 semanas. Los mosquitos adultos se cobijan dentro de las casas y pican durante intervalos de 1-2 horas por la mañana y las últimas horas de la tarde. En áreas de transmisión endémica 1 de cada 20 casas puede contener un mosquito infectado. Los casos suelen agruparse en los habitantes de la casa y los lugares de desplazamiento de las personas y también por el rango de vuelo del mosquito (800 metros) producen la rápida extensión de la infección. Después de la picadura de un mosquito infeccioso, el virus se replica en los ganglios linfáticos locales, y en 2 -3 días se disemina por vía sanguínea a varios tejidos, los virus circulan en la sangre típicamente durante 5 días en los monocitos/macrófagos infectados. (7)

El ciclo comienza cuando un mosquito hembra ingiere sangre que contiene el virus del dengue. Este se replica en el epitelio intestinal, ganglios nerviosos, cuerpo grasoso y glándulas salivales del mosquito. El virus entra a la célula por endocitosis mediada por receptor, la replicación se realiza en el citoplasma y es acompañada por la proliferación del retículo endoplasmático liso y rugoso. El ARN genómico sirve directamente como mensajero, este contiene un fragmento de lectura grande de más de 10 Kb y es trasladado completamente desde su extremo 5' para producir una poliproteína grande precursora la cual luego es dividida para generar las proteínas virales individuales. El ensamble del virion ocurre en las células vertebradas sobre la membrana del retículo endoplasmático y en las células del mosquito en la membrana plasmática, pero la conformación de una cápside y proceso de gemación no se observa. Una vez se forma totalmente el virion dentro de la cisterna del retículo endoplasmático, éste es liberado vía lisis de la célula. Este ciclo en el mosquito dura de ocho a doce días dependiendo de las condiciones ambientales; una vez infectado, el mosquito permanece así toda su vida. (2)



Esquema del ciclo de transmisión del virus Dengue.



Formas clínicas del dengue

Cuadro Clínico: Los síntomas de virus del dengue, se diferencian según el grado de gravedad en tres variedades clínicas: dengue clásico, dengue hemorrágico y el síndrome de choque por dengue. (15)

Dengue Clásico: El dengue clásico es el más frecuente, en la mayoría de los casos. Se caracteriza por la presencia de fiebre de más de 40° C, y puede estar acompañada de uno o más de los siguientes signos o síntomas: dolor de cabeza de predominio frontal, dolor detrás de las órbitas de los ojos, dolor muscular, dolor articular, náusea, vómito y erupción en la piel, molestia a la luz, enrojecimiento de la faringe, conjuntivitis, dolor abdominal leve, náuseas, vómito, diarrea, alteraciones del gusto, prurito generalizado, insomnio, temor, depresión, así como bradicardia relativa y adenopatías. (15)

La fiebre persiste por uno a dos días, y luego desciende, pero puede subir nuevamente con menor intensidad al cabo de dos días. Estos síntomas pueden durar entre 5 a 8 días. (15)



Dengue Hemorrágico: Afecta a pacientes previamente infectados con el virus del dengue, principalmente a pacientes en la edad infantil.

Incluye los síntomas del dengue clásico, a los que se agregan manifestaciones hemorrágicas, con aumento de permeabilidad vascular y anormalidades en el mecanismo de coagulación, que muchas veces pueden comprometer a órganos específicos vitales. Se observó sangrado nasal, sangrado en las encías, vómito con sangre, hemorragias gastrointestinales, cutáneas (petequias y equimosis) y epistaxis; la hematuria es menos frecuente. (15)

Las petequias pueden verse con mayor frecuencia en extremidades, aunque pueden aparecer también en el tronco y en la cara. En las mujeres puede ocurrir un incremento en la cantidad o duración del periodo menstrual. (15)

Síndrome de choque por Dengue: Este cuadro se caracteriza por iguales manifestaciones que el dengue hemorrágico, al cual se agrega, pulso débil y acelerado, disminución de la presión del pulso, hipertensión, desvanecimientos, respiración difícil, extremidades húmedas y frías (el tronco suele estar caliente), palidez, inquietud generalizada, insomnio, dolor de estómago intenso y continuo, vómitos frecuentes, cianosis en torno a la boca, hemorragias nasales, bucales o gingivales y equimosis cutáneas. (15)

Es común la hepatomegalia, lo mismo que la bronconeumonía, eventualmente con derrames pleurales bilaterales. Puede haber miocarditis.

El estado del enfermo se va deteriorando progresivamente, hay tendencias hemorrágicas, generalmente en forma de púrpura, petequias o equimosis en los puntos de inyección; algunas veces hematemesis, melena o epistaxis. (15)

Se produce el choque a los 2 a 6 días de enfermedad, con colapso súbito o postración, requiriendo tratamiento hospitalario, ya que el sistema circulatorio del paciente se ve muy comprometido y pone en riesgo su vida. (15)



Diagnóstico diferencial: Al comienzo de la fase febril, el diagnóstico diferencial comprende una amplia gama de infecciones víricas, bacterianas y protozoarias. En la región de las Américas, deben considerarse enfermedades como la leptospirosis, la malaria, la hepatitis infecciosa, la fiebre amarilla, la meningococemia, la rubéola y la influenza.

La presencia de trombocitopenia intensa con hemoconcentración simultánea distingue el Dengue Hemorrágico / Síndrome de Choque por Dengue de otras enfermedades. En pacientes con hemorragia grave, los signos de derrame pleural, hipoproteinemia o ambos, pueden indicar la extravasación de plasma. El hallazgo de una velocidad de sedimentación globular normal ayuda a diferenciar esta enfermedad de una infección bacteriana o de un choque séptico.

Diagnóstico de Laboratorio

A.- Aislamiento Viral: Existen varios sistemas disponibles para el aislamiento viral: Inoculación intracerebral en ratones recién nacidos, en los que la infección produce parálisis y otros signos de afectación del sistema nervioso central; Cultivos celulares de mamíferos tanto de líneas de mamíferos (Vero, LLCMK2, BHK-21) como de células de mosquitos (C6-36 HT, AP61) siendo éstas últimas las más sensibles y por último los mosquitos del género *Aegypti aegypti*, *A.albopictus*, *Toxorhynchites amboinensis* y *T. splendens*. (8)

Para la técnica del aislamiento del virus, se debe obtener una muestra de suero tan pronto sea posible o dentro de 5 días después de la fecha del comienzo de síntomas, ya que se ha podido constatar que el período virémico se encuentra entre los días 4 y 5 después del comienzo de los síntomas. Es una técnica útil y sensible para la confirmación de la infección por el virus de dengue, sobre todo si se toma la muestra antes de que desaparezca la fiebre.



B.- Diagnóstico Molecular

Hibridación del ácido Nucleico: Se realiza a partir del RNA extraído del virus del dengue procedente de los sobrenadantes de cultivos celulares o de grupos de mosquitos como *Aedes albopictus*. Se usa para estudios epidemiológicos y también se puede utilizar para diagnóstico viral a partir de tejidos obtenidos de autopsias. (8)

Transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa. (RT- PCR): Permite la identificación de los serotipos en muestras de suero y sobrenadantes de células infectadas con muestras clínicas. El RT-PCR es útil para obtener información rápida de los serotipos circulantes de dengue; sin embargo, es muy importante aislar el virus para confirmar su identidad y realizar estudios más detallados. (8)

Es un método “*in vitro*” que utiliza la síntesis enzimática para replicar selectivamente una región diana dentro de un ADN de doble cadena, de forma similar la amplificación de ARN puede ser hecha proporcionando una copia de ADN complementario (ADNc) que haya sido previamente sintetizada por reverso transcriptasa. El principio fundamental es la amplificación de un fragmento específico de ADN, por medio de ciclos sucesivos de multiplicación exponencial, hasta llegar a obtener una cantidad adecuada del producto, el cual puede ser visualizado por electroforesis. Una sola molécula puede generar más de un millón de copias de sí misma luego de 30 ciclos de replicación exponencial ($2^{30}=1,073,741,842$). Está comprendida de tres reacciones consecutivas, la desnaturalización, la hibridación y la polimerización elongación o extensión. Después de varios ciclos el producto predominante de la reacción será aquella pieza de ADN la cual está flanqueada por los cebadores e incluirá a los cebadores por sí mismos. (9)



C. Determinación de anticuerpos dengue: Existen cinco pruebas serológicas usadas para el diagnóstico de infección por el virus del dengue: Inhibición de la hemaglutinación (HI), fijación de complemento (FC), prueba de neutralización (TN), ELISA de captura de IgM, y ELISA indirecta para determinación de anticuerpos IgG. (8)

1.- Inhibición de la Hemaglutinación (IH): Esta prueba fue la más usada para el diagnóstico serológico de rutina de la infección por dengue, debido a su sensibilidad y a un requerimiento mínimo de equipo para su realización porque IH persiste por largos períodos (superiores a 50 años), esta prueba es ideal para estudios sero- epidemiológicos. La prueba se basa en el hecho que el virus, bajo condiciones controladas de pH y temperatura, puede aglutinar glóbulos rojos y su efecto puede ser inhibido por anticuerpos específicos. (8)

2.- Fijación del complemento (FC): No se usa para el diagnóstico rutinario del dengue, por lo difícil de su ejecución y el requerimiento de personal altamente calificado y entrenado para obtener buenos resultados. La prueba se basa en el principio que el complemento será consumido durante la reacción antígeno – anticuerpo. (8)

3.- Prueba de Neutralización (PN): Las pruebas de neutralización y en particular las de neutralización vírica, son uno de los estándares habituales para medir los niveles de inmunidad protectora frente a un patógeno. Normalmente la prueba se realiza en dos pasos, uno primero de incubación del patógeno con el suero del animal a analizar y un segundo consistente en la inoculación del patógeno en un cultivo celular o en un animal. Si el suero contenía anticuerpos neutralizantes, se bloquea la capacidad infectiva del patógeno y; por lo tanto, no produce la infección del animal o del cultivo. A pesar de su utilidad, este método requiere de mucho tiempo para su realización. (9)

Para esta prueba los virus pueden ser aislados en cualquier sistema aunque en ocasiones es necesario realizar un pase por una línea de células de mamífero permisiva LLCMK2, y Vero y las de mosquitos. La utilización de células BHK 21 en la técnica de placas (micrométodo) ha brindado resultados satisfactorios y rápidos. (9)



4.- Detección de IgM de captura a través de inmunoensayo ligado a enzimas (MAC-ELISA).

El ensayo tiene más del 95 % de sensibilidad cuando los especímenes del suero se obtienen de 7-10 días del comienzo de la infección, usada ampliamente en los últimos años, es simple, y es una prueba rápida, que requiere pocos equipos sofisticados. MAC-ELISA se basa en la detección en suero de anticuerpos IgM específico para virus dengue. Esta prueba de ELISA se ha considerado la más útil para el diagnóstico del dengue, debido a su alta sensibilidad y a la facilidad de su empleo. (8)

Las tiras son sensibilizadas con una inmunoglobulina de carnero anti IgM humana, que reaccionará con los anticuerpos de clase IgM presentes en la muestra del paciente. Al adicionar el antígeno del virus del dengue éste reaccionará con las inmunoglobulinas M capturadas si estas son específicas para el virus. Posteriormente se adiciona el conjugado, formado por inmunoglobulinas anti virus dengue acopladas a la enzima peroxidasa de rábano, que reaccionará con el antígeno del virus. Cuando se adiciona el substrato éste es degradado por la enzima peroxidasa traduciéndose en un cambio de color en la reacción en las muestras positivas. (9)

Prevención: La lucha contra el mosquito vector del virus del dengue es a la hora actual la única opción de que disponemos para reducir la incidencia de la enfermedad, tanto en sus formas benigna como severas. La resistencia de *Aedes sp.* Contra el DDT apareció en los primeros años 60 y desde esa época los insecticidas órgano-fosforados (Fenthion, Malathion, Fenitrothion) comenzaron a ser utilizados en el control de *Aedes aegypti*. Otros métodos de lucha anti-mosquito incluyen: la utilización de larvicidas como *Bacillus thuringiensis* H-14 y otros. La protección personal es evidentemente una medida complementaria a otras como el uso de "sprays" repelentes en el día, de mosquiteros impregnados con Pyrethroides en la noche, bien que esta última medida tiene un impacto muy limitado debido a los hábitos diurnos del vector. En cuanto a las medidas de tipo doméstico, es necesario evitar toda colección de agua, por mínima que sea (floreros, recipientes para almacenar agua para el uso familiar,). Si estos últimos son indispensables debe cubrirse sistemáticamente los recipientes. Las fumigaciones a domicilio son también de gran importancia y las campañas, para ser eficaces, deben ser periódicamente practicadas. (5)



Diseño metodológico del Estudio

El presente estudio se dividirá en dos fases por el tipo de muestra que se está utilizando la cual procede de una temporada de dengue durante un brote epidémico.

Fase 1: Evaluación del kit inmunocromatográfico.

Reacción Cruzada: Se escogerán 15 sueros los que estarán distribuidos en 4 sueros positivos para leptospira, 6 sueros positivos con los cuatro serotipos de dengue y 5 sueros positivos para VIH confirmados por el Centro Nacional de Diagnostico y Referencia.

Preparación de Panel de sueros control: Para realizar un control de especificidad del kit inmunocromatográfico en estudio previo al procesamiento de las muestras de dicha investigación se va a testar un panel de sueros con resultado conocido con las siguientes patologías: sueros positivos para dengue de los 4 serotipos, sueros positivos para leptospira y sueros positivos a VIH.

Validez estadística

Para hacer la validación interna del kit se realizaran los siguientes cálculos estadísticos a partir de los resultados obtenidos del procesamiento de las muestras tales como:

Sensibilidad: Proporción de muestras positivas correctamente identificadas por la prueba empleada.

Especificidad: Proporción de muestras negativas correctamente identificadas por la prueba empleada.

Valor predictivo positivo: Probabilidad de estar infectado que tiene un individuo, cuando el resultado de la prueba que se le practica resulte positivo.



Valor predictivo negativo: Probabilidad que tiene un individuo de no tener la infección que detecta la prueba, cuando el resultado de la misma es no reactivo

Índice Kappa: Test de concordancia que se basa en la comparación de índices de concordancia esperada (pe) con los índices de concordancia observados (po).

Fase 2: Valoración de la utilidad del kit en muestras provenientes de un brote epidémico.

Tipo de estudio: El presente estudio corresponde a una investigación retrospectiva de corte transversal la cual se realizó en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia.

Universo: Todas las muestras de pacientes que resulten a través de la clínica sospechosos para Dengue en el hospital Manuel de Jesús Rivera y acepten participar en el Estudio hospitalario prospectivo de la clasificación, manejo y diagnóstico de casos de dengue en Nicaragua el cual se desarrolla en el Hospital Manuel de Jesús Rivera.

Población de estudio: Está integrado por los 396 niños enrolados al Estudio Clínico Hospitalario del Dengue, durante la temporada Agosto 2009 a Enero 2010.

Muestra: La muestra es de 101 niños lo cual representa el 26% del total de niños ingresados al estudio Clínico Hospitalario del Dengue.

Procedimientos de selección: La muestra se seleccionó por conveniencia a partir de las muestras ingresadas en el período de octubre 2009 a Enero 2010.



Criterios de inclusión: Todas aquellas muestras pertenecientes al estudio clínico del Dengue que hayan sido tomadas durante la fase aguda de la enfermedad y que fueran manejadas con todos los criterios de calidad para la toma, manejo y conservación de especímenes.

Criterios de exclusión: Todas aquellas muestras que no pertenezcan al estudio clínico del Dengue y las que hayan sido tratadas inadecuadamente.

Recolección y procesamiento de la información: Los datos de cada una de las muestras serán obtenidas a través de la ficha epidemiológica la cual es llenada por el médico en el momento de la consulta. Dicha información se encuentra además en la base de datos del estudio. (Ver anexo No 5)

Los resultados de laboratorio tales como el diagnóstico serológico IgM, ELISA Inhibición, y la RT-PCR se utilizaran para valorar la utilidad diagnóstica de la prueba inmucromatográfica SD Dengue NS1, a partir de los cálculos estadísticos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice Kappa (κ). Los datos serán procesados con el paquete informático Epi info vs. 2003, y presentados a través de tablas y gráficos que faciliten su Interpretación.

Toma de la muestra: Es a partir de las muestras del estudio clínico del dengue que se tomaron 100 μ l del plasma el cual es transportado con todas las normas de conservación de muestras. El procesamiento se estableció que fuera a lo inmediato de tener el plasma y si no se realizaba se conservaban los plasmas de 2 a 8 grados.



Métodos de rutina del laboratorio para diagnóstico de Dengue: Se tomará una muestra para obtener plasma en fase aguda (el día del enrolamiento) y una muestra de suero en fase convaleciente (> 6 días (preferiblemente > 10 días)) después de iniciados los síntomas). Ambas muestras serán colectadas en el HIMJR y transportadas inmediatamente al CNDR en refrigeración, donde serán separadas en alícuotas y almacenadas a -70°C hasta su uso. Se determinará IgM por MAC ELISA y ELISA de Inhibición; el RT-PCR nested utilizando primers de la región de la cápside, se realizarán en las muestras de fase aguda.

Descripción de los métodos de laboratorio

Descripción del kit SD Dengue NS1 Ag: El procedimiento se realizó tal como lo describe la técnica que trae consigo el kit SD Dengue NS1 Ag. La prueba rápida inmuncromatográfica SD dengue NS1 Ag está diseñada para detectar el antígeno viral del dengue NS1 en suero, plasma o sangre total durante la fase aguda de la enfermedad y el tipo de determinación es cualitativa. La prueba contiene una tira membrana la cual es preparada con anti-dengue NS1 Ag de captura en la región de la banda determinada para el test. El anti-dengue NS1 Ag es conjugado con oro coloidal, la muestra al ser colocada en el puerto de entrada del test se va desplazando a través de la membrana cromatografica la cual visualizara la línea en la región del test y otra la cual es la del control de la prueba detectando el complejo antígeno- anticuerpo-antígeno con partículas de oro. El kit se mantiene a temperatura ambiente y cada una de las pruebas debe estar en el empaque hasta el momento de su uso. (11)

Procedimiento

- 1.- Remover el empaque que contiene a la prueba inmunocromatografica.
- 2.- Colocar tres gotas de la muestra en el puerto de entrada del dispositivo de la prueba inmunocromatográfica.
- 3.- Dejar reaccionar aproximadamente de 15 a 20 minutos y así observar el resultado a través de la ventana del dispositivo.



Interpretación

- 1.-Se debe de observar una línea purpura en la región del control de la prueba.
- 2.-Si la muestra es positiva se van a observar la línea en la zona del control de la prueba y otra en la zona del test.
- 3.-Si sólo se observa una línea en la zona del control, la muestra es negativa.
- 4.-De observarse solamente la línea en la zona del test y no en la zona del control la prueba es inválida.

Limitaciones del test: Un resultado falso negativo puede ocurrir por una baja cantidad del virus en la muestra o por una infección reciente. La fase inmunológica de la muestra debe estar después de un día de iniciada la fiebre hasta los nueve días.

Para realizar la comparación de los datos del método SD NS1 Ag se utilizarán diferentes técnicas de laboratorio tales como:

Reacción en Cadena de la Polimerasa de Lanciotti: El PCR es un método "*in vitro*" que usa la síntesis enzimática para replicar selectivamente una región diana dentro de un DNA de doble cadena, de forma similar la amplificación de RNA puede ser hecha proporcionando una copia de DNA complementario (DNAc) que haya sido previamente sintetizada por reverso transcriptasa.

El principio fundamental de PCR es la Amplificación de un fragmento específico de DNA por medio de ciclos sucesivos de multiplicación exponencial hasta llegar a obtener una cantidad adecuada del producto el cual puede ser visualizado por electroforesis. De esta manera, una sola molécula puede generar más de un millón de copias de sí misma luego de 30 ciclos de replicación exponencial ($2^{30}=1,073, 741,842$). (10). (Ver anexo No 1)



Las secuencias genéticas de los primers a utilizar en el PCR son:

EHD1: 5'- TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G 3'

EHD2: 5'- DTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT T 3'

DTS1: 5'- CGT CTC AGT TGA TCC GGC GG

DTS2: 5'- CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG

DTS3: 5'- TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C

DEN 4: 5'-TGT TGT CTT AAA CAA GAG AGG TC

ELISA IgM Captura Dengue: El método de elección para la vigilancia seroepidemiológica del dengue es el inmunoensayo enzimático sobre fase sólida de captura para IgM (MACELISA) antidengue. Este método es específico, sensible, económico, sencillo y de relativa rapidez, que determina infecciones actuales o recientes, aún cuando no permite identificar los serotipos circulantes. (10) (Ver anexo no 2)

ELISA Inhibición: Este método es utilizado para constatar los casos primarios y secundarios de los enfermos por dengue y sus fines son epidemiológicos y no de diagnóstico. (10) (Ver anexo No 3).

Riesgos de participar en el estudio: La toma de la muestra del estudio durante la fase aguda de la enfermedad será realizada conjuntamente con la toma de muestra que de rutina se realiza a los pacientes con dengue, esto minimizará los riesgos de esta actividad, de esa forma cada participante será expuesto sólo una vez a un riesgo extra como resultado de este estudio (durante la toma de muestra convaleciente). Los riesgos asociados con la toma de muestra de sangre incluyen potenciales complicaciones como dolor, sangramiento y hematoma en la zona de la venopuntura y en muy raras ocasiones pueden ocurrir infecciones. Con el objetivo de evitar tales riesgos la toma de muestra será realizada por profesionales en cuidados de salud. La utilización de técnicas de asepsia y la presión en el sitio de la venopuntura minimiza las complicaciones tales como sangramientos e infecciones. No existen riesgos legales asociados con el estudio. Todo lo



antes expuestos se describe a mayor detalle en el consentimiento informado firmado por los padres o tutores del niño o niña que acepta participar en el estudio Clínico del dengue. (Ver anexo No 4)

Confidencialidad: Toda información obtenida de los participantes será confidencial. Las identidades individuales no serán utilizadas en ningún reporte o publicación en este estudio. Cada participante tendrá una identificación única y todas las muestras serán marcadas con un código único. La clave del código será mantenida en la base de datos del estudio la cual está protegida con código de seguridad. Solamente los coordinadores del estudio y el personal clave tendrán acceso a la base de datos Master, la cual será almacenada en computadoras codificadas que permanecen en las oficinas cerradas con llave del médico coordinador del estudio en el HIMJR así como en la oficina del proyecto en el Centro de Salud “Sócrates Flores”. Los identificadores individuales (códigos del estudio) no serán usados en cualquier reporte o publicación del estudio.



Operacionalización de las Variables.

Variable	Descripción	Indicador	Categoría
RT-PCR	Técnica de biología molecular a través de la cual se pueden detectar los 4 serotipos del dengue.	Ausencia de bandas o presencia de bandas en los siguientes pares de bases. D1: 482 pb D2: 119 pb D3: 290 pb D4: 389 pb	Negativo Positivo D1 Positivo D2 Positivo D3 Positivo D4
IgM Dengue	Anticuerpo de fase aguda el cual aparece en sangre después de 5 días de inicio de la enfermedad	Este va a ser determinado en base al valor de corte del ensayo inmunológico.	Positivo Negativo Indeterminado
IgG Dengue	Anticuerpo de fase convaleciente el cual aparece en sangre aproximadamente después de 10 días de iniciados los síntomas.	Este va a ser determinado en base al valor de corte del ensayo inmunológico	Caso Primario Caso Secundario



Variable	Descripción	Indicador	Categoría
NS1	Proteína no estructural del virus dengue la cual aparece en los 1ros días de la enfermedad y participa en la replicación del virus.	Presencia o ausencia de la proteína no estructural NS1.	Positiva Negativa Indeterminada
Resultado final	Se define como el diagnostico final de la enfermedad a través del análisis de las diferentes pruebas utilizadas en el sistema integrado de diagnostico de dengue	Positividad o negatividad de las pruebas realizadas	Positivo Negativo
Prueba inmuncromatografica	Prueba rápida que utiliza como soporte un cassette el cual contiene una membrana fijada con anticuerpos en oro coloidal.	Ausencia o presencia de bandas en el área de test. Ausencia de banda en el área de control.	Positivo Negativo Invalido



RESULTADOS

En Nicaragua, cada año se presenta la temporada de dengue la cual inicia aproximadamente en el mes de Junio y finaliza hasta el mes de Enero del año siguiente, aunque de manera esporádica se detectan algunos casos durante los siguientes meses restantes. En la temporada del año 2009 se presentó un brote epidémico el cual según datos de Vigilancia Epidemiológica Nacional 2950 casos fueron confirmados con dengue, de ellos 2872 fueron Dengue clásico y 78 Dengue Hemorrágico con un total de 8 fallecidos por dengue, todos menores de edad. El serotipo circulante que dómino fue el Den-3 pero además se confirmó la circulación de los serotipos DEN-1 y DEN-2. Los resultados obtenidos en este estudio se realizaron en dos fases, la primera evaluó la posible reacción cruzada que podía desarrollar el dispositivo inmunocromatografico de NS1 con otros microorganismos tales como Leptospira y VIH y una segunda fase en la que se relacionaron los datos obtenidos por el kit en estudio y las técnicas diagnosticas que se utilizan tales como RT-PCR e IgM dengue y ELISA Inhibición.

Se procesaron un total de 101 muestras de las cuales 59 fueron positivas de acuerdo al Resultado final. El Kit en estudio logró detectar 38 de estas muestras, aunque es importante mencionar que del total de 43 muestras positivas para los 4 primeros días de enfermedad la prueba rápida NS1 logro detectar 31. Del total de niños 52 de ellos fueron del sexo masculino con 27 casos positivos según resultado final.

A continuación se presentan las tablas y gráficos conteniendo los resultados obtenidos.



1ra Fase del Estudio: Evaluación de Reacción cruzada.

Tabla No 1

Resultados de Panel de sueros control con la Prueba inmunocromatografica NS1

EN la tabla N° 1 podemos observar los resultados obtenidos a través del kit inmunocromatografico para el panel de sueros control con resultado ya confirmado, en lo cual se observa la negatividad para los sueros de Leptospira y VIH; y positividad para los sueros de los cuatro serotipos de dengue.

Tipo de muestra	Resultado prueba inmunocromatografica NS1	Resultado Diagnosticado en el suero conocido.
Suero Den 1	Positiva	Den1
Suero Den2	Positiva	Den2
Suero Den3 Año 2007	Positiva	Den3
Suero Den3 Año 2008	Positiva	Den3
Suero Den3 Año 2009	Positiva	Den3
Suero Den4	Positiva (tenue)	Den4
Suero Leptospira No 1	Negativa	Positiva Leptospira
Suero Leptospira No 2	Negativa	Positiva Leptospira
Suero Leptospira No 3	Negativa	Positiva Leptospira
Suero Leptospira No 4	Negativa	Positiva Leptospira
Suero VIH No 1	Negativa	Positiva VIH
Suero VIH No 2	Negativa	Positiva VIH
Suero VIH No 3	Negativa	Positiva VIH
Suero VIH No 4	Negativa	Positiva VIH



2da Fase del Estudio: Utilidad Diagnostica del Kit SD EDEN Dengue NS1Ag.

Tabla No 2

Comparación entre el resultado de la Prueba inmunocromatografica NS1 y el obtenido por PCR según el día de la enfermedad de la muestra.

La tabla N° 2 muestra los resultados comparativos entre la prueba rápida NS1 y la técnica de PCR según los días de enfermedad de los pacientes. Se observa que las muestras de los casos que se encontraban en los 3 primeros días presentaron los resultados más aceptables con sensibilidad (82%), especificidad (95%), VPP (95%) y VPN (83%), seguido por las muestras de pacientes en los 4 primeros días con sensibilidad (76%), especificidad(94%), VPP (94%) y VPN (76%); sin embargo después de 4 días los resultados no fueron satisfactorios con sensibilidad (43%), especificidad (83%), VPP (75%), VPN (56%).

	Días de Enfermedad		
	3 días	4 días	+ de 4 días
Numero de Muestras	42	75	26
Pos.NS1/Pos. PCR	18(42.8%)	31(41.3%)	6(23%)
Pos. NS1/Neg. PCR	1(2.3%)	2(2.6%)	2(7.6%)
Neg. NS1/Neg. PCR	19(45.2%)	32(42.6%)	10(38.4%)
Neg.NS1/Pos. PCR	4(9.5%)	10(13.3%)	8(30.7%)
% Sensibilidad	82%	76%	43%
% Especificidad	95%	94%	83%
%VPP	95%	94%	75%
%VPN	83%	76%	56%
I. Kappa	0.763	0.6835	0.2529
	0.5699-	0.5231-	-0.0753-
IC	0.9566	0.8440	0.5811



Tabla No 3

Comparación entre el resultado de Prueba inmunocromatografica NS1 y el obtenido por Resultado Integral Final según el día de la enfermedad de los pacientes.

En la tabla N° 3 se observan los resultados comparativos entre la prueba rápida NS1 y el obtenido por Resultado Integral Final según el día de la enfermedad de los pacientes. Nuevamente los resultados de las muestras realizadas en los 3 primeros días presentaron la mayor sensibilidad, especificidad, VPP y VPN con (82%), (100%), (100%) y (83%), respectivamente; siguiéndole los resultados de las mx. procesadas en los 4 primeros días con sensibilidad (72%), especificidad(97%), VPP (97%) y VPN (71%). Los resultados de muestras de pacientes con más de 4 días de enfermedad no fueron satisfactorios con sensibilidad (47%), especificidad (90%), VPP (88%), VPN (53%).

	Días de Enfermedad		
	3 días	4 días	+ de 4 días
Numero de Muestras	41	74	25
Pos.NS1/Pos. RF	18(43.9%)	31(41%)	7(28%)
Pos. NS1/Neg. RF	0(0%)	1(1.3%)	1(4%)
Neg. NS1/Neg. RF	19(46.3%)	30(40.5%)	8(32%)
Neg.NS1/Pos. RF	4(9.7%)	12(16%)	9(36%)
% Sensibilidad	82%	72%	47%
% Especificidad	100%	97%	90%
%VPP	100%	97%	88%
%VPN	83%	71%	53%
I. Kappa	0.8066	0.6562	0.3284
IC	0.63 – 0.9832	0.4938 – 0.8186	0.0029 – 0.6318



Tabla No 4

Comparación entre el resultado de Prueba inmunocromatografica NS1 y el obtenido por Elisa captura IgM en muestra de fase aguda según el día de la enfermedad de la muestra.

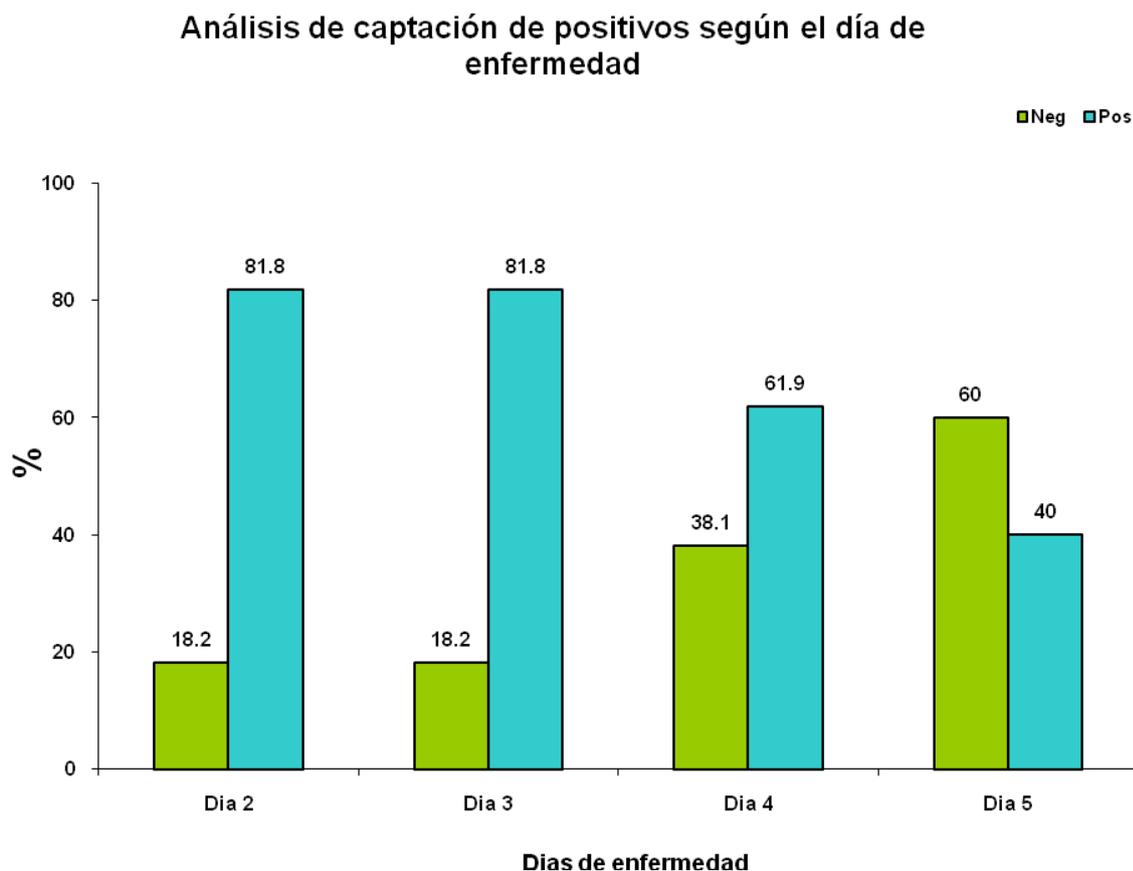
En la tabla N° 4 se observan los resultados comparativos entre la prueba rápida NS1 y el obtenido por Elisa captura IgM en muestras de fase aguda esto según el día de enfermedad de los pacientes siendo los resultados de las muestras realizadas en los 3 primeros días con la menor sensibilidad (6%) pero con buena especificidad (100%), VPP (100%) y VPN (58%), siguiéndole los resultados de las mx. procesadas en los 4 primeros días con sensibilidad (80%), especificidad(59%), VPP (13%) y VPN (98%); siendo los días con muestras procesadas con más de 4 días sensibilidad (50%), especificidad (84%), VPP (56%), VPN (74%).

	Días de Enfermedad		
	3 días	4 días	+ de 4 días
Numero de Muestras	41	73	28
Pos.NS1/Pos. IgM	1(2.4%)	4(5.4%)	5(17%)
Pos. NS1/Neg. IgM	0	28(38.1%)	4(14.2%)
Neg. NS1/Neg. IgM	23(56%)	40(54.7%)	14(50%)
Neg.NS1/Pos. IgM	17(41.4%)	1(2.5%)	5(17%)
% Sensibilidad	6%	80%	50%
% Especificidad	100%	59%	78%
%VPP	100%	13%	56%
%VPN	58%	98%	74%
I. Kappa	0.0619	0.1109	0.2841
IC	0.1801-0.2124	0.2476-00913	0.6532-01315



Figura No 1

Análisis de casos positivos captados por la prueba SD Dengue NS1 Ag. Por día de enfermedad.



En la figura numero 1 se puede observar la captación de los casos positivos por la prueba rápida NS1 según el día de enfermedad; el día 2 y día 3 con un total de 22 casos positivos 11 por cada uno con 9 casos detectados en cada día. En el día 4 con 21 casos positivos de los cuales se detectaron 13 de ellos y el día 5 con 10 casos positivos de los cuales se detectaron 4 casos.



ANÁLISIS DE RESULTADOS

Históricamente las pruebas rápidas han ocupado un papel fundamental en el diagnóstico de las enfermedades por las facilidades que presentan su uso e interpretación. En Nicaragua el uso de pruebas rápidas ha sido integrado al diagnóstico de patologías tales como HIV, Influenza y Malaria generando beneficios en el diagnóstico precoz.

Dentro del sistema integrado de vigilancia epidemiológica del dengue el diagnóstico de rutina se hace a través de la detección de anticuerpos IgM en muestras convalecientes y PCR en muestras agudas. Además de estas técnicas de rutina se realizan otros procedimientos para fines de investigación; tales como aislamiento viral, ELISA inhibición, Ensayos por neutralización de anticuerpos e inhibición de la hemaglutinación. El tiempo que toma confirmar un caso positivo desde que es tomada la muestra al paciente, hasta que el resultado se encuentra disponible en Vigilancia Epidemiológica es de aproximadamente 7 días esto a través de los métodos tradicionales tales como ELISA captura IgM con muestras que deben tener más de 5 días desde iniciados los síntomas y la PCR con muestras en los 1ros 5 días de la enfermedad.

De Agosto 2009 a Enero 2010 se realizó el 4to año del Estudio Clínico del Dengue el cual se desarrolla en el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera. Es con muestras procedentes de dicha investigación que se realizó el presente estudio el cual se dividió en dos fases, la primera evaluó al kit inmunocromatográfico SD EDEN Dengue NS1 Ag con un panel de sueros controles con diagnóstico conocido. Los resultados que se obtuvieron del Panel de Sueros control que estaba integrado por sueros positivos para los cuatro serotipos dengue, sueros positivos para Leptospira y sueros positivos para VIH fueron satisfactorios en base a la concordancia de diagnóstico obtenida por el kit en estudio y el ya confirmado en cada uno de los sueros que integraban el panel control. Estos resultados demostraron que dicha prueba no reaccionó de forma cruzada con los antígenos de los sueros de Leptospira y los de VIH; pero si detectó de forma efectiva los antígenos NS1 de los sueros dengue. Durante el inicio de este estudio se pretendió integrar en el panel de sueros control a otros Flavivirus pero dentro de la seroteca del CNDR no se cuenta con estos virus y fue por ello que se decidió integrar a sueros positivos a Leptospira y VIH por ser una espiroqueta y un virus de vigencia actual en nuestro país.



En la segunda fase del estudio se procedió a evaluar la utilidad diagnóstica del Kit inmunocromatográfico a través de cálculos estadísticos, correlacionando los resultados de la prueba rápida con los obtenidos por PCR, ELISA captura IgM en la respectiva muestra aguda del paciente y el Resultado Final del Sistema de diagnóstico integrado del dengue.

Al relacionar los resultados obtenidos por RT-PCR y el kit inmunocromatografico SD EDEN Dengue NS1 Ag pero basándose en el número de días que tenía la muestra desde iniciados los síntomas hasta la toma de muestra se verificó que la detección de la proteína NS1 en los primeros 3 días de la enfermedad por la prueba rápida fue un aceptable marcador inmunológico con sensibilidad (82%), especificidad (95%), y un 95% de confianza de 0.5699 - 0.9566; pero además las muestras que se encontraron dentro de los 4 primeros días la sensibilidad (76%), especificidad (94%), y un 95% de confianza de 0.5231 - 0.844 siguieron demostrando que dicha prueba rápida fue efectiva en la detección de la proteína NS1 del virus Dengue. Guzmán M, y colaboradores realizaron en el 2006 un estudio con muestras de seis países incluyendo Tailandia, Vietnam, Malasia, Nicaragua, Cuba y Venezuela del proyecto del Denco en el que se trato de evaluar la sensibilidad y especificidad de dos Kit ELISA disponibles comercialmente los cuales detectan la proteína estructural NS1, uno de ellos fue Pan-E Dengue Early ELISA de Pan-bio y Platelia Dengue NS1 de Bio-rad. Este estudio reflejó en sus resultados que la sensibilidad y especificidad de ambos kit se veía afectada por el número de días de enfermedad pero además por el serotipo al que fuera positiva la muestra. La sensibilidad del kit Platelia Dengue NS1 de Bio-rad fue de 62% y del kit Pan-E Dengue Early ELISA de Pan-bio fue del 50%. El análisis del estudio reflejó que la sensibilidad aumentaba en muestras que se encontraron en los 1ros 4 días de la enfermedad. Ambos kit demostraron tener 100% de especificidad en pacientes febriles. En las muestras de Nicaragua las cuales eran positivas a Den-2 la sensibilidad y especificidad diagnóstica del kit Pan-E Dengue Early ELISA de Pan-bio se disminuyó drásticamente con una sensibilidad del 35% y el kit Platelia Dengue NS1 de Bio-rad con sensibilidad del 59%. En el presente estudio en el que se evaluó el kit SD EDEN Dengue NS1 Ag se evidencia que los primeros 4 días de enfermedad son los óptimos para utilizar dicha prueba en pacientes sospechosos con Dengue. (6)



La importancia de contar con una prueba rápida dentro del sistema integrado del diagnóstico del dengue radica en que se podría distribuir tanto en zonas urbanas como rurales y de esta manera se acortaría el tiempo necesario para el diagnóstico precoz del dengue siendo realizada por los recursos humanos de los puestos y centros de salud, además de hospitales en todo el país; ya que no se necesita de equipos sofisticados o de recursos humanos altamente entrenados para ejecutarla. De forma continua se mantendría el diagnóstico molecular a través de PCR para la identificación de los serotipos para la vigilancia epidemiológica.

De forma rutinaria el diagnóstico del dengue en Nicaragua se basa en la detección de anticuerpos IgM a las muestras con más de 5 días de enfermedad. Al relacionar los resultados del kit en estudio con los del ELISA IgM, se evidencia que el ELISA IgM no es aplicable a las muestras en fase aguda ya que su objetivo es la detección de anticuerpos IgM los cuales comienzan a circular en sangre aproximadamente desde el 5to día de enfermedad. (1)

En las muestras que se encontraron en los 3 primeros días de la enfermedad se detecta baja sensibilidad (6%) pero una alta especificidad (100%) con intervalo de confianza del 95% de 0.1801- 0.2524. Esto es evidencia de que la detección del marcador inmunológico NS1 durante los primeros días de la enfermedad es una herramienta que reduce el tiempo requerido para diagnosticar a los pacientes y contar con una prueba rápida como lo es SD EDEN Dengue NS1 Ag que comparada contra RT-PCR tiene una sensibilidad y especificidad aceptable, lo que nos hace ver lo importante que sería integrar dentro del algoritmo de diagnóstico del dengue una prueba rápida. Bessoff K, y colaboradores (16) realizaron un estudio en el que evaluaron la utilidad que tiene como herramienta diagnóstica el kit comercial Platelia DENV NS1 antigen capture en la detección de la proteína no estructural NS1 del virus Dengue esto con el objetivo de readecuar el algoritmo de diagnóstico del dengue. Entre los resultados obtenidos destacan que NS1 fue detectada en un 22% de muestras que tenían más de 10 días de iniciados los síntomas; adicionalmente NS1 fue detectada en 37% de las muestras en fase aguda con resultado PCR falso negativo sugiriendo que la detección de NS1 quizás es valiosa en el incremento de la sensibilidad diagnóstica en la fase aguda en curso. En este estudio la utilidad diagnóstica de la detección de NS1 evidencia que durante la fase aguda se convierte en un marcador inmunológico temprano para el diagnóstico del dengue.



Al realizar la relación de los datos del resultado final integrado del diagnóstico con los de la prueba rápida NS1 se obtiene una sensibilidad (82%) y especificidad (100%) demostrándonos que incluir dentro del sistema integrado de diagnóstico del dengue una prueba rápida con buena sensibilidad y especificidad ya que en materia de salud pública en países como el nuestro poder contar con una prueba rápida la cual puede ser ejecutada tanto en zonas urbanas como rurales por cualquier recurso humano se convierte en una herramienta diagnóstica importante no sólo para el manejo de los pacientes sino que además para obtener datos preliminares de un posible brote epidémico y en su defecto de una correcta intervención epidemiológica; de esta forma el diagnóstico molecular por PCR podría realizarse a nivel de laboratorios de referencia y la detección de NS1 del virus Dengue a nivel de la red y de hospitales nacionales y regionales.



Conclusiones

Al finalizar este estudio se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1.- El kit inmunocromatografico SD EDEN Dengue NS1 Antígeno no reaccionó de forma cruzada con el panel de sueros control integrado por sueros positivos para VIH y los sueros positivos para Leptospira; pero si detectó los antígenos NS1 de los sueros positivos para los cuatro serotipos del dengue.

2.- La sensibilidad, especificidad, Índice Kappa e Intervalos de Confianza de los resultados del kit inmunocromatografico SD EDEN Dengue NS1 Ag al compararse con la técnica diagnóstica molecular para dengue RT-PCR cumple con los criterios de validez estadística con muestras que se encuentren dentro de los primeros 4 días de la enfermedad. No siendo así con muestras con más de 4 días; donde el resultado fue prácticamente inaceptable.

3.- La utilidad diagnóstica que tiene el kit SD EDEN Dengue NS1 antígeno se basa en la validez estadística que se obtuvo, que lo convierte en una importante herramienta diagnóstica en la detección temprana del marcador inmunológico, reduciendo considerablemente el tiempo necesario para diagnosticar a los pacientes durante la fase aguda; cuya prueba rápida además puede ser realizada en zonas rurales y de difícil acceso por cualquier recurso humano.



Recomendaciones

1.- El serotipo predominante en este estudio fue Denv-3 sería de gran interés poder evaluar dicha prueba rápida con otros serotipos, garantizando de esta manera que la prueba podría funcionar con los distintos serotipos del virus dengue.

2.- Los resultados obtenidos por la evaluación de la prueba son satisfactorios como para convertirla en una herramienta diagnostica basada en su cualidad de marcador inmunológico temprano pero sabemos que es de alto costo económico por lo tanto sería importante realizar un estudio de costo –efectividad, para ver si el beneficio obtenido de integrar una prueba rápida al algoritmo de diagnostico de dengue supera su alto costo.

3.- Las muestras utilizadas para este estudio fueron de pacientes pertenecientes al Estudio clínico del dengue en el Hospital La Mascota sería interesante demostrar la implementación de esta prueba rápida en los sitios de atención primaria en salud a nivel nacional y así verificar su correcta utilización diagnostica.



Bibliografía

1. - Guzman M.G, and Kouri G. 2002. Dengue an update. *The Lancet Infectious Diseases* Vol 2. Cuba.
- 2.- Rodríguez Roche R. 2005. Caracterización Molecular de cepas de Dengue aisladas en epidemias cubanas. Tesis en opción de grado de doctor en ciencias de la salud. Cuba, Habana. .
- 3.- Simancas Montoto M.; Villalba N.; García Alonso E.; Toledo Sotomayor G. 2000. Dengue, una amenaza permanente. Instituto Superior de ciencias medicas de la Habana. Cuba, Habana.
4. - Harris, E., Roberts, T.G., Smith, T., Selle, J., Kramer, L.D., Valle, S., Sandoval, E., Balmaseda, A. 1998. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.*36:2634-9.
5. - Barkman, T.M., Chung, Y.K., Tang, K.F., Ooi, E.E. 2006. The performance of RT-PCR compared with a rapid serological assay for acute dengue fever in a diagnostic laboratory. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 100:142-8.
- 6.- Guzman M.G.; Jaenisch T.; Gaczkowski R.; Vo Thi Ty Hang.; Devin S.; Horstick O.; Kroeger A.; Simmons C. 2007. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *DENCO*.
- 7.- Sáenz-Bolaños E.; Lara-Araya J.; Sequeira Soto J.; Alfaro Obando A. 2006. Evaluación de una prueba rápida para el diagnostico de dengue en el nivel local. Centro Nacional de Referencia Viroológica, INCIENSA. Costa Rica.
- 8.- Siqueira, J.B. Jr., Martelli, C.M., Coelho, G.E., Simplicio, A.C., Hatch, D.L. 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brasil, 1981-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 11:48-53.



- 9.- Kuno, G., Gomez, I., Gubler, D.J. 1991. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J. Virol. Methods.* 33:101-13
- 10.- Balmaseda Hechavarria A. 2002. Manual de procedimientos de técnicas para el diagnóstico de dengue. OPS, Nicaragua.
- 11.- <http://www.standardia.com>
- 12.- Fontanela M.; Ibarra M. 2001. Conocer donde han hecho vida los usuarios con serología positiva al dengue, que viven en el municipio de Mario Briceño Irigorry – Costa de oro. Aragua, Venezuela.
13. - A PDVI publication on behalf of the Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards, Seoul International Vaccine Institute. 2009. Recommendations on Dengue Diagnostics from the Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Board.
- 14.- Angel R.M. 2006. Entrada del virus de dengue: moléculas que pueden modular la patogenia viral. Cinestav.
- 15.- Chiparelli H.; Schelotto F. 2001. Dengue, una enfermedad emergente muy cerca de nuestro país. Montevideo, Uruguay.
- 16.- Bessoff K.; Phoutrides E.; Delorey M.; Acosta LN.; Hunsperger E.; Utility of a commercial nonstructural protein 1 antigen capture kit as a dengue virus diagnostic tool.
- 17.- Balmaseda A, Standish K, Mercado JC, Matute JC, Tellez Y, Saborío S, Hammond SN, Nuñez A, Avilés W, Henn MR, Holmes EC, Gordon A, Coloma J, Kuan G, Harris E. 2010. Trends in patterns of dengue transmission over 4 years in a pediatric cohort study in Nicaragua. *J Infect Dis.* Jan 1; 201(1):5-14.



Anexos



Anexo 1

Procedimiento técnico de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Fase de Extracción del ARN (Método Qiagen)

Reactivos:

Buffer de Lisis (AVL)

Atemperar el reactivo hasta disolver el precipitado de lo contrario ponerlo a baño de maría a 80oC. Adicione 1ml de buffer AVL a un tubo de carrier RNA liofilizado, disolver bien y transferirlo a la botella de buffer AVL.

Nota: Una vez añadido el carrier RNA no calentar más de 6 veces y no incubar a 80 grados por más de 5 min.

El carrier de RNA una vez disuelto debe almacenarse de 2-8 grados y es estable máximo 6 meses.

Buffer de lavado 1 (AW1)

Antes de usar por primera vez añadir etanol (96-100 %). Ver cantidad en el folleto Pág. 15 pues es en dependencia del código de presentación del Kit. Mantener a temperatura ambiente cerrado y su estabilidad es de un año.

Buffer de lavado 2 (AW2)

Antes de usar por primera vez añadir Etanol (96-100%), ver cantidad en la Pág. 15 del folleto. La estabilidad se comporta igual que el buffer AW1.

Buffer AVE. Buffer de elusión listo para su uso.

Tipo de muestra: suero, plasma, orina, sobrenadante de cultivo, tejido de cerebro de ratón.

Procedimiento de extracción:

- 1- Colocar 140 ul de la muestra en un vial de 1.5 ml, previamente rotulado.
- 2- Añadir 560 µL de buffer de lisis ya preparado.
- 3- Mezclar con vortex durante 15 segundos.



- 4- Incubar a temperatura ambiente (15-25 grados) por 10 min.
- 5- Centrifugar por un tiempo corto (aprox 30 seg) a 14000 rpm.
- 6- Añadir 560 µl de Etanol (96-100%) y mezcle por vortex durante 15 segundos.
- 7- Traspasar 630µl de la solución de la etapa 5 a una columna de elusión, cierre la tapa y centrifugue a 8000rpm por 1 min. Después pasar la columna a un recolector limpio de 2ml y descartar el tubo que contiene el filtrado.
- 8- Repetir el paso 7.
- 9- Abrir con cuidado la columna y añadir 500ul de buffer AW-1 cerrar y centrifugar por 1 min a 8000rpm. Después pasar la columna a un tubo recolector limpio y descarte el tubo que contiene el filtrado.
- 10- Abrir la columna y añadir 500µl de buffer AW2 cerrar y centrifugar a 14000 rpm por 3min. Si aún quedan restos del buffer AW2 volver a centrifugar para eliminarlo.
- 11- Pasar la columna a un vial limpio de 1.5ml abrirla y añadir 60 µl de buffer AVE (Buffer de elución) e incubar a temperatura ambiente por 1 min.
- 12- Centrifugar 1 min a 8000 rpm. Descartar la columna y guardar el eluido que contiene el RNA. Colocarlo sobre hielo si se usa de forma inmediata, en caso contrario almacenarlo a -80oC hasta su uso.

NOTA: TODAS LAS CENTRIFUGACIONES SON A TEMPERATURA AMBIENTE.

Preparación de Mezcla (Cuarto Blanco):

PROCEDIMIENTO:

Nota: Es importante el manejo de los reactivos y muestras en hielo todo el tiempo del procesamiento.

1. Calcular la cantidad reacciones de PCR a procesar teniendo en cuenta los parámetros de la siguiente tabla:



PRIMER PCR

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración de trabajo</i>	<i>Ul por Tubos</i>	<i>Números de tubos</i>	<i>Volumen Final (ul)</i>
H ₂ O		7.5	1	7.5
dNTPS (Promega)	0.8mM	1	1	1
MgCL ₂	1.5mM	1.5	1	1.5
Buffer sin MgCL ₂	1x	2.5	1	2.5
Buffer con MgCL ₂			1	
Betaine (Sigma)	0.5M	3.175	1	3.175
TMAC (Fluka Biochemika)	0.03mM	0.75	1	0.75
AMV-RT (Invitrogen)	0.04 U/ul	0.2	1	0.2
Taq (Promega)	0.05 U/ul	0.25	1	0.25
DTT	5mM	1.25	1	1.25
EHD-1(Operon)	0.5uM	1.25	1	1.25
EHD-2 (Operon)	0.25uM	0.625	1	0.625

NESTED PCR

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración de trabajo</i>	<i>Ul por Tubos</i>	<i>Números de tubos</i>	<i>Volumen Final (ul)</i>
H ₂ O		0.95	1	0.95
dNTPS (Promega)	0.8mM	1	1	1
MgCL ₂	1.5mM	1.5	1	1.5
Buffer sin MgCL ₂	1x	2.5	1	2.5
Buffer con MgCL ₂			1	
Betaine (Sigma)	0.5M	3.175	1	3.175
TMAC (Fluka Biochemika)	0.03mM	0.75	1	0.75
Taq (Promega)	0.05 U/ul	0.125	1	0.125
EHD-1(Operon)	1uM	2.5	1	2.5
DTS1(Operon)	1uM	2.5	1	2.5
DTS2(Operon)	0.5uM	1.25	1	1.25



DTS3(Operon)	0.5uM	1.25	1	1.25
DTS4(Operon)	1uM	2.5	1	2.5

2. Rotular Tubos de 0.5 ml de acuerdo al número de muestras incluidas en el protocolo de trabajo
3. Descongelar las alícuotas de cada reactivo. Mezclar bien cada solución con vortex.
4. Preparar la mezcla de PCR adicionando cuidadosamente el volumen correspondiente de cada reactivo. Las enzimas deberán ser el último reactivo que se agregue a la mezcla de PCR. Realizar el procedimiento en el **cuarto blanco** y utilizar únicamente los materiales designados para esta área.
5. Distribuir 20 ul de la mezcla de PCR en cada tubo marcado de reacción.
6. Agregar 1 gota de aceite mineral (esto va a depender del tipo de termociclador a utilizar).
7. Agregar 5 ul de agua bidestilada al primer tubo para preparar el control negativo del cuarto blanco.
8. Transferir los tubos de la hielera del cuarto blanco a la hielera del cuarto gris.
9. En el cuarto gris adicionar 5 ul de ARN purificado a los 20 ul de la mezcla en el tubo correspondiente a cada código de muestra.
10. Realizar procedimiento de termociclaje de primer PCR.
11. Una vez finalizado el primer PCR de estos productos de amplificación obtener 5ul y colocarlos en las mezclas de nested PCR y proceder a la siguiente amplificación.
12. Al momento que se ha finalizado y se tienen los productos de amplificación del primer PCR y de su respectivo nested PCR se procede al análisis de ambos productos en un Gel de agarosa.



TERMOCICLAJE DE CAPSIDE

PRIMER PCR	<i>Temp</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Ciclos</i>
RT-PCR	50	60min	1
Desnaturalización	94	30seg	
Hibridación	55	1min	
Extensión	72	2min	
Numero de Ciclos			35
NESTED PCR	<i>Temp</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Ciclos</i>
Desnaturalización	94	30 seg	
Hibridación	60	1min	
Extensión	72	2min	
Numero de Ciclos			20

ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR (Cuarto Negro)

PROCEDIMIENTO

1. Preparar el molde para gel y colocar un peine de acuerdo al número de pozos que necesitamos.
2. Preparar una solución de 1.5% de agarosa (Sigma) en TBE 1X y calentar hasta disolver la agarosa (preparación del gel).
3. Dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 55° C. Agregar bromuro de etidium (10 mg/ml) a una dilución de 1/20000 (Concentración final 0.4 ug/ml).
4. Verter el gel sobre el molde teniendo cuidado de no formar burbujas. Esperar que solidifique
5. Preparar un esquema que muestre el orden en que serán colocadas las muestras.

Nota: Descartar las puntas en un beaker con cloro.

6. Ubicar el gel dentro de la cámara de electroforesis que contiene TBE 1X.
7. Agregar 10 ul de producto a cada pozo del gel, según el orden de las muestras.



8. Colocar 5 ul del marcador de peso molecular de DNA.
9. Correr el gel aproximadamente 1 hora a 100.
10. Tomar fotografía utilizando el transiluminador y la cámara digital ubicar la foto en la hoja de resultados de PCR, imprimir y archivar los resultados en la base de datos de PCR.

Tamaño de los productos.

- 482 pares de base (Dengue 1: D1- TS1)
- 119 pares de base (Dengue 2: D1- TS2)
- 290 pares de base (Dengue 3: D1- TS3)
- 389 pares de base (Dengue 4: D1- Den 4)



Anexo 2

Procedimientos Técnicos ELISA captura IgM Dengue

Tipo de muestra: suero, plasma, saliva.

- 1- Las tiras de poliestireno son sensibilizadas con anti IgM humana producidas en carnero a una concentración proteica de 6.6 µg/ml. Se adicionan 100 µl/ pozo.
- 2- Incubar a 4° C durante toda la noche. En cámara húmeda.
- 3- Lavar 3 veces con PBS mas Tween 20 al 0.05% (PBS-T).
- 4- Adicionar las muestras de sueros y los controles diluidos 1/20 en Leche descremada al 2.5 % en PBST1X en el caso que se use Antígeno Celular o al 5% en caso que se use Antígeno de ratón. En un volumen total de 50 µl/pozo. Utilizar un control positivo bajo y un control positivo alto y un negativo por triplicado.
- 5- Incubar 30 minutos a 37° C. En cámara húmeda.
- 6- Lavar 4 veces con PBS-T. 280 µl por pozo.
- 7- Adicionar la mezcla de antígeno (celular o de ratón) de los 4 serotipos de Dengue, diluidos en PBS-T mas 2.5% o 5% de Leche descremada dependiendo del antígeno usado, a una concentración acorde con el título del lote. 50 µl/pozo.
- 8- Incubar 1 hora a 37° C. En cámara húmeda.



- 9- Lavar 4 veces con PBS-T. 280 μ l por pozo.

- 10- Adicionar el conjugado diluido en PBS-T mas (2.5% o 5% de acuerdo al tipo de antígeno) de Leche descremada, a una concentración acorde con el título del lote. 50 μ l/pozo.

- 11- Incubar 30 minutos a 37° C. En cámara húmeda.

- 12- Lavar 5 veces con PBS-T. 280 μ l por pozo.

- 13- Adicionar 50 μ l/pozo del sustrato TMB, listo para usar.

- 14- Incubar de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.

- 15- Detener la reacción con 50 μ l/pozo de Acido Sulfúrico.

- 16- Leer un lector de ELISA a una longitud de onda 450/630 nm. El resultado es calculado automáticamente por un Software ELISA Versión 1.09, desarrollado en el laboratorio. Este calcula el resultado Negativo o Positivo y las unidades de cada muestra leída.

- 17- Valor de Corte será igual a la media de los controles negativos multiplicados por 2.

Validez del procedimiento: Para que la técnica sea considerada válida, se deben cumplir los siguientes criterios:

- a. El valor de la absorbancia del control positivo alto debe ser 5 veces o más superior al valor de DO promedio de los controles negativos.

- b. El valor de DO del control positivo bajo debe ser mayor que el valor de corte.



INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS EN LA DETERMINACION DE IgM ESPECÍFICA CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE

La presencia de IgM específica contra el virus del Dengue en una muestra de suero significa que esta persona se ha infectado recientemente con este virus. Los resultados negativos deben interpretarse cuidadosamente. Una muestra tomada antes del 7mo día de iniciados los síntomas puede resultar negativa. En este caso debe tomarse una segunda muestra o auxiliarse de otro método diagnóstico. En las infecciones secundarias o terciarias la IgM puede fallar en un porcentaje bajo, en ese caso se puede auxiliar de otros métodos serológicos que determinen fundamentalmente IgG anti-virus del dengue en sueros pareados.



Anexo 3

Procedimiento Técnico ELISA Inhibición

Tipo de muestra: suero, plasma.

1. Placas de poliestireno de 96 pozos son sensibilizadas con 100 μ l /pozo de Inmunoglobulina humana anti VD a una concentración proteica de 10 μ g/ml.
2. Incubar toda la noche a Temperatura ambiente en cámara húmeda.
3. Lavar 3 veces con PBS-T. 280 μ l por pozo.
4. Bloquear con 150 μ l/pozo de BSA al 1% en PBS-T.
5. Incubar a 37° C durante 30 minutos en cámara húmeda.
6. Adicionar 100 μ l/pozo de la mezcla de antígeno diluida en PBS-T según título.
7. Incubar a 37° C durante 1 hora.
8. Lavar 4 veces con PBS-T 280 μ l por pozo.
9. Diluir las muestras usando diluciones en base a 10, desde 1/10 hasta 1/100000 en PBS-T mas 0.5% de BSA. 100 μ l/pozo. Colocar el control negativo diluido 1/20 en 4 pozos y el control positivo diluido desde 1/100 hasta 1/100000 (en base a 10) en 4 pozos respectivamente.
10. Incubar a 37° C durante 2 horas, en cámara húmeda.
11. Lavar 4 veces con PBS-T, 280 μ l por pozo.



12. Adicionar 100µl/pozo del conjugado diluido en PBS-T más 1 % de SHN, según título.
13. Incubar a 37° C durante 30 minutos en cámara húmeda.
14. Lavar 4 veces con PBS-T, 280µl por pozo.
15. Adicionar 50µl/ pozo de TMB.
16. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.
17. Detener la reacción con 50µl de ácido sulfúrico 2N.
18. Leer en lector de ELISA a una longitud de onda 450/630 nm, con ayuda del Software ELISA Versión 1.09 (Propietario) que calcula automáticamente el resultado de cada muestra pareada.

Para el cálculo manual del resultado tiene el siguiente esquema:

19. Calcular la media de los valores de absorbancia de los controles negativos (MCN). Calcular el valor de corte: MCN X 0.5.
20. Validez de la técnica:
 - a. La MCN debe ser igual o mayor a 0.8

CALCULOS

$$\% \text{ de Inhibición de Elisa} = 1 - \frac{\text{DO de la muestra}}{\text{DO del C. Negativo}} \times 100$$



Título R&M = $\text{Anti log } [(\%>50 - 50 / \%>50 - \%<50) + \text{log dilución } >50]$

El título de una muestra es la última dilución con valores de absorbancia inferiores al valor de corte. Un paciente que presente títulos de anticuerpos por ELISA de Inhibición igual o mayor que 1/2000 se considera un caso probable de Dengue.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Un paciente con una muestra tomada en período convaleciente (7 o más días después de iniciado los síntomas) y con un título igual o mayor a 5000 se considera como un caso secundario de Dengue.

RELACIÓN ENTRE TÍTULOS 1 ^{ER} Y 2 ^{DO} SUERO	INTERVALO 1 ^{ER} Y 2 ^{DO} SUERO	TÍTULO SUERO CONVALECIENTE	INTERPRETACIÓN
≥ 4	≥ 7 días	≤ 1/2000	Infección comprobada primaria
≥ 4	≥ 7 días	≥ 1/5000	Infección comprobada secundaria
≥ 4	< 7 días	≤ 1/2000	Infección comprobada secundaria o primaria
Sin cambio	≥ 7 días	≥ 1/5000	Presunta infección secundaria
Sin cambio	≥ 7 días	< 1/2000	No dengue
Sin cambio	< 7 días	≤ 1/2000	Sin interpretación
	Solo una muestra	< 1/2000	Sin interpretación
		≥ 1/2000	Caso probable



Anexo 4

Consentimiento informado

El consentimiento presentado a continuación es el ocupado por el Estudio Clínico del dengue en el Hospital Pediátrico Manuel de Jesús Rivera del cual proceden las muestras que ocupan al estudio Evaluación de un Kit inmunocromatografico para la detección de antígenos del dengue durante el brote epidémico de Agosto a Enero del 2009.



Anexo 5

Ficha epidemiológica de dengue

Ministerio de Salud

FICHA EPIDEMIOLOGICA PARA DIAGNOSTICO DE DENGUE Y LEPTOSPIRA

Datos Generales: No. de Expediente: _____ ID Lab.: _____

Fecha: ___/___/___ SILAIS _____ Municipio: _____ Unidad de salud: _____

Nombres y Apellidos: _____

Dirección _____

Nombre del Papá y Mamá: _____

Edad: _____ (Indicar edad en años en mayores de 2 años y edad en meses en menores de 2 años)

Fecha de Nacimiento ___/___/___ Sexo: _____ Peso: _____ Talla: _____ m (solo para niños)

Contestar si (S) o no (N) o desconocido (D)

Procedencia: Urbano _____ Rural _____

Viajo en el último mes?: _____ Donde: _____

Fuente de agua:

Potable _____ Puesto público: _____ Pozo: _____ Río: _____

Presencia de animales en casa:

Perros: _____ Gatos: _____ Cerdos: _____ Ganado: _____ Ratonos: _____ Otros: _____

Embarazada: _____ Tiempo de embarazo: _____ meses

Enfermedad crónica: S/N/D _____ Asma _____ Alergia Resp _____ Alergia Dermatol _____ Diabetes _____ Otra: _____

Enfermedad aguda adicionales N/D _____ Neumonía _____ Malaria _____ Infecc. Vías urinarias _____ Otra _____

Fecha de inicios de los síntomas ___/___/___

Fecha de toma de muestra: ___/___/___ Hora de toma de la muestra: _____ AM/PM

Hora de refrigeración de la muestra _____ AM/PM

Marque con una si (S) no (N) o desconocido (D)

Síntomas:

Fiebre _____
 Cefalea _____
 Mialgias _____
 Artralgias _____
 Dolor retroorbital _____
 Dolor Abdominal _____
 Diarrea _____
 Vomitos _____
 Escalofríos _____
 Tos _____

Signos:

Rash _____
 Epistaxis _____
 Petequias _____
 Melena _____
 Hematemesis _____
 Hemorragia vaginal _____
 Hematuria _____
 Gingivorragia _____
 Derrame pleural _____
 Hepatomegalia _____

P. Torniquete pos _____
 PA (sistólica/ diastólica) _____/____ mmHg
 Frec. Cardíaca o pulso _____/min
 Llenado Capilar _____/seg
 Temperatura _____ °C
 Frecuencia Resp _____/min
 Disnea _____
 Ascitis _____
 Ictericia _____



Anorexia _____ Piel fría _____

Signos de deshidratación al ingreso: marcar si (S) no (N) o desconocido (D) (para uso hospitalario)

Llanto sin lágrimas: _____ Mucosas secas: _____
Globo ocular hundido: _____ Fontanelas hundidas _____ Pliegue cutáneo: _____

Contestar si (S) no (N) o desconocido (D)

Hospitalizado __ **Fecha de Ingreso** __/__/__

Fallecido __ Fecha fallecido __/__/__

Laboratorio Clínico:

Hematocrito: _____ Hemoglobina: _____ Plaquetas: _____ GB: _____ LINF: _____ SEG: _____

Mono: _____ Gota Gruesa: _____ (positivo (P) negativo(N) desconocido (D))

Dx. Clínico: _____ Nombre del encuestador _____

Resultados Serológicos v Viroológicos de Dengue:

ELISA IgM _____ IH _____ ELISA Inhib _____ RT- PCR: _____ Extracción: _____ M/K Tipo PCR: _____ N/C

AV _____ Res Final _____

Resultados de Leptospira

Disptick: _____ ELISA IgM: _____ MAT: _____ HA: _____

Fecha de Recibida de la muestra __/__/__ Hora de recibida de la muestra _____ AM/PM

Fecha de separación: __/__/__ Hora de separación: _____ AM/PM

Fecha de congelación: __/__/__ Fecha de Procesada __/__/__

